

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**História evolutiva das linhagens do complexo *Cnesterodon
brevirostratus* (Cyprinodontiformes: *Poeciliidae*)**

DANIELA AMBROS QUINSANI

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientação: Nelson Jurandi Rosa Fagundes

Porto Alegre, 15 março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Ao Nelson Fagundes por ser o melhor orientador do mundo. Ao pessoal do laboratório, à Martiela Freitas e ao Elmo Cardoso por me acalmarem durante todo o Mestrado. À Aline Ramos-Fregonezi por sempre responder minhas dúvidas tão rapidamente, mesmo estando de férias. Ao prof. Malabarba pela ajuda no trabalho. Aos Profs Andreia Turchetto Zolet, Eduardo Eizirik e Jorge Dergam dos Santos por aceitarem participar da banca examinadora. Ao CNPq pela bolsa.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
SUMÁRIO.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A Ictiofauna Neortopical.....	2
1.2 Os Campos de Cima da Serra.....	3
1.3 As linhagens evolutivas de <i>Cnesteroson</i>	4
1.4 Ferramentas genéticas para compreender a história evolutiva.....	6
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivos específicos.....	10
3. MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO.....	11
5. OUTRAS ANÁLISES.....	51
4. DISCUSSÃO GERAL	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RESUMO

Cnesterodon brevirostratus é uma espécie de peixe de água doce que ocorre em campos de altitude na Serra Geral do Sul do Brasil. Dados gnômicos recentes mostraram que este táxon consiste em 4 linhagens evolutivas distintas, sendo que 2 delas se subdividem conforme bacias hidrográficas. Morfologicamente, essas linhagens apresentam diferenças no apêndice distal do gonopódio, o que pode estar relacionado à seleção sexual. Além disso, elas apresentam forte relação a distribuição geográfica conforme as bacias hidrográficas da região, algumas estando em simpatria. Apesar de sua recente identificação, aspectos da divergência e história evolutiva dessas linhagens ainda são desconhecidos. Neste trabalho, nós usamos 6840 SNPs nucleares obtidos por RADSeq de 133 indivíduos para realizar uma série de análises a fim de entender padrões na história evolutiva e construir um panorama completo da diversificação dessas linhagens. A análise filogenética realizada por métodos coalescentes mostrou dois clados irmãos que estão de acordo com a morfologia do apêndice distal do gonopódio e não relacionado com a distribuição geográfica. A divergência parece ter sido rápida, sendo que a separação entre esses clados ocorreu há aproximadamente 1,2 milhão de anos atrás, seguido pela separação das linhagens evolutivas e sub-linhagens geográficas, ocorrida entre 1 milhão e 600 mil anos atrás, também durante o Pleistoceno, período caracterizado por repetidas mudanças climáticas. Nenhum evento de introgressão foi detectado entre as linhagens, sugerindo que o isolamento genético entre as linhagens se deu em um cenário de alopatria. Nenhum loco foi identificado como estando sob seleção diversificadora, o que pode reforçar a interpretação de isolamento alopátrico. De acordo com o espectro de frequência alélica, o melhor modelo demográfico para todas as linhagens incluiu crescimento populacional. Na maioria das linhagens, o crescimento ocorreu durante o Holoceno, o que pode estar associado ao aumento de umidade no período, com maior disponibilidade de banhados e turfeiras nos quais a espécie habita. De forma geral, nossos

resultados sugerem que a topografia da região pode ter tido um papel determinante na geração da grande diversidade para esse táxon

ABSTRACT

Cnesterodon brevirostratus is a freshwater fish species occurring in highland grasslands in South Brazil. Recent genomic data have shown that this taxon consists of 4 distinct evolutionary lineages, being that two of them are subdivided accordingly to hydrological basins. Morphologically, these lineages present differences in the distal appendix of the gonopodium, which may be related to sexual selection. In addition, they are strongly associated to a geographic distribution according to the hydrographic basins of the region, some of them are in sympatry. Despite their recent identification, details of the divergence and evolutionary history of these lineages are still unknown. In this work, we used data from 6840 genomic SNPs obtained by RADSeq from 133 individuals in order to use them in different analyzes to search for patterns in evolutionary history and to construct a complete panorama of the diversification of these lineages. The phylogenetic analysis performed by coalescent methods showed the existence of two sister clades being in agreement with the morphology of the distal appendix of the gonopodium and not related to the geographic distribution. The divergence between them seems to have happened very rapidly, with the separation between the two clades mentioned above occurring approximately 1.2 million years ago, followed by the separation of the evolutionary lineages and geographic sub-lineages, between 1 million and 600 thousand years ago, also during the Pleistocene, a period characterized by repeated climatic changes. No introgression event was detected among the lineages, suggesting that the genetic isolation between the lineages occurred in a scenario of allopatry. No locus has been identified as being under diversifying selection, which may reinforce the interpretation of isolation in allopatry. According to the allelic frequency spectrum, the best demographic model for all lineages included population growth. In most of the lineages, the growth occurred during the Holocene, which might be associated to the increase of humidity in the period, with greater availability of wetlands and peat bogs in

which the species lives. In general, our results suggest that the topography of the region may have played a key role in generating the great diversity for this taxon.

1.INTRODUÇÃO

1.1 A Ictiofauna Neotropical

A diversidade de peixes é considerada extremamente alta, e o número de novas espécies descritas vem aumentando continuamente (Vari & Malabarba, 1998). A diversidade na ictiofauna de água doce é especialmente notável, pois, enquanto os oceanos representam 97% da água na Terra e a água presente em rios e lagos apenas 0.0093%, mais de 40% da diversidade total de peixes está contemplada por peixes de água doce. Uma possível explicação para esse incrível fenômeno de diversidade se dá pelo fato de o ambiente de água doce propiciar diversos nichos e alto grau de isolamento entre as espécies (Berra, 2001).

No Neotrópico, onde o reservatório de água doce é bastante grande, não poderíamos deixar de esperar um extraordinário número de espécies, que está estimado entre 6.000 a 8.000 (Schaefer, 1998; Reis *et al.* 2003). O Brasil, maior país da América do Sul, tem 2.300 espécies, que representam 22% da ictiofauna de água doce total (Reis *et al.* 2003, Buckup *et al.*, 2007). Ainda assim, o número de taxons pode estar subestimado (Levêque *et al.*, 2008; Agostinho *et al.*, 2005). A baixa amostragem parece ser um dos principais motivos por trás desse inventário incompleto. O Rio Grande do Sul, um dos estados com melhor amostragem, apresenta muitas espécies endêmicas. Das 12 ordens ocorrentes há quatro grupos com maior número de espécies descritas: Characiformes, Siluriformes, Cichliformes e Cyprinodontiformes (Bertaco *et al.*, 2016).

A ictiofauna neotropical tem uma longa e complexa história evolutiva. Diversos períodos geológicos apresentam evidências de altas taxas de diversificação, sendo que alguns clados se diversificaram no Cretáceo (65-145 m.a) enquanto outros no Paleogeno, por exemplo (23-65 m.a) (Lundberg *et al.*, 1998). Glaciações, movimentação das placas tectônicas e mudanças nos níveis oceânicos que ocorreram ao longo das eras geológicas tem

grande impacto sobre as populações de peixes de água doce, mas ainda se sabe pouco sobre como essas alterações influenciaram a ictiofauna neotropical e o quanto esses eventos foram responsáveis por essa diversificação (Lundeberg *et al.*, 1998; Moyer *et al.*, 2005).

Entre os estudos que tratam dessa maravilhosa parcela da biodiversidade, a maioria trata apenas de aspectos morfológicos e osteológicos, deixando de lado aspectos genéticos e biogeográficos. Assim, a realização de estudos de genética e evolução é importante para adquirirmos ainda mais conhecimento sobre esse grupo. A ictiofauna neotropical apresenta grande potencial para estudos biogeográficos devido a topografia e história geomorfológica da região (Vari & Malabarba, 1998). Além disso, os peixes do Neotrópico estão sujeitos a ações humanas que causam grande impacto nos sistemas aquáticos e muitas informações sobre a biodiversidade podem estar sendo perdidas. Mudanças nos cursos d'água e bacias hidrográficas também podem ter forte influência sobre a diversidade genética das populações de peixes (Castro, 1999; Montoyas-Burgos, 2003; Bruno *et al.*, 2015).

