

## **FILOGEOGRAFIA DO PEIXE ANUAL CRITICAMENTE AMEAÇADO, *Austrolebias wolterstorffi* (CYPRINODONTIFORMES: RIVULIDAE): ALTOS NÍVEIS DE DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA E ESPECIAÇÃO INCIPIENTE**

**DAIANA KASTER GARCEZ<sup>1</sup>; CRISLAINE BARBOSA<sup>2</sup>; MARCELO LOUREIRO<sup>3</sup>;  
MATHEUS VOLCAN<sup>4</sup>; DANIEL LOEBMANN<sup>2</sup>; LIZANDRA JAQUELINE ROBE<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande – daiana\_kg@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande

<sup>3</sup>Universidad de la República

<sup>4</sup>Instituto Pró Pampa

<sup>5</sup> Universidade Federal do Rio Grande – lizbiogen@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

O nível de diversidade genética apresentado por qualquer população ou espécie, bem como sua estruturação, dependem de uma série de fatores, como taxas mutacionais, tamanho efetivo populacional e nível de fluxo gênico (FRANKHAM et al., 2004). Como tal, as análises genéticas de conservação que avaliam os níveis populacionais de variação genética e níveis de fluxo gênico podem fornecer importantes informações para a gestão de espécies ameaçadas (CAMARGO et al., 2015). Além disso, a inferência dos processos microevolutivos responsáveis pelo estabelecimento dos padrões filogeográficos no espaço e no tempo permite avaliar a influência de diferentes eventos na demografia das espécies, o que pode ser útil não apenas na caracterização do passado, mas também na compreensão do presente e até na gestão do futuro.

Os peixes anuais figuram entre as espécies de vertebrados mais ameaçadas de extinção. No Rio Grande do Sul, por exemplo, cerca de 70% das espécies de peixes de água doce ameaçadas são rivulídeos (SEMA, 2014). Estas espécies estão sujeitas à ação de um conjunto de condições evolutivas, demográficas e metabólicas que podem resultar na rápida divergência entre populações. Alguns destes mecanismos, acrescidos da degradação e fragmentação das áreas úmidas, fazem destes peixes um dos grupos de vertebrados mais ameaçados.

*Austrolebias wolterstorffi* é um peixe anual criticamente ameaçado, que ocorre em áreas úmidas temporárias do Sistema Lagunar Patos-Mirim, no Rio Grande do Sul e Uruguai. Historicamente, essa região foi bastante impactada pelas transgressões e regressões marinhas do Pleistoceno e pós-Pleistoceno, resultando em modificações e fragmentações (SPRECHMAN, 1978) que influenciaram na divergência e diversificação de muitas espécies.

Portanto, buscamos avaliar os níveis de diversidade e a estrutura genética dentro e entre as populações de *A. wolterstorffi* ao longo de sua área de ocorrência, tentando reconstruir sua história evolutiva e auxiliar no estabelecimento de estratégias de manejo e conservação.

### **2. METODOLOGIA**

Um total de 122 espécimes foram coletados entre 2014 e 2015, em 22 locais de amostragem distribuídos em toda a distribuição conhecida desta espécie (Fig. 1), de acordo com a autorização SISBIO (44834-2). Após a eutanásia e fixação dos peixes, conforme protocolo aprovado pela CEUA-FURG (23116.008163/2015-23 Pq036/2015), o DNA foi extraído e fragmentos do gene mitocondrial citocromo *b* (cyt *b*) foram amplificados, purificados e sequenciados. Os eletroferogramas foram montados e as sequências obtidas foram alinhadas.

Foram avaliadas diferentes hipóteses de agrupamentos populacionais através da análise espacial da variância molecular (SAMOVA), com o uso da análise hierárquica da variância molecular (AMOVA). A estrutura da população e o número mais provável de clusters de indivíduos também foram avaliados usando a análise da Estrutura de População Bayesiana, no software BAPS.

