



**UnB**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

**Diversidade, estrutura genética e história evolutiva  
do Pirá-Brasília (*Simpsonichthys boitonei*), uma  
espécie de peixe anual ameaçada de extinção  
endêmica do Distrito Federal**

**Thiago de Moura Amaral**

**Brasília**

**Outubro/2022**



**UnB**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Diversidade, estrutura genética e história evolutiva do Pirá-  
Brasília (*Simpsonichthys boitoni*), uma espécie de peixe  
anual ameaçada de extinção endêmica do Distrito Federal

Thiago de Moura Amaral

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Zoologia,  
Instituto de Ciências Biológicas, da  
Universidade de Brasília, como parte dos  
requisitos necessários à obtenção do título de  
Mestre em Zoologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Gimenes Giugliano

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

Brasília

Outubro/2022

Diversidade, estrutura genética e história evolutiva do Pirá-Brasília  
(*Simpsonichthys boitone*), uma espécie de peixe anual ameaçada de extinção  
endêmica do Distrito Federal

Thiago de Moura Amaral

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Gimenes Giugliano

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós graduação em Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zoologia.

Aprovada por

Dra. Lilian Gimenes Giugliano – UnB (Orientadora)

Dr. Antônio Jose Camillo de Aguiar – UnB (Membro Interno - Titular)

Dr. Rodrigo Augusto Torres – UFPE (Membro Externo – Titular)

Dr. Fábio Porto-Foresti – UNESP (Membro Externo – Suplente)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de alguma maneira para que eu pudesse realizar este trabalho.

À minha família por todo apoio financeiro e moral durante meus anos de estudo, principalmente à minha mãe Esther e à minha vó Nicinha.

À minha namorada, Camila Hime, pelo carinho, paciência e apoio emocional, presente em todos esses anos que caminhamos juntos.

À minha orientadora, professora Dra. Lilian Giugliano, por ter me orientado e dado suporte nas análises realizadas.

Ao professor Dr. Fernando Rodrigues, por ter me disponibilizado a ideia do projeto e por toda supervisão e suporte dado a mim durante a realização das minhas pesquisas desde a graduação.

Ao professor Dr. Renato Caparroz, pelo auxílio na montagem do genoma mitocondrial do Pirá-brasília.

Ao Dr. Pedro de Podestá, por ter me auxiliado nas saídas de campo para coletas de amostras.

À Taís Morais, pela revisão textual e ortográfica realizada no meu trabalho.

A todos do Laboratório de Genética e Biodiversidade que contribuíram de alguma maneira com o trabalho, em particular a Marcela que me ensinou as práticas laboratoriais, e ao técnico Fred, com o suporte material.

À CAPES e à FUB/UnB/DPG, pelo incentivo à pesquisa, por meio do apoio financeiro.

À FAP-DF, pelo recurso financeiro disponibilizado para a realização deste projeto de pesquisa (Processo No 00193-00000122/2019-68).

Ao Programa de Pós-graduação em Zoologia e à Universidade de Brasília, pela estrutura física e tecnológica que tornou possível a realização das pesquisas deste projeto, principalmente durante o período turbulento da pandemia de Covid-19.

Muito obrigado!

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT .....	viii
INTRODUÇÃO .....	1
Peixes anuais e família Rivulidae .....	1
Pirá-Brasília ( <i>Simpsonichthys boitonei</i> ).....	2
Abordagem genética em rivulídeos.....	3
Origem biogeográfica dos peixes anuais na América .....	6
Distribuição geográfica e filogenia dos rivulídeos .....	7
Objetivo geral.....	9
MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
Área de estudo e Amostragem .....	10
Extração do DNA .....	11
Marcadores microssatélites .....	11
Amplificação e Genotipagem dos locos.....	11
Análise de dados microssatélites .....	13
Análise de diversidade pelo gene mitocondrial COI.....	14
Montagem e anotação do DNA mitocondrial.....	15
Análises filogenéticas .....	15
Amplificação e sequenciamento do DNA .....	15
Análises de dados filogenéticos baseado em locos .....	16
Datação molecular da análise filogenética .....	16
Análise filogenética a partir do genoma mitocondrial .....	17
RESULTADOS .....	17
Análises de diversidade populacional .....	17
Análise filogenética e posição de <i>S. boitonei</i> .....	24
Tempo de divergência .....	25
Genoma Mitocondrial.....	26
Análise filogenética por genoma mitocondrial.....	28
DISCUSSÃO .....	30
Diversidade Genética das populações de <i>S. boitonei</i> .....	30
Considerações sobre a filogenia do grupo.....	33
Origem de Aplocheiloidei na América. ....	34
Origem de <i>Simpsonichthys boitonei</i> .....	36
CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38
ANEXOS.....	46

## RESUMO

Diversidade, estrutura genética e história evolutiva do Pirá-Brasília (*Simpsonichthys boitonei*), uma espécie de peixe anual ameaçada de extinção endêmica do Distrito Federal

Thiago de Moura Amaral

Orientadora: Lilian Gimenes Giugliano

Coorientador: Fernando Pacheco Rodrigues

Resumo da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Zoologia.

Os peixes anuais (*killifishes*), pertencentes à subordem Aplocheiloidei, possuem forte dimorfismo sexual e são caracterizados por estarem presentes apenas em um período do ano, durante a ocorrência de poças sazonais. A família Rivulidae, uma das maiores da ordem Cyprinodontiformes, é encontrada no continente americano e tem sofrido nos últimos anos perdas de habitat devido à atividade humana. *Simpsonichthys boitonei*, conhecido como Pirá-brasília, é uma espécie de rivulídeo endêmico do Distrito Federal, que se encontra presente em lagoas temporárias no período chuvoso do Cerrado. Até o momento, não havia estudos que explorassem a genética desta espécie, atualmente ameaçada e isolada em pontos específicos da região. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de *Simpsonichthys boitonei*, bem como observar sua relação filogenética e biogeográfica com outras espécies do mesmo grupo taxonômico pelo uso de marcadores genéticos mitocondriais e nucleares. Para isso, foram utilizadas amostras de indivíduos coletados nas duas populações conhecidas, localizadas em brejos próximos aos córregos Guará e Taquara. A partir da extração de DNA das amostras foi realizado o sequenciamento e a genotipagem de locos nucleares e mitocondriais, bem como a montagem e anotação

do genoma mitocondrial completo de *S. boitonei*. Por meio da genotipagem de locos microssatélites, foram realizadas análises de diversidade genética nas duas populações conhecidas, em que se demonstrou uma redução populacional recente e uma diferença genética significativa entre elas. A partir da montagem do genoma mitocondrial completo de *S. boitonei*, foi realizada uma análise filogenética utilizando mitogenomas de espécies próximas encontradas no Genbank. Trata-se do primeiro trabalho a avaliar a filogenia da ordem Cyprinodontiformes com base no genoma mitocondrial completo. Os locos sequenciados foram utilizados para a realização de análises filogenéticas, que possibilitaram apontar a posição filogenética de *S. boitonei*, bem como revisar a filogenia e discutir a biogeografia histórica dos grupos aos quais ela pertence.

Palavras-chaves: *Simpsonichthys boitonei*; diversidade genética; marcadores microssatélites; análise filogenética; genoma mitocondrial; biogeografia.

Brasília

Outubro/2022

## ABSTRACT

Diversity, genetic structure and evolutionary history of Pirá-Brasília (*Simpsonichthys boitonei*), an endangered annual fish species endemic to Distrito Federal, Brazil

Thiago de Moura Amaral

Advisor: Lilian Gimenes Giugliano

Co-advisor: Fernando Pacheco Rodrigues

Abstract for the Master's thesis presented to the Postgraduate Zoology Program, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, as part of the necessary requirements to obtain the Master's Degree in Zoology.

Annual fishes (killifishes) from the suborder Aplocheiloidei have strong sexual dimorphism and they are characterized by being present only in one period of the year during the occurrence of seasonal wetlands. The Rivulidae family, one of the largest in the Cyprinodontiformes order, is found on American continent and has suffered in recent years habitat loss due to human activity. *Simpsonichthys boitonei*, known as Pirá-brasília, is a rivulid specie endemic to Distrito Federal, which is present in temporary ponds while the rainy season of the Cerrado. Until now, there were no studies that explored the genetics of this specie that is currently threatened and isolated in specific points of the region. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of *S. boitonei*, as well as to observe its phylogenetic and biogeographic relationship with other species from the same taxonomic group based on mitochondrial and nuclear genetic markers. Samples of individuals collected in the two known populations, located in temporary swamps near the Guará and Taquara streams, were used to this purpose. After extracting DNA from the samples, nuclear and mitochondrial *loci* sequencing and genotyping were conducted, along with the assembly and annotation of the complete mitochondrial genome of *S. boitonei*. Microsatellite genotyping and genetic diversity analyzes were performed in the two known populations, in which a recent population reduction and a significant genetic

difference between them was demonstrated. After the assembly of the complete mitochondrial genome of *S. boitonei*, phylogenetic analysis was done using mitogenomes of closely related species found in Genbank. This is the first effort that evaluated the phylogeny of the Cyprinodontiformes order based on the complete mitochondrial genome. The sequenced *loci* were used to perform phylogenetic analyses, which made it possible to get strong support for the phylogenetic position of *S. boitonei*, as well as to review the phylogeny and to discuss the biogeographic history of the groups to which it belongs.

Keywords: *Simpsonichthys boitonei*; genetic diversity; microsatellite markers; mitochondrial genome; biogeography.

Brasília

October/2022

# INTRODUÇÃO

## Peixes anuais e família Rivulidae

Os peixes anuais (*killifishes*) pertencem majoritariamente à subordem Aplocheiloidei, da ordem Cyprinodontiformes (Costa, 2013). Esta subordem é composta por aproximadamente 620 espécies de peixes de água doce que se encontram em regiões tropicais e subtropicais das Américas, África e sudeste Asiático (Berois *et al.*, 2017). Uma característica marcante desse grupo é o evidente dimorfismo sexual que muitas espécies apresentam, com machos mais compridos e padrão de cores brilhantes (Berois *et al.*, 2015). A família Rivulidae, uma das maiores da ordem Cyprinodontiformes, é encontrada no continente americano e inclui 367 espécies distribuídas em 38 gêneros (Ponzetto *et al.*, 2016). Os rivulídeos apresentam pequeno tamanho corporal (máximo 200 mm) e muitos possuem um ciclo de vida anual (Loureiro *et al.*, 2018). Este ciclo pode ser descrito pela sobrevivência em formações de águas rasas e sazonais (como riachos ou brejos), que se encontram presentes apenas em uma parte do ano, e pela postura de ovos com córion rígido capazes de passar por diapausas no desenvolvimento embrionário (Hrbek e Larson, 1999; ICMBio, 2013).

Nas últimas décadas, os rivulídeos têm sofrido perdas de habitat e ameaças a integridade de suas espécies por conta da intensa destruição das lagoas temporárias em áreas ocupadas pela agropecuária, bem como pelo desmatamento, drenagem e aterros decorrentes do processo de urbanização, além da implantação de barragens, açudes e rodovias (ICMBio, 2013). Outro fator que tem contribuído para a redução de suas populações é a retirada de exemplares da natureza para sua comercialização como peixes ornamentais, em razão da valorização dada à diversidade de cores e morfologias presentes nos machos das espécies. Em 2008, 52 espécies de peixes rivulídeos foram listados pelo Ministério do Meio Ambiente, no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção como ameaçados de extinção no Brasil (Machado *et al.*, 2008). Em 2011, uma nova avaliação realizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), agora com 132 espécies, mostrou que todas elas sofrem algum grau de ameaça de acordo com os critérios adotados pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN).

*Simpsonichthys* é um gênero pertencente a família Rivulidae que pode ser encontrado em uma vasta área geográfica na América do Sul. Com tamanho corporal diminuto, todas as espécies pertencentes ao grupo possuem ciclo anual de vida (Costa, 2007). Na região central do Brasil, encontram-se diversas espécies endêmicas: *S. boitonei*, *S. punctulatus*, *S. zonatus*, *S. santanae*, *S. parallelus* e *S. cholopteryx* (Costa e Brasil, 2006; Costa e Brasil, 2007).

### **Pirá-Brasília (*Simpsonichthys boitonei*)**

Conhecida popularmente como Pirá-Brasília, *Simpsonichthys boitonei* é uma espécie rara e endêmica do Distrito Federal que possui forte dimorfismo sexual e dieta onívora baseada em microcrustáceos, insetos e algas (Shibatta, 2005). Uma característica notável da espécie é a ausência da nadadeira pélvica. Além disso, diferencia-se de espécies próximas (*S. parallelus* e *S. cholopteryx*) pela sua nadadeira dorsal ser mais projetada anteriormente do que a nadadeira anal (Ramos, 2010). Os machos possuem o corpo avermelhado com manchas pontilhadas em tom azulado, enquanto as fêmeas possuem uma coloração clara e rajada em castanho, com uma ou duas manchas escura no centro do corpo (Figura 1).



Figura 1. Macho (à esquerda) e fêmea (à direita) da espécie Pirá-Brasília (*S. boitonei*), coletados na Reserva Biológica do Guará. Fotos de Pedro de Podestá.

O Pirá-Brasília, assim como todas as espécies de *Simpsonichthys*, apresenta ciclo de vida anual, tendo como habitat natural poças de água temporárias formadas pelas chuvas. O Cerrado apresenta um período chuvoso normalmente entre novembro a junho, e durante este tempo ocorre o período reprodutivo da espécie. Como

observado por Shibatta (2006), o macho corteja a fêmea pelas vibrações do seu corpo, que causam variações de coloração corporal entre vermelho e azul, atraindo a fêmea e a conduzindo até o substrato lamacento, onde eles se enterram e a fêmea é induzida a depositar os ovos. Com a seca prevalecendo entre julho e novembro, os peixes adultos morrem, restando nessas áreas apenas os ovos em diapausa, enterrados no substrato. Com a chegada novamente das chuvas, as poças retornam, os ovos eclodem e os alevinos desenvolvem-se rapidamente até a fase adulta reprodutiva (em cerca de dois meses), dando assim continuidade ao ciclo de vida da espécie (Shibatta, 2005).

Os primeiros espécimes de Pirá-brasília foram coletados durante a construção de Brasília por *de* Carvalho em 1959, dando origem à descrição do gênero e da espécie. Esses primeiros exemplares foram coletados em uma área de alagamento sazonal na zona de drenagem do córrego Riacho Fundo, onde atualmente se encontra o Zoológico de Brasília. A última vez que a espécie foi registrada em sua localidade tipo foi em 1976, com alguns relatos isolados de sua coleta próximos à essa área no fim da década de 70 e início da década de 80 (Costa e Brasil 2006; Costa 2007). Em 1994, o Pirá-brasília foi utilizado como bandeira para a criação de um plano de manejo com o fim de preservar espécies do Santuário de Vida Silvestre do Riacho Fundo, localizado próximo às áreas do Zoológico de Brasília, no entanto não houveram mais registros da população neste local nos anos posteriores.