1.2 Os Campos de Cima da Serra

A região sul do Brasil apresenta dois biomas: Pampa e Mata Atlântica. Ambos apresentam grande diversidade e estão sendo devastados por ações humanas (Roesch *et al.*, 2009; Overbeck *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009). O bioma pampa ocupa a metade sul do Rio Grande do Sul, enquanto a Mata Atlântica ocupa a metade norte. A Mata Atlântica é um bioma bastante heterogêneo, e entre suas diferentes formações podemos encontrar a Floresta Ombrófila Mista e os Campos de Cima da Serra (CCS) ou Campos de Altitude (Iserhard *et al.*, 2010). Os Campos de Cima da Serra distribuem-se no norte do Estado, e na região sul de Santa Catarina, sendo caracterizados por altitudes maiores de 800m e clima temperado.

A hidrografia dessa região, no Rio Grande do Sul, compreende as nascentes de 3 bacias: a do rio Uruguai, a do Tramandaí-Mampituba (TM), e a bacia da Laguna dos Patos

(LP). (Malabarba *et al.*, 2009; Bertaco *et al.*, 2016). A bacia do rio Uruguai ocupa a parte norte/noroeste e central dos CCS, e é bastante ampla, ocorrendo tanto no Rio Grande do Sul quanto em Santa Catarina. Nos CCS no Rio Grande do Sul, um de seus principais formadores é o Rio Pelotas. Já a bacia Tramandaí-Mampituba localiza-se a nordeste/leste dos CCS, e embora sua maior parte ocupa a encosta da Serra Geral e o litoral, as nascentes dos rios Maquiné, Três Forquilhas, e Mampituba ocorrem nos CCS. Finalmente, a bacia da Laguna dos Patos ocupa a porção sul/sudoeste dos CCS, e tem no rio das Antas um de seus principais formadores (Krepper *et al.* 2013; Bertaco *et al.*, 2016).

Além disso, essa região é rica em espécies endêmicas tal que o número de novas espécies vem crescendo continuamente (Safford, 2007; Malabarba *et al.*, 2009; Iserhard *et al.*, 2010; Iganci *et al.* 2011). O alto grau de endemismo dessa região pode estar associado ao fato de que, por se tratar de uma região relativamente plana e com diversos sistemas de nascentes, pequenas mudanças no relevo alteram a configuração de drenagem dos cursos d'água, gerando uma diversidade de nichos diferentes e possibilitando esse grande grau de endemismo (Gentry, 1995; Webster, 1995), sendo, portanto, um ambiente muito interessante para estudos evolutivos.

1.3 As linhagens evolutivas de *Cnesterodon*

A família Poeciliidae (Rosen e Bailey, 1993) consiste em peixes geralmente bem pequenos, de água salobra e doce, está distribuída por toda América e é encontrada também na África. Dentro desta família, a subfamília *Poeciliinae*, a qual pertence também o guppy (*Poecilia reticulata*), se destaca como espécie modelo para estudos experimentais sobre evolução (Fraser *et al.*, 2015). No Rio Grande do Sul, o gênero *Cnesterodon* conta com duas espécies amplamente distribuídas, sendo uma delas distribuída no Bioma Pampa (*C. decemmaculatus*), enquanto a outra, *C. brevirostratus*, ocupa as regiões de campos de

altitude (CCS, ver acima), distribuindo-se também no estado de Santa Catarina (Rosa & Costa, 1993). Essa espécie tem cerca de 5cm de comprimento e é vivípara, sendo popularmente chamada de “barrigudinho” devido ao aumento do tamanho da barriga nas fêmeas. *C. brevirostratus* ocorre em ambientes sem correnteza como banhados e turfeiras, e está restrita a ambientes com de grande altitude em locais com vegetação campestre (Malabarba *et al.*, 2013). Já há algum tempo, entretanto, o status taxonômico de *C. brevirostratus* tem sido questionado. Juan Anza e colaboradores propuseram a existência de uma nova espécie para a região dos CCS: *Cnesterodon* sp. nov. B, tendo como principal característica distintiva o formato da porção distal do gonopódio, além de pequenas diferenças no formato da cabeça (dados não publicados, ver Lucinda, 2005). Nesse estudo, o termo “complexo *C. brevirostratus*” será usado para se referir a todas as linhagens evolutivas relacionadas a *C. brevirostratus* que carecem de uma descrição taxonômica formal (como é o caso de *Cnesterodon* sp. nov. B).

Um estudo recente realizado por Fregonezi (2015), utilizando DNA mitocondrial e marcadores genômicos (obtidos por RAD-Seq), revelou que o complexo *C. brevirostratus* é um conjunto de linhagens evolutivas sem relação trivial com os grupos morfológicos tratados como *C. brevirostratus* e *Cnesterodon* sp. nov. B. Foram identificadas 6 linhagens geneticamente distintas (Figura 1). No presente trabalho, as linhagens de cores “amarela”, “azul”, “verde”, e “vermelha”, serão chamadas de linhagens 1, 2, 3 e 4 respectivamente. Essas linhagens apresentam algumas diferenças morfológicas e algumas ocorrem em simpatria e sintopia. As linhagens 1 e 2 subdividem-se em outras duas, fortemente associadas a bacias hidrográficas de Tramandaí-Mampituba (TM) e Laguna dos Patos (LP) e portanto serão chamadas de linhagem 1- TM, linhagem 1-LP, linhagem 2-TM e linhagem 2-LP. Entre elas, o apêndice distal do gonopódio (estrutura reprodutiva do macho) tem morfologia mais curta quando comparada as demais. A linhagem 3 tem em sua maioria apêndice alongado e

distribuição mais ampla, sendo a única que ocorre nas três bacias. Já a linhagem 4 também possui apêndice distal do gonopódio alongado mas ocorre apenas na bacia TM. A existência de seis linhagens evolutivas em um espaço geográfico relativamente limitado revela um sistema bastante complexo.

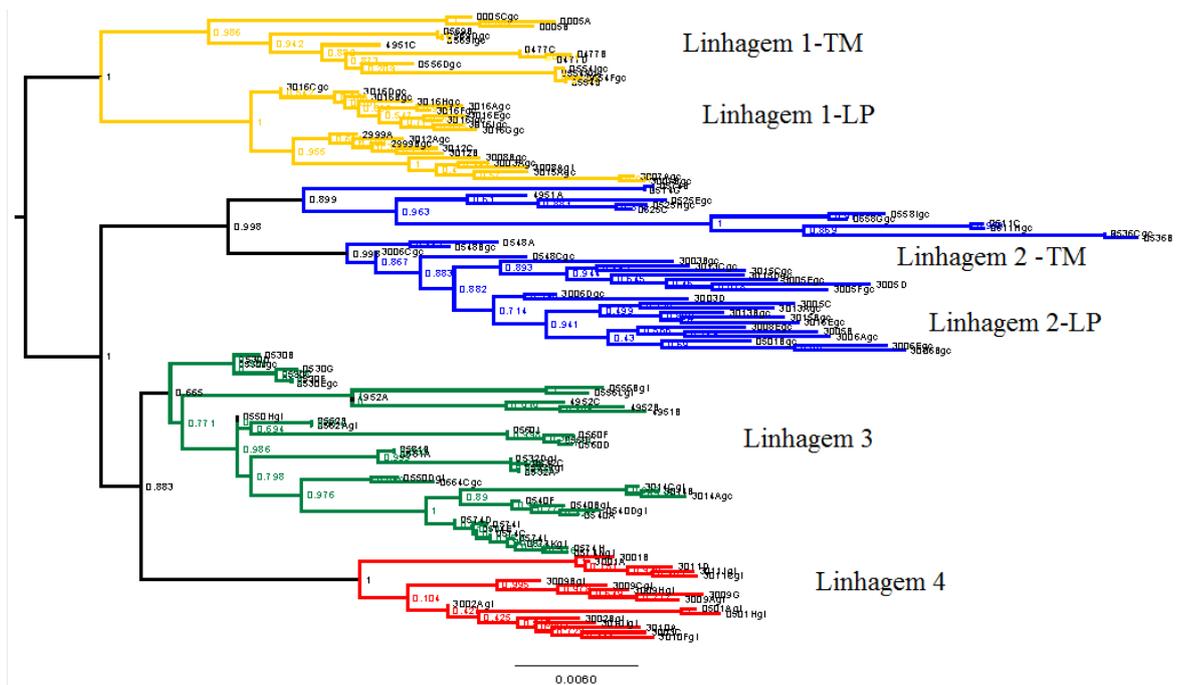


Figura 1. As seis linhagens do complexo *Cnesterodon brevisrostratus* identificadas em análise de RAxML. Modificado de Fregonezi (2015).

