
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Biologia Celular e Molecular)

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DAS
ESPÉCIES DE PEIXES ANUAIS DO GÊNERO *Simpsonichthys*
(CYPRINODONTIFORMES: RIVULIDAE)

JOSI MARGARETE PONZETTO

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Biologia
Celular e Molecular.

Março - 2012

JOSI MARGARETE PONZETTO

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E FILOGEOGRAFIA MOLECULAR DAS
ESPÉCIES DE PEIXES ANUAIS DO GÊNERO *Simpsonichthys*
(CYPRINODONTIFORMES: RIVULIDAE)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Orientador: Anderson Luis Alves

Co-orientadora: Patrícia P. Parise-Maltempi

RIO CLARO

- 2012 -

597 Ponzetto, Josi Margarete
P819r Relações filogenéticas e filogeografia molecular das
 pespécies de peixes anuais do gênero *Simpsonichthys*
 (Cyprinodontiformes: rivulidae / Josi Margarete Ponzetto. -
 Rio Claro : [s.n.], 2012
 64 f. : il., figs., gráfs., tabs., mapas

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientador: Anderson Luis Alves
 Co-Orientador: Patrícia Pasquali Parise-Maltempi

 1. Peixe. 2. Filogenia molecular. 3. Sequenciamento. 4.
 ATPase 8/6. 5. Fluxo gênico. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

*“Se o conhecimento pode criar problemas,
não é através da ignorância que podemos solucioná-los”*

Issac Asimov

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

A minha Mãe Jucimara, por ter acreditado e fornecido condições para
que eu concluísse mais uma etapa da minha vida.

A minha irmã, noivo e a todos os meus familiares e amigos sempre
presentes em todos os momentos.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao meu inesquecível pai, Antonio Geraldo Ponzetto (em memória),
exemplo de pai, esposo e amigo,
figura de fundamental importância em minha formação
e de quem sinto muitas saudades.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar aqui meus sinceros agradecimentos a todos àqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, especialmente:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp - 2010/03145-1), pelo auxílio concedido.

À Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista, câmpus de Rio Claro e ao Departamento de Biologia pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – AC. Biologia Celular e Molecular, e à Seção de Pós-Graduação do Instituto, pelo cordial apoio.

A todos os funcionários e professores, do Departamento de Biologia, pela contribuição, dentro de suas áreas, para o desenvolvimento dessa tese, e, principalmente pela dedicação e empenho que demonstraram no decorrer de suas atividades para com todo o grupo.

Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Continentais/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, CEPTA/ICMbio, pela grandiosa colaboração.

Ao Prof. Dr. Anderson Luis Alves, pela oportunidade oferecida, pelo conhecimento compartilhado, pela orientação, apoio, confiança e dedicação.

A Profa. Dra. Patricia P. Parise-Maltempi, pelo apoio e amizade fornecido em todos os momentos do mestrado.

Aos amigos do Laboratório pelo companheirismo nessa jornada: Allan, Rafael, Eduarda, Carolina, Edson, Diovani, Daniela, Gabriela, Kenny, Mariana e Ketheryne.

Em especial aos amigos Edson, Tamaris, Ana Claudia, Rafael e Tatiane pelo companheirismo nessa jornada, compartilhando comigo bons e maus momentos.

A todos os amigos que mesmo a distância não deixaram de fazer parte dessa conquista.

Aos colegas Ricardo Britzke e Dalton T. B. Nielsen pela disponibilidade, imagens cedidas e fornecimento de exemplares, os quais permitiram a realização desse trabalho.

A minha mãe, Jucimara, simplesmente por tudo, pela vida, pelos ensinamentos e por todo amor a mim dedicado onde quer que eu estivesse durante estes anos. Obrigada por fazer parte da minha vida.

A toda minha família pelo apoio incondicional a mim fornecido.

Ao Paulo, meu noivo e futuro marido, pelo amor, compreensão, amizade, incentivo e principalmente por estar ao meu lado durante a realização deste trabalho.

Resumo

A família Rivulidae inclui atualmente 240 espécies válidas, sendo distribuídas desde o sul da Flórida (EUA) até o sul da Patagônia (Argentina). Dentro da família Rivulidae, o gênero de peixes anuais mais especioso é *Simpsonichthys*, compreendendo 56 espécies válidas. Devido sua ampla distribuição e a ocorrência de variação morfológica entre as espécies do gênero, foi sugerido a divisão deste grupo em cinco subgêneros: *Xenurolebias*, *Ophthalmolebias*, *Simpsonichthys*, *Spectrolebias* e *Hypsolebias*. Buscando levantar as primeiras informações genéticas para o gênero, o objetivo do trabalho foi inferir as relações filogenéticas do grupo na tentativa de testar a hipótese de divisão de *Simpsonichthys* em cinco subgêneros. Para tanto, indivíduos pertencentes ao gênero *Simpsonichthys* foram coletados ao longo de riachos costeiros da bacia do Leste do Brasil e tiveram seu DNA genômico extraído para a realização da reação de PCR, com o intuito de amplificar os genes de interesse (ATPase 8/6 e RAG-2). Os produtos de PCR obtidos com o gene mitocondrial (ATPase 8/6) foram sequenciados e as análises filogenéticas foram realizadas pelos métodos *Neighbour-Joining* e Máxima Parcimônia, com 1000 réplicas de *bootstrap*, utilizando o modelo evolutivo Kimura-2-Parâmetros. Os resultados obtidos permitem inferir que a hipótese de divisão de *Simpsonichthys* é válida, e que o gênero é subdividido em sete subgêneros distintos. A topologia obtida apresentou dois clados, sendo o clado I composto pelo subgênero *Hypsolebias*, grupo *S. magnificus*, e o II contendo os subgêneros *Hypsolebias*, grupos *S. flammeus* (IIA), *S. notatus* (IIB) e *S. antenori* (IID), *Simpsonichthys* (IIC), *Spectrolebias* (IIE) e *Ophthalmolebias* (IIF). As relações filogenéticas observadas foram: o clado I como grupo irmão de todo o clado II, e dentro do segundo clado o subgênero *Ophthalmolebias* mais relacionado à *Spectrolebias*, formando estes o grupo irmão de *Hypsolebias* (*S. antenori*), os quais formam o grupo irmão de *Simpsonichthys*. E por fim, *Simpsonichthys* igualmente relacionado à *Hypsolebias* (*S. notatus*) e *Hypsolebias* (*S. flammeus*). Apesar das linhagens obtidas serem consideradas unidades monofiléticas bem corroboradas, por altos valores internos de *bootstrap*, para ambas as análises realizadas em nosso estudo, não podemos afirmar que elas sejam gêneros distintos, pois o parafiletismo de *Simpsonichthys* não foi testado. Entretanto, podemos afirmar que *Hypsolebias* não se comporta como monofilético, pois foi dividido em quatro clados distintos. Além disso, a topologia encontrada sugere relação entre espécies do médio e baixo São Francisco, bacias costeiras e do planalto central, o que se deve provavelmente ao neotectonismo de capturas de cabeceiras ocorridas nessas áreas.

Palavras Chave: Filogenia molecular. Sequenciamento. ATPase 8/6. *Simpsonichthys*.

Abstract

The family Rivulidae currently comprises 240 valid species, being distributed from southern Florida (USA) to the southern Patagonia (Argentina). Within the family Rivulidae, the genus of annual fish that is more specious is *Simpsonichthys*, comprising 56 valid species. Due to the wide distribution and occurrence of morphological variation among species of the genus, it was suggested to divide this group into five subgenus: *Xenurolebias*, *Ophthalmolebias*, *Simpsonichthys*, *Spectrolebias* and *Hypsolebias*. Seeking to raise the first genetic information for the genus, the aim of this study was to infer the phylogenetic relationships of the group in order to test the hypothesis of the division of *Simpsonichthys* into five subgenus. So, individuals belonging to the genus *Simpsonichthys* were collected along coastal streams of the East Brazilian basin and had their genomic DNA extracted to perform the PCR reaction to amplify the genes of interest (ATPase 8/6 and RAG-2). The PCR products (ATPase 8/6) were subjected to sequencing and phylogenetic analysis were performed by methods *Neighbour-Joining* and *Máximum Parcimony*, with 1000 *bootstrap* replicates, using the evolutionary model Kimura-2-Parameters. The results obtained allow us to infer that the hypothesis of division of *Simpsonichthys* is valid, and that the genus is divided into seven distinct subgenus. The topology obtained showed two clades, the clade I is composed of the subgenus *Hypsolebias*, group *S. magnificus*, and the II containing the subgenus *Hypsolebias* groups *S. flammeus* (IIA), *S. notatus* (IIB) and *S. antenori* (IID), *Simpsonichthys* (IIC), *Spectrolebias* (IIE) and *Ophthalmolebias* (IIF). Phylogenetic relationships observed were: the clade I, composed by subgenus *Hypsolebias* (*S. magnificus*), appears as sister group of clade II, and within the second clade, the subgenus *Ophthalmolebias* is more related to *Spectrolebias*, forming the sister group of *Hypsolebias* (*S. antenori*), which form the sister group of *Simpsonichthys*. Ultimately, *Simpsonichthys* is equally related to *Hypsolebias* (*S. notatus*) and *Hypsolebias* (*S. flammeus*). Despite the lineages obtained were considered monophyletic units and supported by high internal bootstrap values to both analyzes in our study, we cannot affirm that they are distinct genus, because the parafiletismo didn't is tested to *Simpsonichthys*. However, we can say that *Hypsolebias* does not behave as monophyletic, because it was divided into four distinct clades. Furthermore, the topology found, suggests relationship between species of the middle and lower São Francisco, coastal basins and the central plateau, which is probably due to the neotectonism of captures of headwaters that occurred in these areas.

Key words: Molecular phylogeny. Sequencing. ATPase 8/6. *Simpsonichthys*.

Lista de Ilustrações

Figura 1: Distribuição dos subgêneros de <i>Simpsonichthys</i> nas bacias hidrográficas brasileiras.	17
Figura 2: Exemplos representativos do gênero <i>Simpsonichthys</i> . <i>Ophtalmolebias</i> : <i>S. semiocellatus</i> (M. Chauche); <i>Spectrolebias</i> : <i>S. flagellatus</i> (M. Endruweit); <i>Hypsolebias</i> (<i>S. antenori</i>): <i>S. punctulatus</i> (F. Vermeulen); <i>Simpsonichthys</i> : <i>S. constanciae</i> (M. Chauche); <i>Hypsolebias</i> (<i>S. notatus</i>): <i>S. auratus</i> (M. Chauche); <i>Hypsolebias</i> (<i>S. flammeus</i>): <i>S. fasciatus</i> (F. Falcon) e <i>Hypsolebias</i> (<i>S. magnificus</i>): <i>S. picturatus</i> (R. Britzke) respectivamente.	26
Figura 3: Distribuição das espécies analisadas.	27
Figura 4: Extrações de DNA genômico de 32 exemplares de <i>Simpsonichthys</i> .	60
Figura 5: Quantificação do produto gênico ATPase 8/6 amplificado por gel de agarose. ($y_{30}=\lambda_{30}$, $y_{50}=\lambda_{50}$ DNA Lambda, marcador de peso molecular).	61
Figura 6: Quantificação do produto gênico ATPase 8/6 amplificado por gel de agarose. O gradiente A-C pode ser observado na Tabela 2. ($y_{30}=\lambda_{30}$, $y_{50}=\lambda_{50}$ DNA Lambda, marcador de peso molecular).	61
Figura 7: Extrações de DNA genômico de 32 exemplares de <i>Simpsonichthys</i> .	62
Figura 8: Quantificação do produto gênico ATPase 8/6 amplificado por gel de agarose.	63
Figura 9: Quantificação do produto gênico ATPase 8/6 amplificado por gel de agarose. ($y_{50}=\lambda_{50}$ DNA Lambda, marcador de peso molecular).	63
Figura 10: Gráfico de transição (linha “s”) / transversão (linha “v”), evidenciando a não ocorrência de saturação dos dados.	34
Figura 11: Árvore consenso obtida pelo método <i>Máxima Parsimônia</i> com 1000 réplicas de <i>bootstrap</i> , foram considerados valores iguais ou acima de 50%.	35
Figura 12: Árvore consenso obtida pelo método “ <i>Neighbor-Joining</i> (NJ)” com 1000 réplicas de <i>bootstrap</i> , sem cortes. Destacando a posição de <i>S. ocellatus</i> dentro do subgênero <i>Hypsolebias</i> . A direita exemplares dos subgêneros.	36
Figura 13: Hipótese de relação filogenética dentro do gênero <i>Simpsonichthys</i> , baseado em dados moleculares do presente trabalho.	38
Figura 14: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo <i>S. magnificus</i> , baseado em dados moleculares do presente estudo.	38
Figura 15: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo <i>S. flammeus</i> , baseado em dados moleculares do presente estudo.	39
Figura 16: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo <i>S. notatus</i> , baseado em dados moleculares do presente estudo.	39
Figura 17: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo <i>S. antenori</i> , baseado em dados moleculares do presente estudo.	39
Figura 18: Hipótese de relação filogenética dentro do subgênero <i>Spectrolebias</i> , baseado em dados moleculares do presente estudo.	40
Figura 19: Hipótese de relação filogenética dentro do subgênero <i>Ophtalmolebias</i> , baseado em dados moleculares do presente estudo.	40
Figura 20: Rede de haplótipos obtida para espécies do gênero <i>Simpsonichthys</i> .	41
Figura 21: Hipótese de relação filogenética dentro do gênero <i>Simpsonichthys</i> . (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2010a), (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.	43
Figura 22: Relações filogenéticas entre peixes <i>Cynolebiasini</i> , representado espécies de <i>Hypsolebias</i> (COSTA, 2010a).	44
Figura 23: Hipótese da relação filogenética dentro de <i>Hypsolebias</i> . (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2006a, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.	44

Figura 24: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo <i>S. magnificus</i> . (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.	45
Figura 25: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo <i>S. flammeus</i> . (A) baseado em dados morfológicos (Costa, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.	45
Figura 26: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo <i>S. notatus</i> . (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.	46
Figura 27: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo <i>S. antenori</i> . (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.	46
Figura 28: Hipótese de relação filogenética dentro do subgênero <i>Spectrolebias</i> . (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.	47
Figura 29: Hipótese de relação filogenética dentro do subgênero <i>Ophtalmolebias</i> . (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.	47
Figura 30: Topologia resumida da reconstrução de distribuição ancestral obtida através de análises de dispersão e vicariância (Costa, 2010a).	48
Figura 31: Mapa indicando bacias hidrográficas, passíveis de captura entre os rios.	49

Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista de espécies/indivíduos analisados x Localidade.....	25
Tabela 2: Gradiente de temperatura utilizado para amplificação do gene ATPase 8/6 e RAG-2.	60
Tabela 3: Relação de espécies/indivíduos analisados	62
Tabela 4. Divergência genética dentro e entre os subgêneros de <i>Simpsonichthys</i> . Em negrito, divergência dentro dos subgêneros.....	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 FAMÍLIA RIVULIDAE	14
1.1.1 GÊNERO <i>SIMPSONICHTHYS</i>	15
1.2 MARCADORES MOLECULARES NA GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO.....	18
1.3 SISTEMÁTICA E FILOGEOGRAFIA MOLECULAR BASEADA EM ANÁLISES DE DNA MITOCONDRIAL.....	20
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 MATERIAL	24
3.1.1 LOCAL DE COLETA E MANUTENÇÃO DOS EXEMPLARES	26
3.2 MÉTODOS	27
3.2.1 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA	27
3.2.2 LIMPEZA COM O KIT ExoSAP-IT	30
3.2.3 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO mtDNA (ATPase).....	30
3.2.4 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO nDNA (RAG-2)	32
3.2.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	33
3.2.6 ANÁLISES DE HAPLÓTIPOS	33
4 RESULTADOS	34
4.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE ATPase 8/6	34
4.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS E DIVERGÊNCIA DO mtDNA DOS <i>SIMPSONICHTHYS</i>	34
4.3 ANÁLISE POPULACIONAL	40
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	50
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
8. ANEXO	60

1 INTRODUÇÃO

Segundo L  veque et al. (2008) a grande maioria dos peixes Neotropicais pertencem a cinco grupos: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Perciformes. A ordem Cyprinodontiformes constitui uma das assembl  as de peixes Teleostei de água doce com maior número de espécies, incluindo aproximadamente 850 em aproximadamente 110 gêneros.

Dentre os Cyprinodontiformes destacam-se os peixes da família Rivulidae os quais geralmente são pequenos, raramente superando os 80mm de comprimento (COSTA 1990, 1995; THOMERSON e TAPHON 1995; COSTA e NIELSEN, 1997).

Exemplares de várias espécies de Rivulidae possuem alto valor comercial, sendo apreciadas pelo aquarismo devido    beleza da colora  o das nadadeiras. Muitas das espécies desta família estão na lista nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes ameaçados de extin  o (BRASIL, 2004),   m de possuir uma espécie do gênero *Simpsonichthys* (Rivulidae) na lista de risco de extin  o da IUCN (The International Union for Conservation of Nature) como vulnerável (IUCN, 2011). E segundo Nogueira et. al. (2010) os quais realizaram um levantamento sobre peixes raros no Brasil, há uma lista composta por 819 espécies, que inclui cinco espécies do subgênero *Simpsonichthys*.

A falta do conhecimento da estrutura genética de popula  es e ausência de hipóteses de relacionamento filogenético com base em análise de DNA entre as espécies deste grupo podem deixar de serem acessados devido ao processo de extin  o de algumas espécies do gênero.   m disso, os peixes de pequeno porte, como os representantes de Rivulidae, correspondem a cerca de 50% das espécies de peixes de água doce descritas na América do Sul e mostram um elevado grau de endemismo (CASTRO et al., 2003).