Atualmente a espécie é considerada ameaçada de extinção e recentemente, em junho deste ano, sua situação de conservação foi reclassificada de vulnerável para criticamente em perigo (CR) (IUCN, 2021; MMA, 2014; MMA 2022). Sua distribuição geográfica limita-se à porção sul da bacia do Paranoá, com populações conhecidas próximas ao córrego Taquara (presente na Estação Ecológica do Jardim Botânico e na Reserva Biológica do IBGE), e ao córrego Guará (presente na Reserva Biológica do Guará).

### **Abordagem genética em rivulídeos**

Foram poucos os estudos genéticos realizados até agora com peixes anuais pertencentes à família Rivulidae. Entre estes, a maioria envolve o estudo das relações filogenéticas entre as espécies (García *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2014a; García *et al.*,

2014; Ponzetto *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017). Garcia *et al.* (2000) utilizaram o gene mitocondrial citocromo c oxidase I (COI) para avaliar as relações filogenéticas do gênero *Cynolebias*, e revisar sua validade taxonômica, sendo uma das primeiras análises genéticas para avaliar relações ao nível de gênero. Costa *et al.* (2014) realizaram uma análise filogenética sobre as populações conhecidas do gênero *Hypsolebias*, a partir de sequências do gene citocromo b, em que foi possível responder questões sobre a validade e distribuição geográfica do gênero. Garcia e Gutiérrez (2014) demonstraram em uma análise citogenética o tamanho anormalmente grande do genoma de espécies do gênero *Austrolebias*, bem como analisaram a filogenia deste grupo baseado em sequências do gene mitocondrial citocromo b. Ponzetto *et al.* (2016) testaram a validade da classificação, feita previamente com base em morfologia, de recentes gêneros originados de subgêneros de *Simpsonichthys* por meio de uma análise filogenética a partir dos genes mitocondriais ATPase 6 e 8, levantando uma discussão sobre o posicionamento das espécies nestes gêneros. Finalmente, Costa *et al.* (2017), em um dos trabalhos filogenéticos mais recentes para espécies de Rivulidae, retificaram a validade dos gêneros da tribo Cynolebiini, entre os quais se encontra presente o gênero *Simpsonichthys*, assim como discutiram o passado biogeográfico do grupo na América do Sul.

Fora os trabalhos de análise filogenética, houveram também trabalhos sobre filogeografia (García, 2006), diferenciação genética entre populações (Guerrero-Jiménez *et al.*, 2017), delimitação de espécies e identificação molecular por DNA *barcode* (Costa *et al.*, 2014b), isolamento e caracterização de marcadores microssatélites (G. García *et al.*, 2014), análise citogenética (Nascimento *et al.*, 2014) e descrição do genoma mitocondrial (Gutiérrez *et al.*, 2015)

Até o momento não há estudos publicados que explorem a genética do *S. boitonei*. Por constituir-se de pequenas populações isoladas, essa espécie pode ser útil para o estudo das alterações genéticas causadas pelo isolamento populacional. Com a redução e o isolamento das populações, estas tornam-se mais propensas a sofrer efeitos negativos oriundos de fenômenos ambientais, genéticos e demográficos (Fahrig, 2003; Frankham *et al.*, 2010). Além de contribuir para o entendimento do impacto de mecanismos evolutivos sobre populações pequenas, o estudo genético da espécie pode revelar a sua atual diversidade genética, assim como o grau de

conservação das populações existentes. A partir dessas análises é possível obter dados relevantes para realização de projetos de conservação para a espécie, uma medida necessária e urgente, visto o desaparecimento de suas populações nas regiões do Distrito Federal anteriormente ocupadas por ela.

Populações isoladas e fragmentadas tendem a ter tamanho populacional reduzido, o que leva a maiores chances de perdas em sua variabilidade genética (Fahrig, 2003). O processo de deriva genética, em que alelos são fixados ou eliminados durante a passagem de genes pelas gerações, tem mais força sobre pequenas populações, o que as leva à perda de diversidade genética e de potencial adaptativo (Allendorf *et al.*, 2022). A probabilidade de reprodução entre indivíduos aparentados também aumenta nessas condições, favorecendo a ocorrência do fenômeno conhecido como depressão endogâmica, que também reduz as chances de sobrevivência de indivíduos da população (Charlesworth & Willis, 2009).

Os possíveis efeitos da deriva genética e da endogamia sobre as populações podem ser analisados utilizando marcadores moleculares, que permitem identificar diferenças genéticas entre organismos, que nem sempre são visíveis ao nível fenotípico (Marwal e Gaur, 2020). Entre os marcadores genéticos mais utilizados para análise de estruturação genética populacional, encontram-se os marcadores do tipo microssatélite. Por geralmente apresentar alto polimorfismo, ter característica codominante, ter uma taxa de mutação maior que outras regiões do DNA e ser facilmente detectado pela técnica de PCR, os marcadores microssatélites são extremamente úteis para o estudo de indivíduos e populações, bem como para a avaliação da estrutura genética a elas associadas (Solé-Cava, 2001, Abdul-Muneer, 2014).

Por muito tempo o custo elevado das metodologias utilizadas em análises moleculares foi considerado um fator que desestimulou seu uso em estudos de diversidade populacional. No entanto, as novas tecnologias de sequenciamento de DNA desenvolvidas nos últimos anos têm permitido sequenciar genomas com maior velocidade que métodos tradicionais e com um custo menor (Shendure *et al.*, 2011). Conhecidos como Sequenciamento de Nova Geração (NGS), esses novos métodos sequenciam várias regiões do genoma simultaneamente, formando uma biblioteca de fragmentos que, ao serem combinados a partir de análises computacionais, podem resultar no genoma completo (Van Dijk, 2014).

É importante ressaltar que os dados genéticos obtidos em análises de diversidade populacional podem contribuir também para as avaliações de risco de extinção de espécies. Atualmente, as avaliações sobre o estado de conservação de espécies apresentadas na Lista Vermelha da IUCN, as quais o ICMBio utiliza como referência para suas avaliações (ICMBio, 2013), levam em conta critérios quantitativos sobre o tamanho populacional, número de indivíduos maduros, área de ocupação e fragmentação das populações de uma espécie (IUCN, 2022). No entanto estas avaliações raramente consideram os fatores genéticos (Laikre, 2009). A partir das informações genéticas, como o tamanho estimado populacional ( $N_e$ ) e perdas na heterosigiosidade esperada, é possível identificar riscos de redução no tamanho e diversidade populacional, que não seriam observados em dados demográficos (Garner *et al.*, 2020).

### **Origem biogeográfica dos peixes anuais na América**

Os peixes anuais da subordem Aplocheiloidei se subdividem em três famílias: Aplocheilidae, encontrado na Ásia; Nothobranchiidae; grupo endêmico da África Subsariana; e Rivulidae, endêmico da América Central e do Sul (Costa, 2004). O padrão de distribuição biogeográfica desse último grupo para o continente americano tem sido foco de discussão de muitos estudos filogenéticos nas últimas décadas. Alguns autores mostraram-se a favor da teoria de distribuição por vicariância durante a quebra do supercontinente Gondwana, no período Cretáceo (Parenti, 1981; Murphy & Collier, 1997; Costa, 2013); e outros defenderam uma distribuição mais tardia (Eoceno) a partir de uma dispersão transoceânica (Briggs, 2003; Lundberg, 1993).

Costa (2013) combinou dados morfológicos e moleculares para analisar a filogenia e as distribuições biogeográficas de Aplocheiloidei. Os resultados apontaram esta subordem como monofilética e corroboraram a teoria da vicariância, indicando que a família Rivulidae se originou por volta de 100 milhões de anos atrás (Maa), simultaneamente com a separação da América do Sul e África, na quebra do supercontinente Gondwana. No entanto, outro estudo mais recente do mesmo autor (Costa *et al.* 2017), em que a datação foi realizada por meio de análise de fósseis, a divergência dos clados obtidos pela análise filogenética molecular contrariou a teoria da vicariância, apontando a distribuição da subordem Aplocheiloidei para a América

como um evento de dispersão ocorrido no Eoceno (aprox. 50 Maa). Evidencia-se, deste modo, a incerteza quanto à origem biogeográfica dos representantes sul-americanos dos peixes anuais.

### **Distribuição geográfica e filogenia dos rivulídeos**

Rivulidae é uma das maiores famílias de peixe de água doce de regiões neotropicais (Reis *et al.*, 2003), compreendendo 3 principais subfamílias: Cynolebiinae Hoedeman 1961; Rivulinae Myers 1925; e Kryptolebiatinae Costa 2004. Cynolebiinae é o grupo mais diverso e amplamente distribuído na América do Sul, sendo composto pelos seguintes gêneros principais: *Austrolebias*, *Campellolebias*, *Cynopoecilus*, *Cynolebias*, *Leptolebias*, *Nematolebias*, *Notholebias*, *Mucurilebias*, *Simpsonichthys*, *Hypsolebias*, *Ophthalmolebias*, *Spectrolebias*, *Xenurolebias*; com os 4 últimos sendo gêneros novos originados de *Simpsonichthys* (Costa, 2010; Ponzetto *et al.*, 2016).

A distribuição dos rivulídeos pela América do Sul se deu por um conjunto de eventos de vicariância e dispersão. Uma barreira geográfica proveniente da formação da margem continental passiva da América do Sul após sua separação da África causou a divergência basal das subfamílias Rivulinae e Cynolebiinae (40 Maa), isolando-as, respectivamente, na região amazônica e na região leste do Brasil (Costa, 2013). A partir disso, *Cynolebiinae* passou por uma série de eventos de dispersão: para as planícies amazônicas (aprox. 17 Maa), onde deu origem ao gênero *Spectrolebias*; em seguida para diversos planaltos internos do Brasil (12-14 Maa), atuais regiões de Caatinga, Cerrado e Pampas, onde formaram-se os gêneros *Hypsolebias* e *Cynolebias*, *Simpsonichthys*, e *Austrolebias*, respectivamente (Costa *et al.*, 2017).

A Classificação de *Simpsonichthys*, *Hypsolebias*, *Ophthalmolebias*, *Spectrolebias*, *Xenurolebias* como gêneros independentes é recente e foi inicialmente considerada por Costa (2010). Porém, esses táxons, antes inseridos como subgêneros de *Simpsonichthys*, não se encontram bem estruturados, visto que há presença de inconsistências filogenéticas. Amorim (2014), a partir de análises filogenéticas baseadas em genes mitocondriais e nucleares, obteve resultados que corroboraram o monofiletismo desses gêneros, com exceção de *Hypsolebias*, que foi dividido em dois grupos. Outro estudo filogenético de Ponzetto (2016), também

baseado em genes mitocondriais, apontou, além de *Hypsolebias*, os gêneros *Simpsonichthys* e *Spectrolebias* como táxons parafiléticos. Em contraposto, Costa *et al.* (2017), utilizando diferentes genes mitocondriais, demonstrou resultados que corroboram a monofilia de *Simpsonichthys* e *Hypsolebias*. A incongruência presente nesses estudos demonstra a necessidade de mais trabalhos envolvendo a filogenia desses gêneros.

Neste estudo foi proposto a utilização de diferentes abordagens genéticas para acessar a diversidade, estrutura genética e história evolutiva do Pirá-Brasília (*S. boitonei*), uma espécie endêmica do Cerrado. Para tanto, marcadores moleculares mitocondriais e nucleares foram utilizados para:

a) Avaliar como a fragmentação e o isolamento populacional do Pirá-Brasília atua sobre a diversidade e estrutura genética de suas populações. Para isso, foram utilizados marcadores moleculares do tipo microssatélites isolados para a espécie, para estudar a diversidade e estrutura genética em populações de *S. boitonei* em unidades de conservação localizadas no Distrito Federal. Além dos marcadores microssatélites, foi utilizado também nessa avaliação o gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI);

b) Avaliar a posição filogenética e o tempo de divergência do Pirá-Brasília em relação à outras espécies/gêneros de peixes anuais presentes nas regiões tropical e subtropical da América do Sul, correlacionando a topologia encontrada nas árvores filogenéticas com os processos históricos que levaram à formação do platô do Brasil Central e com a dinâmica da vegetação no bioma Cerrado. Para tanto, as amostras de *S. boitonei* foram analisadas a partir do sequenciamento de dois genes mitocondriais e quatro genes nucleares, os quais foram utilizados em conjunto com sequências já depositadas no banco de sequências GenBank para a reconstrução de árvores filogenéticas;

c) Investigar a biogeografia histórica e o tempo de divergência entre as espécies no Novo Mundo (incluindo *S. boitonei*) e as espécies do Velho Mundo. Também foram utilizados dois genes mitocondriais e quatro genes nucleares, sendo analisados em conjunto com sequências já disponíveis no GenBank;

d) Avaliar a performance da utilização do mitogenoma de *S. boitonei* para a resolução filogenética em diferentes níveis taxonômicos. Para isso, foi descrito o

genoma mitocondrial completo de *S. boitonei*, para comparar sua estrutura com o mitogenoma de outras espécies de peixes Cyprinodontiformes, e desenvolver uma árvore filogenética a partir dos mitogenomas disponíveis.

Com base nas análises aqui propostas geramos informações que preenchem algumas lacunas de conhecimento apresentadas acima, contribuindo para que políticas públicas mais efetivas possam ser estabelecidas para a conservação não apenas do Pirá-Brasília, mas de toda a biodiversidade presente no Cerrado.

### **Objetivo geral**

- Avaliar a diversidade genética de *S. boitonei*, analisar a estrutura genética de suas populações, bem como observar sua relação filogenética e biogeográfica com outras espécies do mesmo grupo taxonômico com base no uso de marcadores genéticos mitocondriais e nucleares.

### **Objetivos específicos**

- Analisar a diversidade genética existente em *S. boitonei* pelo uso de marcadores mitocondriais e microssatélites, visando uma melhor compreensão sobre a diversidade genética de suas populações.
- Analisar a estruturação/diferenciação genética existente entre as populações de *S. boitonei* a partir do uso de marcadores microssatélites e do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI), visando a avaliação dos impactos que o isolamento populacional (natural ou ocasionado pela ocupação humana de seu habitat) pode exercer sobre a estrutura genética de suas populações;
- Avaliar com base nas análises filogenéticas utilizando sequências de genes mitocondriais e nucleares a posição de *S. boitonei* dentro das filogenias já conhecidas e correlacionando o tempo de divergência entre os diferentes táxons estudados com eventos históricos ocorridos durante a separação do supercontinente Gondwana e eventos posteriores ocorridos no continente americano.
- Descrever o genoma mitocondrial de *S. boitonei* e utilizá-lo em análises filogenéticas posteriores.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Área de estudo e Amostragem

Atualmente existem dois locais conhecidos em que há a presença de populações de *S. boiotnei*, ambos no Distrito Federal: Córrego do Guará, localizado na Reserva Biológica do Guará (população Guará - coordenadas 15°48'27.6"S 47°58'33.0"W); e Córrego Taquara, localizado nas Estações Ecológicas do IBGE e do Jardim Botânico (população Jardim Botânico - coordenadas 15°55'38.8"S 47°54'11.4"W) (Figuras 2 e 3). As amostras utilizadas neste trabalho baseiam-se em coletadas realizadas nesses locais nos anos de 2014, 2016 e 2021.