Os níveis de diversidade genética dentro de populações ou grupos populacionais foram estimados. As relações entre haplótipos foram inferidas através de redes de haplótipos. Os níveis de diferenciação genética entre as populações foram medidos pelo índice de fixação ( $F_{ST}$ ). Um teste de Mantel foi realizado usando essas medidas para verificar a correlação entre distâncias genéticas ( $F_{ST}$ ) e geográficas. A análise filogenética foi realizada utilizando máxima verossimilhança (ML), com o modelo de substituição de nucleotídeos HKY + I + G, conforme selecionado pelo Critério de Informação Akaike (AIC).

Além disso, uma árvore cronofilogenética foi reconstruída sob uma abordagem bayesiana (BA) no Beast, utilizando o modelo de substituição HKY + I + G e um relógio molecular relaxado lognormal não correlacionado, que permite a variação da taxa entre as linhagens. Neste caso, uma taxa média de 2% por milhão de anos ( $SD = 0,5\%$ ), ajustada para os genomas mitocondriais de ectotérmicos, foi empregada como *prior* em uma análise filogenética piloto e posteriormente complementada pela datação de 325 mil anos atrás ( $SD = 12,5$  kyr) para a principal divisão entre linhagens orientais e ocidentais recuperada na primeira análise do Beast (ver resultados).

Finalmente, para estimar parâmetros populacionais como o  $n^o$  efetivo de fêmeas e o  $n^o$  efetivo de fêmeas migrantes, uma análise bayesiana baseada na coalescência foi implementada no LAMARC. Para isso, os indivíduos foram subdivididos em grupos, de acordo com os resultados da SAMOVA e BAPS.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises demonstraram vários casos de níveis significativamente altos de diferenciação entre as populações, em um padrão de divergência de isolamento por distância, com pelo menos seis grupos populacionais diferentes ao longo do Sistema Lagunar Patos-Mirim. Essa estrutura foi evidenciada pela rede de haplótipos (Fig. 1), análise filogenética, SAMOVA, BAPS e também sugerida pela ausência total de compartilhamento de haplótipos entre os grupos, que é capaz de explicar mais de 76% da variação detectada para esta espécie no gene *cyt b*. Isso sugere que a vicariância tem desempenhado um papel importante na diversificação genética de *A. wolterstorffi*, como também foi sugerido para várias outras espécies de Rivulidae (BARTÁKOVÁ et al., 2013; GARCÍA et al., 2015).

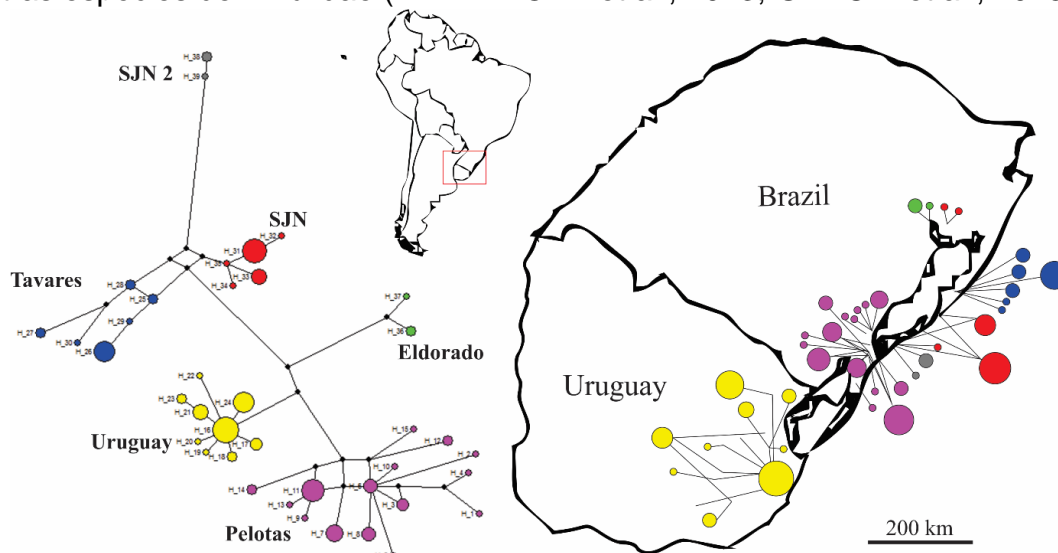


Figura 1. Rede de haplótipos e distribuição geográfica dos 39 haplótipos de citocromo *b* amostrados para *A. wolterstorffi*. O tamanho de cada círculo é proporcional às frequências de haplótipos, e as cores se referem aos principais haplogrupos identificados pelo SAMOVA e BAPS.

