

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**FILOGEOGRAFIA DE *CYANOCHARAX ITAIMBE* MALABARBA & WEITZMAN
(TELEOSTEI: CHARACIDAE)**

Karina Vogel Vidal de Oliveira

Orientador: Luiz Roberto Malabarba

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao
Instituto de Biociências - UFRGS como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2010

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido por todo apoio, ajuda e por ter entendido a necessidade de adiarmos em seis meses nossos projetos.

Ao Malabarba por ter tornado esse projeto possível, pelo seu conhecimento, por tudo que me ensinou, pelo apoio e por todo o seu envolvimento durante todas as etapas deste trabalho.

À Andréa pela ajuda, por me ensinar muito sobre biologia molecular e filogeografia e por ter me ajudado mesmo de férias na Bahia.

À Renata pelo auxílio constante no laboratório e pela amizade.

Ao Saulo pela amizade, por me animar e pelos inúmeros cafezinhos.

À Circe pelo apoio.

À Fernanda, à Júlia, à Andréia, à Andréa e ao Juliano pela ajuda na coleta de *Cyanocharax itaimbe*.

Ao Juliano pela ajuda na identificação correta dos peixes e me ensinar a ver a diferença entre o *C. alburnus* e o *C. itaimbe*.

A todos do laboratório de ictiologia pela ajuda e apoio.

“Varieties, as we shall see, may justly be called incipient species”

Charles Darwin

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho é apresentado na forma de artigo, segundo as normas exigidas pela revista *Neotropical Ichthyology* para o envio de manuscritos (anexo 1), com exceção das figuras que estão inseridas no corpo do texto e do idioma.

Filogeografia de *Cyanocharax itaimbe* Malabarba & Weitzman (Teleostei: Characidae)

Karina Vogel Vidal de Oliveira¹, Andréa Tonolli Tomaz¹ e Luiz Roberto Malabarba¹

¹Laboratório de Ictiologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, Brasil.

Abstract

This study investigates the phylogeography of *Cyanocharax Itaimbé* (Teleostei: Characidae) to elucidate whether there is divergence in the genetic lineages among populations present in different river basins, inferring on their degree of isolation and on the historical factors that can influence this process. A total of 57 fish specimens of the genus *Cyanocharax* were used in this study: 1 specimen of *C. alburnus*, 2 of *C. dicropotamicus* and 54 of *C. itaimbe*, the last ones caught in four drainages (Maquiné, Três Forquilhas, Mampituba and Araranguá Rivers). The investigation was based on the COI mitochondrial gene, amplified by PCR and sequenced for haplotype identification and phylogenetic tree construction. The results revealed that population of *C. itaimbe* from the Araranguá River basin is a distinctive group regarding the three other populations. The populations from Três Forquilhas and Mampituba river basins showed more recent gene flow.

Resumo

O presente estudo investiga a filogeografia de *Cyanocharax itaimbe* (Teleostei: Characidae) buscando elucidar se há divergência nas linhagens gênicas entre as populações presentes em bacias hidrográficas distintas, inferindo sobre seu grau de isolamento e sobre os fatores históricos que podem influenciar neste processo. Um total de 57 espécimes de peixes do gênero *Cyanocharax* foram utilizados neste estudo, sendo 1 indivíduo de *C. alburnus*, 2 espécimes de *C. dicropotamicus* e 54 exemplares de *C. itaimbe*, estes últimos provenientes de quatro bacias hidrográficas (rios Maquiné, Três Forquilhas, Mampituba e Araranguá). A investigação baseou-se nas linhagens do gene mitocondrial COX I, amplificadas por PCR e sequenciadas para posterior identificação de haplótipos e construção de árvores filogenéticas, com o uso de *softwares* específicos. Os resultados revelaram que a população de *C. itaimbe* da bacia do rio Araranguá forma um grupo distinto em relação às outras três populações. As populações das bacias dos rios Três Forquilhas e Mampituba apresentam fluxo gênico mais recente.

Palavras-Chave: Biogeografia, peixes Neotropicais, gene COX I.