Em fevereiro de 2014, foram coletados tecidos de 9 indivíduos no córrego Guará, no entanto foi possível extrair o DNA de apenas 2 amostras. Já em junho de 2016, as coletas foram realizadas no Córrego Taquara, obtendo-se um total de tecidos de 11 indivíduos, em que 8 amostras tiveram sucesso na extração. Por fim, em julho de 2021 ambos os córregos foram revisitados, nos quais se coletaram 11 indivíduos do córrego Taquara e 10 do córrego Guará. Nesta última coleta foi possível extrair com sucesso o DNA de todas as amostras.



Figura 2 Área do Distrito Federal em que se encontra as populações de *S. boiotnei*. Pontos representam as populações. As manchas urbanas e a poluição que essas ocasionam nos lagos e rios são barreiras que ameaçam as populações atuais e as isolam. Imagens de satélites retiradas do Google Earth.



Figura 3. Local de coleta das amostras na Reserva Biológica do Guará. Poças que se formam em períodos de chuva (brejo).

### **Extração do DNA**

A extração de DNA das amostras foi realizada utilizando o kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, o total de DNA nas amostras foi quantificado por espectrofotometria de massa. Em seguida, cada amostra foi diluída para as concentrações de 10 ng/μl e 25 ng/μl, para análises de sequenciamento e genotipagem, respectivamente.

### **Marcadores microssatélites**

#### ***Amplificação e Genotipagem dos locos***

Para a realização das análises de diversidade e estruturação genética das populações, foram selecionados 13 locos de microssatélites previamente isolados e caracterizados por Martins (2019). Tais locos foram obtidos por meio da metodologia de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS), utilizando o equipamento Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, California, USA).

Os locos de microssatélites passaram por amplificação utilizando-se PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a partir do protocolo de Schuelke (2000), em que se utiliza três iniciadores (iniciador *forward* sintetizado com cauda universal, iniciador *reverse*, e cauda universal marcada com fluoróforo), e da metodologia multiplex proposto por Vartia *et al.* (2014). Foram utilizadas três diferentes caudas universais marcadas com diferentes fluoróforos: Hill: TGACCGGCAGCAAATTG marcada com FAM; *Neomycin\_rev.* AGGTGAGATGACAGGAGATC marcada com CAL Fluor Orange 560; e M13 (-21): TGTAACGACGGCCAGT marcada com NED. Este método permite a amplificação de vários locos simultaneamente por meio da combinação dos diferentes fluoróforos com os tamanhos dos marcadores selecionados. Por meio disso, acelera-se os processos de caracterização dos locos desenvolvidos e de genotipagem das amostras, como também ajuda a reduzir custos de materiais.

As PCRs multiplex foram realizadas por meio do kit de PCR multiplex da Qiagen (Qiagen Multiplex PCR Kit) em uma solução final de 15 µL contendo 35,5 ng de DNA, 1x Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), 0,05 µM de cada iniciador *forward* modificado com a cauda específica, 0,2 µM de cada iniciador *reverse*, 0,2 µM de cauda universal marcada com fluoróforo para cada iniciador *forward* modificado. As soluções passaram pelas seguintes temperaturas no termociclador: 95°C por 15 minutos seguido por 30 ciclos a 94°C por 30s, 56°C por 90s e 72°C por 60s, seguidos de 8 ciclos de 94°C por 30s, 53°C por 90s e 72°C por 60s, e finalmente 72°C por 30 minutos. Em seguida, verificou-se o sucesso da amplificação por meio de uma eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

Posteriormente à amplificação, as amostras foram preparadas para genotipagem em uma solução contendo 2,0 µL de produto do PCR multiplex, 7,6 µL de formamida e 0,4 µL do marcador de peso molecular GeneScan 500 ROX (Applied Biosystems), sendo posteriormente desnaturada à 95°C por 5 minutos e analisada em eletroforese capilar no sequenciador ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas gerados foram analisados utilizando o software GENEIOUS 6.1.6, por meio do qual se avaliou o tamanho dos alelos encontrados para cada um dos locos.

## **Análise de dados microssatélites**

A ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos utilizados foi avaliada pelo teste para desequilíbrio genotípico implementado no programa Genepop 4.3 (Rousset, 2008). A diversidade genética para o conjunto total de amostras e para cada uma das localidades foi medida utilizando-se os programas FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001) e Genepop (Rousset, 2008). Vários índices foram calculados, incluindo o número de alelos por loco ( $A$ ) e sua média, a heterozigosidade esperada (diversidade gênica  $H_E$ ) (Nei, 1987), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), riqueza alélica ( $AR$ ) e o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) (Weir e Cockerham, 1984). Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram avaliados a partir do programa Genepop por meio do teste de deficiência de heterozigosidade. Testes múltiplos passaram por correções utilizando a metodologia de Bonferroni (Rice, 1989).

O programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) foi utilizado para avaliar a ocorrência de alelos nulos, *allele dropout* e erros de genotipagens. A frequência de alelos nulos ( $r$ ) foi calculada para cada loco e população mediante uma estimativa de máxima verossimilhança (Dempster *et al.*, 1977) pelo do programa FREENA (Chapuis e Stoup, 2007).

Para testar a redução recente no tamanho efetivo populacional foi utilizado o programa Bottleneck 1.2.02 (Piry *et al.*, 1999), adotando-se o modelo de mutação em duas fases (*two-phase mutation model*, TPM) com diferentes porcentagens de mutação passo-a-passo (SMM), por ser a melhor abordagem para uma análise baseada em microssatélites, conforme recomendação dos autores do programa, e avaliando a significância estatística dos resultados obtidos pelo teste de postos sinalizados de Wilcoxon (*Wilcoxon signedrank test*). O programa Ne Estimator v 2.1 (Do *et al.*, 2014) foi utilizado para estimar o tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) para cada uma das populações, a partir do método de desequilíbrio de ligação.

A diferenciação genética entre as populações amostradas foi realizada utilizando a estatística  $F$  (Weir & Cockerham, 1984) e a metodologia Bayesiana (Beaumont, 2002). Para a diferenciação por estatística  $F$  utilizou-se o estimador de Weir e Cockerham (1984) para  $F_{ST}$  ( $\theta$ ) pelo do programa Genepop 4.3 (Rousset, 2008), enquanto que as análises Bayesianas foram feitas utilizando o programa

Structure 2.3.4, com o qual foi possível determinar o número de agrupamentos genéticos mais provável (K) e também obter a probabilidade de atribuição dos indivíduos analisados aos diferentes agrupamentos populacionais inferidos (Pritchard *et al.*, 2000). A análise foi realizada baseada na premissa de que as populações têm uma ancestralidade comum e que suas frequências alélicas são correlacionadas, além disso foi utilizado um Burn-in de 10.000 e um MCMC de 100.000, com 10 interações para cada K (1,2,3 ou 4). Após obtidos os resultados brutos no programa Structure, o programa de *Web Structure Harvester* v0.6.94 (Earl *et al.*, 2012) foi utilizado para identificar o número provável de agrupamentos por meio do método de Evanno *et al.* (2005).

### **Análise de diversidade pelo gene mitocondrial COI**

A fim de complementar as análises de diversidade, foi utilizado o sequenciamento de fragmentos do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) de cada indivíduo das amostras das populações do Guará e do Jardim Botânico. Os iniciadores e o protocolo de referência para a amplificação do gene pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram extraídos do trabalho de Costa *et al.* (2017). O procedimento para amplificação e sequenciamento deste gene mitocondrial é detalhado no subtópico “Amplificação e sequenciamento do DNA” de “Análises Filogenéticas”, presente no Material e Métodos deste trabalho.

As sequências brutas resultantes do sequenciamento foram verificadas e manipuladas por meio dos programas BioEdit (Hall, 1999) e MEGAX (Kumar, 2018), em que se fez o alinhamento das sequências Forward e Reverse de cada gene para obter uma sequência consenso. Em seguida, foi realizado o alinhamento das sequências consenso no conjunto de amostras, e aparou-se as extremidades das sequências de forma a deixar todos os fragmentos com mesmo tamanho. Após esses procedimentos, análises de diversidade genética puderam ser realizadas, sendo os índices de diversidade obtidos pelo programa DNASP v6 (Rozas *et al.*, 2017).

Embora o gene COI possua uma taxa de mutação mais lenta e seja normalmente utilizado para análises de diferenciação interespecífica (Ward *et al.*, 2009), optou-se por utilizá-lo neste trabalho a fim verificar a possível existência de sinal de divisão entre as populações. Esta escolha levou em consideração o isolamento ambiental que as populações de *S. boitonei* apresentam, bem como

peculiaridades biológicas desta espécie, principalmente em virtude de seu ciclo de vida anual.

### **Montagem e anotação do DNA mitocondrial**

Sequências do DNA mitocondrial também foram obtidas por meio da metodologia NGS como subproduto do trabalho desenvolvido por Martins (2019), realizado para o isolamento dos locos microssatélites para *S. boitonei* a partir de uma das amostras coletadas na Estação Ecológica do Jardim Botânico em 2016. Os fragmentos de leitura foram alinhados com o mitogenoma de referência da espécie *Austrolebias charrua* (Genbank ACN KP718940) por meio do programa *Geneious Prime 2020*. A anotação dos genes foi realizada no mesmo programa usando o mitogenoma de referência como base e aplicando ajustes manuais a partir de informações provenientes das plataformas Web MITOS (Bernt *et al.*, 2013) e MitoAnnotator (Sato *et al.*, 2018). Usando como referência os resultados do trabalho de Satoh (2016), foi verificado se os códons de início e fim dos genes codantes encontrados se equiparam aos de maior frequência em 250 mitogenomas de peixes de diferentes ordens. O programa MITOS também foi utilizado para se observar as estruturas secundárias dos RNAs transportadores presentes.

### **Análises filogenéticas**

#### **Amplificação e sequenciamento do DNA**

Para fins de análises filogenéticas, foram utilizadas sequências parciais dos genes mitocondriais RNA ribossômico 16S e citocromo c oxidase subunidade I (COI); e dos genes nucleares córtex neural ectodérmico 1 (ENC1), transportador de glicina do tipo 1 (GLYT1), rodopsina (RHO) e domínio proteico SH3-PX 3 (SH3PX3). Os iniciadores e o protocolo de referência para a amplificação dos genes pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram extraídos do trabalho de Costa *et al.* (2017). A solução utilizada na PCR continha 1x de Tampão de Reação de DNA Polimerase (Invitrogen); 0,5 U de Taq Polimerase; 2  $\mu$ M de MgCL<sub>2</sub>; 0,2  $\mu$ M de cada iniciador (*forward* e *reverse*); 30 ng de DNA genômico; e 0,2 mM de cada dNTP, em um volume final de 15  $\mu$ l após diluição em água MiliQ. A configuração de temperaturas no termociclador foi de, inicialmente, 1 ciclo à 94°C por 5 min; em seguida 35 ciclos

de 1 min em 92°C, 1 min em 56°C e 1 min em 72°C, respectivamente; e por fim, 1 ciclo à 72°C por 10 min. Após a verificação dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose, estes foram purificados para remoção de iniciadores e dNTPs restantes por meio de uma mistura com as enzimas Exonuclease I (EXO1) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP). Após a purificação, as amostras foram sequenciadas por meio do Sequenciador Genetic Analyzer 3130 utilizando o método Sanger (1977).

### ***Análises de dados filogenéticos baseado em locos***

Os genes amplificados de uma das amostras de *S. boitonei* foram adicionados ao conjunto de dados já analisados no trabalho de Costa *et al.* (2017), que consistiu na análise filogenética de 54 espécies, sendo 35 do grupo Cynolebiini. Realizou-se o alinhamento do conjunto de sequências para cada gene usando o programa MEGA X (Kumar, 2018) por meio da ferramenta ClustalW (Thompson *et al.*, 2003). As extremidades de cada sequência no alinhamento foram removidas de modo a aproximar os tamanhos de fragmentos entre as espécies. Em seguida, os locos foram concatenados para a realização da análise filogenética. O programa BEAST versão 1.10.4 (Suchard *et al.*, 2018) foi usado para as análises filogenéticas baseada na inferência bayesiana, com MCMC de 10 milhões de repetições. O modelo de substituição para os genes foi definido como GTR+I+G, após análise no Jmodeltest 2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012), baseando-se no critério de informação de Akaike (AIC). A convergência das cadeias MCMC foram avaliadas graficamente para a definição do *burn-in* por meio do programa Tracer v. 1.7.2 (Rambaut *et al.*, 2018). A melhor árvore filogenética foi estabelecida utilizando a ferramenta TreeAnnotator (Drummond e Rambaut, 2007), pertencente ao pacote de programa BEAST 1.10.4.

### ***Datação molecular da análise filogenética***

Quanto à análise filogenética baseada nos locos, a estimativa do tempo de divergência entre as espécies, que incorpora a abordagem do relógio molecular relaxado (Drummond *et al.*, 2006), foi calculada a partir do estabelecimento de dois pontos de calibração, considerando o processo de especiação de Yule (Gernhard, 2008). O primeiro ponto foi estabelecido como o nó que compreende os gêneros *Aphanius*, *Valencia*, *Jenynsia* e *Phalloptychus*. Esta marcação foi baseada no fóssil

de *Prolebias stenoura* Sauvage (1874), de Puy de Dôme, França, considerado o membro mais antigo já identificado do clado dos cyprinodontiformes europeus (Costa *et al.*, 2017; Pohl *et al.*, 2015) e estimado de ter 33 Ma (Prior distribution: Exponencial; Off set: 33; média = 0,5). O segundo ponto foi o ponto de divergência entre *Aphanius* e *Valencia*, baseado no fóssil de *Aphanius chebianus* (Obrhelová, 1985) da bacia de Cheb, República Tcheca (Gaudant, 2009) com 17 Ma (Prior distribution: Exponencial; Off set: 17; média = 0,5). A calibração temporal foi realizada simultaneamente à análise filogenética a partir do pacote de programas do BEAST 1.10.4.

### ***Análise filogenética a partir do genoma mitocondrial***

Aproveitando-se a montagem do genoma mitocondrial completo de *S. boitonei* no presente trabalho, foi realizado também uma análise filogenética para a ordem Cyprinodontiformes, tendo como caráter filogenético as bases nitrogenadas presentes no mitogenoma completo de representantes das famílias desta ordem. Foram utilizados na análise, além do mitogenoma de *S. boitonei*, o mitogenoma de outras 16 espécies, extraídos da base de dados Genbank (Anexo 1), sendo 2 espécies utilizadas como representantes da Ordem Atheriniformes. Optou-se pela utilização de um grupo externo pelas suas vantagens para o fortalecimento dos testes de hipóteses filogenéticas (Grant, 2019). O método utilizado para a análise foi a inferência Bayesiana, seguindo os mesmos parâmetros utilizados na análise filogenética por meio dos locos.

## **RESULTADOS**

### **Análises de diversidade populacional**

O teste de desequilíbrio de ligação na análise por localidade não apontou nenhum valor significativo nas comparações par-a-par. Ao analisar todas as amostras em conjunto, o MicroChecker apontou não haver presença de alelos nulos para os locos analisados. No entanto, as frequências de alelos nulos dos locos SBOI 03, SBOI 09 e SBOI 14 encontradas no teste realizado pelo programa FreeNa foram superiores a 20%, um valor considerado alto (Chapuis & Estoup, 2007). Os valores de heterozigidade observada para os locos foram em geral menores que os de

heterozigosidade esperada (médias de  $H_o = 0,3647$  e  $H_e=0,61$ ), sendo encontrados valores estatisticamente significativos para desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em 6 locos. O número de alelos dos locos variou de 2 a 13, com uma média de 6,46 alelos (Tabela 1).