Esses resultados ampliaram a possível diversidade específica da região, uma vez que apenas uma possível nova espécie havia sido proposta baseada em dados morfológicos (*Cnesterodon* sp. nov. B). Entretanto, Fregonezi (2015) não analisou em maior detalhe a história evolutiva de cada um desses clados, nem apresentou uma filogenia propriamente dita com dados genômicos para avaliar as relações entre as linhagens. Devido à escassez de conhecimento sobre a ictiofauna neotropical, incluindo o gênero *Cnesterodon*, e ao fato de ações antropogênicas estarem alterando os sistemas aquáticos, fazem-se necessários novos estudos visando esclarecer os processos por trás da diversificação deste grupo. Através de

análises de história demográfica junto de eventos geológicos do passado e padrões fenotípicos e genéticos atuais podemos compreender melhor o processo de especiação em *Cnesterodon* e entender mais sobre a história evolutiva desse gênero.

1.4 Ferramentas genéticas para compreender a história evolutiva

Acontecimentos do passado são responsáveis por moldar a história evolutiva de uma espécie. Os padrões de diversidade e distribuição que vemos hoje são resultado de uma série de mudanças, geográficas e demográficas, ocorridas ao longo do tempo. Muitas ferramentas da genética de populações podem ser usadas para entender a história evolutiva de uma entidade (espécie ou população) (p.ex.; Smýkal *et al.*, 2010; Litvinchuk *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2015; Boissin *et al.*, 2016). Os estudos demográficos são importantes pois o aumento ou diminuição do tamanho populacional, bem como o isolamento ou migração entre populações são eventos que podem ter consequências importantes nas linhagens evolutivas, pois tem influência direta em suas frequências alélicas (Liu *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2016). Além disso, esses processos são subjacentes ao surgimento de novas espécies, de modo que compreendê-los em maior detalhe, nos possibilita classificar espécies (ou linhagens) com mais precisão, fazer estudos comparativos, identificar linhagens evolutivas distintas, e melhorar iniciativas de conservação (Guerrero *et al.*, 2015). Desse modo, a história demográfica é uma maneira poderosa para investigar padrões geográficos e medidas de diversidade genética.

De modo geral, os táxons neotropicais parecem exibir um padrão complexo de tempos e modos de diversificação, sem processos gerais capazes de explicar uma fração importante da história evolutiva de diferentes grupos, possivelmente porque a região apresenta uma história geológica complexa e espécies bastante antigas (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). Ainda assim, nas regiões mais ao norte alguns padrões têm sido encontrados,

como eventos vicariantes que geraram barreiras entre os grupos de peixes (Vari & Malabarba, 1998). Com a utilização de ferramentas atuais de genética de populações e bioinformática podemos inferir sobre mudanças demográficas ocorridas no passado de uma população a partir de marcadores genéticos (Strimmer & Pybus, 2001; Emerson *et al.*, 2001). Porém, as novas abordagens genômicas que geram dados para milhares de locos trouxeram um novo desafio a métodos de análise tradicionais em estudos evolutivos e filogeográficos (Beheregaray, 2008). Gutenkunst e colaboradores (2009) demonstraram que o espectro de frequência alélica (isto é, a distribuição das contagens da frequência absoluta de um alelo para todos os locos) continha informação sobre os eventos demográficos sofridos pelas populações, podendo ser estendido para abordagens multi-populacionais. Essa passou a ser uma abordagem tradicional no tratamento de dados genômicos, e vem sendo utilizada para análises com outras espécies, desde artrópodes a humanos (Gutenkunst *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; McCoy *et al.*, 2014).

Desde o estabelecimento da teoria neutra de Kimura (1968) como modelo nulo para estudos de evolução molecular, muitos evolucionistas buscam encontrar sinais de seleção positiva em determinados genes para compreender o processo adaptação e diversificação nas espécies (Vitti *et al.*, 2013). Esses estudos são mais comuns na espécie humana (p.ex. Voight *et al.*, 2006; Enard *et al.*, 2014) mas muito locos sob seleção também já foram encontrados em outras espécies (p. ex. Pespenti & Palumbi, 2013; Seeb *et al.*, 2014; Schweizer *et al.*, 2016). Novamente, essas inferências só são possíveis graças a poderosas ferramentas de genética de populações, informática e estatística. Existem muitas abordagens para identificação de locos sob seleção (revisado em Vitti *et al.*, 2013), mas uma das mais populares para dados genômicos envolve a identificação de locos “outlier”, isto é, locos cujo padrão de variação parece não ser compatível com o “padrão médio” (neutro) dos demais.

Além disso, análises filogenéticas também são importantes ferramentas que podem, a partir de diferentes dados genéticos, fornecer uma melhor compreensão da ancestralidade comum e das mudanças genéticas ao longo do tempo. Porém, dentro de diferentes abordagens, estimar filogenias utilizando marcadores bialélicos, que normalmente são bastante informativos, pode ser um problema pois não são dados de sequência e, portanto, nem sempre é correto concatená-los (Lemmon & Lemmon, 2013; Liu *et al.*, 2015). SNAPP é um software capaz de contornar essa questão pois implementa um modelo coalescente multiespécies completo (Bryant *et al.*, 2014).

Outro fator fundamental e muito discutido dentro da biologia evolutiva é a especiação ocorrendo com fluxo gênico e em espécies que ocorrem em simpatia, além do grau de miscigenação atual entre determinadas populações. Embora ferramentas e métodos focados em estabelecer taxas de migração entre populações (ou o grau de miscigenação de indivíduos) sejam bastante populares (p. ex. Beerli & Felsenstein, 2001; Pritchard *et al.*, 2000; Alexander *et al.*, 2009), a estimativa de fluxo gênico em conjunto com divergência é algo mais complexo. Entretanto, utilizando dados genéticos, podemos inferir se a divergência entre grupos foi acompanhada de migração eles. No caso de grupos irmãos, análises baseadas em cenários do tipo isolamento-e-migração (IM) foram as primeiras a tentar abordar esse tema (Hey & Nielsen, 2004). A complexidade dessa pergunta, porém, aumenta se considerarmos que eventos de contato secundário podem ter ocorrido em populações ancestrais, ou ainda, que o fluxo gênico se dá entre populações que não constituem grupos irmãos, o que pode ser especialmente problemático no caso de espécies simpátricas proximamente relacionadas (mas não irmãs), como é o caso do complexo *C. brevisstratus*. Recentemente, uma abordagem para lidar com isso foi através de “grafos” de ancestralidade, na qual uma árvore populacional “base” é testada para a existência de reticulações que representariam grandes eventos de migração entre qualquer grupo presente no grafo (Pickrell & Pritchard, 2012).

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo estudar a história evolutiva do complexo *Cnesterodon brevirostratus*, buscando compreender os processos que possam ter propiciado a diversificação de linhagens evolutivas.

2.1 Objetivos específicos

1. Estabelecer as relações filogenéticas dentro das seis linhagens do complexo.
2. Entender a história demográfica do complexo de linhagens, quanto a variação no tamanho populacional, a divergência, o fluxo gênico e o tempo em que esses eventos podem ter ocorrido, relacionando-os a eventos biogeográficos.

4. OUTRAS ANÁLISES

Além dos resultados previamente reportadas no manuscrito, uma série de outras análises foram realizada no software *âaâi* que merecem ser discutidas. Este programa possibilita a construção do espectro de frequência alélica conjunto, que pode englobar 2 ou 3 populações. De acordo com os resultados do SNAPP, espectros de frequência alélica (AFS) conjuntos para as linhagens que formam grupos irmãos foram construídos. Portanto, espectros para as linhagens 1 x 2; 3 x 4; 1-LP x 1-TM, 2-LP x 2-TM foram criados. Nós testamos diferentes modelos: o modelo “neutro” (as duas populações são tratadas como uma só, sem subdivisão populacional), SI (strict isolation) e IM (isolation with migration) com o objetivo de inferir se houve (IM) ou não (SI) migração, assim como também os tempos de divergência entre as populações.