Estas espécies são dependentes da vegeta  o ripária para a alimenta  o, abrigo e reprodu  o, por isso também estão ameaçadas por atividades antrópicas como desmatamento, uso de fertilizantes e praguicidas associados a atividades agrícolas intensivas (CASTRO et al., 2003; CASTRO et al., 2005). Nesse sentido, de acordo com Castro et al. (2005) as pesquisas na ictiofauna de riachos são necessárias e urgentes.

O estudo da sistemática, evolu  o e ecologia das espécies de pequeno porte    o grande desafio da ictiologia Neotropical do século 21 (CASTRO et al., 2003; CASTRO et al., 2005). Apesar dos esforços pouco se conhece sobre esta ictiofauna. Um bom exemplo são as sub-bacias de drenagem do Alto rio Paraná no Estado de São Paulo, onde cerca de 70% dos

riachos desta região não tinham sido exploradas satisfatoriamente em trabalhos científicos publicados até esse período (CASTRO et al., 2003; CASTRO et al., 2004).

Com a escassez de dados sobre a ictiofauna de riachos e os aspectos importantes a serem considerados na biologia da conservação, a genética mostra papel fundamental, pois além de ajudar a compreender o contexto evolutivo das espécies, permite o desenvolvimento de melhores estratégias de manejo (HURT e HEDRICK, 2005).

1.1 Família Rivulidae

Rivulidae é a quarta maior família de peixes que ocorrem em ambientes de água doce da região Neotropical (REIS et al., 2003). Aproximadamente metade de todas as espécies de Rivulidae são peixes anuais (WOURMS, 1972 *apud* COSTA, 2010a). Esta família inclui atualmente 240 espécies válidas, 27 gêneros, e se encontra distribuída desde o sul da Flórida até o sul da Patagônia (COSTA, 2006b; NIELSEN, 2008).

Os rivulídeos habitam os mais variados ambientes, onde possivelmente outros peixes não conseguiriam perpetuar sua espécie (NIELSEN, 2008). Existem espécies que habitam pequenos córregos e lagoas, conhecidos como peixes não anuais; e espécies que habitam poças de água e charcos, formadas pela água da chuva ou cheias dos rios, e que secam em determinadas épocas do ano, conhecidos como peixes anuais (COSTA, 2007; NIELSEN, 2008).

A característica marcante dos peixes conhecidos como anuais é seu ciclo de vida. Os indivíduos adultos deixam seus ovos fecundados depositados no substrato, os quais permanecem em diapausa até o início do próximo período chuvoso, quando eclodem liberando as larvas (WOURMS, 1972 *apud* COSTA, 2010a).

Rivulidae compreende duas grandes subfamílias: Rivulinae e Cynolebiatinae. Cynolebiatinae é a subfamília mais diversificada e geograficamente distribuída, compreendendo 107 espécies que habitam amplamente a América do Sul, incluindo Brasil, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina (COSTA, 2001, 2002a, 2006b, 2007). Os Cynolebiasines ocorrem nos principais rios das bacias Sul Americanas, incluindo as bacias dos rios Amazonas, Paraguai, Paraná e São Francisco, em áreas ocupadas por uma grande diversidade de habitats (COSTA, 2002b). Estes peixes tem sido classificados em quatro gêneros, três dos quais são bem corroborados em estudos filogenéticos recentes (COSTA, 2006a,b): *Cynolebias*, *Austrolebias*, e *Nematolebias* (COSTA, 2001, 2002a, 2006b).

O quarto gênero, *Simpsonichthys*, é o mais especioso (COSTA, 2007, 1996, 2006b), incluindo cinco subgêneros (COSTA 2006a, 2007): *Simpsonichthys*, *Xenurolebias*, *Ophthalmolebias*, *Hypsolebias* e *Spectrolebias*.

1.1.1 Gênero *Simpsonichthys*

O gênero *Simpsonichthys* compreende atualmente 56 espécies válidas, com ampla distribuição na região nordeste, central e oriental do Brasil (COSTA, 1996, 2006a, 2007, 2008, 2010b, 2012; COSTA e BRASIL 2008; NIELSEN, 2008; NIELSEN et al. 2010).

Devido à exuberância dos peixes do gênero *Simpsonichthys*, os mesmos são bastante populares no aquarismo mundial, existindo clubes dedicados especialmente à criação desses peixes. No Brasil há uma sociedade bastante conhecida de aquaristas chamada Killifish Brasil, a qual produz periódicos com artigos sobre espécies de peixes anuais, e disponibiliza de um web site: www.killifishbrasil.com.br com todas as informações.

Muitas das espécies desse gênero, por apresentarem reduzida área de distribuição em algumas regiões, e exploração econômica para uso ornamental, se encontram ameaçadas de extinção devido ao desconhecimento da maioria da população (COSTA, 2002b), e a eliminação dessas espécies na natureza pode ser um *gap* no estabelecimento das relações filogenéticas entre elas, o que pode levar a consequências desastrosas. Pois esses peixes tem se mostrado componentes importantes da Biota neotropical.

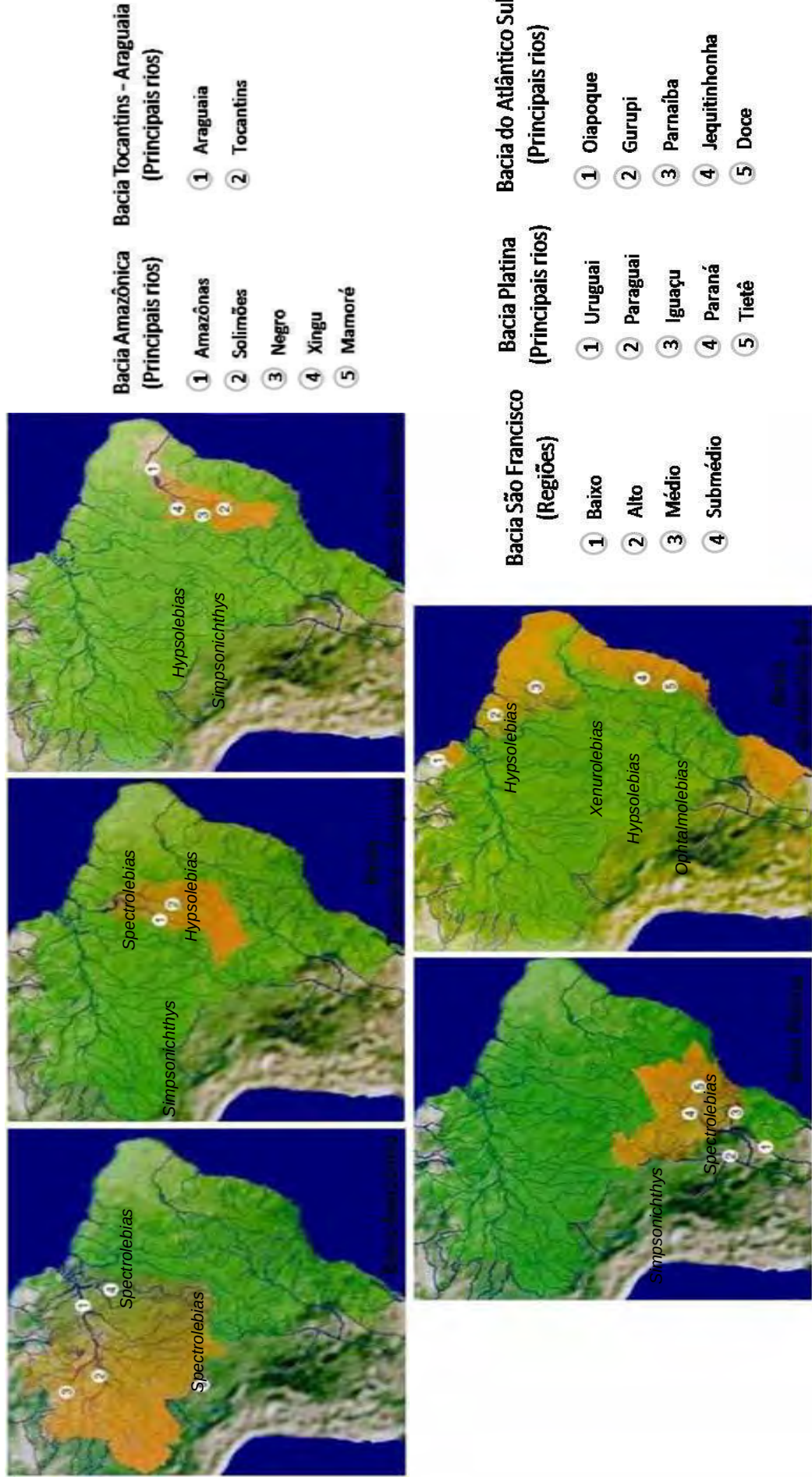
A exploração sobre esse tipo de peixe é tão grande que existem hoje web sites, especializados em vendas, que comercializam esse tipo de material (<http://portuguese.alibaba.com/products/killifish-eggs-for-sale.html>). Para se ter uma idéia, aproximadamente 30 ovos de peixes anuais podem custar de 5 a 10 dólares, dependendo da espécie desejada.

As espécies de *Simpsonichthys* apresentam no comportamento reprodutivo um exemplo notável de adaptação a ambientes diversificados (NIELSEN, 2008). A capacidade de adaptação destes peixes a habitats como poças de água temporárias fez com que estes peixes fossem popularmente conhecidos como Peixes das Nuvens em algumas regiões brasileiras (NIELSEN, 2008).

Apesar de *Simpsonichthys* ser o gênero de peixe anual com maior diversidade de espécies, só recentemente, muitas delas se tornaram conhecidas cientificamente (NIELSEN, 2008). Somente a partir da década de 80 houve a descoberta de muitas espécies

principalmente na bacia do rio São Francisco, onde se registra 75% das espécies conhecidas (COSTA, 2003).

Costa (2006a, 2007), sugere com base no elevado número de espécies, ampla distribuição e a grande variação morfológica do gênero, a divisão do gênero em cinco subgêneros (*Xenurolebias*, *Ophtalmolebias*, *Simpsonichthys*, *Spectrolebias* e *Hypsolebias*) com base em caracteres diagnósticos morfológicos. ***Xenurolebias***, das planícies costeiras do leste do Brasil, que inclui as espécies *S. myersi* e *S. izecksohni*; ***Ophtalmolebias***, das bacias costeiras do leste e sudeste do Brasil, que compreende *S. constancie*, *S. suzarti*, *S. bokermanni*, *S. perpendicularis* e *S. rosaceus*; ***Simpsonichthys***, do planalto central brasileiro, nas bacias do alto rio Paraná, alto rio Araguaia e alto rio São Francisco, que compreende *S. choloptyx*, *S. margaritatus*, *S. parallelus*, *S. nigromaculatus*, *S. punctulatus*, *S. boitonei*, *S. santanae* e *S. zonatus*; ***Spectrolebias***, das bacias do médio rio Tocantins, médio rio Araguaia, rio Xingu, rio Mamoré e rio Paraguai, no Brasil, Bolívia e Paraguai, que compreende *S. reticulatus*, *S. costae*, *S. chacoensis*, *S. filamentosus*, *S. inaequipinnatus* e *S. semiocellatus*; ***Hypsolebias***, o qual é subdividido em quatro grupos, denominados: *S. antenori*, *S. flammeus*, *S. magnificus*, e *S. notatus*. Pertencentes as bacias dos rios São Francisco, Tocantins, médio Jequitinhonha e baixo Jaguaribe, e bacias costeiras isoladas do nordeste do Brasil. Compreendem as espécies *S. marginatus*, *S. ocellatus*, *S. rufus*, *S. igneus*, *S. stellatus*, *S. nielsenii*, *S. notatus*, *S. radiosus*, *S. similis*, *S. virgulatus*, *S. trilineatus*, *S. auratus*, *S. hellneri*, *S. adornatus*, *S. lopesi*, *S. fulminantis*, *S. carletoi*, *S. magnificus*, *S. harmonicus*, *S. picturatus*, *S. antenori*, *S. macaubensis*, *S. mediopapillatus*, *S. janaubensis*, *S. ghisolfii*, *S. gibberatus*, *S. flavicaudatus*, *S. flagellatus*, *S. delucaii*, *S. alternatus*, *S. fasciatus*, *S. multiradiatus*, *S. flammeus*, *S. brunoi* e *S. longignatus* (Figura 1).



Fonte: www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/meio-ambiente-agua/hidrografia-do-brasil.php

Figura 1: Distribuição dos subgêneros de *Simpsonichthys* nas bacias hidrográficas brasileiras.

Segundo Nielsen (2008), de todas as espécies que compreendem os cinco subgêneros sugeridos por Costa (2006a, 2007), apenas *S. filamentosus* e *S. chacoensis* não são encontradas em território brasileiro. A escassez de dados obtidos fora do território brasileiro pode estar relacionada a poucas expedições de pesquisas em outros países.

Em relação às análises de genética de populações ou de sistemática molecular para estabelecimento das relações filogenéticas do gênero *Simpsonichthys*, nenhuma informação nesse sentido está disponível na literatura, o que torna os resultados obtidos na presente proposta inéditos para o grupo.

1.2 Marcadores moleculares na genética da conservação

O DNA se converteu num excelente instrumento para auxiliar na conservação e taxonomia das espécies, além de ser o responsável por fixar mudanças evolutivas, carrega o registro dos eventos ocorridos no passado. Desse modo, conhecer a diversidade genética dentro e entre espécies se torna fundamental para biologia evolutiva e para definir estratégias de conservação.

Altos níveis de variação genética podem aumentar o potencial que uma população tem em responder a seleção, e podem também promover limites de colonização e distribuição, possibilitando sua sobrevivência em grande variedade de ambientes (CARVALHO, 1993; KALINOWSKI, 2004).

A dispersão pode influenciar a variação genética nas populações através do fluxo gênico, além disso, a dispersão e a estrutura da população podem estar ligadas ao comportamento social da espécie. A elucidação dessas relações é crítica para estratégias de conservação com o objetivo de proteger populações evolutivamente distintas ou reabilitar populações ameaçadas (FRASER et al., 2005).

A diversidade genética dentro da população pode ser reduzida por dois processos: seleção natural de traços adaptativos ou deriva genética (NIELSEN, 1998). Entre populações, essa redução de diversidade se dá quando populações geneticamente distintas se extinguem ou quando a integridade é comprometida pela hibridação (RYMAN et al., 1995). Dependendo da magnitude da perda de diversidade genética esse processo pode influenciar na evolução da espécie e da população e limitar sua habilidade de adaptação. Essa situação pode reduzir a viabilidade da população através da depressão por endocruzamento (LAIKRE et al., 2005). Devido a estes fatores, estudos visando o esclarecimento da variabilidade genética dentro e entre as populações são de extrema importância.

O estudo da variabilidade genética populacional e entre espécies, tem sido possível devido ao desenvolvimento de vários marcadores moleculares principalmente daqueles baseados no polimorfismo do DNA. De acordo com Sunnucks (2000), marcadores genéticos ou moleculares são caracteres simples herdáveis com múltiplos estados para cada caráter. Esses marcadores têm sido aplicados em muitos estudos biológicos como mapeamento genético, genética de populações, reconstruções filogenéticas, testes de paternidade, aplicações forenses e sobretudo em estudos de conservação genética (SCHLOTTERER, 2004).

Os avanços na genética molecular têm aumentado o impacto da genética de populações na conservação. Dentre esses avanços, destacam-se os estudos utilizando marcadores bioquímicos e moleculares tais como: aloenzimas/isoenzimas, RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”- polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), SPAR (“Single *Primer* Amplification Reaction”- reação de amplificação com *primer* único), RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”- polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”- polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados), VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”- número variável de repetições em tandem - minissatélites) e STR (“Short Tandem Repeats”- repetições curtas em tandem). No entanto, a metodologia que tem fornecido melhores resultados nas análises de estruturação de populações e relações filogenéticas entre espécies é o sequenciamento de DNA (HILLS et al., 1996). Este fato se deve aos nucleotídeos serem a unidade básica de informação codificada nos organismos; são relativamente fáceis de serem obtidos, e de incorporarem informações sobre processos históricos de evolução molecular, e mostrarem que o potencial de informações dos dados fornecidos são imensos.

Recentemente, vários grupos de pesquisa têm voltado sua atenção para o uso de sequências de DNA para elucidar problemas relativos à genética de populações e à sistemática. Entre os marcadores mais comumente utilizados nestes estudos estão os genes mitocondriais. O tamanho do genoma mitocondrial (mtDNA) é bastante variável, apresentando valores em torno de 16 quilobases (kb) nos vertebrados até 570 kb em algumas espécies de plantas (LEWIN, 1994). Apresenta-se altamente conservado nos animais, variando de 14 a 26 kb (BILLINGTON e HEBERT, 1991), sendo representado por 2 genes que codificam RNAs ribossômicos (12S e 16S do rRNA), 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNA) e 13 genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP. A molécula de mtDNA possui uma região controle, de cerca de 1kb, que é rica em sequências AT e desprovida de genes, embora exerça importante papel no

início da replicação do mtDNA e da transcrição do RNA. Esta região controle é conhecida como “D-loop” (*displacement loop*).

Em peixes, são vários os exemplos da utilização de haplótipos de mtDNA na resolução de problemas taxonômicos, de relações filogenéticas, populacionais e conservacionistas (BERMINGHAM e MARTIN, 1998; KOTLIK e BERREBI, 2002; PATERNELLO et al., 2003; FALK et al., 2003; PERDICES et al., 2004; STRECKER et al., 2004; WANG et al., 2004; BATISTA e ALVES-GOMES, 2006; WILLIS et al., 2007; HUBERT et al., 2007).