Tabela 1 Caracterização dos 13 locos microssatélites isolados para *S. boitonei* utilizando o total amostral de 31 indivíduos da espécie das duas localidades amostradas.

Loco	Nº Alelos	Riqueza Alélica	Tamanho alelos (pb)	$H_o$	$H_e$	Valor de $F$	$r$
SBOI 01	8	7,79	333-361	0,5806	0,769	0.0007*	0,11136
SBOI 02	7	7,00	385-413	0,1935	0,510	0.0001*	0,19346
SBOI 03	12	11,31	250-354	0,2258	0,612	0.0006*	0,21541
SBOI 04	12	11,41	373-481	0,5484	0,837	0.0103	0,12779
SBOI 06	5	4,89	272-308	0,2903	0,344	0.1879	0,04121
SBOI 08	5	5,00	301-330	0,3548	0,666	0.0050	0,16773
SBOI 09	3	3,00	214-226	0,0968	0,556	0.0000*	0,28993
SBOI 12	3	3,00	258-264	0,3548	0,561	0.0061	0,13353
SBOI 13	2	2,00	369-378	0,1935	0,177	1.0000	0,00001
SBOI 14	4	4,00	232-288	0,3226	0,691	0.0000*	0,20527
SBOI 15	7	6,90	395-431	0,4193	0,751	0.0001*	0,17573
SBOI 17	3	3,99	263-278	0,3548	0,584	0.0620	0,12261
SBOI 18	13	12,71	270-327	0,8064	0,875	0.0897	0,02586
MÉDIA	6,46	6,38	-	0,3647	0,6102	-	0,13922

$H_o$ : heterozigosidade observada;  $H_e$ : heterozigosidade esperada (Nei 1987);  $r$ : frequência alelo nulo (valor médio de todas populações). \*Valores significativos após correção de Bonferroni ( $\alpha \leq 0,00385$ ).

Ao realizar as análises de diversidade em cada população separadamente, os índices de diversidade obtidos foram diferentes dos encontrados na análise geral. Na população do Jardim Botânico, foi encontrado uma média de 3 alelos por loco. A heterozigosidade observada nos locos variou de 0,105 a 0,737 ( $0,359 \pm 0,217$ ), enquanto a heterozigosidade esperada variou de 0,102 a 0,781 ( $0,426 \pm 0,246$ ). Apenas o locus SBOI 01 desviou do EHW de modo significativo. Já na população do

Guará, o número de alelos por loco foi maior, com uma média de 4,4. Tanto a heterozigosidade observada quanto a esperada dos locos permaneceram em um intervalo de 0,083 a 0,917, porém a heterozigosidade observada apresentou uma média menor que a da heterozigosidade esperada ( $0,467 \pm 0,217$  e  $0,555 \pm 0,254$ , respectivamente). Nesta população, apenas o locus SBOI 02 desviou do EHW de modo significativo. Quanto ao coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), não houve presença de valores significativos (Tabela 2).

Tabela 2 Caracterização dos 13 locos microssatélites isolados para *S. boitonei* das populações de Jardim Botânico (n=19) e Guará (n=12).

População da Estação Ecológica de Jardim Botânico (N=19)								
Loco	Nº alelos	Alelos Exclusivos	Ho	He	Valor de EHW	$F_{IS}$	P-valor $F_{IS}$	r
SBOI 01	4	0	0,474	0,707	0,0321*	0,336	0,0308	0,12533
SBOI 02	2	0	0,105	0,102	1,0000	-0,029	1,0000	0,00002
SBOI 03	1	1	-	-	-	-	-	0,00100
SBOI 04	7	6	0,684	0,781	0,3407	0,127	0,1577	0,00005
SBOI 06	2	1	0,158	0,235	0,2587	0,333	0,2269	0,08442
SBOI 08	3	2	0,263	0,240	1,0000	-0,098	1,0000	0,00100
SBOI 09	2	1	0,105	0,193	0,1598	0,463	0,1346	0,10717
SBOI 12	2	1	0,421	0,501	0,4021	0,163	0,3923	0,00000
SBOI 13	1	0	-	-	-	-	-	0,04534
SBOI 14	2	2	0,210	0,341	0,1427	0,390	0,1192	0,10958
SBOI 15	4	3	0,368	0,439	0,2749	0,166	0,2269	0,03916
SBOI 17	3	1	0,421	0,284	0,2845	0,170	0,2231	0,03491
SBOI 18	6	3	0,737	0,734	0,5305	-0,004	0,6423	0,00001
<b>MÉDIA</b>	<b>3</b>	<b>1,615</b>	<b>0,358</b>	<b>0,427</b>	<b>-</b>	<b>0,183</b>		<b>0,04215</b>

População da Reserva Biológica do Guará (n=12)

Loco	N <sup>o</sup> alelos	Alelos Exclusivos	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	Valor de EHW	F <sub>IS</sub>	Valor de F <sub>IS</sub>	r
SBOI 01	8	4	0,750	0,815	0,0621	0,083	0,4077	0,04926
SBOI 02	7	5	0,400	0,771	0,0028*	0,496	0,0115	0,19465
SBOI 03	11	11	0,583	0,844	0,0353	0,319	0,0077	0,08383
SBOI 04	6	5	0,500	0,482	0,1222	-0,039	0,1269	0,00001
SBOI 06	4	3	0,333	0,442	0,7071	0,254	0,6692	0,00000
SBOI 08	3	2	0,500	0,649	0,2396	0,237	0,1846	0,05815
SBOI 09	2	1	0,083	0,083	-	0,000	1,0000	0,00002
SBOI 12	2	1	0,250	0,344	0,4037	0,283	0,3731	0,07431
SBOI 13	2	1	0,500	0,391	1,0000	-0,294	1,0000	0,00000
SBOI 14	2	2	0,500	0,522	0,6673	0,043	0,7154	0,00058
SBOI 15	4	3	0,500	0,714	0,0891	0,309	0,0962	0,10620
SBOI 17	3	1	0,250	0,238	1,0000	-0,064	1,0000	0,00001
SBOI 18	10	7	0,917	0,917	0,4366	0,000	0,5808	0,00000
<b>MEDIA</b>	4,924	3,538	0,467	0,555	-	0,125	-	0,04361

H<sub>o</sub>: heterozigossidade observada; H<sub>e</sub>: heterozigossidade esperada (Nei 1987); F<sub>IS</sub>: coeficiente de endogamia; r: frequência alelo nulo (valor médio de todas populações). \*Valores significativos após correção de Bonferroni ( $\alpha \leq 0,00385$ ).

Ao comparar os índices de diversidade das duas populações (Tabela 3), pode-se observar uma riqueza alélica maior na população do Guará (4,496) do que na população do Jardim Botânico (2,702). Tal fato ganha notoriedade ao considerar que o número de amostras da população do Guará foi menor que o número obtido na Esto do Jardim Botânico. Quanto ao coeficiente de endogamia total, a população do Jardim Botânico apresentou um valor de 17,8%, sendo maior do que o observado na população do Guará, de 16,8%.

Tabela 3. Diversidade genética de *S. boitonei* em cada uma das áreas de estudadas, com base na análise de 13 locos microssatélites.

	A	RA	Ho	He	F <sub>IS</sub>
Guará	4,923	4,496	0,4667	0,555	0,169
JB	3,000	2,702	0,3589	0,427	0,178

A: quantidade média de alelos observados; RA: riqueza alélica; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada (Nei 1987); F<sub>IS</sub>: coeficiente de endogamia;

A análise de redução populacional feita por meio do programa Bottleneck apresentou, em ambas as populações, valores muito significativos em cada uma das diferentes porcentagens de SMM utilizadas no modelo TPM (Tabela 4), demonstrando um excesso de heterozigotos em ambas as populações. Além disso, em relação à estimativa do tamanho efetivo das populações calculada através do programa Ne Estimator, a população de Jardim Botânico apresentou um Ne de 26,7±10,5 (IC 95%), enquanto para a população do Guará, de 130,6±16,5 (IC 95%).

Tabela 4 Teste de redução populacional (Bottleneck) para as 2 localidades amostradas. Valores de P para excesso de heterozigotos foram estimados com diferentes proporções de mutação passo-a-passo (SMM) no modelo TPM.

	Porcentagem de mutações passo-a-passo (SMM) no modelo TPM		
	75%	85%	95%
<b>Guará</b>	0,0003*	0,0006*	0,0034*
<b>JB</b>	0,0008*	0,0012*	0,0017*

\* Valores significativos ( $\alpha \leq 0,05$ )

Quanto à análise de diferenciação genotípica realizada por meio do programa Genepop, foi obtido um valor alto de F<sub>ST</sub> (0,4418) para a comparação entre as duas populações, sendo este resultado estatisticamente significativo (Tabela 5). Isso sugere que as populações comparadas possuem estruturação genética, ou seja, estão geneticamente diferenciadas. A análise Bayesiana de estruturação genética realizada no programa Structure foi compatível com os valores encontrados na estatística F e indica, como mais provável, a existência de 2 agrupamentos genéticos bem definidos (K=2), de acordo os valores de delta K na análise realizada no programa Structure Harvester (Figura 4). Na figura 5, é possível observar a representação gráfica dos agrupamentos inferidos na análise, sendo que para cada um dos indivíduos foi

apontado uma probabilidade superior a 99% de pertencimento a um dos grupos inferidos. Estes grupos são compatíveis com as duas populações amostradas, o que demonstra uma forte evidência de diferenciação genética entre elas.

Tabela 5 Diferenciação par-a-par das localidades amostradas. Diagonal inferior: valores de  $F_{ST}$  (Weir & Cockerham 1984); Diagonal superior: valor de P da diferenciação genotípica par-a-par.

	Guará	JB
Guará	---	<0.05*
JB	0.4418	---

\* Valor significativo após correção de Bonferroni ( $\alpha \leq 0,05$ )

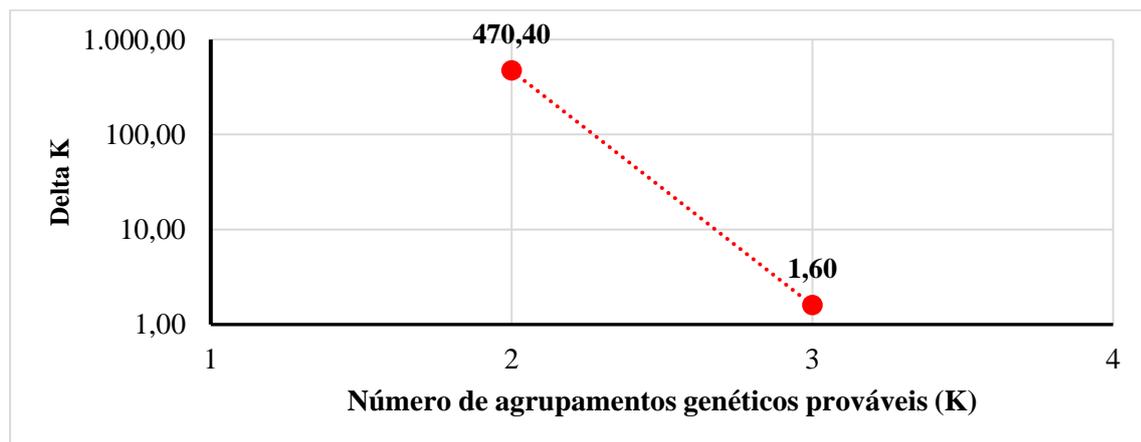


Figura 4. Valores de Delta K obtidas no programa Structure Havester referentes a cada hipótese de K simulado no programa Structure. Escala do Eixo Y em logarítmo.

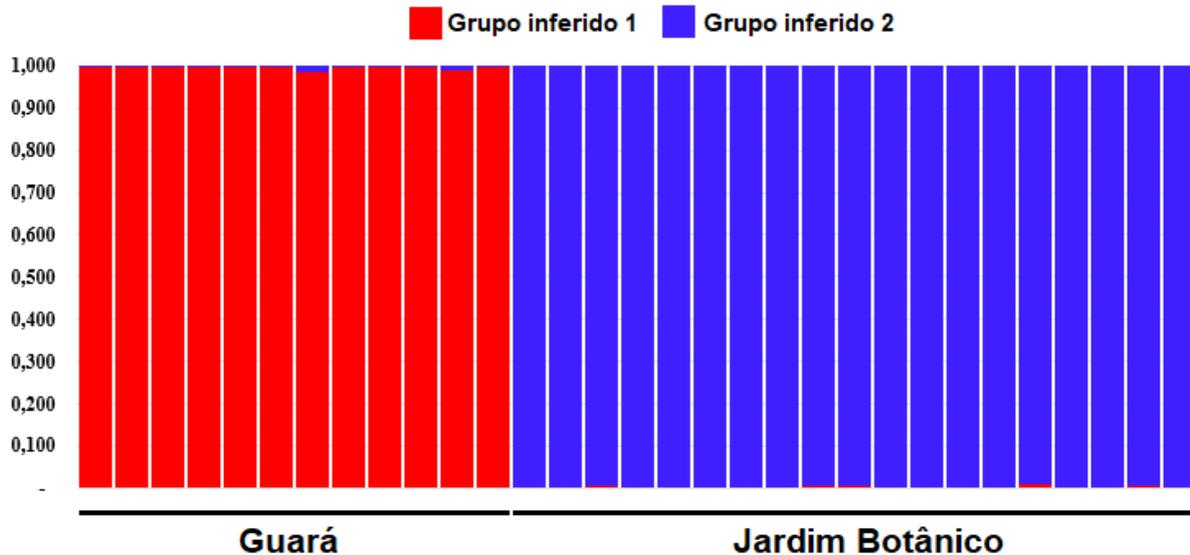


Figura 5. Agrupamentos genéticos resultantes da análise do programa STRUCTURE. Cada coluna representa um indivíduo, e as cores (vermelho ou azul) a sua probabilidade de atribuição é um determinado agrupamento genético inferido na análise.

O sequenciamento do gene mitocondrial COI para cada uma das amostras analisadas resultou em fragmentos com 615 pares de base (Anexo 2). A partir da análise das sequências alinhadas foi possível observar a presença de 6 sítios polimórficos, resultando na existência de 3 haplótipos diferentes e exclusivos nas populações estudadas: 1 na população do Guará e 2 na população do Jardim botânico (Tabela 6). A análise do polimorfismo a partir do programa DNASP apontou um valor total de 0,658 de diversidade haplotípica e 0,00451 de diversidade nucleotídica no conjunto amostral. Ao utilizar a estatística  $K_{st}$  de Hudson (1992) baseada em sequência nucleotídica, foi apontando um valor de 0,899, demonstrando que há uma diferenciação genética significativa entre as duas populações, o que corrobora os resultados obtidos na análise de  $F_{ST}$  no programa Genepop e na análise de inferência bayesiana realizada no programa Structure.

Tabela 6. Polimorfismos observados e Haplótipos presente na análise dos fragmentos do gene COI dos indivíduos coletados nas duas populações conhecidas. Números à esquerda representam a posição dos nucleotídeos polimórficos no fragmento do gene COI. Colunas representam cada indivíduo.