O modelo sem migração (SI) apresentou um maior likelihood para todas as combinações de linhagens (Tabela 1). Apesar de estar de acordo com as demais análises apresentadas que reportam ausência de fluxo gênico, os gráficos não indicaram um bom ajuste entre o modelo e os dados (Figuras 2-6). No exemplo da figura 2, há grande semelhança entre os AFS gerados para os dados e para o modelo. Quanto aos resíduos, sua distribuição é bastante heterogênea e segue uma curva normal. Estas características são esperadas em casos de bom encaixe de acordo com o manual do programa, assim como as informações fornecidas pelo próprio desenvolvedor (Dr. Ryan Gutenkunst, Univ. Arizona) em um fórum online. Diversas tentativas foram feitas para corrigir essas questões, alterando as modalidades possíveis no programa de acordo com o manual, porém sem sucesso. Nas figuras 3-6, os painéis que reportam dados e modelo apresentam características contrárias aquelas que seriam ideais para indicar bons resultados e ainda, os valores dos resíduos são bastante altos. Tanto uma maior filtragem nos dados, quanto alterações nos parâmetros e

opções de cálculo do programa resultaram em encaixes piores ou muito similares aos aqui reportados. Ainda assim, os resultados contêm algumas informações interessantes.

Entre as quatro principais linhagens, os espectros mostram um grande número de alelos privados para cada população. É possível notar no gráfico das linhagens 3 e 4 que grande parte do espectro está branco (Figura 4), a explicação para isso é justamente o fato de elas terem se separado antes das outras e sem a ocorrência de migração, assim cada uma dessas linhagens tem muitos alelos exclusivos. De modo parecido, as linhagens 1 e 2 também apresentam bastante alelos privados (Figura 3), porém um pouco menos, o que pode ser devido ao menor tempo de divergência dessas linhagens quando comparadas as linhagens 3 e 4. Já as linhagens de divergência mais atual apresentam um espectro mais preenchido (Figuras 5 e 6), e nesse aspecto os resultados do $\partial a \partial i$ podem ser facilmente justificados.

Entretanto, as estimativas de tamanho populacional e tempo encontradas foram bem diferentes dos tempos obtidos na abordagem filogenética coalescente (SNAPP) e também dos tamanhos populacionais nas outras análises deste software considerando linhagens individuais (Tabela 2). Todos os tamanhos populacionais foram menores para o espectro conjunto de frequências alélicas. Em relação aos tempos de divergência, com exceção das linhagens 2-LP e 2-TM, houve uma concordância relativa para os tempos de divergência, porém as datas são muito mais recentes nas análises do $\partial a \partial i$. O fato de haver alelos privados em demasia pode ter sido determinante para esses problemas, obrigando o uso de estratégias que acabam reduzindo o poder estatístico do método e reduzindo o número de SNPs disponíveis para análise (o que pode ter levado a uma subestimativa da diversidade e da diferenciação genética entre populações, acarretando numa subestimativa tanto do tamanho populacional quanto dos tempos de divergência). Em termos biológicos, cabe lembrar que a biblioteca de SNPs foi montada com o intuito de identificar as linhagens evolutivas para esse complexo de espécies. Assim, para que um alelo passasse nos filtros de qualidade, bastava

que ele fosse polimórfico para o complexo de espécies como um todo. Assim, o banco de SNPs resultante desse experimento deve contar com diversos alelos linhagem-específicos que são informativos em termos filogenéticos, mas que pouco informam sobre a diversidade genética dentro das linhagens. Esses resultados reforçam a ideia de que pode ser problemático aplicar determinados testes para um conjunto de dados que foi obtido com um propósito diverso.

Tabela 1. Probabilidade composta dos três modelos testados para os quatro AFS conjuntos.

O melhor modelo está indicado em negrito.

	Neutro	SI	IM
1 x 2	-4.308	-626	-2.336
3 x 4	-2.838	-226	-1.655
1-LP x 1-TM	-815	-114	-384
2-LP x 2-TM	-1.132	-170	-429

Tabela 2. Parâmetros demográficos inferidos pelo software *daði* usando os AFS alélica conjunto de duas linhagens.

	N ₀	N _{f1}	N _{f2}	T
1 x 2	5.346	11.855	25.749	14.050
3 x 4	1.385	22.355	10.789	18.911
1-LP x 1-TM	1.587	32.329	6.064	12.262
2-LP x 2-TM	3.851	14.800	17.255	17.913

N₀ – Tamanho populacional efetivo inicial; N_{f1} - Tamanho populacional efetivo final para a primeira população (na ordem que estão listadas); N_{f2} – Tamanho populacional final da segunda população (na ordem que estão listadas); T – Tempo de divergência (em anos).

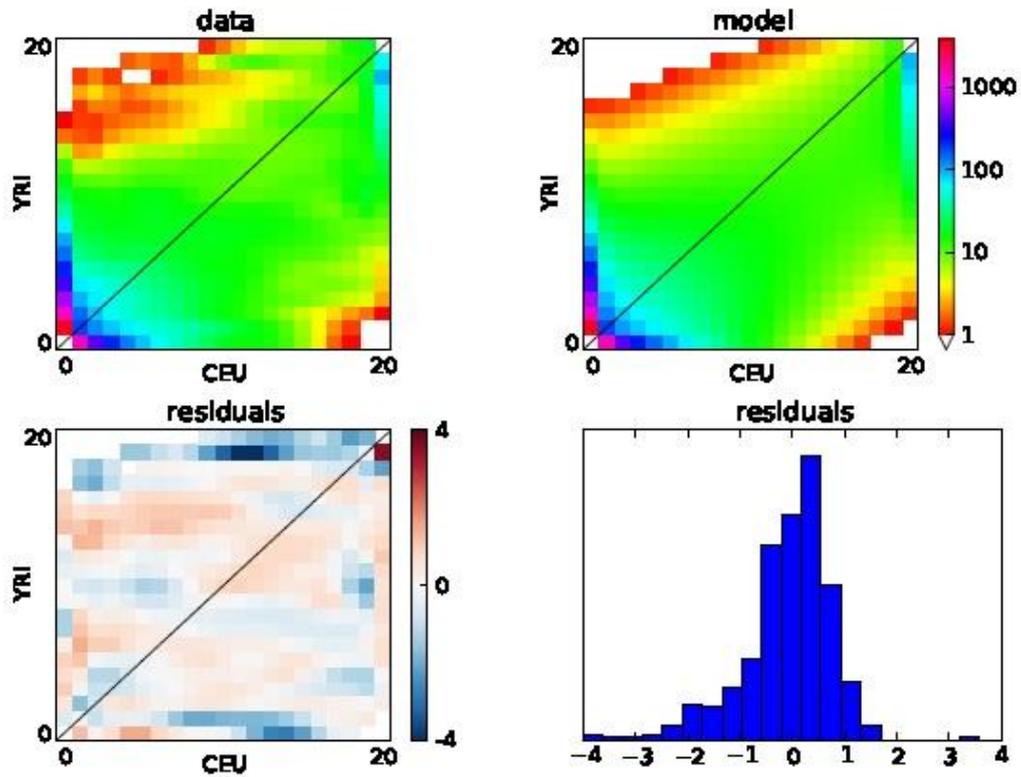


Figura 2. Exemplo de gráfico retirado do manual do *daði* onde dados e modelo apresentam boa concordância. Os primeiros dois painéis os espectros gerados para os dados e para o modelo. Os dois últimos indicam os valores e a distribuição dos resíduos de Anscombe quando estes espectros são comparados.