1.3 Sistemática e filogeografia molecular baseada em análises de DNA mitocondrial

Nos últimos anos as análises filogenéticas em peixes eram predominantemente realizadas apenas com base na análise de genes mitocondriais (MONTROYA-BURGOS et al., 1998; ZARDOYA e DOADRIO, 1999; PERDICES e DOADRIO, 2001; STRECKER et al., 2004; TEMPLETON, 2004; ALVES, 2005; HARDMAN, 2005), porém, atualmente há uma nova tendência em utilizar genes nucleares e mitocondriais em conjunto tanto em análises de sistemática molecular como em filogeografia (CALCAGNOTTO et al., 2005; PERDICES et al., 2005; MORRISON et al., 2006; HARDMAN e LUNDBERG, 2006; BETANCUR-R et al., 2007; LI e ORTI, 2007). Segundo Slowinski e Page (1999), o ideal seria combinar dados obtidos de mtDNA e de nDNA, pois as histórias dos genes são independentes, no entanto deve se ter muito cuidado para que os dados não deixem de ser consistentes, evidenciando topologias distintas que não refletem a história evolutiva das espécies e sim dos genes.

As observações de que os haplótipos de mtDNA de populações de muitas espécies apresentam localização geográfica específica, introduziram uma dimensão filogenética nas discussões sobre a estrutura das populações, levando à proposição do termo “filogeografia” (AVISE et al., 1987). Desse modo, com base na distribuição geográfica dos haplótipos de mtDNA e no grau de divergência de sequências entre eles, Avise (2000) propôs e discutiu cinco categorias filogeográficas, considerando aspectos da divergência de sequências entre populações alopátricas e simpátricas.

Na categoria I, estão incluídos os casos em que são observadas linhagens de mtDNA bastante divergentes, em geral valores superiores a 1-2%, ocupando áreas geográficas distintas (Alopatria). Na categoria II, estão as linhagens de mtDNA divergentes que ocorrem na mesma área geográfica (Simpatria). Na categoria III, ocorrem linhagens de mtDNA com baixos valores de divergência de sequências, em geral menores que 1%, ocupando áreas geográficas distintas (Alopatria). Na categoria IV, estão as linhagens de mtDNA com

divergência de sequências muito baixas ou praticamente nulas e que estão geograficamente localizados (Simpatria, com grande área de distribuição). Na categoria V, são encontradas linhagens pouco divergentes exibindo uma separação espacial parcial, sendo intermediária entre as categorias III e IV. De maneira geral, a presença de clones de mtDNA filogeneticamente próximos, reflete a ocorrência de fluxo gênico (ao menos, via materna), ou a presença de barreiras recentes, enquanto descontinuidades genéticas mais profundas, podem evidenciar separações populacionais historicamente mais antigas (AVISE, 2000).

Ainda segundo Avise (2000), cerca de 56% (27) das espécies de peixes de água doce já analisadas apresentam padrão filogeográfico de estruturação populacional da Categoria I, enquanto 17 espécies apresentam o padrão filogeográfico da categoria III a V e apenas 4 espécies apresentam o padrão filogeográfico da categoria II. As 48 espécies listadas por Avise (2000) estão distribuídas em sistemas hidrográficos de vários continentes, principalmente Europa e América do Norte, chamando atenção o fato de que nenhuma espécie de peixe de água doce da região neotropical (América do Sul e América Central) havia sido analisada filogeograficamente.

Este cenário mudou consideravelmente nos últimos anos e atualmente cerca de 60 espécies de peixes de água doce da região Neotropical apresentam dados disponíveis sobre filogeografia molecular (ALVES et al., submetido). Entre estes destacam-se os seguintes trabalhos: o estudo filogeográfico em populações de *Prochilodus lineatus* nos principais rios da América do Sul, principalmente na bacia do rio Paraná (SIVASUNDAR et al., 2001), sugerindo elevado nível de variação nucleotídica entre os haplótipos amostrados na bacia do rio Paraná, sendo possível identificar haplótipos divergentes em simpatria (subpopulações) nos rios da Plata e Uruguai. Os autores ainda sugerem que as amostras de *P. lineatus* do alto rio Paraná (rio Mogi-Guaçu) seriam fortemente relacionadas com os haplótipos encontrados à 2600 km em rios do baixo rio Paraná na Argentina. Outro importante trabalho foi realizado por Strecker et al. (2004) com populações de *Astyanax* na América Central e do Norte. Os resultados dos autores sugerem que a divergência genética baixa observada não é compatível com a taxonômica proposta, e que as espécies encontradas nesta região, mesmo as de cavernas, como *A. mexicanus*, devam constituir uma simples unidade taxonômica, *Astyanax fasciatus*.

Perdices et al. (2002) apresentam um extenso trabalho com o gênero *Rhamdia* na América Central. As inferências filogenéticas mostraram que *R. nicaraguensis* é sinônimo de *R. laticauda* e sugerem dois clados para a América Central, *R. guatemalensis* e *R. laticauda* e não três como sugeria Silfvergrip (1996). Os autores ainda restringem a distribuição de *Rhamdia quelen* apenas para a região cis-Andina da América do Sul, diferindo de Silfvergrip

(1996) e Bockmann e Grezzelli (2003). Para testar está hipótese filogeográfica de *Rhamdia quelen*, Alves et al. (2007, submetido1) analisaram populações desta espécie ao longo das bacias da Plata, Amazônica, Orinoco e Essequibo na América do Sul, e além de confirmar a hipótese de que *Rhamdia quelen* não está presente na América Central e na porção trans-Andina da América do Sul, os autores ainda observaram 11 linhagens mitocondriais na região cis-Andina da América do Sul distintas geneticamente, sugerindo a ocorrência de um complexo de espécies principalmente nas bacias dos rios costeiros e do Alto rio Paraná.

Embora o número de espécies analisadas sob o enfoque filogeográfico tenha crescido nos últimos anos (BATISTA e ALVES-GOMES, 2006; WILLIS *et al.*, 2007; HUBERT et al., 2007; entre outros) ainda é inexpressivo perto das aproximadamente 6000 espécies de peixes de água doce descritas para a região Neotropical (REIS et al., 2003).

Em relação às análises sobre a filogeografia molecular em *Simpsonichthys*, nenhuma informação está disponível na literatura. Nesse sentido, reforçamos aqui a necessidade de um amplo estudo envolvendo essa abordagem em exemplares do gênero.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo abordar questões acerca das relações filogenéticas das espécies do gênero *Simpsonichthys* através da análise de sequência de genes do DNA mitocondrial e DNA nuclear, gerando uma contribuição adicional para o entendimento da sistemática do gênero, e dentro do possível, da família Rivulidae. Os dados obtidos permitem fornecer importantes informações filogenéticas e taxonômicas que podem ajudar no desenvolvimento de ações voltadas à conservação deste grupo de peixes anuais.

Nesse sentido, para testar a hipótese apresentada abaixo foram adotados os seguintes objetivos específicos:

Hipótese: “O gênero *Simpsonichthys* é dividido em cinco subgêneros conforme proposta de Costa (2006a, 2007) com base em estudos morfológicos”

Objetivos específicos:

- Inferir as relações filogenéticas e estimar a divergência genética do gênero *Simpsonichthys* e seus subgêneros, através da análise de sequências do gene mitocondrial ATPase 8/6 e gene nuclear RAG-2;
- Auxiliar na caracterização de possíveis novos grupos taxonômicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Para análise populacional 32 indivíduos do gênero *Simpsonichthys* foram utilizados (Figura 2). E para análises populacionais e filogenéticas foram incluídos exemplares de *Kryptolebias marmoratus* (1), e *Aphyosemion australe* (1) como grupo externo, esses dados podem ser observados na Tabela 1.



Figura 2: Exemplos representativos do gênero *Simpsonichthys*. **Ophthalmolebias**: *S. semiocellatus* (M. Chauche); **Spectrolebias**: *S. flagellatus* (M. Endruweit); **Hypsolebias (S. antenori)**: *S. punctulatus* (F. Vermeulen); **Simpsonichthys**: *S. constanciae* (M. Chauche); **Hypsolebias (S. notatus)**: *S. auratus* (M. Chauche); **Hypsolebias (S. flammeus)**: *S. fasciatus* (F. Falcon) e **Hypsolebias (S. magnificus)**: *S. picturatus* (R. Britzke) respectivamente.

3.1.1 Local de coleta e manutenção dos exemplares

Simpsonichthys compreende 56 espécies válidas, com ampla distribuição na região nordeste, central e oriental do Brasil (COSTA, 1996, 2006a, 2007, 2008, 2010b, 2012; COSTA e BRASIL 2008; NIELSEN, 2008; NIELSEN et al. 2010).

Os subgêneros sugeridos por Costa (2006a, 2007) possuem ampla distribuição: **Xenurolebias**, planícies costeiras do leste do Brasil; **Ophthalmolebias**, bacias costeiras do leste e sudeste do Brasil; **Simpsonichthys**, planalto central brasileiro, bacias do alto rio Paraná, alto rio Araguaia e alto rio São Francisco; **Spectrolebias**, bacias do médio rio Tocantins, médio rio Araguaia, rio Xingu, rio Mamoré e rio Paraguai, no Brasil, Bolívia e Paraguai; e **Hypsolebias**, bacias dos rios São Francisco, Tocantins, médio Jequitinhonha e baixo Jaguaribe, e bacias costeiras isoladas do nordeste do Brasil.

Tento em vista o interesse de caracterizar as relações filogenéticas dentro e entre os subgêneros de *Simpsonichthys* foram capturados 32 exemplares desse gênero da população natural de diferentes estados brasileiros (Figura 3) (Tabela 1).



Figura 3: Distribuição das espécies analisadas.

Após a captura, os animais foram identificados e transportados para o laboratório a fim de processamento do material. Os animais analisados foram conservados em álcool 100% e estão depositados na coleção do Laboratório de Citogenética da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brasil. Os peixes tiveram sua identificação realizada pelos pesquisadores Dalton T. B. Nielsen do Laboratório de Zoologia da Universidade de Taubaté e Ricardo Britzke do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP de Botucatu.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA total foi obtido a partir de amostras de músculo ou nadadeira, utilizando a técnica de Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico (SAMBROOK, 2001):

1 - Preparar uma solução lise, contendo:

Soluções	Volume/Amostra
TNE 1X	300 µL
Tris-Hcl 1u (ph 8,0)	30 µL
SDS 10%	20 µL
Proteinase K (20mg/mL)	25 µL
Volume Final	375 µL

2 - Colocar as amostras de tecidos juntamente com a solução de lise, homogeneizar agitando por 15 minutos;

3 - Deixar as amostras em uma estufa 37° C *overnight* ou a 55° C por 4 horas, em seguida adicionar 8 µL de RNase (10 mg/mL);

4 - Adicionar 400 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1);

5 - Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm;

6 - Retirar o sobrenadante e transferir para um novo tubo;

7 - Adicionar a cada tubo 60 µL de Acetato de Sódio 3M (ph 5,3);

8 - Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm e descartar o sobrenadante;

9 - Adicionar 150µl de etanol 70% (temperatura ambiente) e centrifugar por 30 minutos a 14000 rpm;

10 - Descartar o sobrenadante;

11 – Repetir os passos 9 e 10;

12 - Secar em estufa a 37° C por 30 minutos;

13 - Eluir em 100µl de água ultrapura autoclavada e incubar a 37° C por 30 minutos, posteriormente transferir para a geladeira, *overnight*, para a completa ressuspensão.

As amostras foram preservadas em tampão de eluição ou água deionizada autoclavada até a amplificação, que foi efetuada num ciclador térmico.

Os produtos de PCR foram aplicados em um gel de agarose 1,0%, corados com 2µL SYBER Safe (10,000X) (Invitrogen®), em 1µL tampão de corrida *blue juice* (10X) e visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta, verificando a qualidade e tamanho dos fragmentos amplificados. A quantificação do produto gênico amplificado foi realizada utilizando o marcador de peso molecular Lambda (λ) DNA 50ng e 30ng, verificados em gel de agarose 1%.

O gene mitocondrial ATPase 8/6 foi amplificado utilizando os *primers* L8331 (5'- AA GCR TYR GCC TTT TAA GC-3') e H9236 (5'- GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC-3'), obtendo um total de 840 pares de bases. Para a amplificação do gene nuclear RAG-2 foram utilizados os *primers* (5'- TGY TAT CT CCCA CC TCT GC GYT ACC – 3') e (5'- TCA TCC TCC TCAT CKT CCT CWTT GTA – 3'). Os primers para os genes ATPase 6/8 foram desenvolvidos por Eldredge Birmingham (<http://striweb.si.edu/bermingham/research/primers/index.html>) e os primers do gene RAG-2 foram desenvolvidos por Hardman e Page (2003).

A reação de amplificação por PCR foi preparada em um tubo de 0.5 mL, com as quantidades descritas a seguir:

Soluções	Volume/Amostra
Mix PCR * (Qiagen)	6,25µL
Água Milli Q	5,25µL
Primer F 10µM	0,5µL
Primer R 10µM	0,5µL
DNA	1,0µL
Volume final	13,5µL

* Na solução de MIX PCR estão contidas os reagentes Taq DNA polimerase 5U, Tampão da enzima 10X, MgCl₂ 1,5mM e dDNTP (dideoxinucleotídeo trifosfato) 200µM.

Para que o gene mitocondrial ATPase 8/6 fosse amplificado, o programa padrão de PCR consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 45,5°C por 45 segundos para anelamento dos *primers* (gradientes de temperatura foram utilizados para a padronização – Tabela 2 (Anexo)), 68°C por 90 segundos, estendendo a cadeia e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Como a padronização para a amplificação do mtDNA das diferentes espécies foi bastante divergente, outras temperaturas, bem como diferentes programas foram utilizados para a amplificação do mesmo.

Para o gene nuclear RAG-2, o programa de PCR testado consistiu de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 1 minuto, seguido de 34 ciclos a 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* (gradientes de temperatura foram utilizados para a padronização – Tabela 2 (Anexo)), 72°C por 2 minutos, estendendo a cadeia, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Para as análises das sequências, o DNA amplificado foi purificado pelo tratamento com a enzima EXOSAP-IT. O DNA purificado foi sequenciado com o kit DYEnamic ET terminator reagent premix para MEGABACE (Amersham Biociences) em um sequenciador automático de modelo MEGABACE 1000 (GE HealthCare™), através de terceirização de serviços pela empresa MacroGen da Korea.

3.2.2 Limpeza com o kit ExoSAP-IT

O tratamento com a enzima ExoSAP-IT (USB Corporation) foi realizado de acordo com o seguinte protocolo:

1. Adicionar em um tubo eppendorf 10µL de produto de PCR (50ng de DNA/µL), 2µL da enzima EXOSAP e 2µL de água Milli Q autoclavada;
2. Levar os tubos ao termociclador em um ciclo de 1 hora a 37°C e 15 minutos a 80°C;
3. Manter as amostras no freezer (-20°C).

3.2.3 Extração, amplificação e sequenciamento do mtDNA (ATPase)

Em uma primeira etapa de execução do projeto, foram realizadas extrações de DNA genômico e amplificação do gene ATPase 8/6, das 17 espécies primeiramente coletadas,

totalizando 32 indivíduos (1352 à 1384 (registros do Laboratório)), as quais foram obtidas com a colaboração do pesquisador Dalton T. B. Nielsen.

A extração de DNA genômico obtida através da técnica de Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico mostrou bons resultados (Figura 4) (Anexo).

Após a realização da extração de DNA dos 32 exemplares, iniciou-se a padronização para amplificação do gene mitocondrial por PCR. A princípio todas as amostras de *Simpsonichthys* foram amplificadas utilizando-se o mesmo programa, com temperatura padrão de 55° C, para o gene ATPase 8/6 (Figura 5) (Anexo). Apesar de obtido o DNA genômico de todos os exemplares, a amplificação inicial não foi obtida com o mesmo sucesso.

Após a primeira tentativa de amplificação do gene mitocondrial, outros testes, utilizando gradientes de temperaturas, foram realizados (Figura 6) (Anexo).

Nessa primeira etapa apenas amostras de 16 exemplares foram amplificadas com sucesso, para que a etapa seguinte pudesse ser realizada. Os exemplares foram: 1352, 1353, 1354, 1355, 1357, 1358, 1362, 1364, 1369, 1370, 1374, 1375, 1376, 1382, 1383 e 1384, que podem ser observados nas figuras 5 e 6 (Anexo).

Os demais exemplares passaram por diferentes testes de PCR, que não foram bem sucedidos. Alguns exemplares, como o 1371 que apresentava banda dupla, passaram por um processo onde a banda de tamanho correspondente a amplificação correta foi extraída do gel de agarose e posteriormente purificada, no entanto a amplificação não foi satisfatória para que o sequenciamento fosse processado.

Sendo assim, os 16 exemplares amplificados com sucesso foram purificados e enviados para o sequenciamento junto a MacroGen.

Assim que o sequenciamento foi finalizado observou-se que apenas quatro exemplares (1358, 1382, 1383, 1384) foram devidamente sequenciados. Após alguns processos de extrações mal sucedidos, bem como inúmeras tentativas de amplificação do gene mitocondrial e por fim um sequenciamento pouco satisfatório, a hipótese de que nossas amostras, primeiramente coletadas, estariam mal conservadas foi levantada. Pois haviam sido coletadas há algum tempo, e alocadas em recipientes não apropriados, os quais permitiam a evaporação do álcool onde estavam inseridas, possibilitando assim sua degradação.

Sendo assim, foram amplificadas as amostras coletadas posteriormente, as quais estavam bem conservadas devido à alocação em recipientes apropriados.