Esses grupos diferiram em um mínimo de 0,9% e um máximo de 2,6% das distâncias de nucleotídeos corrigidas, sugerindo a ocorrência de especiação incipiente como consequência da fragmentação alopátrica. Na verdade, distâncias tão pequenas quanto 1,4% foram relatadas anteriormente para o *cyt b* entre diferentes espécies de *Austrolebias* (García et al., 2000), com intervalos de distância ainda menores (0 a 1,8%) sendo relatados recentemente no complexo de espécies de *A. bellottii* (GARCÍA et al., 2015). No entanto, independente do status taxonômico atribuído a cada uma das seis unidades evolutivas detectadas aqui, é importante que estratégias de conservação independentes sejam aplicadas a cada uma das cinco principais áreas de amostragem cobertas por este estudo, quatro das quais localizadas no Brasil.

Finalmente, no que diz respeito ao cenário evolutivo espaço-temporal, é possível inferir que os seis grupos de populações abrangem duas linhagens distintas, cuja distribuição coincide com as margens oriental e ocidental da Lagoa dos Patos e sugere uma rota de colonização norte-sul, com a população localizada na parte noroeste da planície costeira do Rio Grande do Sul apresentando a mais antiga divergência (Fig. 2). Em geral, os tempos de divergência e os padrões biogeográficos recuperados são altamente consistentes com os registros de mudanças paleogeoclimáticas que ocorreram ao longo da área habitada pela espécie estudada no Quaternário (VILLWOCK; TOMAZELLI, 2007). Isso nos permitiu ainda estabelecer uma taxa de substituição corrigida para as sequências do citocromo *b* de *Austrolebias* e um sistema de calibração do relógio molecular no grupo.