Posição	População Guará (n=12)	População Jardim Botânico (n=19)		
	Haplótipo 1	Haplótipo 2		Haplótipo 3
122	A A A A A A A A A A A A	G G		
146	A A A A A A A A A A A A	G G		
272	T T T T T T T T T T T T	C C		
377	T T T T T T T T T T T T	C C		
382	G G G G G G G G G G G G	A A		
536	T T	C C C C C C		

### Análise filogenética e posição de *S. boitonei*

O conjunto concatenado de locos de cada um dos 55 táxons analisados gerou sequências de 4195 pares de bases. A análise bayesiana resultou em uma árvore filogenética com a maioria dos nós apresentando valores de probabilidade posterior elevados ( $p(\theta/data) > 0,9$ ; Figura 6). O monofiletismo, tanto da tribo Cynolebiini (Costa, 2010) quanto do gênero *Simpsonichthys*, mostrou-se bem sustentado estatisticamente após o acréscimo de *S. boitonei* (prob. posterior  $\approx 1$ ), sendo este mais próximo filogeneticamente de *S. punctulatus* do que *S. parallelus*.

Os demais gêneros que compõe a tribo Cynolebiini também se mostraram monofiléticos, com exceção de *Hypsolebias*, em que uma parte de seus representantes (*H. igneus*, por exemplo) se mostrou mais próxima dos representantes de *Austrolebias*, enquanto a outra parte (*H. ocellatus*, por exemplo), mais próxima de *Ophthalmolebias*.

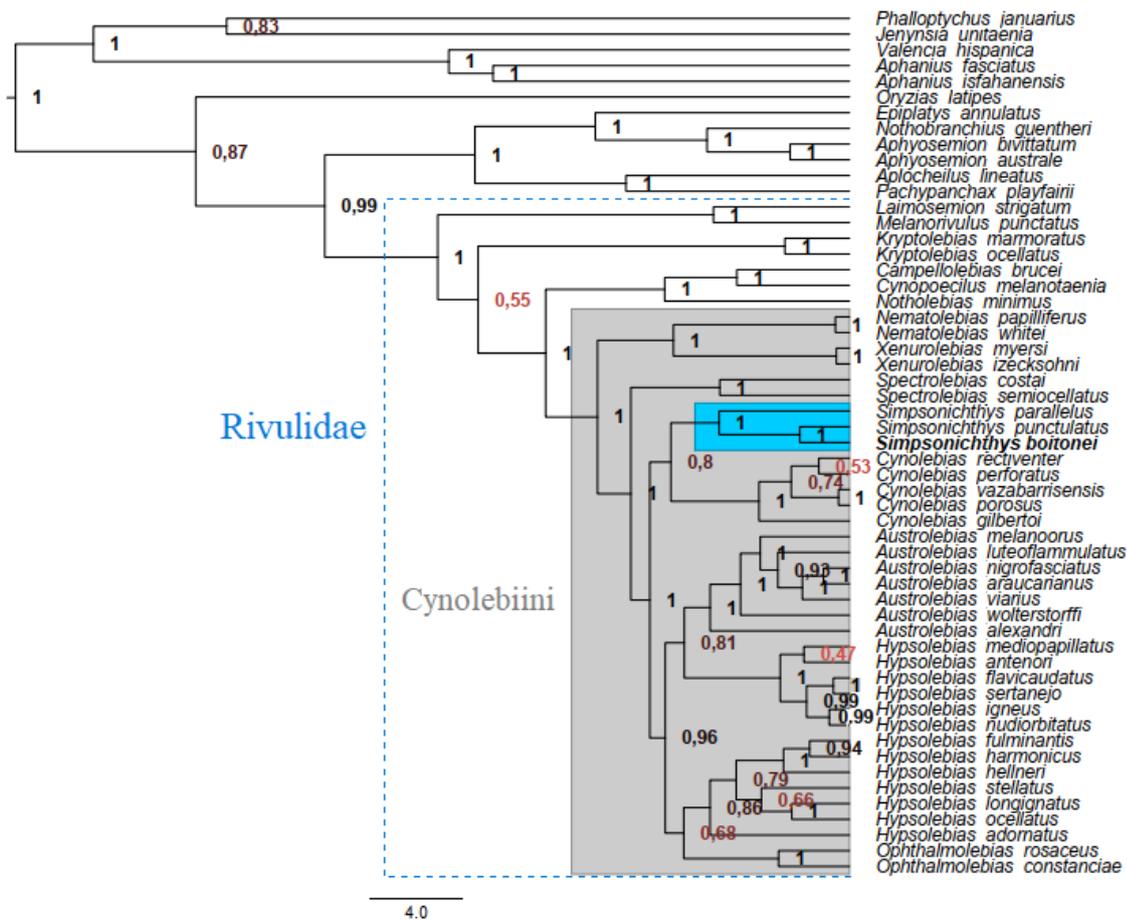


Figura 6. Relações Filogenéticas entre 36 espécies de Cynolebiini (incluindo *S. boitonei*) e 19 espécies externas, baseada na inferência bayesiana a partir de sequências parciais dos genes nucleares GLYT1, ENC1, Rho, SH3PX3 e dos genes mitocondriais 16S e COI, totalizando 4195 pb. Números ao lado de cada nó da árvore se referem ao valor de probabilidade posterior obtido.

### Tempo de divergência

A partir da análise bayesiana de datação molecular, foi estimado o tempo de divergência entre os grupos taxonômicos (Figura 7). Estima-se que a família Rivulidae tenha surgido na transição de Oligoceno para o Mioceno, por volta de 23,1 Maa (95% *High Posterior Density*[HPD]: 16,11-32,16). Para a tribo Cynolebiini, a estimativa foi por volta de 13,4 Maa (95% HPD: 9,15-19,82), na metade do Mioceno. O gênero *Simpsonichthys* divergiu de seu grupo irmão *Cynolebias* no final do Mioceno, há aproximadamente 7,8 Maa (95% HPD: 4,81-11,53 Maa). Para a espécie *S. boitonei* foi estimado que sua divergência em relação à sua espécie irmã *S. punctulatus* tenha ocorrido por volta de 2,2 Maa, na transição do Plioceno para o Pleistoceno (95% HPD: 0,52-5,95).

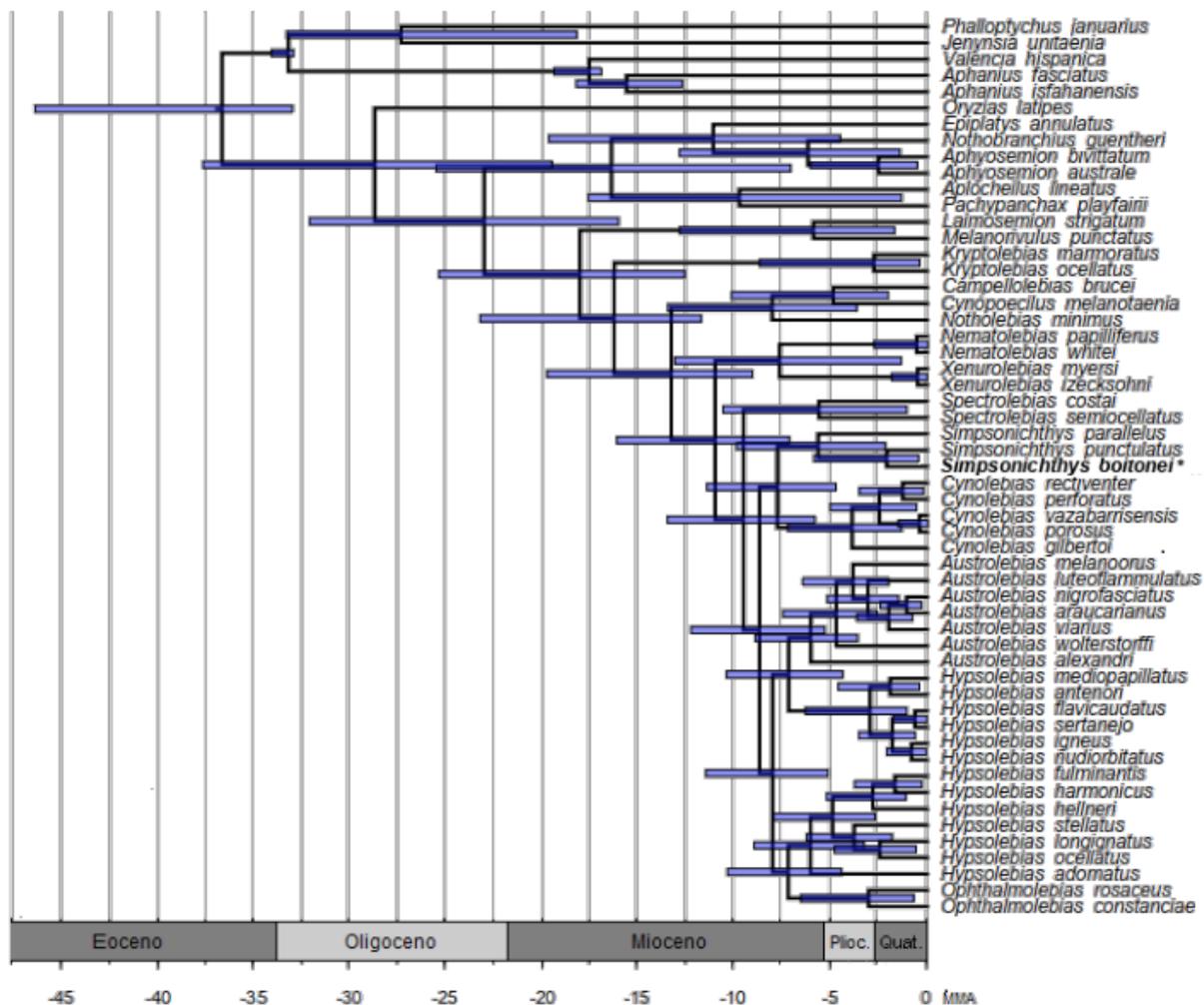


Figura 7. Filogenia de Cynolebiini (e grupos externos) com calibração temporal a partir de análise bayesiana de datação molecular feita no programa BEAST. \*Em negrito, novo táxon de *S. boitonei* adicionado ao conjunto de espécies trabalhado por Costa *et al.* (2017).

### Genoma Mitocondrial

1.976.844 pares de sequências (*forward e reverse*) foram obtidas a partir do sequenciamento NGS de *S. boitonei*. Desse total, 3809 pares de fragmentos foram alinhados para o mapeamento do mitogenoma da espécie, com uma cobertura média de 52(±39) leituras por base. O produto final foi um genoma mitocondrial de 17.402 bp com uma ordem gênica típica de vertebrados (Sato, 2016), contendo 2 rRNAs, 22 tRNAs (duplicação para tRNA-Leu e tRNA-Ser), 13 genes codantes de proteína e uma região controle (Figura 8). Praticamente todos os nucleotídeos do mitogenoma foram obtidos, com exceção de alguns nucleotídeos não identificados ou de leitura ambígua, localizados no gene ND5 (n=1) ou na região controle (n=13), o que representa apenas 0,08% do total.

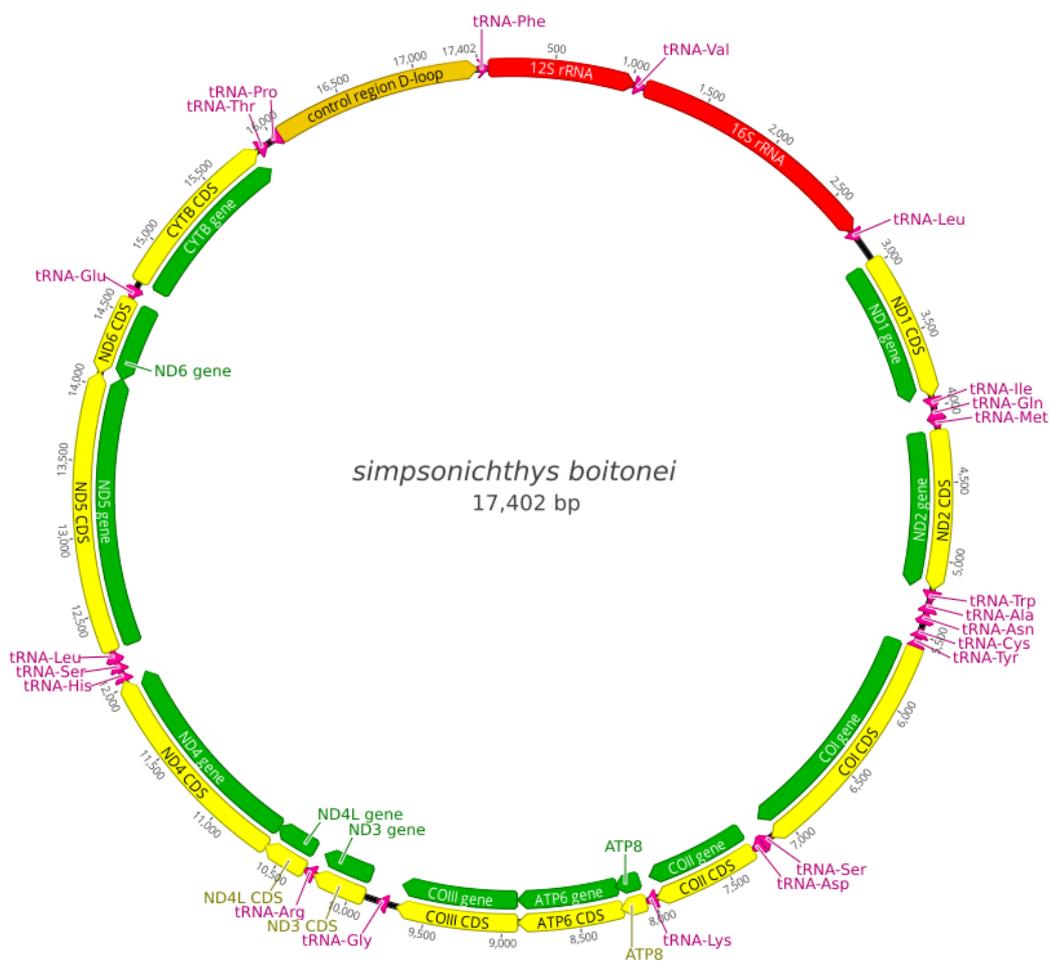


Figura 8. Genoma mitocondrial da espécie *S. boitonei*.

Nove genes foram identificados na cadeia leve (L): tRNA-Gln, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, tRNA-Tyr, tRNA-Ser (1), tRNA-Glu e tRNA-Pro e o gene codante ND6. Os genes restantes do mitogenoma foram codificados na cadeia pesada (H). ATG é o códon de início de todos os genes codantes, com exceção do gene COI, que se inicia por GTG. Em relação ao códon de parada, o mais comum é o TAA, sendo que só não é observado nos genes COI, COII e ND4, em que se observa um códon incompleto (T-). 21 dos RNA transportadores presentes apresentam a típica estrutura secundária de 3 braços (D, Anticódon e T), com um tamanho variando de 67 a 75 pb. No entanto, o tRNA-Cys (tamanho de 59 pb) apresentou uma estrutura secundária com o braço-D ausente (Figura 9), característica incomum na ordem Cyprinodontiformes, porém já observada no mitogenoma de *Austrolebias charrua* (Gutiérrez *et al.*, 2015). Detalhes sobre cada gene podem ser observados no Anexo 3.