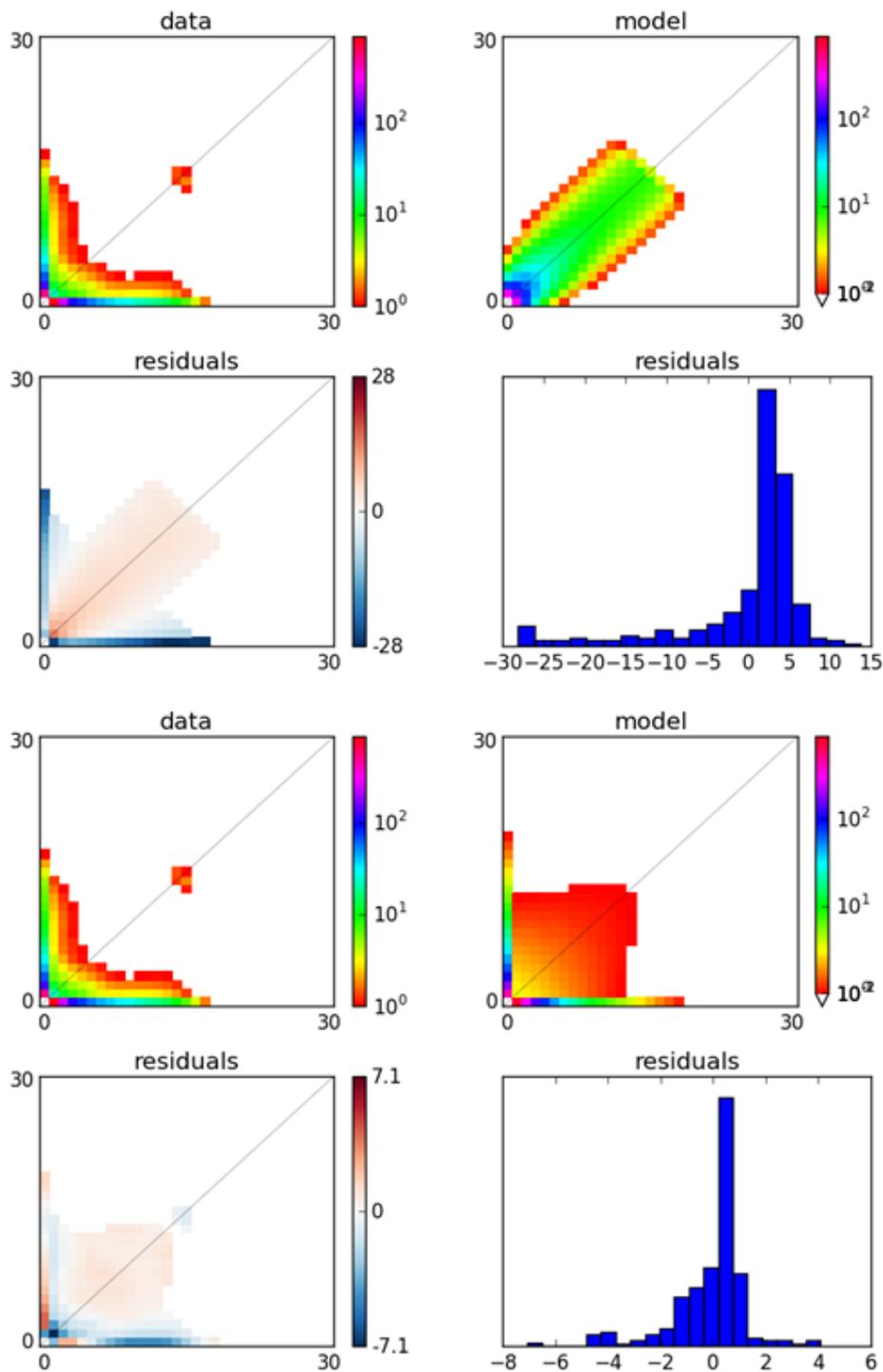


Figura 3. Gráficos de comparação entre modelo e dados gerados pelo software $\partial a \partial i$ para as linhas 1 x 2. Os primeiros quatro painéis indicam o ajuste dos dados ao modelo neutro, enquanto os quatro últimos painéis indicam o ajuste dos dados ao modelo SI.

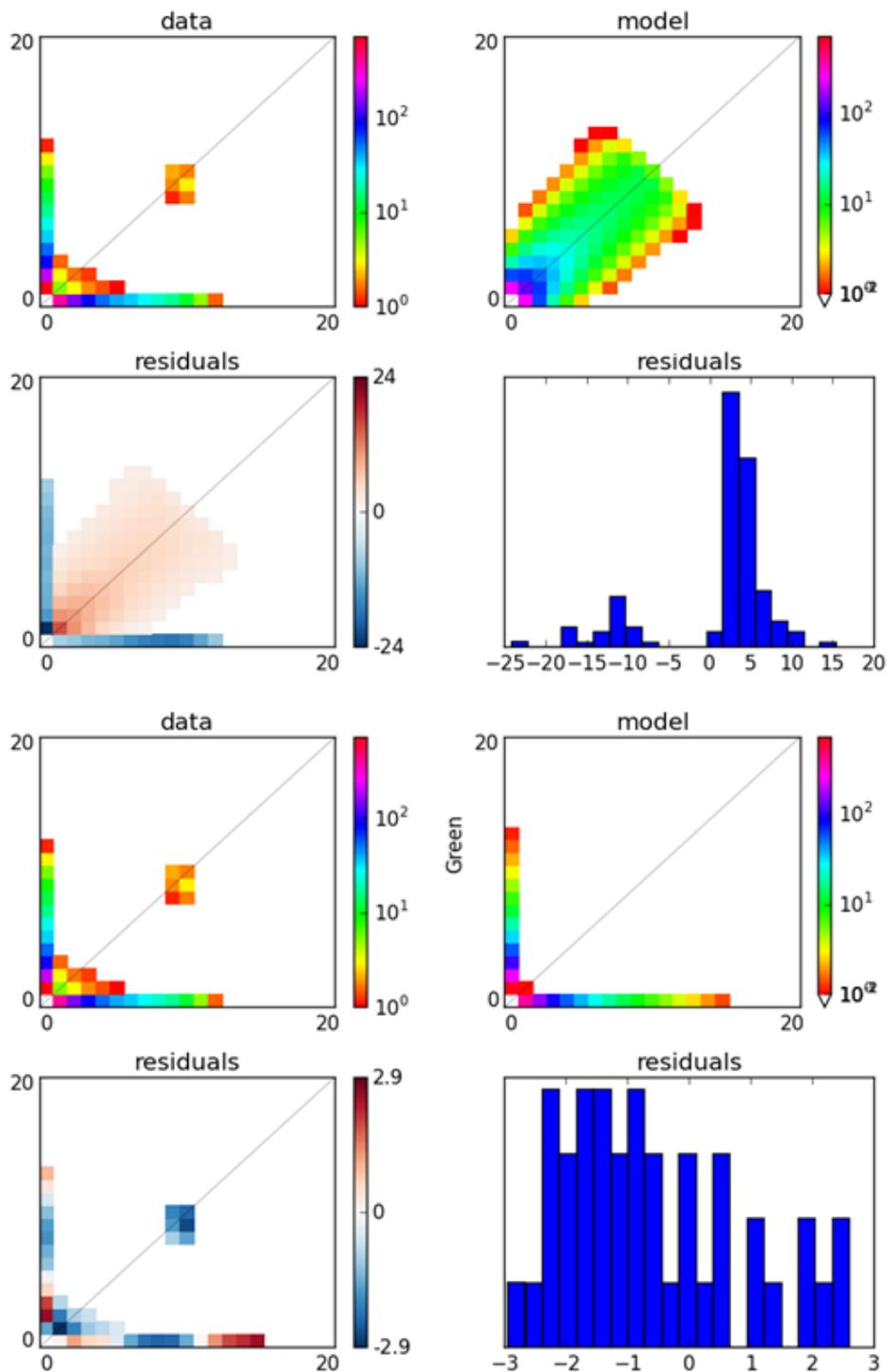


Figura 4. Gráficos de comparação entre modelo e dados gerados pelo software $\partial a \partial i$ para as linhas 3 x 4. Os primeiros quatro painéis indicam o ajuste dos dados ao modelo neutro, enquanto os quatro últimos painéis indicam o ajuste dos dados ao modelo SI.