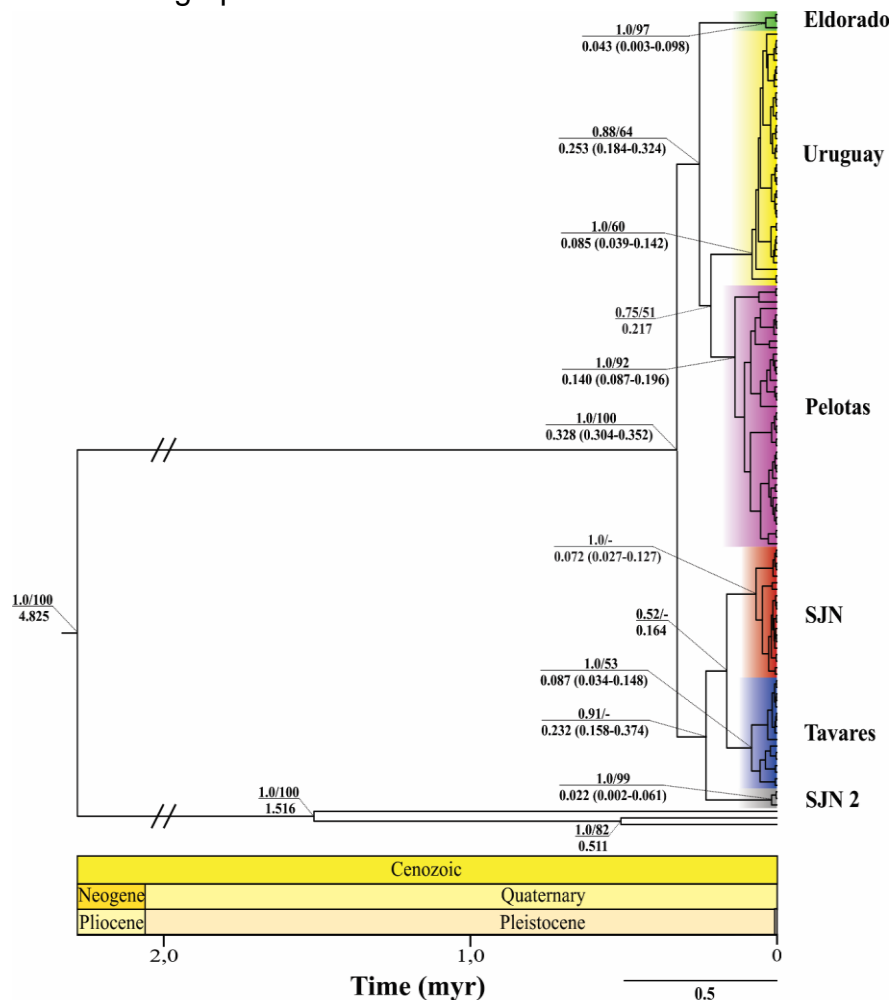


Figura 2. Árvore cronofilogenética bayesiana reconstruída com base nas 122 sequências de *cyt b* amostradas para *A. wolterstorffi*, enraizada com *A. nigrofasciatus*, *A. minuano* e *A. adloffii*. Os valores acima dos ramos internos representam os valores de suporte, dados por probabilidades posteriores e valores de bootstrap da análise BA e ML, respectivamente. Valores abaixo dos nós indicam estimativas do tempo de divergência, com o intervalo de densidade posterior (HPD) contendo 95% dos valores amostrados apresentados em parênteses. Grupos de populações foram representados por seus respectivos nomes e cores.

#### 4. CONCLUSÕES

*Austrolebias wolterstorffi* apresenta níveis significativamente altos de diferenciação genética entre as populações, com pelo menos seis grupos populacionais diferentes ao longo do sistema lagunar Patos-Mirim. Os padrões biogeográficos recuperados são altamente consistentes com os registros de mudanças paleogeoclimáticas que ocorreram ao longo da área habitada durante o Quaternário. Ressalta-se que a independência evolutiva sugerida para as seis linhagens evidencia a necessidade de estratégias de conservação independentes em cada uma das principais áreas abrangidas por este estudo.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTÁKOVÁ, V.; REICHARD, M.; JANKO, K., et al. Strong population genetic structuring in an annual fish, *Nothobranchius furzeri*, suggests multiple savannah refugia in southern Mozambique. **BMC Evolutionary Biology**, v.13, n.196, 2013.
- CAMARGO, C.; GIBBS, H.L.; COSTA, M.C.; DEL-RIO, G.; SILVEIRA, L.F.; WASKO, A.P.; FRANCISCO, M.R. Marshes as "Mountain Tops": Genetic analyses of the critically endangered São Paulo Marsh Antwren (Aves: Thamnophilidae). **PLOS ONE**, v.10, 2015.
- GARCÍA, G.; WLASIUK, G.; LESSA, E. High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.129, p.93-110, 2000.
- GARCÍA, G.; GUTIÉRREZ, V.; RÍOS, N.; DE SÁ, R.O. Comparative Phylogeographic Patterns in *Austrolebias* from Different South American Basins. In: BEROIS, N.; GARCÍA, G.; DE SÁ, R. O. **Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution**. Press Taylor & Francis group, 2015. Cap.15, p.259-279.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.
- SPRECHMANN, P. The paleoecology and paleogeography of the uruguayan coastal area during the neogene and quaternary. **Zitteliana**, v.4, p.3-72, 1978.
- SEMA. Secretaria Estadual de Meio Ambiente. **Reavaliação da Lista das Espécies da Fauna Silvestre Ameaçadas de Extinção no Rio Grande do Sul**. 2014. Acessado em 20 jun. 2017. Disponível em: [http://www.liv.fzb.rs.gov.br/livcpl/?idmodulo=1andid\\_uf=23](http://www.liv.fzb.rs.gov.br/livcpl/?idmodulo=1andid_uf=23)
- VILLWOCK, J.A.; TOMAZELLI, L.J. Planície Costeira do Rio Grande do Sul: gênese e paisagem atual. In: BECKER, F.G.; RAMOS, R.A.; MOURA, L.A. **Biodiversidade. Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, planície costeira do Rio Grande do Sul**. Ministério do Meio Ambiente/SBF, 2007, 388 pp.