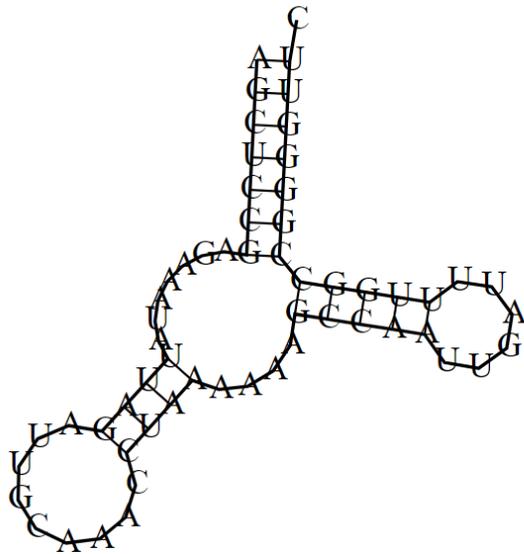


Figura 9. Estrutura secundária do RNA transportador de Cisteína (tRNA-Cys) da espécie *S. boitonei*. Ausência do braço-D.

### **Análise filogenética por genoma mitocondrial**

A filogenia resultante da análise bayesiana a partir do genoma mitocondrial apontou como monofiléticas as duas subordens de Cypridontiformes, bem como as famílias da subordem Aplocheiloidei, se mostrando bem suportado, com uma média de 0,94 de probabilidade posterior. A família Rivulidae foi posicionada como um grupo mais basal em relação às outras duas famílias da subordem Aplocheiloidei, sendo considerada monofilética e apresentando um suporte de 0,78 de probabilidade posterior.

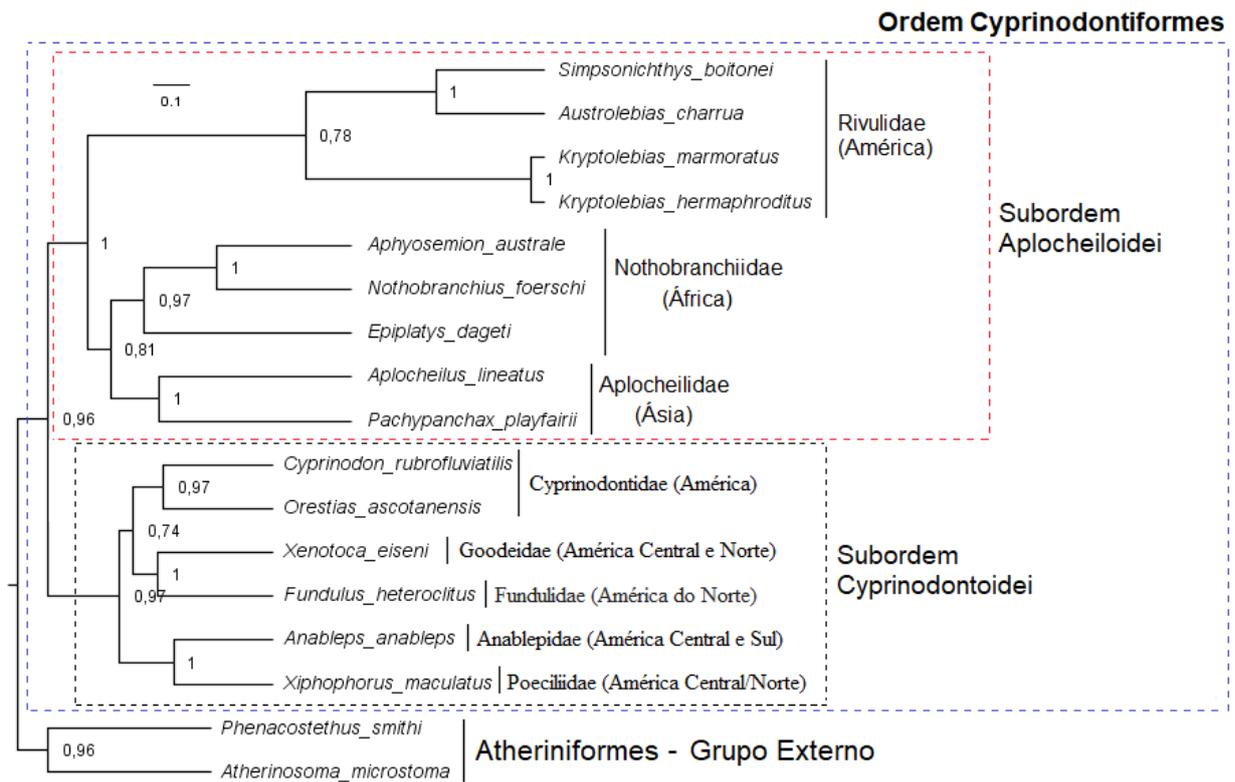


Figura 10. Filogenia da ordem Cyprinodontiformes com 15 espécies representantes de famílias do grupo e 2 espécies de grupo externo (Ordem Atheriniformes) baseada na inferência bayesiana a partir do genoma mitocondrial. Após o nome científico das espécies, tem-se a família à qual elas pertencem. Entre parênteses, o local de sua distribuição. Valores nas bases dos pontos de divergência representam os valores de probabilidade posterior da inferência bayesiana. O tamanho dos ramos são proporcionais a divergência genética (quantidade de substituições dividido por tamanho da sequência)

## DISCUSSÃO

### **Diversidade Genética das populações de *S. boitonei***

Os índices de diversidade obtidos para os locos microssatélites em análise demonstraram que as populações em geral se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg quando analisadas isoladamente. A quantidade de alelos variou bastante entre os locos analisados, sendo que a média de cada população se encontra abaixo do esperado para peixes de água doce, apontado como 9 alelos por locos (DeWoody e Avise, 2000). O pequeno número de alelos presente em alguns locos sugere que, durante um determinado período de tempo, as populações perderam alelos, provavelmente por conta da deriva genética.

O excesso de heterozigotos observado na análise realizada no programa Bottleneck sugere que estas populações sofreram uma redução de tamanho recente. Esta redução populacional contribui para o aumento dos efeitos da deriva genética, pois populações menores tendem a sofrer mais intensamente o efeito desta força evolutiva (Allendorf *et al.*, 2022).

Os valores não significativos de coeficiente de endogamia presentes nos locos de ambas as populações demonstram que o número de ocorrências deste evento não foi suficiente para impactar significativamente a heterozigosidade observada na população. No entanto, em ambas as populações, o coeficiente de endogamia total calculado demonstrou um valor acima de 12,5%, o que, de acordo com estudos sobre efeito da endogamia em peixes, pode trazer problemas adaptativos, a exemplo de reduções no número de eclosões de ovos ou na sobrevivência dos alevinos (de Freitas *et al.*, 2014). A presença de endogamia em uma população pode acarretar na manifestação de muitos genes recessivos e, conseqüentemente, na diminuição do valor médio adaptativo dos indivíduos, prejudicando o sucesso reprodutivo e a sobrevivência da população (Charlesworth e Willis, 2009).

De acordo com Frankham *et al.* (2014), para que uma população não sofra relevante redução da variabilidade genética por conta de depressão endogâmica, é necessário que seu tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) alcance um valor mínimo de 100 indivíduos, sendo que valores menores podem levar a perdas superiores a 10% de diversidade genética populacional em um curto intervalo de tempo (5 gerações).

Tendo em vista que a população do Jardim Botânico apresentou um  $N_e$  de 26,7 indivíduos, inferior a este limite, evidencia-se o risco de perda ainda maior de sua diversidade genética e a ameaça de extinção futura.

Outro ponto a se considerar é a pequena quantidade de alelos em comum entre as populações. Do total de 84 alelos presentes nos locos microssatélites, apenas 18 (21%) são compartilhados entre as populações, o que indica uma diferença genética relevante entre as populações. Tal diferenciação é evidenciada pelos valores encontrados de  $F_{ST}$ , pelos resultados da inferência bayesiana, bem como pela análise de polimorfismo realizada por meio do gene mitocondrial COI, que demonstrou que as populações de *S. boitonei* possuem haplótipos diferentes para este gene. Apesar dos elevados valores de diferenciação genética observados poderem também ter ocorrido por influência de ser um viés resultante da baixa amostragem, os índices de diversidade obtidos corroboram a existência desta diferença, uma vez que se observou uma maior diversidade genética nos locos da população do Guará, mesmo esta sendo a população para a qual se obteve um menor número de amostras. Uma explicação provável para esta estruturação genética é a interrupção de fluxo genético entre as populações somada à fixação de diferentes alelos devido à deriva genética, como tratado anteriormente.

Considerando que o habitat natural desta espécie se resume a pequenos brejos sazonais espalhados próximos as margens de córregos, é natural que ocorra o isolamento de populações por conta da distância entre estes. Tendo em vista que a primeira população registrada de *S. boitonei* se encontrava onde hoje está o Zoológico de Brasília, e que esta população se posicionava em uma região intermediária às regiões das duas populações atualmente conhecidas, é possível presumir que outras populações existiram ou ainda existem nos trechos dos córregos afluentes da bacia sul do Lago Paranoá.

Durante a construção de Brasília houve o alagamento de áreas para a formação do lago Paranoá, o que provavelmente teria eliminado possíveis populações presentes nestes locais. Visto a específica condição de habitat destes animais, é improvável que esta espécie consiga sobreviver na região deste lago artificial, levando em conta a presença de predadores, poluições, ocupação urbana e outros fatores que sejam incompatíveis com a espécie. Sendo assim, é possível concluir que as

alterações urbanas contribuíram como uma barreira física para o isolamento das populações de *S. boitonei*.

Além disso, com o desenvolvimento de Brasília muitas áreas próximas a córregos passaram por drenagem de águas, de modo que o ambiente fosse propício às construções urbanas. Esta ação ainda é presente nos dias atuais, e seus impactos ao ambiente local ainda são discutidos (dos Santos Conserva *et al.*, 2019). Ao considerar que as populações de *S. boitonei* se encontram justamente em brejos próximo aos córregos, tal evento pode ser uma possível explicação para a recente redução dos tamanhos das populações como observado no teste de postos sinalizados de Wilcoxon. Observando a figura 2 (em Materiais e Métodos), percebe-se a proximidade das áreas urbanas às populações do Pirá-brasília, principalmente em relação à população do Guará. Em setembro deste ano, foi sancionada a Lei 14.777, que reduz em cerca de 40% a Floresta Nacional de Brasília, para fins de regularização urbana, o que demonstra que áreas nativas do Distrito Federal continuam sofrendo reduções por conta de assentamentos urbanos.

Os resultados obtidos mostram que as populações de *S. boitonei* sofreram perdas na sua diversidade genética e se encontram reduzidas, com taxas de endogamia passíveis de causar problemas adaptativos nos indivíduos, principalmente na população do Jardim Botânico, em que foi observada uma diversidade genética menor. Além disso, há uma significativa diferenciação genética entre as duas populações conhecidas, sugerindo que o fluxo gênico entre elas é raro ou inexistente. Tal cenário confirma o estado crítico de perigo de extinção que a espécie enfrenta, como apontado na recente atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas (MMA, 2022). Isso demonstra a necessidade de criação de um projeto de conservação para esta espécie, sendo que os dados genéticos obtidos no trabalho podem contribuir para a definição das medidas a serem adotadas. Vale destacar que a população em que se observou uma maior diversidade genética, encontrada na Reserva Biológica do Guará, é a que se encontra mais ameaçada por fatores antrópicos, visto que está a poucos metros de residências e rodovias.

## Considerações sobre a filogenia do grupo

As relações filogenéticas obtidas no presente trabalho são semelhantes às aquelas presentes em estudos anteriores sobre a família Rivulidae (Costa, 2010; Ponzetto *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017). Com exceção de *Hypsolebias*, todos os gêneros da tribo Cynolebini se mostraram monofiléticos, o que reforça a classificação desses grupos como gêneros independentes (Costa 2010).

O gênero *Hypsolebias* se mostrou parafilético, com parte dos representantes em um grupo irmão com o gênero *Ophthalmolebias*, e a outra parte sendo mais próxima do gênero *Austrolebias*. Esta relação difere do grupo monofilético encontrado no trabalho de Costa *et al.* (2017), porém o parafiletismo já foi observado em trabalhos de outros autores (Ponzetto *et al.*, 2016). Os parâmetros utilizados para o cálculo da melhor árvore filogenética, como o método para reconstrução filogenética (Inferência Bayesiana), as configurações do programa BEAST, bem como o modelo de substituição de nucleotídeos, podem ter causado a diferença encontrada nas análises. Outro fator que também pode ter influenciado para a diferença na filogenia aqui encontrada em comparação à filogenia de Costa *et al.* (2017) foi a inserção da espécie *Simponichthys boitonei* na análise, o que contribui para a quantidade de informação utilizada na reconstrução filogenética. Tendo em vista as divergências existentes na filogenia do gênero *Hypsolebias*, é necessário que haja mais pesquisas para a verificação desse gênero como táxon válido.

A análise filogenética baseada no genoma mitocondrial completo demonstrou ser um método bastante útil para uma análise em diferentes níveis taxonômicos dentro da Ordem Cyprinodontiformes. Foi possível realizar inferências robustas sobre a posição filogenética dos gêneros dentro de Rivulidae, bem como analisar as relações das famílias dentro das subordens Aplocheiloidei e Cyprinodontoidei. Lavoué *et al.* (2007) já havia utilizado com sucesso o mitogenoma completo para analisar as relações filogenéticas de espécies dentro da ordem de peixe Clupeiformes. As vantagens de se utilizar o genoma mitocondrial completo também já foram demonstradas em estudos com insetos, em que foi possível apontar o monofiletismo e as relações de parentesco de táxons já estabelecidos (Coleoptera – Yuan *et al.*, 2016; Orthoptera – Fenn *et al.*, 2008).

No entanto, ao comparar genomas mitocondriais inteiros é necessário considerar que as posições e tamanho dos genes podem mudar de acordo com o grupo taxonômico, principalmente para genes de tRNA, por conta de mutações evolutivas. Satoh *et al.* (2016) demonstraram esta variação na estrutura do mitogenoma a partir de uma análise comparativa com 248 espécies de 42 ordens de peixe raiados, e foram observadas mudanças notáveis no tamanho e posição dos genes, até mesmo dentro de ordens, a exemplo de ordem Perciformes. Sendo assim, torna-se necessário uma análise prévia do nível taxonômico que se deseja abranger na análise filogenética a partir do genoma mitocondrial completo, considerando que níveis mais elevados tendem a acumular mais variações que trariam inconsistências no momento de comparação das sequências, por conta da distância evolutiva entre os representantes dos grupos.