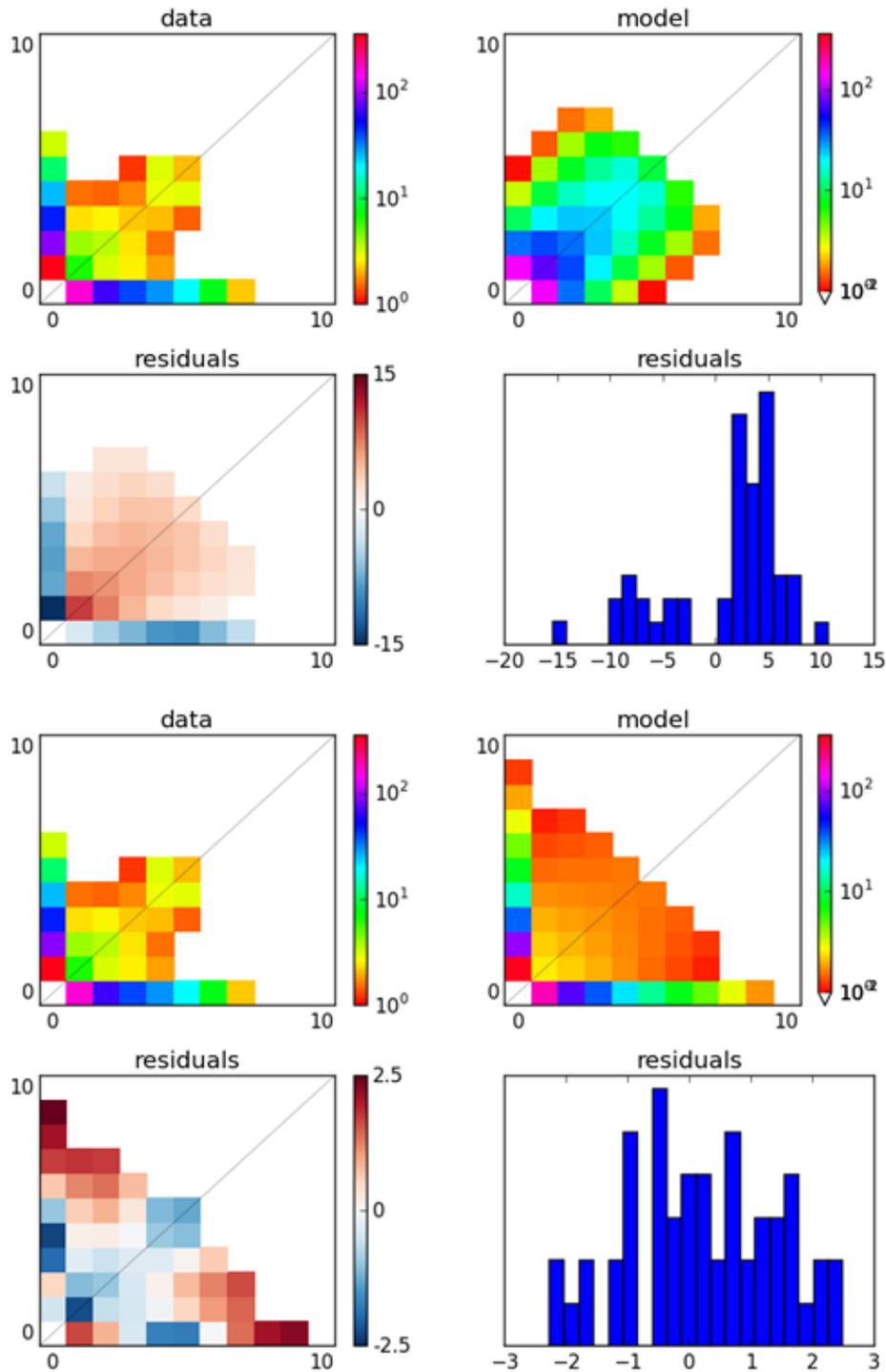


Figura 5. Gráficos de comparação entre modelo e dados gerados pelo software $\partial a \partial i$ para as linhagens 1-LP x 1-TM. Os primeiros quatro painéis indicam o ajuste dos dados aos modelo neutro, enquanto os quatro últimos painéis indicam o ajuste dos dados ao modelo SI.

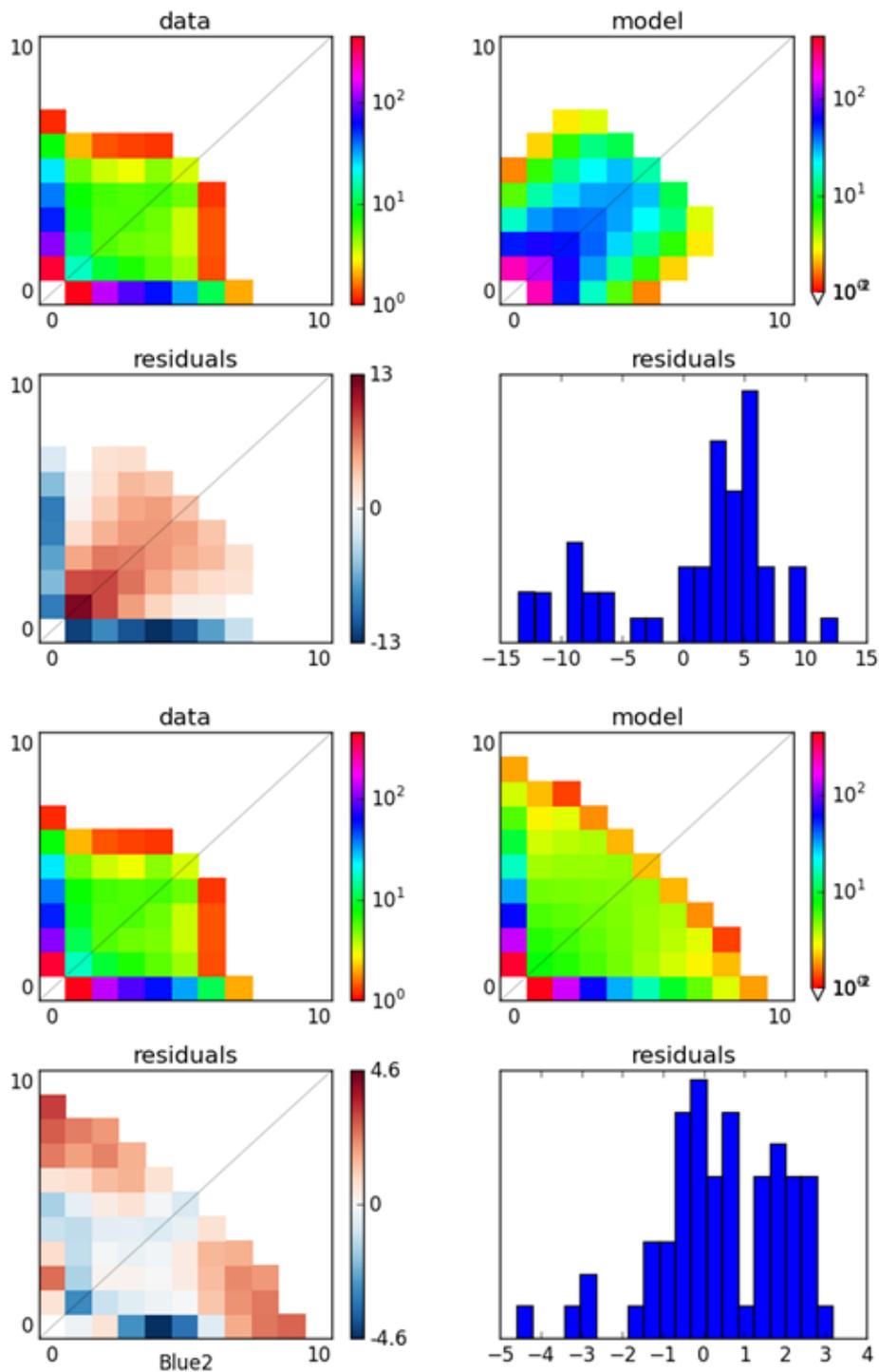


Figura 6. Gráficos de comparação entre modelo e dados gerados pelo software $\partial a \partial i$ para as linhagens 2-LP x 2-TM. Os primeiros quatro painéis indicam o ajuste dos dados ao modelo neutro, enquanto os quatro últimos painéis indicam o ajuste dos dados ao modelo SI.

5. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho, foi feito pela primeira vez a árvore filogenética das linhagens do complexo *Cnesterodon brevirostratus* usando dados genômicos e métodos coalescentes. As datas de divergência são recentes e semelhantes às encontradas para outras espécies que se diversificaram durante o mesmo período (Thomaz *et al.*, 2015; Menezes *et al.*, 2016; Nolasco-Soto *et al.*, 2017). As mudanças climáticas e geomorfológicas são muitas vezes indicadas como principais fatores na diversificação das espécies. Nesse aspecto, nossos resultados para o complexo *C. brevirostratus* são consistentes com outros estudos, em que indicam o Pleistoceno como período de instabilidade climática e propício para surgimento de novas espécies (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Mäder *et al.*, 2013; Menezes *et al.*, 2016) Por outro lado, os padrões de crescimento populacional encontrados datam do Holoceno, geralmente a partir de 4 mil anos atrás, quando a região dos CCS entrou em um período de maior umidade (Behling *et al.*, 2004), o que pode ter favorecido espécies dependentes de ambientes como charcos e turfeiras.

Devido à ausência de evidência de contato secundário antigo entre as linhagens do complexo *C. brevirostratus*, e a ausência de locos evoluindo sob seleção diversificadora, o cenário mais provável para o surgimento dessas linhagens é alopátrico. As diferenças morfológicas que formam a base do isolamento reprodutivo (pré-zigótico) entre as linhagens podem ter surgido como um subproduto do isolamento geográfico pela ação conjunta da deriva genética e, talvez, da seleção natural promovendo adaptação local. Isso deve ter sido facilitado tanto pela história de vida da espécie, que habita charcos e turfeiras com baixo potencial de dispersão, quanto pela própria geomorfologia (ou hidromorfologia) da região, que contém nascentes e cursos d'água que drenam para drenagens distintas em uma área pequena, e que é plana o suficiente para tornar plausível

a ocorrência de múltiplos eventos de captura de cabeceira ou de dispersão entre bacias hidrográficas. Quando há flutuações nos regimes hidrológicos, mudanças entre o contato entre populações ocorrerem e podem acabar isolando apenas parte de uma população, gerando um efeito fundador. Os ambientes de água doce também apresentam bastante variedade ecológica e podem gerar pressões seletivas diferentes (Olden *et al.*, 2001; Boix *et al.*, 2002; De Meester *et al.*, 2005). Seria interessante investigar se existe diferenciação genética dentro de uma mesma linhagem entre os pontos amostrados verificando o grau de isolamento entre os diferentes locais em que uma mesma linhagem ocorre. Provavelmente, devido à rapidez da divergência entre linhagens, as diferenças morfológicas exibidas pelas diferentes linhagens evolutivas do complexo *C. brevirostratus* (no crânio, na mandíbula, na estrutura reprodutiva, nos dentes e nas nadadeiras) tem uma base genética simples. Já foi sugerido que não são necessárias muitas mutações para gerar grandes modificações morfológicas (Fondon & Garner, 2004), principalmente quando os genes que as provocam estão ligados a processos de desenvolvimento (Albertson *et al.*, 2003). Finalmente, a análise recente de uma outra radiação evolutiva neotropical sugeriu que o isolamento reprodutivo alopátrico, sem o envolvimento direto de seleção diversificadora, seria suficiente para explicar o grande número de espécies de roedores sigmodontíneos (Maestri *et al.*, 2017). Nesse contexto, nossos resultados podem ajudar a sugerir que as radiações evolutivas podem ser muito mais afetadas por fatores neutros do que normalmente se supõe.

Finalmente, este estudo corrobora a existência de linhagens evolutivas profundas dentro do complexo *C. brevirostratus*, tornando urgente uma revisão da taxonomia do grupo. Esse seria um passo importante para reafirmar a riqueza da a ictiofauna da região dos Campos de Cima da Serra, podendo ser útil para estratégias de conservação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho AA, Thomaz SM, Gomes LC (2005) Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. *Conserv Biol* 19:646-652.
- Albertson RC, Streebman JT, Kocher TD (2003) Genetic basis of adaptive shape differences in the cichlid head. *J Heredity*, 94:291-301.
- Alexander DH, Novembre J, Lange K (2009) Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res* 19: 1655-1664.
- Beerli P, Felsenstein, J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proc Ntl Acad. of Sci.* 98:4563-4568.
- Beheregaray, LB (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol Ecol* 17:3754-3774.
- Berra, MT (2001) *Freshwater fish distribution*. Academic Press.
- Bertaco VA, Ferrer J, Carvalho FR, Malabarba LR (2016) Inventory of the freshwater fishes from a densely collected area in South America—a case study of the current knowledge of Neotropical fish diversity. *Zootaxa* 4138:401-440.
- Boissin E, Micu D, Goff JL, Neglia V, Bat L, Todorova V, *et al.* (2016). Contemporary genetic structure and postglacial demographic history of the black scorpionfish, *Scorpaena porcus*, in the Mediterranean and the Black Seas. *Mol Ecol* 25:2195-2209.
- Boix D, Biggs J, Céréghino R, Hull AP, Kalettka T, Oertli B (2012) Pond research and management in Europe: “Small is Beautiful”. *Hydrobiologia* 689:1-9.
- Buckup PA, Menezes NA e Ghazzi MS (2007) Catálogo das Espécies de Peixes de Água

- Doce do Brasil. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 290pp.
- Bruno MC, Casciotta JR, Almirón AE, Ricillio FL, Lizarrade MS (2015) Quaternary refugia and secondary contact in the southern boundary of the Brazilian subregion: comparative phylogeography of freshwater fish. *Vertebr Zool* 65:45-55.
- Castro RMC (1999) Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In: Caramaschi EP, Mazzoni R, Bizerril CRSF, E PeresNeto PR (eds) *Ecologia de peixes de riachos. Série Oecologia Brasiliensis. Volume 7.* PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, pp 139-155.
- De Meester L, Declerck S, Stoks R, Louette G, Van De Meutter F, De Bie T, *et al.*(2005) Ponds and pools as model systems in conservation biology, ecology and evolutionary biology. *Aquat Conserv* 15:715-725.
- Emerson BC, Paradis E, Thébaud C (2001) Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends Eco Evol* 16:707-716.
- Enard D, Messer PW, Petrov DA (2014) Genome-wide signals of positive selection in human evolution. *Genome Res* 24:885-895.
- Foll M and OE Gaggiotti (2008) A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics* 180:977-993.
- Fondon JW, Garner HR (2004) Molecular origins of rapid and continuous morphological evolution. *Proc Ntl Acad Sci* 101: 18058-18063.
- Fraser BA, Künstner A, Reznick DN, Dreyer C, Weigel D (2015) Population genomics of natural and experimental populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Mol Ecol* 24: 389-408.

- Fregonezi, AMC (2015) História Evolutiva de *Cnesterodon* Garman, 1895: Padrões de diversificação em ambientes campestres do Bioma Pampa e da Floresta Atlântica revelados por estudos filogenéticos e filogeográficos. Tese de doutorado. UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Gentry AH (1995) Patterns of diversity and floristic composition in neotropical montane forests. In: Churchill SP, Balslev H, Forero E e Luteyn JL (eds) Biodiversity and conservation of neotropical montane forests. New York Bot Garden, New York, pp.103-126.
- Guerrero J, Gallo-Reynoso JP, Biek R (2015) Mitochondrial DNA diversity, genetic structure, and demographic history of the Neotropical otter (*Lontra longicaudis*) in Mexico. *J Mammal* 96:1162-1173.
- Gutenkunst RN, Hernandez RD, Williamson SH, Bustamante CD (2009) Inferring the joint demographic history of multiple populations from multidimensional SNP frequency data. *PLoS Genet* 5:e1000695.
- Hey J, Nielsen R (2004) Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167:747-760.
- Iganci JR, Heiden G, Miotto STS, Pennington R (2011) Campos de Cima da Serra: the Brazilian Subtropical Highland Grasslands show an unexpected level of plant endemism. *Bot J Linn Soc* 167:378-393.
- Iserhard CA, Quadros MT, Romanowski HP, Mendonça Jr MS (2010) Borboletas (Lepidoptera: Papilionoidea e Hesperioidea) ocorrentes em diferentes ambientes na Floresta Ombrófila Mista e nos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biota Neotrop* 1:309-320.