Nessa segunda etapa, foram realizadas extrações de DNA genômico e ampliações do gene ATPase 8/6, de 18 espécies distintas, totalizando 32 indivíduos, as quais foram obtidas com a colaboração do pesquisador Ricardo Britzke (Tabela 3) (Anexo).

A extração de DNA genômico obtida através da técnica de Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico foi mais uma vez bem sucedida (Figura 7) (Anexo).

Após a realização da extração de DNA, iniciou-se a padronização para amplificação do gene mitocondrial (ATPase 8/6) por PCR dos 15 primeiros exemplares. O programa utilizou a temperatura padrão de anelamento de 45,5° C. Apenas oito indivíduos foram amplificados com sucesso (Figura 8) (Anexo).

Após a realização da amplificação do gene mitocondrial (ATPase 8/6) dos 15 primeiros exemplares, os demais indivíduos foram amplificados utilizando-se a mesma temperatura padrão de anelamento (45,5° C) (Figura 9) (Anexo).

Após as primeiras tentativas de amplificação do gene mitocondrial, outros testes foram feitos com as amostras que ainda não haviam sido amplificadas.

Um total de 32 amostras foram amplificados com sucesso, possibilitando assim a realização da etapa seguinte. Essas amostras foram purificadas e enviadas para o sequenciamento junto a MacroGen.

Os dados obtidos com o sequenciamento possibilitaram a realização de algumas inferências, as quais podem ser observadas nos tópicos seguintes.

Após análises da segunda leva de amostras, e a facilidade de obtenção dos resultados em detrimento das anteriores, foi possível confirmar a hipótese de que os primeiros exemplares analisados encontravam-se mal conservados.

3.2.4 Extração, amplificação e sequenciamento do nDNA (RAG-2)

A tentativa de padronização para a amplificação do gene nuclear (RAG-2) foi realizada paralelamente ao processo de amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial (ATPase 8/6). Devido a diferentes características dos genes, principalmente com relação ao tamanho, outros protocolos tiveram de ser testados para a amplificação do gene nuclear.

Os *primers* inicialmente testados, e que foram descritos junto à metodologia utilizada, passaram por diversos testes com diferentes gradientes de temperatura para uma possível padronização. No entanto, os resultados obtidos não foram contundentes, já que as bandas apresentadas foram duplas e extremamente fracas, quando comparadas com o DNA padrão (Lambda).

Esgotadas as possibilidades para a amplificação do RAG-2 com os *primers* inicialmente propostos, outros *primers* foram testados. Além de outros *primers* terem sido testados, outros testes de PCR foram realizados. Um *Nested* PCR foi realizado na tentativa de amplificação do gene nuclear RAG-2. Porém, os resultados esperados não foram obtidos.

Outros testes, com diferentes genes nucleares, foram realizados na tentativa de amplificação de um gene nuclear para esse conjunto de espécies. Primeiramente um gene de histona, H3, com aproximadamente 1/3 do tamanho do gene inicialmente proposto foi testado. A amplificação foi obtida com sucesso para a maioria das amostras, no entanto o sequenciamento não foi satisfatório, o que inviabilizou a utilização desses dados no presente trabalho. Após a tentativa com o gene de histona, o gene nuclear 18S foi testado. No entanto, nenhum resultado foi satisfatório observado.

Tendo em vista a falta resultados, não foi possível realizar inferências filogenéticas através de genes nucleares para esse grupo de espécies.

3.2.5 Análises filogenéticas

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas usando-se o programa BioEdit (HALL, 1999). A variação e o padrão de substituição de nucleotídeos e a distância genética foram examinadas utilizando-se o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). Além disso, a saturação de nucleotídeos foi analisada plotando-se o número absoluto de transições (Ti) e transversões (Tv) contra os valores de distância genética, utilizando-se o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

A análise filogenética foi conduzida pelo método *Neighbour-Joining* (NJ) e Máxima Parcimônia (MP) através do programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). Apenas as topologias mínimas foram retiradas e os ramos com comprimentos zero foram colapsados. As filogenias obtidas foram testadas utilizando o método de *bootstrap* com 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985).

3.2.6 Análises de haplótipos

Para avaliar a associação entre haplótipos e sua distribuição geográfica foi utilizado o programa TCS v1.21 (CLEMENT et al., 2000). O programa TCS é utilizado para gerar redes de haplótipos usando parcimônia estatística (TEMPLETON et al., 1987).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização molecular do gene ATPase 8/6

O gene ATPase 8/6 (840 pb) foi completamente sequenciado para 32 indivíduos do gênero *Simpsonichthys*, e para um indivíduo de *Kryptolebias marmoratus*, e um de *Aphyosemion australe*, utilizados como grupo externo. A composição nucleotídica foi A= 27,3 %, C= 23,5%, G= 10,7% e T= 38,4% sendo 608 posições variáveis, 232 conservadas e 573 filogeneticamente informativas. Uma análise gráfica foi realizada através da relação entre as transições (Ti) e transversões (Tv) e a distância genética estimada pelo modelo Kimura-2-parâmetros (KIMURA, 1980) indica que não há saturação nestes nucleotídeos (Figura 10).

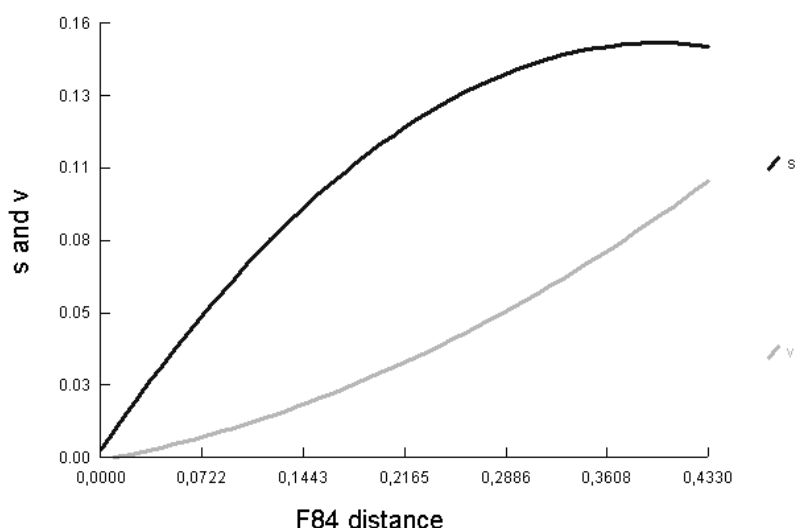


Figura 10: Gráfico de transição (linha “s”) / transversão (linha “v”), evidenciando a não ocorrência de saturação dos dados.

4.2 Análises filogenéticas e divergência do mtDNA dos *Simpsonichthys*

A análise filogenética, utilizando o método de Máxima Parcimônia, foi realizada considerando as sequências dos 32 animais utilizados no presente estudo. Os *gaps* internos foram tratados como dados ausentes. A árvore consenso obtida está representada na Figura 11, a qual mostra a divisão do gênero *Simpsonichthys* em dois clados. *Kryptolebias marmoratus* e *Aphyosemion australe* foram considerados grupo externo nesta análise. Foram considerados os valores de *bootstrap* iguais ou acima de 50%.

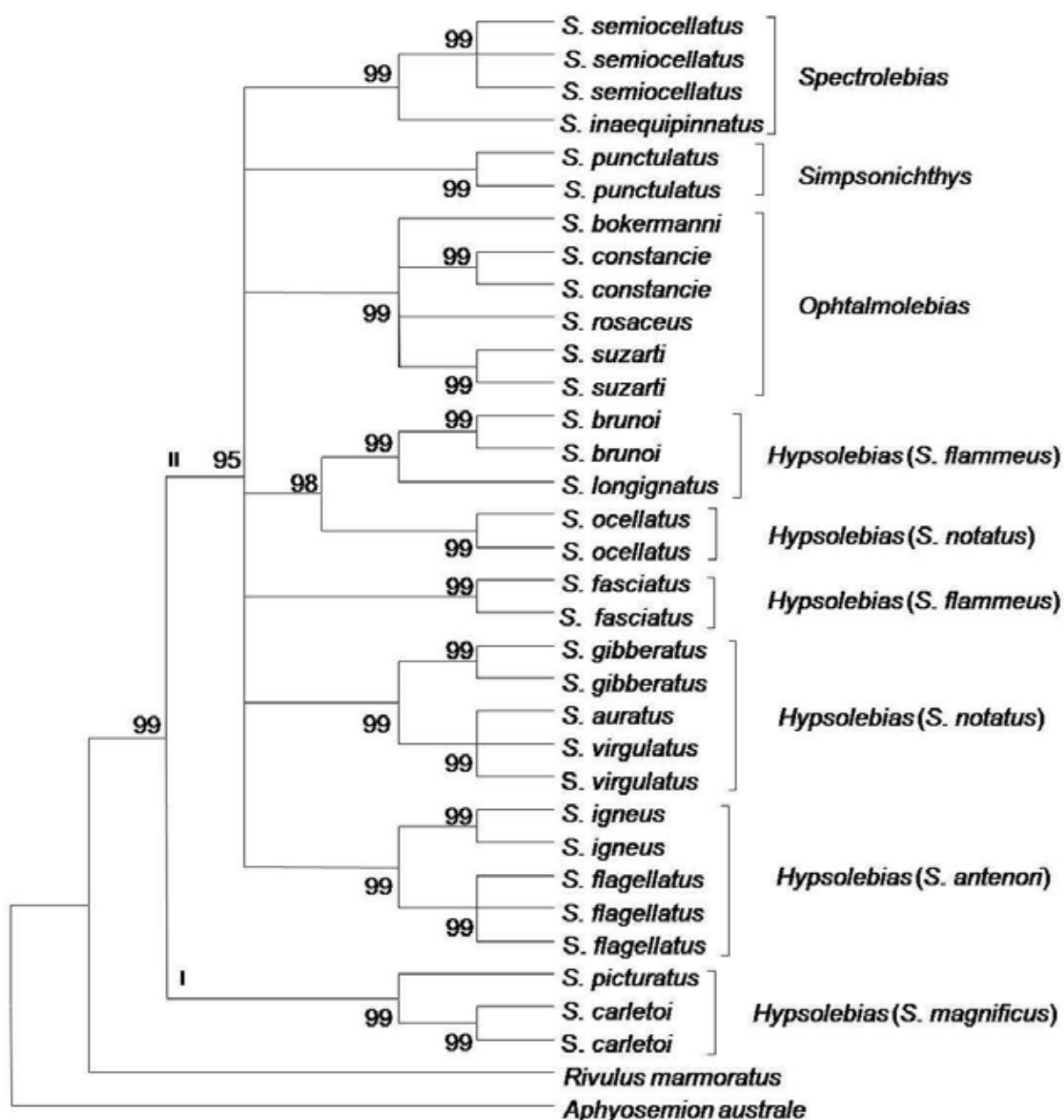


Figura 11: Árvore consenso obtida pelo método *Máxima Parsimônia* com 1000 réplicas de *bootstrap*, foram considerados valores iguais ou acima de 50%.

A análise filogenética, utilizando o método de *Neighbor-joining*, foi realizada considerando as sequências dos 32 animais utilizados no presente estudo. Os *gaps* internos também foram tratados como dados ausentes. A árvore consenso obtida está representada na Figura 12. E *Kryptolebias marmoratus* e *Aphyosemion australe* foram utilizados como grupo externo nesta análise. Foram considerados os valores de *bootstrap* sem cortes.

Apesar da análise filogenética obtida através do método *Neighbor-joining* confirmar a divisão do gênero em dois clados, ela sugere a divisão do clado II em seis linhagens (Figura

12). A divergência genética entre os sugeridos subgêneros se mostrou bastante elevada, o que confirma os dados obtidos por essa filogenia (Tabela 4).

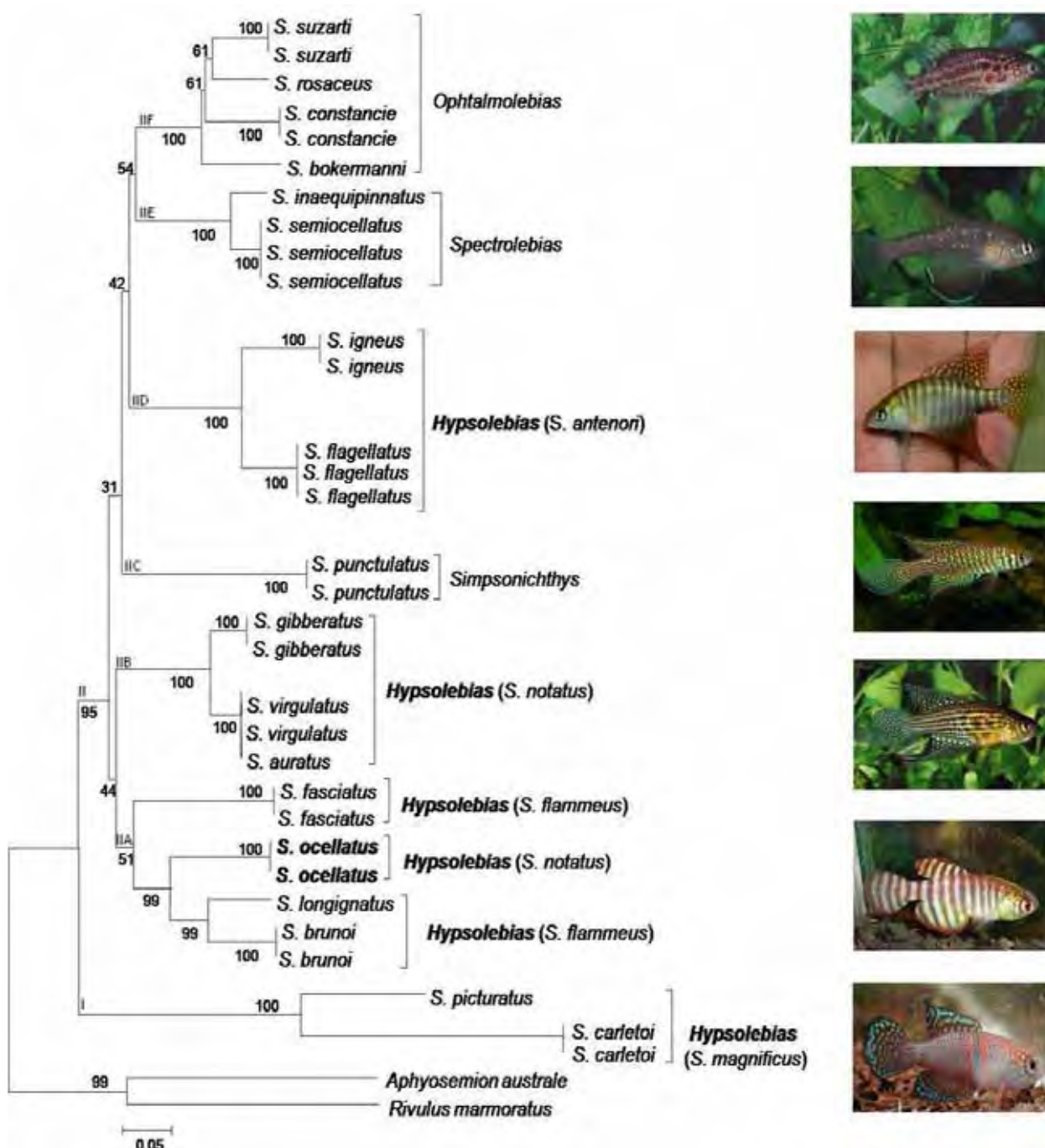


Figura 12: Árvore consenso obtida pelo método “Neighbor-Joining (NJ)” com 1000 réplicas de *bootstrap*, sem cortes. Destacando a posição de *S. ocellatus* dentro do subgênero *Hypsolebias*. A direita exemplares dos subgêneros.

Tabela 4. Divergência genética dentro e entre os subgêneros de *Simpsonichthys*. Em negrito, divergência dentro dos subgêneros.

	<i>Hypsolebias</i> (<i>S. antenori</i>)	<i>Hypsolebias</i> (<i>S. flammeus</i>)	<i>Hypsolebias</i> (<i>S. magnificus</i>)	<i>Hypsolebias</i> (<i>S. notatus</i>)	<i>Spectrolebias</i>	<i>Simpsonichthys</i>	<i>Ophtalmolebias</i>
<i>Hypsolebias</i> (<i>S. antenori</i>)	8,9%						
<i>Hypsolebias</i> (<i>S. flammeus</i>)	27,8%	16,4%					
<i>Hypsolebias</i> (<i>S. magnificus</i>)	41,7%	37,5%	19,6%				
<i>Hypsolebias</i> (<i>S. notatus</i>)	27,3%	22,7%	38,1%	13,2%			
<i>Spectrolebias</i>	26,3%	24,2%	39,3%	23,8%	3,3%		
<i>Simpsonichthys</i>	29,7%	27,8%	40,1%	26,6%	25,6%	-	
<i>Ophtalmolebias</i>	26,7%	25,7%	38,4%	25,2%	22,1%	26,5%	11,1%

Devido à divisão da topologia obtida em dois clados, além da subdivisão observada para o clado II, análises das relações dentro e entre as sugeridas linhagens foram observadas.

O clado I composto pelo subgênero *Hypsolebias*, grupo *S. magnificus*, aparece como grupo irmão de todo o clado II, composto por seis linhagens (IIA, IIB, IIC, IID, IIE e IIF). Dentro do segundo clado o subgênero *Ophtalmolebias* (IIF) está mais relacionado à *Spectrolebias* (IIE), formando estes o grupo irmão de *Hypsolebias* (*S. antenori*) (IID), os quais formam o grupo irmão de *Simpsonichthys* (IIC). E por fim *Simpsonichthys* (IIC) está igualmente relacionado à *Hypsolebias*, grupo *S. notatus* (IIB) e *S. flammeus* (IIA) (Figuras 12 e 13). Os dados observados na árvore filogenética podem ser confirmados pelas divergências genéticas (Tabela 4).