### **Origem de Aplocheiloidei na América.**

A Família Rivulidae pertence à subordem Aplocheiloidei, composta também pelas famílias Nothobranchiidae e Aplocheilidae, que se encontram distribuídas pela África e Ásia, respectivamente. Visto que a América do Sul se separou do continente Africano ao longo do período Cretáceo – aprox. 144 a 66 Maa – (Blakey, 2008) seria razoável associar tal fato à divergência das espécies de Aplocheiloidei e à origem da família Rivulidae. No entanto, a calibração temporal realizada na árvore filogenética apontou a divergência de Rivulidae de seu grupo irmão em um intervalo de período que abrange o Oligoceno e o início do Mioceno (aprox. entre 32 a 16 Maa). Este intervalo encontrado é aproximadamente a metade da estimativa encontrada no trabalho de Costa *et al.* (2017), que apontou esta divergência no período entre o Paleoceno e Eoceno (aprox. entre 63 a 39 Maa). No entanto, em ambos os trabalhos foi apontado a formação desta família milhões de anos a frente do evento de separação de Gondwana.

Um estudo realizado com a família Cichlidae, da ordem Cichliformes, grupo próximo ao Cyprinodontiformes, trouxe um resultado parecido. Ao utilizar calibração filogenética baseada em relógio molecular, foi apontado a divergência de seus representantes africanos e americanos em um período bem posterior ao período

Cretáceo, milhares de anos após a separação da América do Sul (Friedman *et al.*, 2013).

Diante de tal cenário, surge a questão de como estes grupos se dispersaram para o continente americano, havendo a presença do oceano atlântico como barreira física. Uma possível explicação para isso é uma dispersão por ilhas até a América. De Oliveira *et al.* (2009), em um estudo voltado à primatas e roedores analisou, por meio de reconstruções de cenários geográficos entre 50 e 20 Ma, a possibilidade destes animais terem se dispersado utilizando cadeias de ilhas, e apontou o melhor cenário no período Eoceno.

Considerando que os ancestrais dos representantes da família Rivulidae tenham dispersado por ilhas até a América, seria necessário que tivessem aptidão para sobreviver em águas marinhas, o que não se verifica na maioria dos representantes atuais, habitantes de água doce sazonais (Loureiro *et al.*, 2018). No entanto, há espécies do gênero *Kryptolebias*, um dos taxóons mais basais da família Rivulidae, que habitam ambientes de mangues, como o caso de *K. marmoratus* (Costa, 2016). A presença destas espécies em ambientes com salinidade levanta a possibilidade das espécies ancestrais de Rivulidae terem a capacidade de suportar o ambiente marinho para a dispersão.

Outra hipótese de dispersão presente no meio acadêmico é de que as aves serviriam como agentes dispersores a partir do transporte dos ovos em suas penas ou seus pés. De acordo com um levantamento de dados feito por Hirsch *et al.* (2018), até então não existiam evidências empíricas suficientes para a corroboração desta hipótese específica. No entanto, estudos recentes demonstraram ser possível a dispersão dos ovos dos peixes através do trato digestivo de aves aquáticas (Lovas-Kiss *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2019). Silva *et al.* (2019) demonstrou experimentalmente a possibilidade de sobrevivência de ovos de *killifishes* em fezes de cisnes, após passarem horas dentro do sistema digestivo dessas aves.

Considerando a característica evolutiva dos ovos de *killifishes*, o qual incluem a família Rivulidae, de possuírem um córion rígido e de serem resistentes à dissecação (Furness *et al.*, 2015), é possível sugerir que as aves tenham contribuído para a dispersão dos ancestrais de Rivulidae entre as ilhas do Oceano Atlântico até a chegada no continente Americano. Entretanto, a fim de corroborar esta hipótese, são

necessárias melhores mais análises sobre os possíveis mecanismos de dispersão de peixes pelos corpos d'água a partir de realizados com a ajuda das aves, visto que ainda existem poucos estudos experimentais sobre este assunto.

### **Origem de *Simpsonichthys boitonei***

Costa *et al.* (2017) aponta que a divergência do gênero *Simpsonichthys* do seu grupo irmão *Cynolebias* ocorreu durante o Mioceno, período no qual houve a elevação do planalto central. O resultado obtido neste trabalho é compatível com essa estimativa, apontando para sua ocorrência à aproximadamente 8 milhões de anos atrás. De certo, a formação do planalto foi evento geológico de grande importância para a diversidade biológica do Cerrado, sendo também responsável pela diversificação das linhagens de outros grupos de animais, como os lagartos da subfamília *Teiinae* (Giugliano *et al.*, 2013) e os sapos neotropicais do gênero *Physalaemus* (de Oliveira Miranda *et al.*, 2019).

De acordo com os resultados obtidos, a divergência da espécie *S. boitonei* da sua espécie irmã mais próxima analisada, *S. punctulatus*, ocorreu na transição do Plioceno para o Pleistoceno (aprox. 2,2 Ma). Tal período é posterior a elevação do planalto central, momento em que já havia ocorrido uma importante reorganização topográfica do Cerrado, com surgimento de depressões e de planaltos elevados (Oliveira *et al.*, 2018). Neste mesmo período, por volta de 2,5 milhões de anos atrás, o planeta passava por um período glacial, o que limitava a distribuição de espécies, as concentrando em pontos com temperatura e condições específicas adequadas para a sobrevivência, que, de acordo com a hipótese do refúgio florestal, teria tido grande influência na especiação dentro de vários grupos taxonômicos neotropicais (Mayr & O'Hara, 1986).

A população conhecida de *S. punctulatus* é encontrada adjacente a um córrego afluente do rio Bezerra, drenagem do rio Preto (coordenadas 15°33'1.0"S 47°10'33.2"W - Costa e Brasil, 2007), localizada aproximadamente 90 km de distância de ambas as populações conhecidas de *S. boitonei* (localidades em Materiais e Métodos). Considerando a limitação que os rivulídeos possuem para dispersar, e levando em conta sua localização em brejos sazonais, é possível que a especiação dentro de *Simpsonichthys* tenha sido influenciada pelas condições de temperatura

presentes na Terra nesse período. O clima ameno e a topografia com presença de planaltos da região podem ter colaborado para a redução das populações e seu isolamento em regiões de refúgio, criando uma barreira física que impedisse o fluxo gênico entre populações, as levando a uma estruturação genética e resultando na especiação pelo processo de anagênese.

É importante ressaltar que a falta de maiores informações sobre as populações do gênero *Simpsonichthys* existentes nos arredores do Distrito Federal, bem como sobre o passado topográfico desta região, impede que se faça afirmações mais precisas sobre os eventos históricos que determinaram a distribuição atual do Pirá-brasília.

## CONCLUSÃO

No presente trabalho, pela primeira vez se analisou, do ponto de vista molecular, a espécie *Simpsonichthys boitonei*, para fazer estudos sobre a diversidade genética de suas populações conhecidas e sobre sua classificação taxonômica. Trata-se também do primeiro trabalho a realizar uma análise filogenética para a ordem Cyprinodontiformes com base no genoma mitocondrial completo. A análise genética mostrou que as duas populações conhecidas já se encontram reduzidas e com um diferença genética significativa entre elas, o que leva a conclusão de que a ocorrência atual de um fluxo gênico entre as duas populações é bastante limitada. A partir da análise filogenética molecular foi possível confirmar a classificação da espécie como pertencente ao gênero *Simpsonichthys*, apontar sua posição filogenética, bem como revisar a filogenia dos grupos aos quais ela pertence. Por fim, foi discutido a origem biogeográfica da espécie *S. boitonei* e de sua família Rivulidae, em que se levantou possíveis explicações para a sua distribuição espacial ao considerar os tempos de divergência das espécies obtidas na análise filogenética. A fim de ratificar os dados obtidos neste trabalho e obter mais informações sobre a espécie estudada, são necessárias mais explorações de campo, de forma a investigar a ocorrência de outras populações do Pirá-brasília e sua área de distribuição no Cerrado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allendorf, F. W., Funk, W. C., Aitken, S. N., Byrne, M., & Luikart, G. (2022). Conservation and the genomics of populations. Oxford University Press.
- Amorim, P. F. de. (2014). *Filogenia molecular da subfamília Cynolebiasinae (Cyprinodontiformes: Rivulidae)* *Filogenia molecular da subfamília Cynolebiasinae (Cyprinodontiformes: Rivulidae)*. Universidade Federal do Rio de Janeiro Instituto.
- Abdul-Muneer, P. M. (2014). Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics research international*, 2014.
- Beaumont, M. A., Zhang, W., & Balding, D. J. (2002). Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, 162(4), 2025–2035.
- Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritzsche, G., ... & Stadler, P. F. (2013). MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular phylogenetics and evolution*, 69(2), 313-319.
- Berois, Nibia;, Garcia, G., & De Sá, R. O. (2015). *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*. CRC Press.
- Berois, Nibia, Garcia, G., & De Sá, R. O. (2017). A global community effort to decipher the unique biology of annual killifish. *Developmental Dynamics*, 246(11), 807–811.
- Blakey, R. C., Fielding, C. R., Frank, T. D., & Isbell, J. L. (2008). Gondwana paleogeography from assembly to breakup—A 500 my odyssey. *Geological Society of America Special Papers*, 441, 1-28.
- Briggs, J. C. (2003). Fishes and Birds: Gondwana Life Rafts Reconsidered. *Systematic Biology*, 52(4), 548–553.
- Charlesworth, D., & Willis, J. H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature reviews genetics*, 10(11), 783-796.
- Chapuis, M.-P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), 621–631.
- 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. *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, 15(2), 105–120.
- Costa, W. J. E. M., & Brasil, G. C. (2006). Redescription of *Simpsonichthys boitonei* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae), a rare seasonal killifish from the central Brazilian plateau. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 17(3), 221–224.
- Costa, W. J. E. M. (2007). Taxonomic revision of the seasonal South American killifish genus *Simpsonichthys* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei: Rivulidae). *Zootaxa*, 1669(1), 1–134.

- Costa, W. J. E. M., & Brasil, G. C. (2007). *Simpsonichthys punctulatus* n. sp.—a new seasonal killifish (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae) from the upper Rio São Francisco basin, central Brazil. *Vert Zool*, v. 57, n. 1, p. 57-61.
- Costa, W. J. E. M. (2010). Historical biogeography of cynolebiasine annual killifishes inferred from dispersal-vicariance analysis. *Journal of Biogeography*, 37(10), 1995–2004.
- Costa, W. J. E. M. (2013). Historical biogeography of aplocheiloid killifishes (Teleostei: Cyprinodontiformes). *Vertebrate Zoology*, 63(2), 139–154.
- Costa, W. J. E. M., Amorim, P. F., & Bragança, P. H. N. (2014). Species limits and phylogenetic relationships of red-finned cryptic species of the seasonal killifish genus *Hypsolebias* from the Brazilian semi-arid Caatinga (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 52(1), 52–58.
- Costa, W. J. E. M., Amorim, P. F., & Aranha, G. N. (2014). Species limits and DNA barcodes in *Nematolebias*, a genus of seasonal killifishes threatened with extinction from the Atlantic forest of south-eastern Brazil, with description of a new species (teleostei: Rivulidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 24(3), 225–236.
- Costa, W. J. E. M. (2016). Colouration, taxonomy and geographical distribution of mangrove killifishes, the *Kryptolebias marmoratus* species group, in southern Atlantic coastal plains of Brazil (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 27(2), 183-192.
- Costa, W. J. E. M., Amorim, P. F., & Mattos, J. L. O. (2017). Molecular phylogeny and timing of diversification in South American Cynolebiini seasonal killifishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 116(January), 61–68.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.
- de Carvalho, A. D. (1959). Novo gênero e nova espécie de peixe anual de Brasília, com uma nota sôbre os peixes anuais da Baixada Fluminense, Brasil (Pisces-Cyprinodontidae-Fundulinae.). *Boletim do Museu Nacional*, 201, 1-10.
- de Freitas, R. T. F., Hilsdorf, A. W. S., Gonçalves, A. C. S., Moreira, H. L. M. (2014). O que é Endogamia e como controlá-la. *Panorama da Aquicultura*. Vol. 24, nº 144, p. 42 a 53, agosto.
- de Oliveira Miranda, N. E., Maciel, N. M., Lima-Ribeiro, M. S., Colli, G. R., Haddad, C. F. B., & Collevatti, R. G. (2019). Diversification of the widespread neotropical frog *Physalaemus cuvieri* in response to Neogene-Quaternary geological events and climate dynamics. *Molecular phylogenetics and evolution*, 132, 67-80.
- DeWoody, J. A., & Avise, J. C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of fish biology*, 56(3), 461-473.
- Dempster, A. P., Laird, N. M., & Rubin, D. B. (1977). Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 39(1), 1–22.

- Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., & Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol*, 4(5), e88.
- Drummond, A. J. and A. Rambaut. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7:214.
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J., & Ovenden, J. R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size ( $N_e$ ) from genetic data. *Molecular ecology resources*, 14(1), 209-214.
- dos Santos Conserva, C., de Andrade, L. M. S., Sant'Ana, D., Carvalho, D. J., Costa, M. E. L., & Koide, S. (2019). Olhares sobre a Drenagem em Brasília: Expansão Urbana e Infraestrutura SOCioecológica na Serrinha do Paranoá, DF. *MIX Sustentável*, 5(2), 149-164.
- Earl, D. A., & VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Fahrig, L. (2003). Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 487–515.
- Fenn, J. D., Song, H., Cameron, S. L., & Whiting, M. F. (2008). A preliminary mitochondrial genome phylogeny of Orthoptera (Insecta) and approaches to maximizing phylogenetic signal found within mitochondrial genome data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(1), 59-68.
- Frankham, R., Ballou, J., & Briscoe, D. (2010). *Introduction to Conservation Genetics* (2<sup>nd</sup> ed.). Cambridge: Cambridge University Press.  
doi:10.1017/CBO9780511809002
- Frankham, R., Bradshaw, C. J., & Brook, B. W. (2014). Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*, 170, 56-63.
- Friedman, M., Keck, B. P., Dornburg, A., Eytan, R. I., Martin, C. H., Darrin Hulsey, C., Wainwright, P. C., & Near, T. J. (2013). Molecular and fossil evidence place the origin of cichlid fishes long after Gondwanan rifting. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1770).  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1733>
- Furness, A. I., Reznick, D. N., Springer, M. S., & Meredith, R. W. (2015). Convergent evolution of alternative developmental trajectories associated with diapause in African and South American killifish. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1802), 20142189.
- García, Graciela, Wlasiuk, G., & Lessa, E. P. (2000). High levels of mitochondrial cytochrome b divergence in annual killifishes of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 129(1), 93–110.