- Kimura M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217:624-626.
- Krepper CM, Garcia NO, Jones PD (2003) Interannual variability in the Uruguay River basin. *Int J Climatol* 23:103-115.
- Lemmon EM, Lemmon AR (2013) High-throughput genomic data in systematics and phylogenetics. *Ann Rev Ecol Evol Syst* 44:99-121.
- Levêque C, Oberdorff T, Paugy D, Stiassny MLJ, Tedesco PA (2008) Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia* 595:45-567.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM., *et al.* (2015) Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta tropica* 151:166-177.
- Litvinchuk SN, Crottini A, Federici S, De Pous P, Donaire D, Andreone F, *et al.* (2013) Phylogeographic patterns of genetic diversity in the common spadefoot toad, *Pelobates fuscus* (Anura: Pelobatidae), reveals evolutionary history, postglacial range expansion and secondary contact. *Org Divers Evol* 13:433-451.
- Liu S, Lorenzen ED, Fumagalli M, Li B, Harris K, Xiong Z, *et al.* (2014) Population genomics reveal recent speciation and rapid evolutionary adaptation in polar bears. *Cell* 157:785-794.
- Liu L, Xi Z, Wu S, Davis CC, Edwards SV (2015) Estimating phylogenetic trees from genome- scale data. *Ann N Y Acad Sci* 1360:36-53.
- Lorenz- Lemke AP, Togni PD, Mäder G, Kriedt RA, Stehmann JR, Salzano FM, *et al.* (2010) Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Mol Ecol* 19:5240-5251.

- Lucinda PH (2005) Systematics of the genus *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae). *Neotrop Ichthyol* 3:259-270.
- Lundberg, JG, Marshall LG, Guerrero J, Horton B, Malabarba MCSL, Wesselingh F (1998) The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (pp. 13–48). Porto Alegre: Edipucrs.
- Ma X, Kelley JL, Eilertson K, Musharoff S, Degenhardt JD, Martins AL, *et al.* (2013) Population genomic analysis reveals a rich speciation and demographic history of orangutans (*Pongo pygmaeus* and *Pongo abelii*). *PloS one* 8:e77175.
- Mäder G, Fregonezi JN, Lorenz-Lemke AP, Bonatto SL, Freitas LB (2013) Geological and climatic changes in quaternary shaped the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic species of petunia. *BMC Evol Biol* 13:178.
- Maestri R, Monteiro LR, Fornel R, Upham NS, Patterson BD, Freitas TRO (2017) The ecology of a continental evolutionary radiation: Is the radiation of sigmodontine rodents adaptive?. *Evolution* 71:610–632.
- Malabarba LR, Fialho CB, Anza JA, Santos JF, Mendes GN (2009) Fauna aquática: peixes. In: Boldrini II (ed) *Biodiversidade dos campos no planalto das araucárias*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp 131-141.
- Malabarba LR, Neto PC, Bertaco VDA, Carvalho TP, dos Santos JF, Artioli LGS (2013) Guia de identificação dos peixes da bacia do rio Tramandaí. Porto Alegre: Via Sapiens.
- McCoy RC, Garud NR, Kelley JL, Boggs CL, Petrov DA (2014) Genomic inference accurately predicts the timing and severity of a recent bottleneck in a nonmodel insect population. *Mol Ecol* 23:136-150.

- Menezes MO, Zappi DC, Moraes EM, Franco FF, Taylor NP, Costa IR, Loiola MI (2016) Pleistocene radiation of coastal species of *Pilosocereus* (Cactaceae) in eastern Brazil. *J Arid Environ* 135:22-32.
- Montoya-Burgos JI (2003) Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Mol Ecol* 12:1855-1867.
- Moyer GR, Winemiller KO, McPhee MV, Turner TF (2005) Historical demography, selection, and coalescence of mitochondrial and nuclear genes in *Prochilodus* species of northern South America. *Evolution* 59:599-610.
- Nolasco-Soto J, González-Astorga J, de los Monteros AE, Galante-Patiño E, Favila ME (2017) Phylogeographic structure of *Canthon cyanellus* (Coleoptera: Scarabaeidae), a Neotropical dung beetle in the Mexican Transition Zone: insights on its origin and the impacts of Pleistocene climatic fluctuations on population dynamics. *Mol Phylogen Evol* 109:180-190.
- Overbeck GE, Müller SC, Fidelis A, Pfadenhauer J, Pillar VD, Blanco CC, *et al.* (2007) Brazil's neglected biome: the South Brazilian Campos. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 9:101-116.
- Pespeni MH, Palumbi SR (2013) Signals of selection in outlier loci in a widely dispersing species across an environmental mosaic. *Mol ecol* 22:3580-3597.
- Pickrell JK, Pritchard JK (2012) Inference of population splits and mixtures from genome-wide allele frequency data. *PLoS Genet* 8:e1002967.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Reis RO, Kullander SO e Ferraris CJ (2003) Check list of the freshwater fishes of South

- and Central America. EdiPUCRS, Porto Alegre, 729 pp.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol Conserv* 142:1141-1153.
- Roesch LFW, Vieira FCB, Pereira VA, Schünemann AL, Teixeira IF, Senna AJT, Stefenon VM (2009) The Brazilian Pampa: a fragile biome. *Diversity* 1:182-198.
- Rosa RS, Costa WJEM (1993) Systematic revision of the genus *Cnesterodon* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) with the description of two new species from Brazil. *Copeia* 3:696-708.
- Rosen DE, Bailey RM (1963) The poeciliid fishes (Cyprinodontiformes): their structure, zoogeography, and systematics. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 126:1-176.
- Safford HD (2007) Brazilian Páramos IV. Phytogeography of the campos de altitude. *J Biogeogr* 34:1701-1722.
- Schaefer SA (1998) Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Edipucrs, Porto Alegre, pp. 375-400.
- Schweizer RM, Vonholdt BM, Harrigan R, Knowles JC, Musiani M, Coltman D, *et al.* (2016) Genetic subdivision and candidate genes under selection in North American grey wolves. *Mol Ecol* 25:380-402.
- Seeb LW, Waples RK, Limborg MT, Warheit KI, Pascal CE, Seeb JE (2014) Parallel signatures of selection in temporally isolated lineages of pink salmon. *Mol Ecol* 23:2473-2485.

- Singh ND, Jensen JD, Clark AG, Aquadro CF (2013) Inferences of demography and selection in an African population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 193:215-228.
- Smýkal P, Kenicer G, Flavell AJ, Corander J, Kosterin O, Redden RJ, *et al.* (2011) Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genet Resour* 9:4-18.
- Strimmer K, Pybus, OG (2001) Exploring the demographic history of DNA sequences using the generalized skyline plot. *Mol Biol Evol* 18: 2298-2305.
- Thomaz AT, Christie MR, Knowles LL (2016) The architecture of river networks can drive the evolutionary dynamics of aquatic populations. *Evolution* 70:731–739.
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol Evol* 22:1193-1213.
- Vari RP, Malabarba LR (1998) Neotropical Ichthyology: an overview. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (eds) *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. EdiPUCRS, Porto Alegre, pp 1-11.
- Vitti JJ, Grossman SR, Sabeti PC (2013) Detecting natural selection in genomic data. *Annual Rev Genet* 47:97-120.
- Voight BF, Kudravalli S, Wen X, Pritchard JK (2006) A map of recent positive selection in the human genome. *PLoS Biol* 4:e72.
- Wang GD, Zhai W, Yang HC, Fan RX, Cao X, Zhong L, *et al.* (2013) The genomics of selection in dogs and the parallel evolution between dogs and humans. *Nat Comm* 4: 1860.

- Wang GD, Zhai W, Yang HC, Wang L, Zhong L, Liu YH, *et al.* (2016) Out of southern East Asia: the natural history of domestic dogs across the world. *Cell Res* 26:21-33.
- Webster GL (1995) The panorama of neotropical clouds forests. In: Churchill SP, Balslev H, Forero E e Luteyn JL (eds) Biodiversity and conservation of neotropical montane forests. New York Botanical Garden, New York, pp 53-78.
- Zhao S, Zheng P, Dong S, Zhan X, Wu Q, Guo X, *et al.* (2013) Whole-genome sequencing of giant pandas provides insights into demographic history and local adaptation. *Nat Genet* 45:67-71.