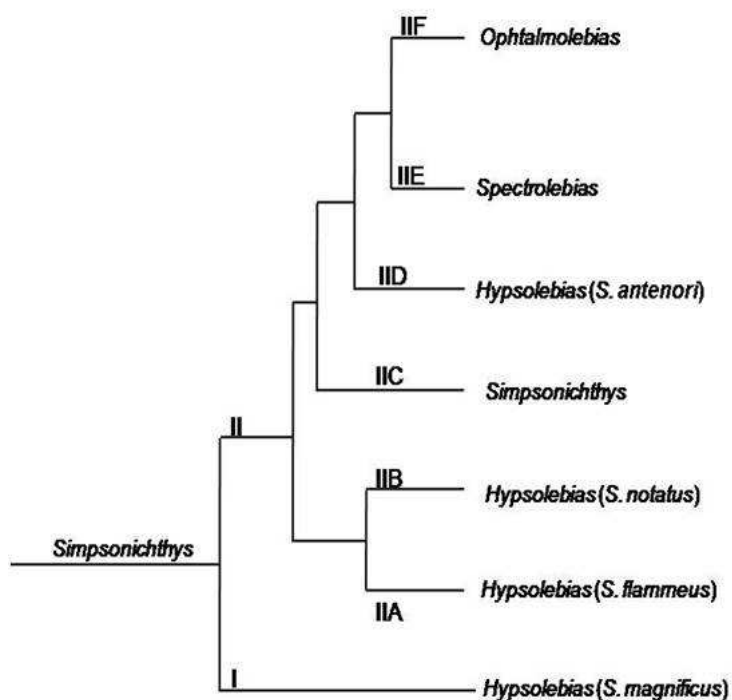


Figura 13: Hipótese de relação filogenética dentro do gênero *Simpsonichthys*, baseado em dados moleculares do presente trabalho.

Nossos dados corroboram a hipótese de que os grupos de *Hypsolebias* podem representar subgêneros independentes, ou ainda, não pertencer a *Hypsolebias*, já que o monofiletismo do grupo não foi mantido (Figuras 11, 12 e 13).

Analisando as relações dentro de cada subgênero podemos observar que:

A relação filogenética dentro do grupo *S. magnificus* sugere estreita relação entre *S. picturatus* e *S. carletoi* (Figura 14).

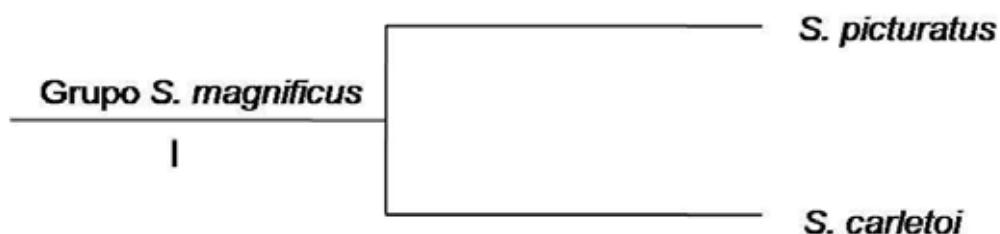


Figura 14: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo *S. magnificus*, baseado em dados moleculares do presente estudo.

Dentro do grupo *S. flammeus* a relação filogenética observada sugere a espécie *S. longignatus* mais relacionada à *S. brunoï*, formando estas o clado irmão de *S. fasciatus* (Figura 15).



Figura 15: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo *S. flammeus*, baseado em dados moleculares do presente estudo.

Para o grupo *S. notatus* a espécie *S. auratus* se apresentou mais próxima de *S. virgulatus*, formando estas o grupo irmão de *S. gibberatus* (Figura 16).

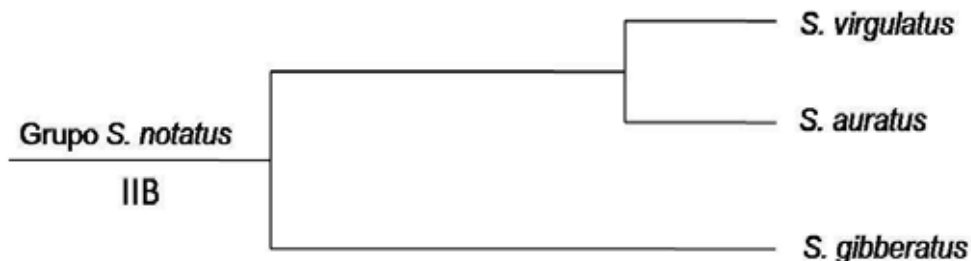


Figura 16: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo *S. notatus*, baseado em dados moleculares do presente estudo.

Em nossas análises filogenéticas a espécie *S. ocellatus* se insere dentro do grupo *S. flammeus*, apesar de inicialmente descrita por outros autores como pertencente ao grupo *S. notatus*. No entanto, quando colocada no grupo *S. notatus*, ela eleva a divergência genética a níveis muito altos para espécies que constituem o mesmo grupo. Entretanto, sem a espécie, o grupo *S. notatus* tem divergência interna de 4%, e quando a espécie é inserida no grupo a divergência salta para 13,2%. Portanto apesar de *S. ocellatus* pertencer a *Hypsolebias*, não faz parte do grupo *S. notatus*, como descrito para a espécie, mas sim do grupo *S. flammeus* (Figura 12).

As relações observadas dentro do grupo *S. antenori* sugerem proximidade entre *S. igneus* e *S. flagellatus* (Figura 17).

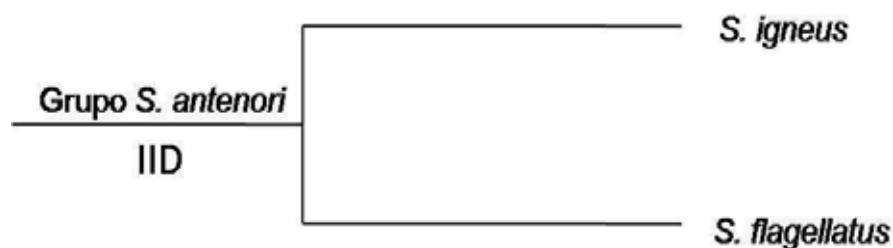


Figura 17: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo *S. antenori*, baseado em dados moleculares do presente estudo.

Para *Spectrolebias* a relação observada foi *S. innaequipinnatus* proximamente relacionado à *S. semiocellatus* (Figura 18).

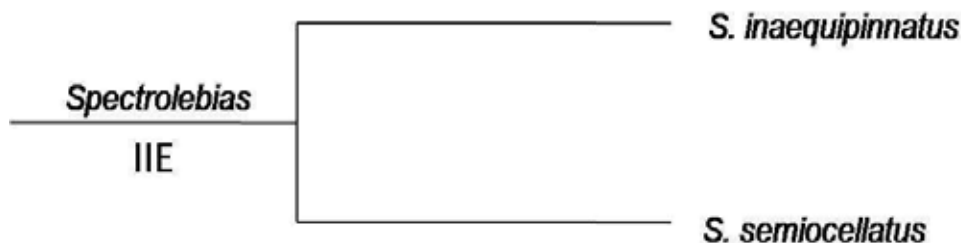


Figura 18: Hipótese de relação filogenética dentro do subgênero *Spectrolebias*, baseado em dados moleculares do presente estudo.

As relações filogenéticas de algumas espécies que compõe o subgênero *Ophtalmolebias* também puderam ser observadas. *S. rosaceus*, por exemplo, está mais relacionado à *S. suzarti*, e *S. constancie* aparece como grupo irmão do clado formado por eles. Já *S. bokermanni* aparece como grupo igualmente relacionado aos clados compostos por *S. rosaceus*, *S. suzarti* e *S. constancie* (Figura 19).

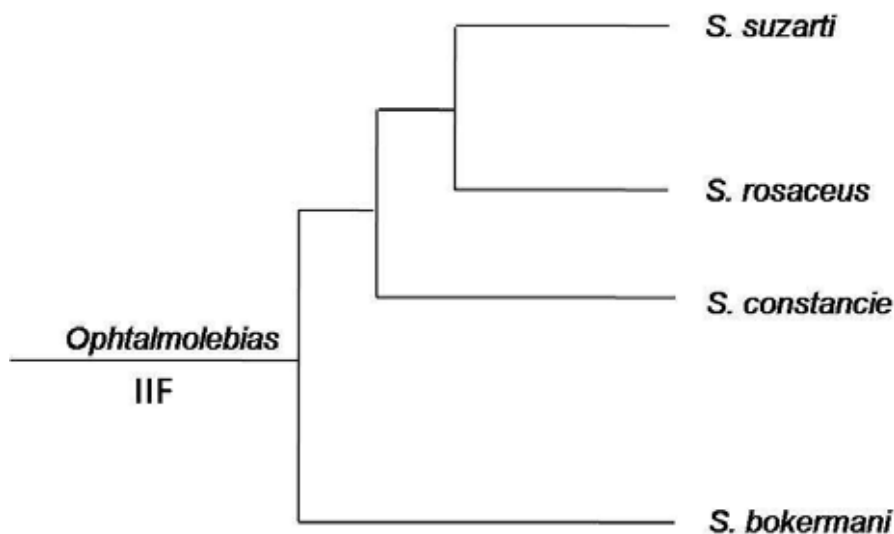


Figura 19: Hipótese de relação filogenética dentro do subgênero *Ophtalmolebias*, baseado em dados moleculares do presente estudo.

A ausência de representantes do subgênero *Xenurolebias*, bem como o limitado número de espécies (1) analisadas para o subgênero *Simpsonichthys*, impossibilitou a realização de inferências sobre as relações filogenéticas tanto dentro quanto entre estes e os demais subgêneros.

4.3 Análise populacional

Os 32 exemplares analisados do gênero *Simpsonichthys*, representam quatro dos cinco subgêneros propostos por Costa (2006a, 2007).

Nesse grupo foram encontrados 19 haplótipos, os quais apenas as espécies *S. virgulatus* e *S. auratus* ambos pertencentes a *Hypsolebias*, grupo *S. notatus*, apresentam compartilhamento de haplótipos (Figura 20).

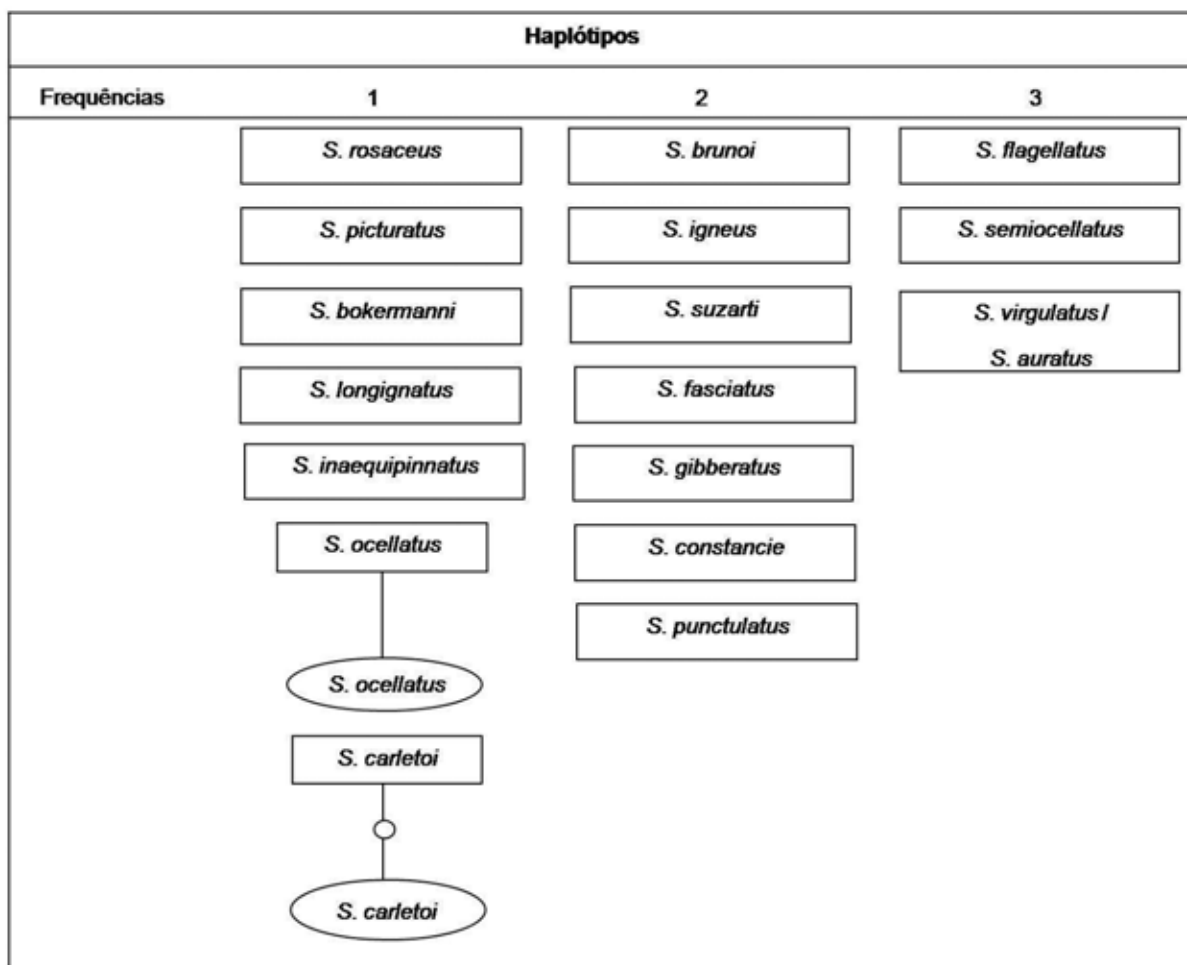


Figura 20: Rede de haplótipos obtida para espécies do gênero *Simpsonichthys*.

5 DISCUSSÃO

Diferentes tipos de caracteres morfológicos têm sido progressivamente empregados na sistemática de peixes anuais, no entanto foi Parenti (1981) que utilizou pela primeira vez estes dados no contexto da cladística. Até pouco tempo os caracteres morfológicos eram os únicos ou a principal fonte utilizada para construção de filogenias e classificações de peixes Actinopterygii. Os caracteres mais utilizados para a identificação dos clados de Rivulidae incluem os caracteres osteológicos, de neuromastos, além do padrão de coloração (COSTA, 2006a). Embora menos usado que caracteres morfológicos, dados sobre o comportamento, ecologia e características da superfície do córion do ovo também tem sido utilizados, pois tem se mostrado filogeneticamente informativos (COSTA, 1990, 1998, 2004, 2006c; BELOTE e COSTA, 2002).

Estudos filogenéticos em peixes anuais utilizando sequências de DNA tem se tornado mais comuns. Porém, esses estudos muitas vezes são conflitantes com os baseados em caracteres morfológicos (HRBEK e LARSON, 1999). Isso sugere que o conhecimento atual sobre as relações destes peixes ainda é confusa.

Este estudo é o primeiro a utilizar dados moleculares para a reconstrução das relações filogenéticas de peixes anuais pertencentes ao gênero *Simpsonichthys*. Nossos dados corroboram a hipótese de divisão de *Simpsonichthys* em diferentes subgêneros. Apesar de analisarmos representantes de quatro dos cinco subgêneros proposto por Costa (2006a, 2007) a divisão do gênero *Simpsonichthys* se manteve.

A hipótese filogenética de Costa (2006a) baseada em 116 caracteres morfológicos sugere que o subgênero *Simpsonichthys* está mais relacionado à *Spectrolebias*, sendo este grupo irmão de *Hypsolebias*, os quais estariam mais relacionados com *Ophthalmolebias* e por fim com *Xenurolebias* (Figura 21a).

Os dados obtidos no presente estudo permitem sugerir a existência de dois clados (I, II). O clado I composto pelo subgênero *Hypsolebias* (*S. magnificus*), aparece como grupo irmão do clado II. O clado II é subdividido em seis linhagens: IIA, IIB, IIC, IID, IIE e IIF. As relações sugeridas dentro do segundo clado são: *Ophthalmolebias* (IIF) mais relacionado à *Spectrolebias* (IIE), formando estes o grupo irmão de *Hypsolebias* (*S. antenori*) (IID), os quais formam o grupo irmão de *Simpsonichthys* (IIC). E por fim *Simpsonichthys* (IIC) está igualmente relacionado à *Hypsolebias*, grupo *S. notatus* (IIB) e *S. flammeus* (IIA) (Figura

21b). As relações obtidas com dados moleculares no presente diferem do inicialmente observado proposto por Costa (2006a) com dados morfológicos.