- García, G. (2006). Multiple simultaneous speciation in killifishes of the *Cynolebias adloffii* species complex (Cyprinodontiformes, Rivulidae) from phylogeography and chromosome data. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44(1), 75–87.
- García, G., Gutiérrez, V., Ríos, N., Turner, B., Santiñaque, F., López-Carro, B., & Folle, G. (2014). Burst speciation processes and genomic expansion in the neotropical annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Genetica*, 142(1), 87–98.
- Garner, B. A., Hoban, S., & Luikart, G. (2020). IUCN Red List and the value of integrating genetics. *Conservation Genetics*, 21(5), 795-801.
- Gaudant, J. (2009). Occurrence of the genus *Aphanius* Nardo (cyprinodontid fishes) in the Lower Miocene of the Cheb Basin (Czech Republic), with additional notes on *Prolebias egeranus* Laube. *Journal of the National Museum (Prague), Natural History Series*, 177(8), 83-90.
- Gernhard, T. (2008). The conditioned reconstructed process. *Journal of theoretical biology*, 253(4), 769-778.
- Grant, T. (2019) Outgroup sampling in phylogenetics: Severity of test and successive outgroup expansion, *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 57(4), pp. 748–763. doi: 10.1111/jzs.12317.
- Goudet, J. (2001). *FSTAT, version 2.9. 3: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Institute of Ecology, University of Lausanne, Switzerland.*
- Giugliano, L. G., de Campos Nogueira, C., Valdujo, P. H., Collevatti, R. G., & Colli, G. R. (2013). Cryptic diversity in South American Teiinae (Squamata, Teiidae) lizards. *Zoologica Scripta*, 42(5), 473-487.
- Guerrero-Jiménez, C. J., Peña, F., Morales, P., Méndez, M., Sallaberry, M., Vila, I., & Poulin, E. (2017). Pattern of genetic differentiation of an incipient speciation process: The case of the high Andean killifish *Orestias*. *PLoS ONE*, 12(2), 1–19.
- Gutiérrez, V., Rego, N., Naya, H., & García, G. (2015). First complete mitochondrial genome of the South American annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): Peculiar features among cyprinodontiforms mitogenomes. *BMC Genomics*, 16(1), 1–15.
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Hirsch, P. E., N'Guyen, A., Muller, R., Adrian-Kalchhauser, I., & Burkhardt-Holm, P. (2018). Colonizing islands of water on dry land—On the passive dispersal of fish eggs by birds. *Fish and fisheries*, 19(3), 502-510.
- Hrbek, T., & Larson, A. (1999). The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): A molecular phylogenetic and biogeographic perspective. *Evolution*, 53(4), 1200–1216.

- Hudson, R. R., Boos, D. D., & Kaplan, N. L. (1992). A statistical test for detecting geographic subdivision. *Molecular biology and evolution*, 9(1), 138-151.
- ICMBio, Brasil. (2013). *Sumário executivo do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção*.
- ICMBio-Instituto Chico Mendes. (2013). Aplicação de critérios e categorias da UICN na avaliação da fauna brasileira. ICMBio.
- IUCN, 2021. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-3. <https://www.iucnredlist.org/species/6083/12416027>. Acessado em 06/2022
- IUCN, Comitê de Padrões e Petições. (2022). Diretrizes para o Uso das Categorias e Critérios da Lista Vermelha da IUCN. Versão 15.1. Preparada pelo Comitê de Padrões e Petições. Disponível em <https://www.iucnredlist.org/resources/redlistguidelines>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Lavoué, S., Miya, M., Saitoh, K., Ishiguro, N. B., & Nishida, M. (2007). Phylogenetic relationships among anchovies, sardines, herrings and their relatives (Clupeiformes), inferred from whole mitogenome sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 43(3), 1096-1105.
- Laikre, L., Nilsson, T., Primmer, C. R., Ryman, N., & Allendorf, F. W. (2009). Importance of genetics in the interpretation of favourable conservation status. *Conservation Biology*, 23(6), 1378-1381.
- Lopes, J. S., Balding, D., & Beaumont, M. A. (2009). PopABC: a program to infer historical demographic parameters. *Bioinformatics*, 25(20), 2747–2749.
- Loureiro, M., de Sá, R., Serra, S. W., Alonso, F., Lanés, L. E. K., Volcan, M. V., Calviño, P., Nielsen, D., Duarte, A., & Garcia, G. (2018). Review of the family rivulidae (Cyprinodontiformes, aplocheiloidei) and a molecular and morphological phylogeny of the annual fish genus *Austrolebias* Costa 1998. *Neotropical Ichthyology*, 16(3), 1–20.
- Lovas-Kiss, Á., Vincze, O., Löki, V., Pallér-Kapusi, F., Halasi-Kovács, B., Kovács, G., ... & Lukács, B. A. (2020). Experimental evidence of dispersal of invasive cyprinid eggs inside migratory waterfowl. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(27), 15397-15399.
- Lundberg, J. G. (1993). African–South American Freshwater Fish Clades and Continental Drift: In *Biological Relationships between Africa and South America* (pp. 156–199).
- Machado, A. B. M., Drummond, G. M., & Paglia, A. P. (2008). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. In *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção* (pp. 1420-1420).
- Mayr, E. and O'Hara, R. J. (1986) 'The biogeographic evidence supporting the Pleistocene forest refuge hypothesis', *Evolution*, 40(1), pp. 55–67.

- Martins, J. A. (2019). Desenvolvimento de marcadores genéticos do tipo microssatélites para o Pirá-Brasília (*Simpsonichthys boitonei*), uma espécie de peixe anual endêmica do Distrito Federal. Universidade de Brasília.
- Marwal, A., & Gaur, R. K. (2020). Molecular markers: tool for genetic analysis. In *Animal Biotechnology* (pp. 353-372). Academic Press.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente (2014) Portaria MMA nº 445, de 17 de dezembro de 2014. DOU Nº 245 Seção 1, 18 de dezembro de 2014, p 126-130.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente (2022) Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022. DOU Nº 108 Seção 1, 8 de junho de 2022, p 75-103.
- Murphy, W. J., & Collier, G. E. (1997). A molecular phylogeny for aplocheiloid fishes (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): The role of vicariance and the origins of annualism. *Molecular Biology and Evolution*, 14(8), 790–799.
- Nascimento, W. S. Do, Bezerra, J. G., Lima-Filho, P. A., Yamamoto, M. E., Chellappa, S., & Molina, W. F. (2014). Karyotype patterns of *Hypsolebias antenori* (cyprinodontiformes: Rivulidae): An endangered killifish of the semiarid region of Brazil. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press.
- Oliveira, F. B. D., Molina, E. C., & Marroig, G. (2009). Paleogeography of the South Atlantic: a route for primates and rodents into the New World?. In *South American primates* (pp. 55-68). Springer, New York, NY.
- Oliveira, E. F. et al. (2018) 'Phylogeography of Muller's termite frog suggests the vicariant role of the Central Brazilian Plateau', *Journal of Biogeography*, 45(11), pp. 2508–2519.
- Parenti, L. R. (1981). A Phylogenetic and Biogeographic Analysis of Cyprinodontiform Fishes. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 168, 335–557.
- Piry, S., Luikart, G., & Cornuet, J.-M. (1999). Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90(4), 502–503.
- Pohl, M., Milvertz, F. C., Meyer, A., & Vences, M. (2015). Multigene phylogeny of cyprinodontiform fishes suggests continental radiations and a rogue taxon position of *Pantanodon*. *Vertebrate Zoology*, 65(1), 37-44.
- Ponzetto, J. M., Britzke, R., Nielsen, D. T. B., Parise-Maltempi, P. P., & Alves, A. L. (2016). Phylogenetic relationships of *Simpsonichthys* subgenera (Cyprinodontiformes, Rivulidae), including a proposal for a new genus. *Zoologica Scripta*, 45(4), 394–406.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5), 901-904.

- Ramos, H. A. C. (2010). Modelos qualitativos para investigar o ciclo de vida e a influência de atividades antrópicas sobre os biótopos de Pirá-Brasília - *Simpsonichthys boitonei* - em Brasília , DF. 227.
- Reis, R. E., Kullander, S. O., & Ferraris, C. J. (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), 223–225.
- Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S., & Sánchez-Gracia, A (2017). DnaSP version 6 for 32-bit and 64-bit environments (ZIP file of 11.7 Mb).
- Sato, Y., Miya, M., Fukunaga, T., Sado, T., & Iwasaki, W. (2018). MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1553-1555.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Satoh, T. P., Miya, M., Mabuchi, K., & Nishida, M. (2016). Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. *BMC genomics*, 17(1), 1-20.
- Shendure, J. A., Porreca, G. J., Church, G. M., Gardner, A. F., Hendrickson, C. L., Kieleczawa, J., & Slatko, B. E. (2011). Overview of DNA sequencing strategies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 96(1), 7-1.
- Shibatta, O. A. (2005). Reprodução do pirá-brasília, *Simpsonichthys boitonei* Carvalho (Cyprinodontiformes, Rivulidae), e caracterização de seu habitat na Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Brasília, Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 22, 1146-1151.
- Shibatta, O. A. (2006). Comportamento social do pirá-brasília, *Simpsonichthys boitonei* Carvalho (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 23, 375-380.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*, 18(2), 233-234.
- Silva, G. G., Weber, V., Green, A. J., Hoffmann, P., Silva, V. S., Volcan, M. V., ... & Maltchik, L. (2019). Killifish eggs can disperse via gut passage through waterfowl. *Ecology*, 100(11), 1-4.
- Solé-Cava, A. M. (2001). Biodiversidade molecular e genética da conservação. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 17: 172-192.
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus evolution*, 4(1), vey016.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2003). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics*, (1), 2-3.

- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538.
- Vartia, S., Collins, P. C., Cross, T. F., Fitzgerald, R. D., Gauthier, D. T., McGinnity, P., Mirimin, L., & Carlsson, J. (2014). Multiplexing with three-primer PCR for rapid and economical microsatellite validation. *Hereditas*, 151(2–3), 43–54.
- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics*, 30(9), 418-426.
- Ward, R. D., Hanner, R., & Hebert, P. D. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of fish biology*, 74(2), 329-356.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1358–1370.
- Yuan, M. L., Zhang, Q. L., Zhang, L. I., Guo, Z. L., Liu, Y. J., Shen, Y. Y., & Shao, R. (2016). High-level phylogeny of the Coleoptera inferred with mitochondrial genome sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 104, 99-111.

## ANEXOS

Anexo 1. Lista de espécies, e seus respectivos números de acesso do Genbank, utilizadas na análise filogenética a partir do genoma mitocondrial completo.

Genbank Accession	Espécie	Família	Ordem
NC_003290	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	Rivulidae	Cyprinodontiformes
NC_032387	<i>Kryptolebias hermaphroditus</i>	Rivulidae	Cyprinodontiformes
NC_028510	<i>Austrolebias charrua</i>	Rivulidae	Cyprinodontiformes
NC_044426	<i>Epiplatys dageti</i>	Nothobranchiidae	Cyprinodontiformes
NC_044451	<i>Aphyosemion australe</i>	Nothobranchiidae	Cyprinodontiformes
NC_044460	<i>Nothobranchius foerschi</i>	Nothobranchiidae	Cyprinodontiformes
NC_044433	<i>Aplocheilus lineatus</i>	<b>Aplocheilidae</b>	Cyprinodontiformes
NC_044380	<i>Pachypanchax playfairii</i>	<b>Aplocheilidae</b>	Cyprinodontiformes
NC_011381	<i>Xenotoca eiseni</i>	<b>Goodeidae</b>	Cyprinodontiformes
NC_012312	<i>Fundulus heteroclitus</i>	<b>Fundulidae</b>	Cyprinodontiformes
NC_009125	<i>Cyprinodon rubrofluviatilis</i>	<b>Cyprinodontidae</b>	Cyprinodontiformes
NC_027582	<i>Orestias ascotanensis</i>	<b>Cyprinodontidae</b>	Cyprinodontiformes
CM026089.1	<i>Anableps anableps</i>	<b>Anablepidae</b>	Cyprinodontiformes
NC_011379	<i>Xiphophorus maculatus</i>	<b>Poeciliidae</b>	Cyprinodontiformes
AP006773	<i>Phenacostethus smithi</i>	<b>Phallostethidae</b>	<b>Atheriniformes</b>
NC_035147	<i>Atherinosoma microstoma</i>	<b>Atherinidae</b>	<b>Atheriniformes</b>

Anexo 2. Fragmento do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI) de um dos indivíduos coletados da espécie *Simpsonichthys boitonei*, da população do Guará (Nº de Campo CiUnb 1039-A). Em negrito e sublinhado, bases polimórficas observada na comparação dos indivíduos das duas populações.

```
1 AGAGGATAGG GTCGCCCCCG CCTGCAGGGT CAAAAAAGT TGTGTTTAGA TTACGGTCTG
61 TAAGTAGTAT TGTAATACCC GCAGCTAAAA CGGGTAAAGA CAAGAGAAGA AGGACAGCGG
121 TAATTAATAC AGCTCAGACA AATAAAGGGG TTTGATATTG AGAGAGTACG GGGGGTTTTA
181 TATTTAAAGC TGTAGTAATG AAGTTGATAG CACCTAAAAT AGAAGAAATG CCGGCTAAAT
241 GTAGAGAAAA AATGGTTAAA TCAACAGAAG CTCCAGCATG TGCAAGGTTA CCAGCAAGAG
301 GAGGATATAC AGTTCACCCT GTTCCTGCCC CTGCTTCTAC ACCTGAGGAA GCAAGAAGTA
361 AAAGAAAAGA AGGGGGTAAT AGTCAAAAGC TTATGTTATT TATTCGTGGA AAAGCTATAT
421 CAGGGGAGCC AATTATTAAA GGAACGAGTC AATTACCAA ACCGCCAATC ATAATTGGTA
481 TTAATAATAA AAAAAATTATT ACGAAAGCAT GAGCTGTCAC AACAACATTA TAAATTTGAT
541 CTTCCCCCAG AAGTGAGCCA GGCTGGCTTA ACTCTGCTCG AATTAGCAA CTTAATGCGG
601 TACCAACTAT GCCCG
```

Anexo 3. Organização do genoma mitocondrial da espécie *Simpsonichthys boitonei*.

Gene	Localização		Tamanho	Códon		Sentido
	Start	End		Start	Stop	
tRNA-Phe1	1	68	69			H
12S rRNA	69	1023	955			H
tRNA-Val	1024	1091	68			H
16S rRNA	1092	2736	1645			H
tRNA-Leu(1)	2737	2810	74			H
ND1	2961	3935	975	ATA	TAA	H
tRNA-Ile	3942	4010	69			H
tRNA-Gln	4010	4080	71			L
tRNA-Met	4080	4148	69			H
ND2	4150	5196	1047	ATA	TAA	H
tRNA-Trp	5210	5277	68			H
tRNA-Ala	5278	5349	72			L
tRNA-Asn	5351	5423	73			L
tRNA-Cys	5459	5517	59			L
tRNA-Tyr	5517	5583	67			L
COI	5585	7141	1557	GTG	T-	H
tRNA-Ser(1)	7145	7215	71			L
tRNA-Asp	7219	7288	70			H
COII	7292	7982	691	ATG	T-	H
tRNA-Lys	7983	8054	72			H
ATP8	8057	8224	168	ATG	TAA	H
ATP6	8215	8898	684	ATG	TAA	H
COIII	8898	9683	786	ATG	TAA	H
tRNA-Gly	9750	9817	68			H
ND3	9909	10259	351	ATG	TAA	H
tRNA-Arg	10258	10326	69			H
ND4L	10327	10623	297	ATG	TAA	H
ND4	10617	12036	1420	ATG	T-	H
tRNA-His	12037	12105	69			H
tRNA-Ser(2)	12106	12172	67			H
tRNA-Leu(2)	12172	12246	75			H
ND5	12250	14085	1836	ATG	TAA	H
ND6	14082	14606	525	ATG	TAA	L
tRNA-Glu	14607	14680	74			L
CYTB	14733	15878	1146	ATG	TAA	H
tRNA-Thr	15882	15951	70			H
tRNA-Pro	15978	16047	70			L
D-loop	16048	17402	1355			H