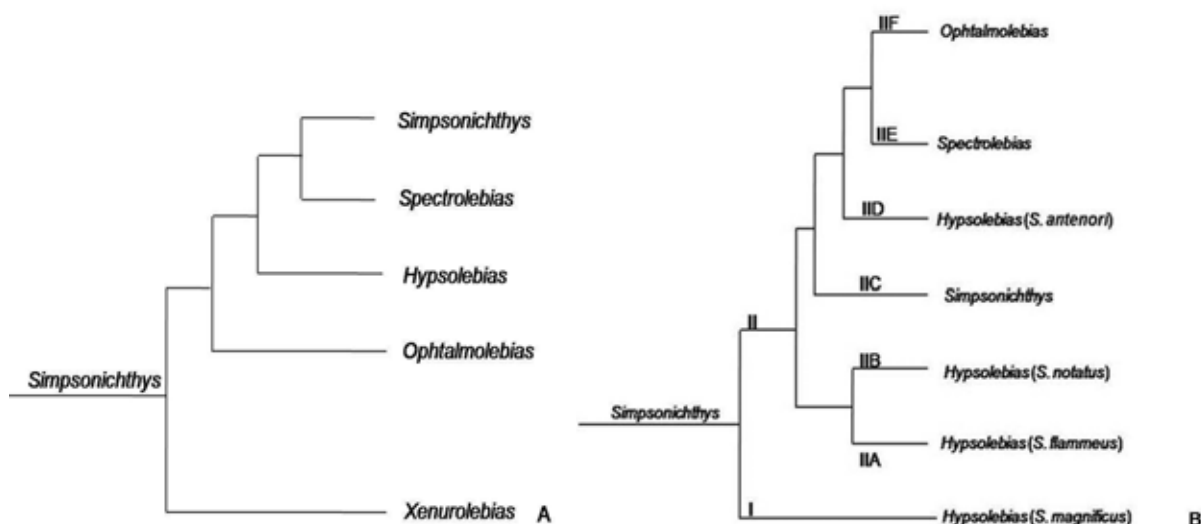


Figura 21: Hipótese de relação filogenética dentro do gênero *Simpsonichthys*. (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2010a), (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.

Apesar de Costa (2010a) elevar *Hypsolebias* a gênero, os grupos propostos por ele em 2006 (*antenori*, *flammeus*, *notatus* e *magnificus*) são mantidos como clados bem suportados (Figura 22). E a relação proposta indica o grupo *Antenori* mais relacionado ao grupo *Flammeus*, formando estes um clado irmão ao formado pelo grupo *Notatus* e *Magnificus* (COSTA 2006a, 2010a) (Figura 23a). No entanto, o trabalho de Costa (2010a) classifica a espécie *H. ocellatus* (*S. ocellatus*) como um taxa terminal, não pertencente a nenhum desses grupos, o que difere do proposto por ele em 2006, onde *S. ocellatus* estava inserido dentro do grupo *S. notatus*.

A relação observada para esses grupos difere do obtido por nossos resultados, onde o grupo *S. notatus* está mais relacionado à *S. flammeus*, estes a *S. antenori* e por fim a *S. magnificus* (Figura 23b). Além disso, nossos dados diferem do obtido por Costa (2006a, 2010a) no que diz respeito a classificação de *S. ocellatus*, pois para nossas análises esta espécie se insere dentro do grupo *S. flammeus*.

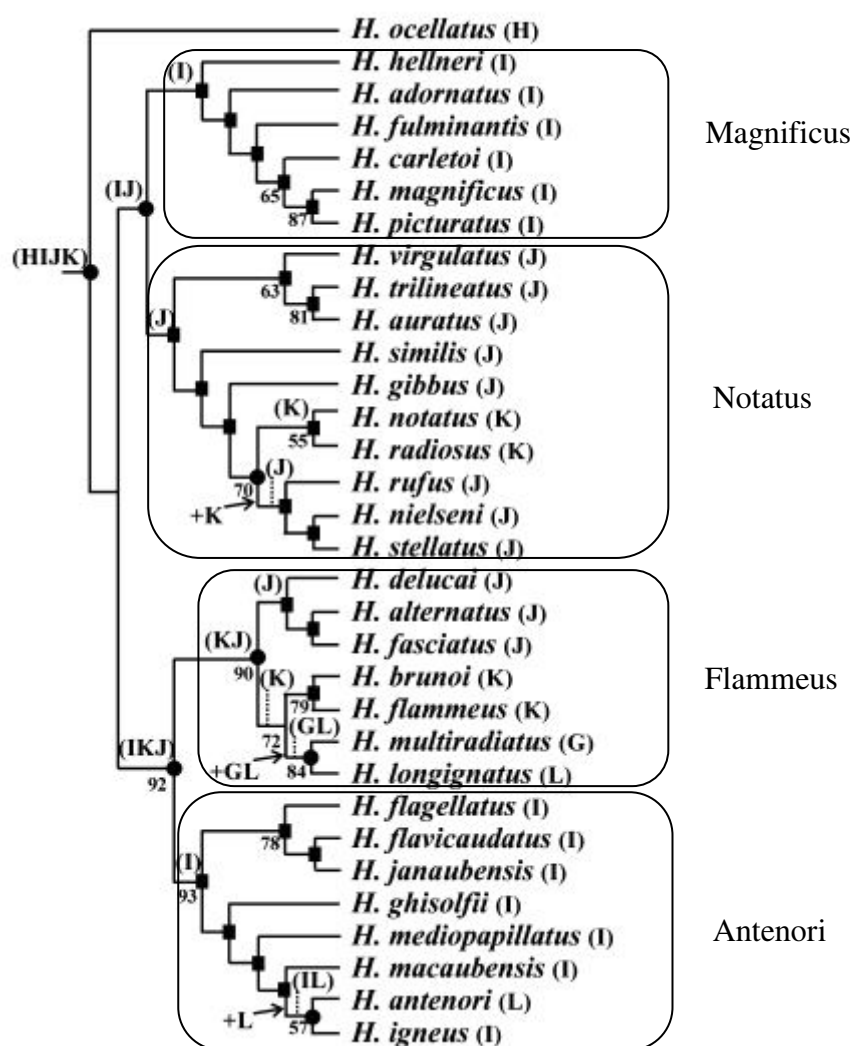


Figura 22: Relações filogenéticas entre peixes Cynolebiasini, representado espécies de *Hypsolebias* (COSTA, 2010a).

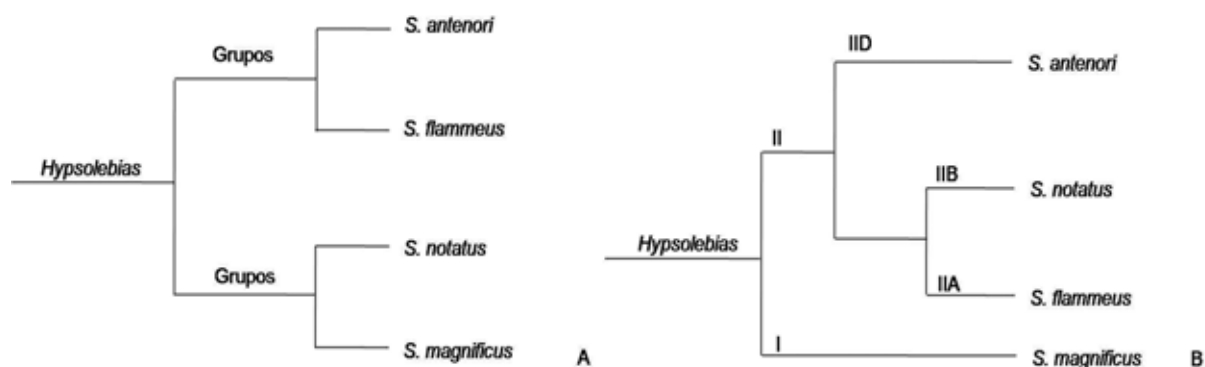


Figura 23: Hipótese da relação filogenética dentro de *Hypsolebias*. (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2006a, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.

Nossos dados não corroboram o observado por Costa (2010a), pois *Hypsolebias* não se manteve como um grupo monofilético, o que impossibilitaria sua elevação a gênero. Além

disso, permitem sugerir que cada grupo dentro de *Hypsolebias* possa representar um gênero independente (Figuras 12, 13, 21b, 23b). Devido ao observado, não tratamos aqui as espécies de *Hypsolebias* como pertencentes a um gênero independente.

As relações observadas para *S. magnificus* não puderam ser comparadas com as observadas por Costa (2010a) já que o presente estudo analisou apenas duas espécies (Figura 24a, b).

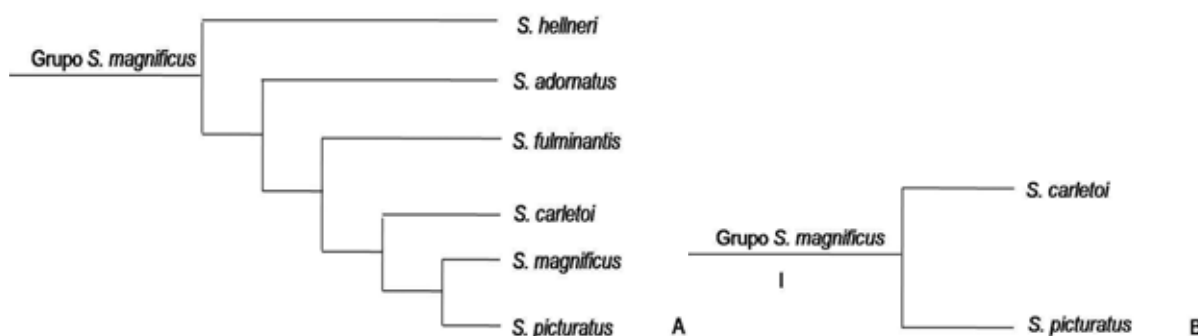


Figura 24: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo *S. magnificus*. (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.

Dentro do grupo *S. flammeus* a relação filogenética observado por Costa (2010a) se apresentou diferente da observada por nossos dados. No entanto, isso pode ser devido às diferentes espécies analisadas (Figura 25a, b).

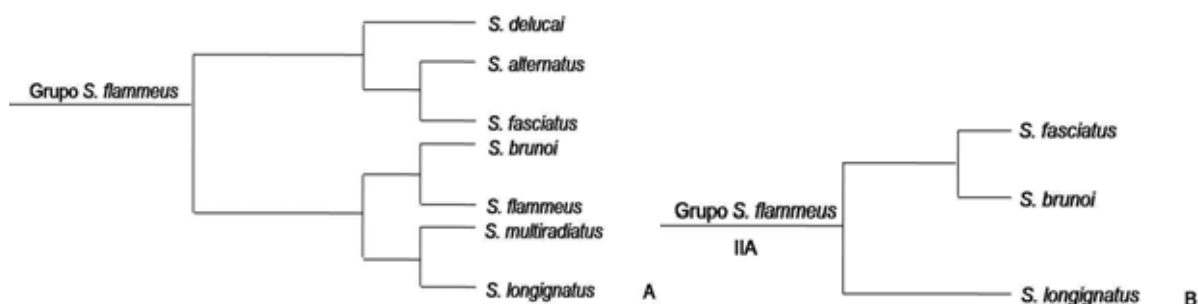


Figura 25: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo *S. flammeus*. (A) baseado em dados morfológicos (Costa, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.

Para o grupo *S. notatus* a relação observada também diferiu da observada por Costa (2010a). Pois *S. auratus* se apresentou mais próximo de *S. virgulatus*, no entanto isso também pode ser devido às diferentes espécies analisadas (Figura 26a, b).

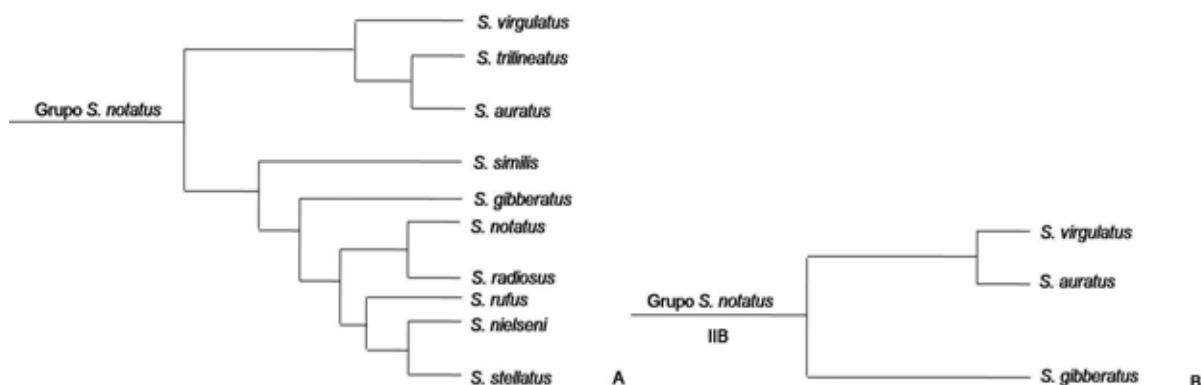


Figura 26: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo *S. notatus*. (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.

As relações observadas dentro do grupo *S. antenori* foram diferentes das observadas por Costa (2010a), pois a espécie *S. flagellatus* aparece proximamente relacionada à espécie *S. igneus*. No entanto, isso não exclui a possibilidade de recuperação das relações observadas por Costa (2010a) caso maior quantidade de espécies sejam analisadas (Figura 27a, b).

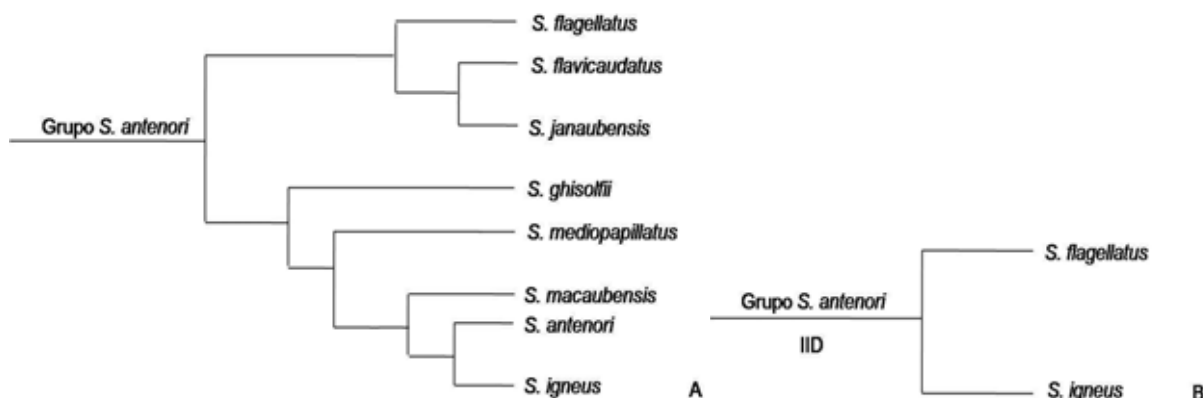


Figura 27: Hipótese de relação filogenética dentro do grupo *S. antenori*. (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.

Para *Spectrolebias* a relação observada por nossos dados corroboraram o relatado por Costa (2010a), pois *S. semiocellatus* aparece proximamente relacionado à *S. inaequipinnatus* (Figura 28).

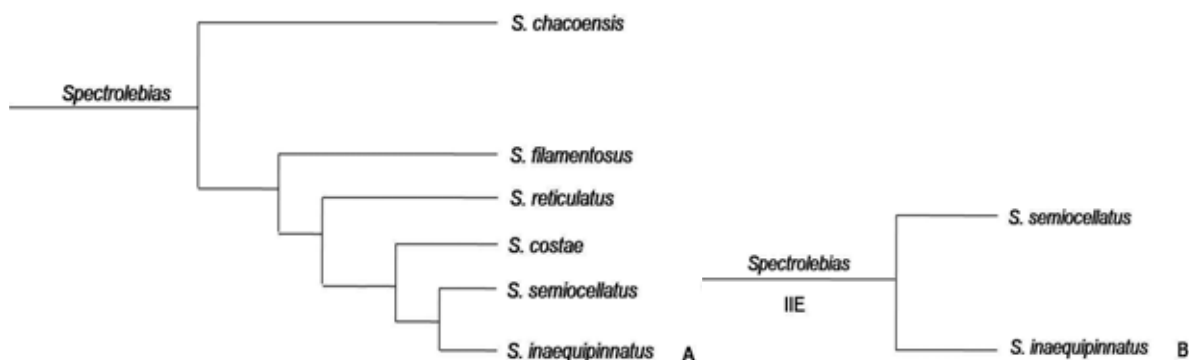


Figura 28: Hipótese de relação filogenética dentro do subgênero *Spectrolebias*. (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.

Dentro de *Ophtalmolebias* a única relação que nosso trabalho não recupera, envolve *S. rosaceus* e *S. perpendicularis* como espécies mais proximamente relacionadas, como observado por Costa (2010a). As demais relações foram iguais tanto para o trabalho de Costa (2010a), quanto para o presente trabalho.

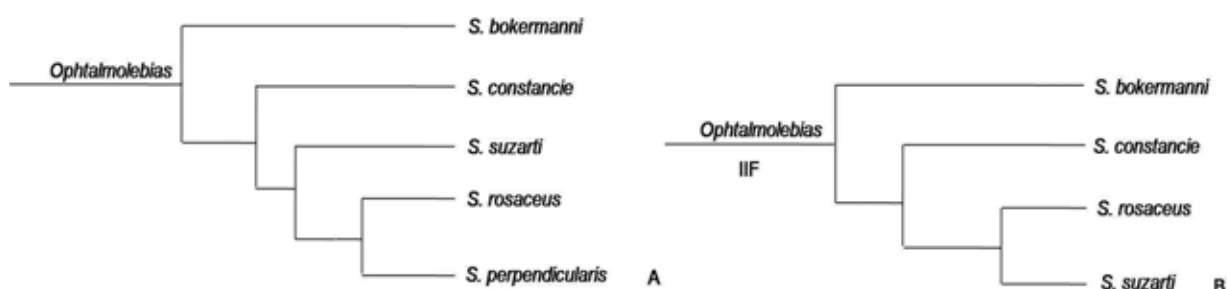


Figura 29: Hipótese de relação filogenética dentro do subgênero *Ophtalmolebias*. (A) baseado em dados morfológicos (COSTA, 2010a); (B) baseado em dados moleculares obtidos no presente trabalho.

Segundo Costa (2010a) *Simpsonichthys* aparece como um conjunto parafilético. Como consequência disso, as unidades monofiléticas anteriormente classificados como subgêneros de *Simpsonichthys* foram consideradas como gêneros válidos. Apesar dessa afirmação, segundo Eschmeyer (2012) os únicos subgêneros elevados a gênero foram *Hypsolebias* e *Ophtalmolebias*.

No entanto, somente com os dados moleculares do presente estudo, não podemos afirmar que essas unidades monofiléticas dentro de *Simpsonichthys* sejam gêneros distintos, portanto o presente estudo as tratou como subgêneros de *Simpsonichthys*. Apesar das unidades monofiléticas serem internamente bem corroboradas por altos valores de *bootstrap*, para ambas as análises realizadas em nosso estudo, não podemos separá-las em gêneros distintos, pois o parafiletismo de *Simpsonichthys* não foi testado. Entretanto, com base em

nossos dados podemos afirmar que *Hypsolebias* não se comporta como um gênero monofilético, pois foi dividido em quatro clados distintos.

Costa (2006a, 2007) propõe a seguinte divisão de seus subgêneros, *Simpsonichthys* do Brasil central (Endêmicos do cerrado, nas bacias do alto Paraná, alto Tocantins, alto Araguaia e afluentes do alto São Francisco), *Xenurolebias* e *Ophthalmolebias* do leste do Brasil (Endêmicos da Mata Atlântica, desde a Bahia ao Rio de Janeiro), *Spectrolebias* do Brasil central, Bolívia e Paraguai (Endêmicos das regiões sazonalmente inundáveis na bacia do alto Xingu, alto Tocantins, alto Araguaia, alto Mamoré e chaco paraguaio) e *Hypsolebias* do centro e nordeste do Brasil (médio São Francisco, médio Jequitinhonha, alto e médio Tocantins e rio Jaguaribe). Costa (2010a), usando um modelo de dispersão e vicariancia (Figura 30) apresenta uma topologia onde *Ophtalmolebias* é mais relacionado a *Simpsonichthys* e esse a *Hypsolebias*, sugerindo relação entre espécies do médio e baixo São Francisco, bacias costeiras e do planalto central.

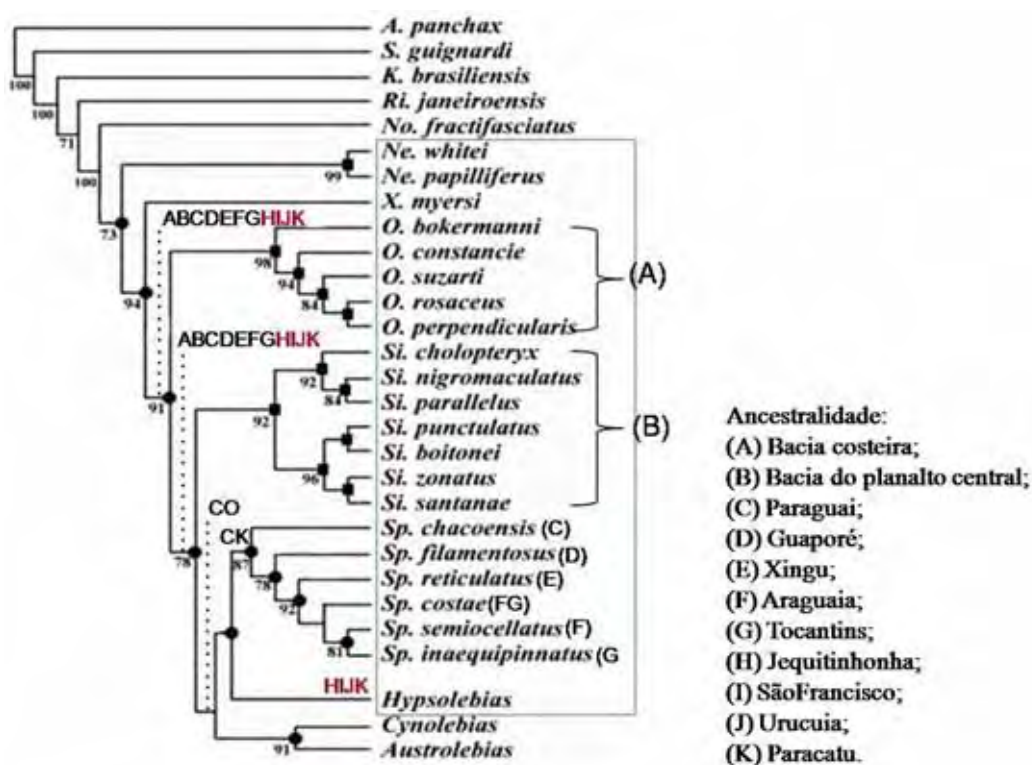


Figura 30: Topologia resumida da reconstrução de distribuição ancestral obtida através de análises de dispersão e vicariancia (Costa, 2010a).

Em nossas análises, não conseguimos a mesma topologia, pois *Ophtalmolebias* aparece mais relacionadas a *Spectrolebias*, estando estes relacionados a *Hypsolebias*, e por fim a *Simpsonichthys*. No entanto, a relação entre espécies do médio e baixo São Francisco,

bacias costeiras e do planalto central proposta por Costa (2010a) é mantida. Pois o subgênero *Spectrolebias* também possui espécies endêmicas do Brasil central.

A relação entre esses subgêneros é provavelmente associada ao neotectonismo de capturas de cabeceiras ocorridas nessas áreas devido a Lineamento Transbrasiliano (LIMA e RIBEIRO, 2011), uma mega-feição linear que se inicia no alto Paraguai, atravessando o escudo brasileiro (alto Paraná, alto Araguaia, alto Tocantins, alto Rio Madeira até o litoral do nordeste brasileiro) e envolvendo as capturas entre os rios costeiros e drenagens adjacentes como relatado por Ribeiro (2006) (Figura 31).



Figura 31: Mapa indicando bacias hidrográficas, passíveis de captura entre os rios.

Lundberg et al. (1998) foram um dos primeiros a associar, de forma clara, a biogeografia de peixes de água doce aos processos tectônicos em escala continental. Lundberg et al. (1998) deixam claro o papel dos processos tectônicos na remodelagem da paisagem e de sua influencia em processos vicariantes que afetam a distribuição geográfica da fauna de peixes de água doce na América do Sul.

Alguns pesquisadores como Saadi et al. (2005) e Riccomini et al. (2004) afirmam que a margem leste da América do Sul apresenta intensa atividade tectônica, diferente do que se acreditava. E segundo Ribeiro (2006) é isso que promove o intenso rearranjo entre as drenagens do escudo cristalino e dos tributários diretos do Oceano Atlântico com consequente mistura faunística (Ribeiro 2006)

Outros eventos de grande magnitude associados aos movimentos tectônicos, como a origem da planície alagada do Pantanal Mato-grossense, são importantes no intercâmbio faunístico entre bacias e não podem ser negligenciados.

6 CONCLUSÕES

- Com base em nossos dados podemos inferir que o gênero *Simpsonichthys* é subdividido em sete subgêneros distintos;
- Os subgêneros *Ophtalmolebias*, *Simpsonichthys* e *Spectrolebias* foram considerados unidades monofiléticas bem corroboradas, que podem ser elevadas a gêneros;
- O subgênero *Hypsolebias* não é monofilético, e os clados observados dentro dele podem ser considerados independentes;
- Não há compartilhamento de haplótipos entre os subgêneros.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A.L. (2005). **Análise da evolução da família Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) baseada em caracteres cromossômicos e de sequências de DNA.** Tese de Doutorado, PG-Genética, UNESP, Botucatu.

ALVES, A.L.; BROCCIO, M.; OLIVEIRA, C.; REIS, S.F. (2007). Hipótese de relacionamento filogenético entre populações de *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) da bacia do rio Paraná. **Congresso Brasileiro de Ictiologia**, Itajaí, SC.

ALVES, A.L.; PERDICES, A.; REIS, S.F.; OLIVEIRA, C. (submetido 1) Phylogeography and evolutionary history of the Neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Teleostei: Heptapteridae) implications for their taxonomy and conservation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**.

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

AVISE, J.C. (2000). Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, London.

BATISTA, J.S.; ALVES-GOMES, J.A. (2006) Phylogeography of *Brachplatystoma rousseauxii* (Siluriformes – Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of homing for an Amazonian migratory catfish. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, p. 723 – 740.

BELOTE, D.F.; COSTA, W.J.E.M. (2002). Reproductive behavior patterns in the Neotropical annual fish genus *Simpsonichthys* Carvalho, 1959 (Cyprinodontiformes, Rivulidae): description and phylogenetic implications. *Boletim do Museu Nacional, Nova Serie, Zoologia*, v. 489, p. 1–10.

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

BETANCUR-R, R.; ACERO, P.; BERMINGHAM, E.; COOKE, R. (2007). Systematics and biogeography of New World sea catfishes (Siluriformes: Ariidae) as inferred from mitochondrial, nuclear, and morphological evidence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, p. 339-357.

BILLINGTON, N.; HEBERT, P. (1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** (suppl. 1), p. 80-94.

BOCKMANN, F. A.; GREZZELLI, G. M. (2003). Family Heptapteridae. In: *Check list of the freshwater fishes of South America*, edited by Reis, R.E., S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr. Edipucrs, Porto Alegre, RS. p. 406 – 431.

BRASIL (2004). **Instrução normativa no 5 de 21 de maio de 2004**. Ministério do Meio Ambiente.

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

CARVALHO, G.R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. **Journal of fish Biology**, v. 43, p. 53-73.

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; FERREIRA, K.M.; RIBEIRO, A.C.; BENINE, R.C.; DARDIS, G.Z.P.; MELO, A.L.A.; ABREU, T.X.; BOCKMANN, F.A.; CARVALHO, M.; GIBRAN, F.Z. e LIMA, F.C.T. (2003). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3, n. 1.

CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H. F.; Melo, A L. (2004). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do rio Grande no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 4, n.1.

CASTRO, M.R.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; VARI, R.P.; MELO, A.L.A. (2005). Structure and composition of the strem ichthyofauna of four tributary rivers of upper Rio Paraná basin, Brazil. **Ichthyol. Ichthyological Exploration Freshwaters**, v. 6, n. 3, p. 193-214.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1657-1659.

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

COSTA, W. J. E. M. (1995). Two new genera and two new species of the neotropical annual fishes Plesiolebiatini (Cyprinodontiformes: Rivulidae), with studies on the relationships of the tribe. **Rev. Fr. Aquariol.**, v. 21, p. 65-74.

COSTA, W.J.E.M. (1996) Phylogenetic and biogeographic analysis of the Neotropical annual fish genus *Simpsonichth* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Journal of Comparative Biology**, v. 1, p. 129–140.

COSTA, W.J.E.M. (1998). Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). **Journal of Comparative Biology**, v. 3, p. 33–92.

COSTA, W.J.E.M. (2001). The neotropical annual fish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 12, p. 333–383.

COSTA, W.J.E.M. (2002a). The neotropical seasonal fish genus *Nematolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae): taxonomic revision, with description of a new species. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 13, p. 41–52.

COSTA, W.J.E.M. (2002b). Peixes anuais brasileiros: diversidade e conservação. Editora UFPR, Curitiba, p. 238.

COSTA, W.J.E.M. (2003). The *Simpsonichthys flavicaudatus* species group (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 14, p. 31–60.

COSTA, W.J.E.M. (2004). Relationships and redescription of *Fundulus brasiliensis* (Cyprinodontiformes; Rivulidae), with description of a new genus and notes on the classification of the Aplocheiloidei. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 15, p. 105–120.

COSTA, W.J.E.M. (2006a). Descriptive morphology and phylogenetic relationships among species of the Neotropical annual killifish genera *Nematolebias* and *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei: Rivulidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 1–26.

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

COSTA, W.J.E.M. (2006c). Taxonomy and phylogenetic relationships among species of seasonal, internally inseminating, South American killifish genus *Campellolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae), with the description of a new species. **Zootaxa**, v. 1227, p. 31–55.

COSTA, W.J.E.M. (2007). Taxonomic revision of the seasonal South American *killifish* genus *Simpsonichthys* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei: Rivulidae). **Zootaxa**, v. 1669, p. 1–134.

COSTA, W.J.E.M. (2008). *Simpsonichthys longignatus*, a new seasonal *killifish* of the *S. flammeus* group from the Pacoti River basin, northeastern Brazil (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 19, n. 2, p. 155–159.

COSTA, W.J.E.M. (2010a). Historical biogeography of cynolebiasine annual killifishes inferred from dispersal–vicariance analysis. **Journal of Biogeography**, v. 37, p. 1995–2004.

COSTA, W.J.E.M. (2010b). *Simpsonichthys harmonicus*, a new seasonal killifish from the São Francisco River basin, northeastern Brazil (Cyprinodontiformes: Rivulidae) **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 21, n. 1, p. 73–78.

COSTA, W.J.E.M. (2012). *Simpsonichthys margaritatus*, a new seasonal miniature killifish from the upper Paraná River basin, central Brazilian Cerrado (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 22, n. 4, p. 313–318.

COSTA, W.J.E.M.; BRASIL, G.C. (2008). *Simpsonichthys inaequipinnatus*, a new seasonal killifish from the Tocantins River basin, Brazil (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 19, n. 3, p. 245–248.

COSTA, W.J.E.M.; NIELSEN, D.T.B. (1997). A new genus and species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from the Araguaia basin, central Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 7, p. 257–265.

ESCHMEYER, W. N. (2012). Catalog of Fishes electronic version (20/03/2012). <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

FALK, T.M.; TEUGELS, G.G.; ABBAN, E.K.; VILLWOCK, W.; RENWRANTZ, L. (2003). Phylogeographic patterns in populations of the black-chinned tilapia complex (Teleostei, Cichlidae) from coastal areas in West Africa: support for the refuge zone theory. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 27, p. 81–92.

FRASER, D.J.; DUCHESNE, P.; BERNATCHEZ, L. (2005). Migratory charr schools exhibit population and Kinassociations beyond juvenile stages. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 3133-3146.

FELSENSTEIN, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791.

HALL, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium** v. 41, p. 95-98.

HARDMAN, M.; LUNDBERG, J.G. (2006). Molecular phylogeny and a chronology of diversification for “phractocephaline” catfishes (Siluriformes: Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, p. 410-418.

HARDMAN, M. (2005). The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, p. 700–720.

HARDMAN, M.; PAGE, L.M. (2003). Phylogenetic relationships among bullhead catfishes of the genus *Ameiurus* (Siluriformes: Ictaluridae). **Copeia**, p. 20–33.

HILLS, D.M.; MABLE, B.K.; MORITZ, C. (1996). Applications of Molecular Systematics. In: **Molecular systematics**. Hills, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. editors. Sinauer Associates, Sunderland.

HRBEK, T.; LARSON, A. (1999). The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): a molecular phylogenetic and biogeographic perspective. **Evolution**, v. 53, p. 1200–1216.

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; GARCIA-DAVILA, C.; PAUGY, D.; RENNO, J.F. (2007). Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 2115-2136.

HURT, C.; HEDRICK, P. (2005). Conservation genetics in aquatic species: General approaches and case studies in fishes and springsnails of arid lands. **Aquatic Sciences**, v. 66, p. 402-413.

IUCN (2011). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 20 March 2012

KALINOWSKI, S.T. (2004). Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, v. 5, p. 539-543.

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

KOTLIK, P.; BERREBI, P. (2002). Genetic subdivision and biogeography of the Danubian rheophilic barb *Barbus petenyi* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 24, p.10-18.

LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. (2005). Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. **Ambio**, v. 34, p. 111 – 119.

LÉVEQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M.L.J. (2008). A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p.545-567.

LEWIN, B. (1994). Genes V. Oxford University Press Inc., New York, p. 1272.

LI, C.; ORTI, G. (2007). Molecular phylogeny of Clupeiformes (Actinopterygii) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 386-398.

LIMA, F.C.T.; RIBEIRO, A.C. (2011). Continental-scale tectonic controls of biogeography and ecology. In: *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. (J.S. Albert & R.E. Reis, eds.). University of California Press.

LUNDBERG, J.G.; MARSHALL, L.G. GUERRERO, J. et al (1998). The stage for Neotropical fish diversification: a history of Tropical South American rivers. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P. et al. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: Edipucrs, p. 13-48.

MONTOYA-BURGOS, J. I.; MULLER, S.; WEBER, C.; PAWLOWSKI, J.; (1998). Phylogenetic relationships of the Loricariidae (Siluriformes) based on mitochondrial rRNA gene sequences. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, C.A.S., Lucena, Z.M.S.

(Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Museu de Ciencias e Tecnologia, PUCRS, Porto Alegre, Brazil, p. 363 – 374.

MORRISON, C.L.; LEMARIE, D.P.; WOOD, R.W.; KING, T.L. (2006). Phylogeographic analyses suggest multiple lineages of *Crystallaria asprella* (Percidae: Etheostominae). **Conservation Genetics**, v. 7, p. 129-147.

NIELSEN, D.T.B. (2008). **Simpsonichthys e Nematolebias**. São Paulo: Editora Cabral, p. 235.

NIELSEN, D. T. B.; SHIBATTA, O. A.; SUZART, R. R.; MARTIN, A. F. (2010). A new species of *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from the rio São Francisco basin, northeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 2452, p. 51-58.

NOGUEIRA, C.; BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; OYAKAWA, O. T.; KASECKER, T. P.; NETO, M. B. R.; SILVA, J. M. C. (2010). Restricted Range Fishes and the Conservation of Brazilian Freshwater. PLoS ONE, v. 5, n. 6, e11390. doi: 10.1371/journal.pone.0011390. Acesso realizado em 18/03/2012

PARENTI, L.R.(1981). A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 168, p. 335–557.

PATERNELLO, T.; MARCATO, S.; ZANE, L.; VAROTTO, V.; BARGELLONI, L. (2003). Phylogeography of the *Chionodraco* genus (Perciformes, Channichthyidae) in the Southern Ocean. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 28, p. 420-429.

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A. e DOADRIO, I. (2002). Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 25, p. 172-189.

PERDICES, A.; CUNHA, C.; COELHO, M.M. (2004). Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (=Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 31, p. 192-203.

PERDICES, A.; DOADRIO, I. (2001). The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 19, n. 3, p. 468-478.

PERDICES, A.; SAYANDA, D.; COELHO, M. M. (2005). Mitochondrial diversity of *Opsariichthys bidens* (Teleostei, Cyprinidae) in three Chinese drainages. **Molecular Phylogenetics and Evolution** *in press*.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. (2003). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), Porto Alegre, Edipucrs, p. 729.

RIBEIRO, A.C. (2006). Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of fauna evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 225-246.

RICCOMINI, C.; SANT'ANNA, L.G.; FERRARI, A.L. (2004). Evolução geológica do rift continental do sudeste do Brasil. In: MANTESSO-NETO, V.; BARTORELLI, A.; CARNEIRO, C. D.R. et al. Geologia do Continente Sul-americano – *Evolução da Obra de Fernando Flávio Marques de Almeida*. São Paulo: Beca, p. 383-405.

RYMAN, N.; UTTER, F.; LAIKRE, L. (1995). Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 5, p. 417-446.

SAADI, A.; BEZERRA, F.H.R.; COSTA, R.D. et al. (2005). Neotectônica da Plataforma Brasileira. In: SOUZA, C.R.G.; SUGUIO, K.; OLIVEIRA, A.M.S. et al. *Quaternário do Brasil*. Ribeirão Preto: Holos, p. 211-235.

SAMBROOK, J. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Publisher**. v. 3.

SCHLOTTERER, C. (2004). The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 63-69.

SILFVERGRIP, A.M.C. (1996). A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei Pimelodidae). **Swedish Museum of Natural History**, Stockholm.

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

SLOWINSKI, J.; PAGE, R.D. (1999). “How should species phylogenies be inferred from sequence data?”. **Systematic Biology**, v. 48, p. 814-825.

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

SUNNUCKS, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, p. 199-203.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 24, p. 1596–1599.

TEMPLETON, A. (2004). Using haplotypes trees for phylogeographic and species inferences in fish populations. *Envirom. Biology of Fishes*, v. 69, p. 7-20.

TEMPLETON, A.R.; BOERWINKLE, E.; SING, C.F. (1987). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. **Genetics**, v. 117, p. 343 – 351.

THOMERSON, J.E.; TAPHORN, D.C. (1995). *Renova oscar*, a new genus and species of annual killifish from Venezuela (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 6, p.185-192.

WANG, J.; LIN, H.; HUANG, S.; PAN, C.; CHEN, X.; CHIANG, T. (2004). Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozymas. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 31, p. 1143 – 1156.

WILLIS, S.; NUNES, M.S.; MONTANA, C.; FARIAS, I.P.; LOVEJOY, N. (2007). Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 291-307.

ZARDOYA, R.; DOADRIO, I. (1999). Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. **Journal Molecular Evolution**, v. 49, p. 227–237.

8 ANEXO

Tabela 2: Gradiente de temperatura utilizado para amplificação do gene ATPase 8/6 e RAG-2.

ATPase 8/6				
Colunas	Figura 6			RAG-2
	A	B	C	
1	44,9	50	43,1	50,0
2	-	-	-	50,2
3	46,6	-	-	50,8
4	48,5	51,7	-	51,7
5	50,8	52,8	-	52,8
6	-	-	43,8	54,1
7	56,1	55,4	-	55,4
8	58,7	-	-	56,7
9	61,1	57,9	-	57,7
10	63,1	-	-	58,8
11	64,5	-	-	59,5
12	65,1	-	44,9	59,9

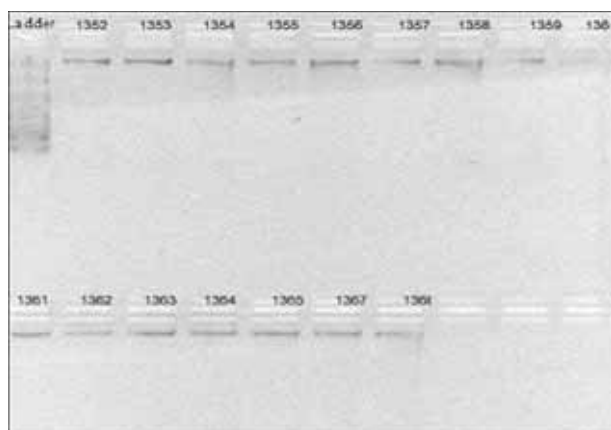


Figura 4: Extrações de DNA genômico de 32 exemplares de *Simpsonichthys*

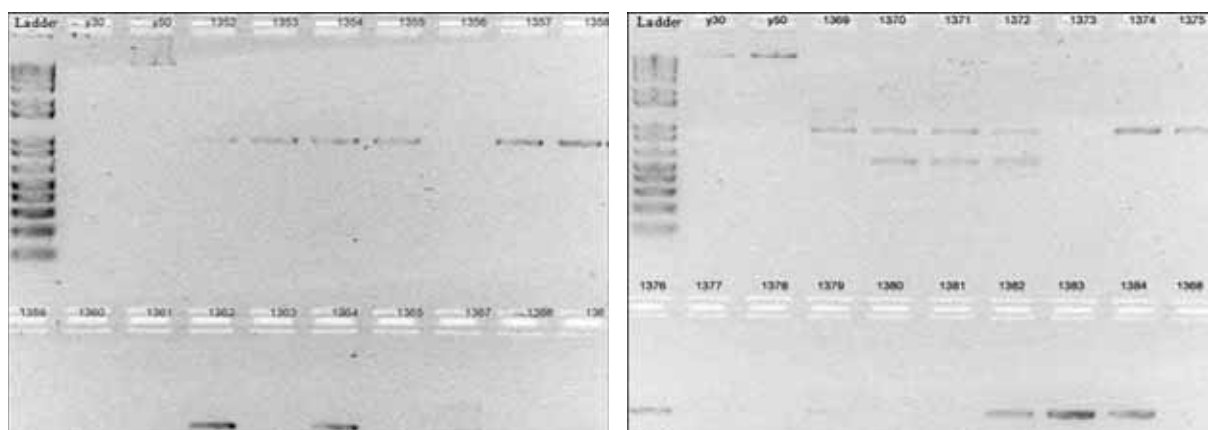


Figura 5: Quantificação do produto gênico ATPase 8/6 amplificado por gel de agarose. (y30= λ 30, y50= λ 50 DNA Lambda, marcador de peso molecular).

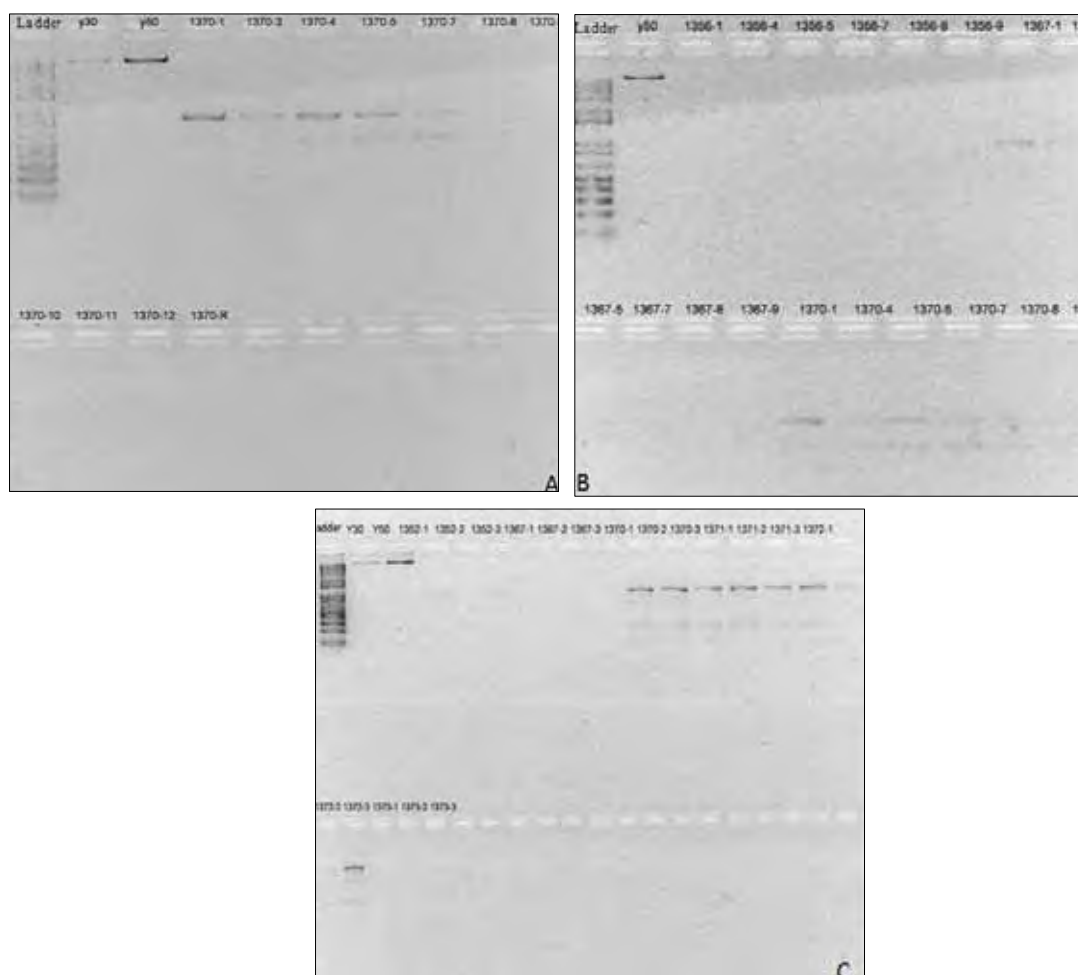
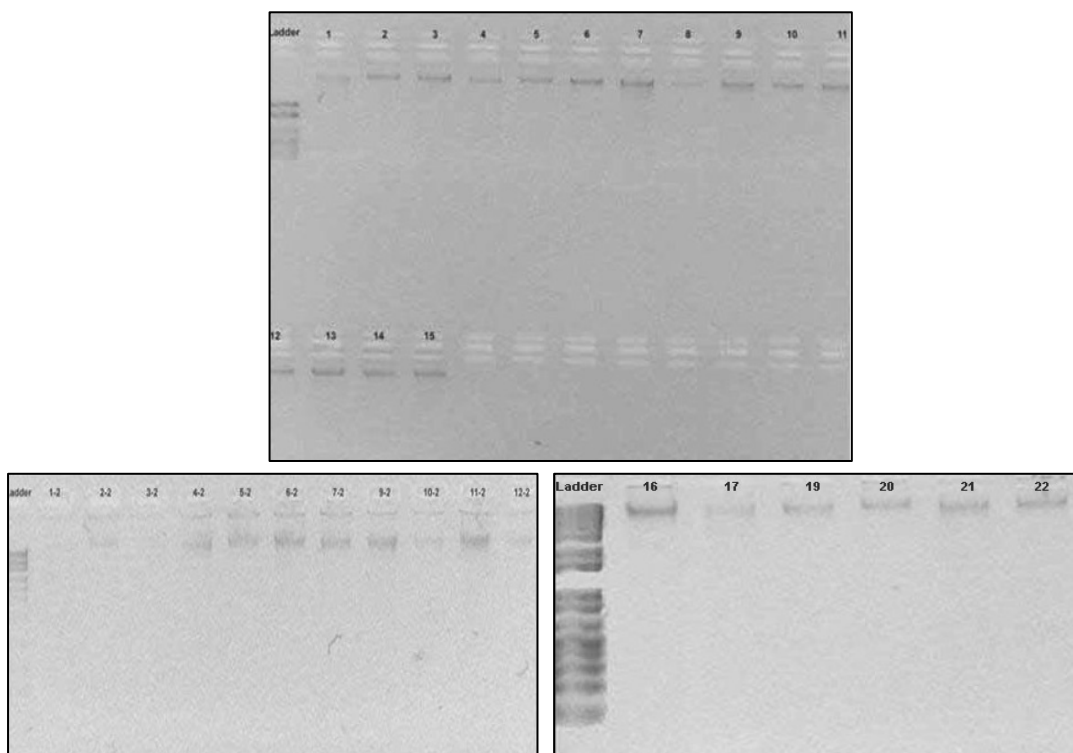


Figura 6: Quantificação do produto gênico ATPase 8/6 amplificado por gel de agarose. O gradiente A-C pode ser observado na Tabela 2. (y30= λ 30, y50= λ 50 DNA Lambda, marcador de peso molecular)

Tabela 3: Relação de espécies/indivíduos analisados

Nº do Exemplar (Registro do Laboratório de Citogenética)	Espécies	Nº do Exemplar (Registro do Laboratório de Citogenética)	Espécies
1	<i>S. carletoi</i>	9-2	<i>S. bruno</i>
1-2	<i>S. carletoi</i>	10	<i>S. ocellatus</i>
2	<i>S. suzartii</i>	10-2	<i>S. ocellatus</i>
2-2	<i>S. suzartii</i>	11	<i>S. gibberatus</i>
3	<i>S. punctulatus</i>	11-2	<i>S. gibberatus</i>
3-2	<i>S. punctulatus</i>	12	<i>S. flagellatus</i>
4	<i>S. virgulatus</i>	12-2	<i>S. flagellatus</i>
4-2	<i>S. virgulatus</i>	13	<i>S. flagellatus</i>
5	<i>S. constancie</i>	14	<i>S. semiocellatus</i>
5-2	<i>S. constancie</i>	15	<i>S. semiocellatus</i>
6	<i>S. fasciatus</i>	16	<i>S. semiocellatus</i>
6-2	<i>S. fasciatus</i>	17	<i>S. rosaceus</i>
7	<i>S. igneus</i>	19	<i>S. bokermanni</i>
7-2	<i>S. igneus</i>	20	<i>S. auratus</i>
8	<i>S. picturatus</i>	21	<i>S. longignatus</i>
9	<i>S. bruno</i>	22	<i>S. inaequipinnatus</i>

Figura 7: Extrações de DNA genômico de 32 exemplares de *Simpsonichthys*.

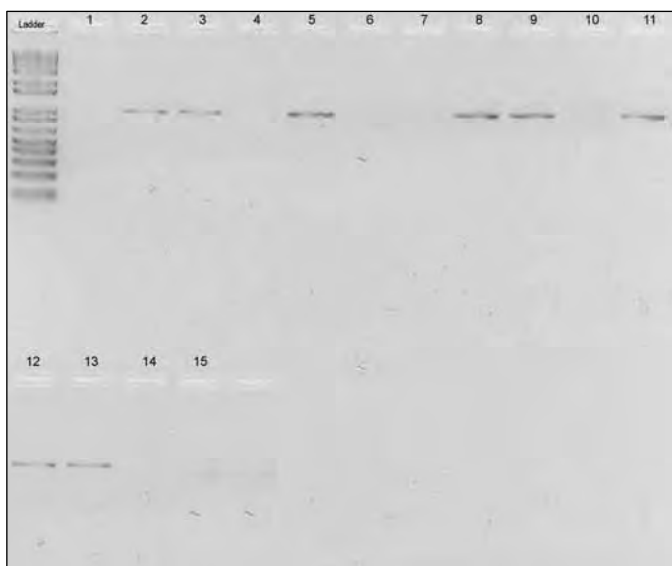


Figura 8: Quantificação do produto gênico ATPase 8/6 amplificado por gel de agarose.

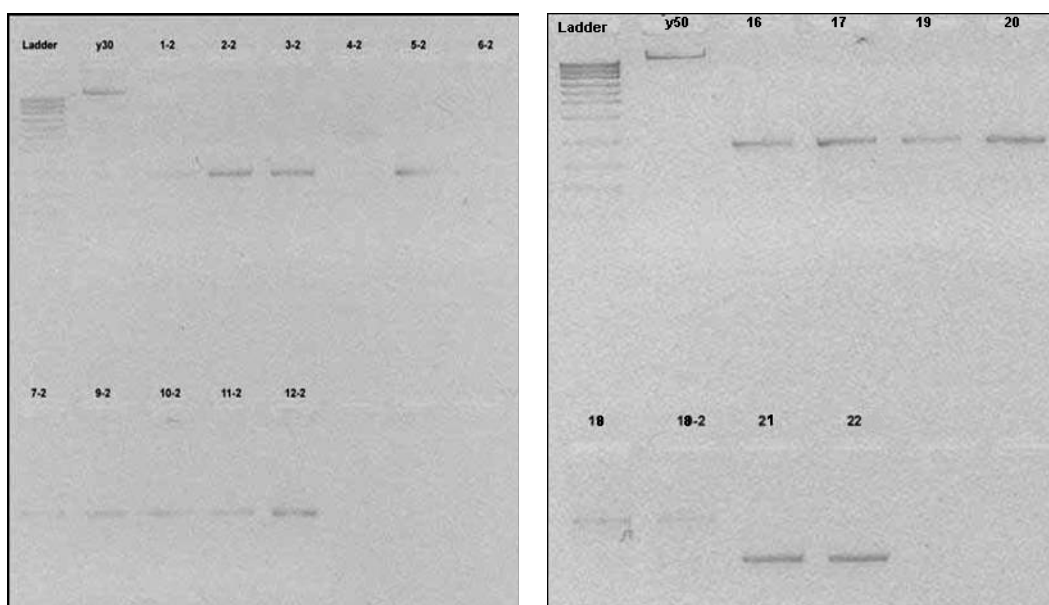


Figura 9: Quantificação do produto gênico ATPase 8/6 amplificado por gel de agarose. (y50= λ 50 DNA Lambda, marcador de peso molecular)