Introdução

A ictiofauna de água doce Neotropical é reconhecida como a mais rica em espécies descritas do mundo, porém a sua biogeografia ainda é pouco conhecida (Ribeiro, 2006). Weitzman *et al.* (1988) sugerem que esse conhecimento poderia ser expandido por meio de estudos de pequenos grupos monofiléticos, que sejam relativamente recentes filogeneticamente e endêmicos de áreas restritas. Isto facilitaria a identificação de prováveis extinções e das relações entre as áreas de endemismo, além de permitir a avaliação das hipóteses propostas sobre os mecanismos de evolução para esses organismos. As informações filogenéticas geradas dessa forma seriam de fundamental importância para o entendimento de questões relativas à biogeografia histórica numa escala menor que a continental (Vari & Weitzman, 1990). Neste contexto, introduz-se a filogeografia, como uma subdisciplina da biogeografia, que enfatiza aspectos históricos que levaram à distribuição contemporânea das linhagens gênicas (Avise, 1998).

Na busca da compreensão dos processos que culminaram na atual distribuição e diversidade das linhagens gênicas dos peixes de água doce, estão sendo usados marcadores moleculares que têm colaborado para um maior entendimento da questão, podendo corroborar ou refutar hipóteses e auxiliar no esclarecimento de problemas evolutivos ainda não resolvidos. A partir da utilização de DNA mitocondrial (mtDNA) são obtidas informações sobre os níveis mais profundos de divergência filogenética (Sunnucks *et al.*, 2000), principalmente por apresentar uma evolução rápida nas populações da maioria dos animais e ser transmitido, raras exceções, pela linhagem materna, sem recombinação intermolecular, sendo por isso uma ferramenta muito utilizada em estudos filogenéticos a nível de populações (Avise, 1998). Além disso, as taxas de substituições de nucleotídeos são relativamente homogêneas dentro dos táxons, tornando possível estimar a cronologia da colonização e os eventos de diversificação (Bermingham & Martini, 1998).

Atualmente, vem sendo convencionado o uso da seqüência de uma região de um único gene que pode ser usada como base para um sistema de identificação biológica global para animais, conhecido por DNA *barcoding*. A disponibilidade de *primers* para a amplificação de um fragmento com 655 pares de base do citocromo *c* oxidase sub-unidade I (COX I) para diversos filos, estabeleceu a terminação 5' deste gene mitocondrial como um alvo particularmente promissor para identificação de espécies. O

gene COX I codifica parte da enzima terminal da cadeia respiratória mitocondrial, sendo que as variações deste gene entre os indivíduos de uma espécie são relativamente baixas quando comparadas às variações entre as espécies (Ward *et al.*, 2009). De fato, o gene COX I possui uma taxa de mutação elevada mesmo para DNA mitocondrial (Hubert *et al.*, 2008).

Neste estudo é investigada a filogeografia de *Cyanocharax itaimbe* Malabarba & Weitzman a partir das seqüências do gene COX I encontradas para diferentes populações desta espécie. O gênero *Cyanocharax* compreende um grupo de pequenos peixes caracídeos reconhecível em campo principalmente pela coloração azul dos espécimes maduros. Este gênero pertence ao clado A (*sensu* Malabarba & Weitzman, 2003), juntamente com *Odontostoechus*, *Bryconamericus*, entre outros.

A descrição da espécie *Cyanocharax itaimbe* foi baseada em amostras de populações coletadas da bacia do rio Mampituba (situada na divisa entre os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil); entretanto, amostras de outras populações isoladas geograficamente foram identificadas como *C. itaimbe* por Malabarba & Weitzman (2003). Uma ocorre imediatamente ao norte, no rio Araranguá e seus tributários (Santa Catarina), e a outra imediatamente ao sul, no sistema do rio Tramandaí (Rio Grande do Sul). Nesta última região, foi encontrado *C. itaimbe* nos vales dos rios Maquiné e Três Forquilhas na Serra Geral. Não foram encontradas diferenças claras entre estas populações, exceto por diferentes valores do número médio de raios ramificados na nadadeira anal (Malabarba & Weitzman, 2003).

Espécies do gênero *Jenynsia* (Cyprinodontiformes) de ocorrência restrita foram descritas por Ghedotti & Weitzman (1996) e Ghedotti *et al.* (2001, sendo *J. santaecatarinae* endêmica do rio Araranguá e *J. weitzmani* para o rio Tubarão. Além disso, *Jenynsia unitaenia* ocorre nas mesmas bacias do que *C. itaimbe*. Espécies do gênero *Epactionotus* (Siluriformes) também tem sua distribuição restrita à região estudada, sendo *E. bilineatus* endêmica dos rios Maquiné e Três Forquilhas, *E. itaimbezinho* endêmica do rio Mampituba e *E. gracilis* endêmica da bacia do rio Araranguá (Reis & Schaefer, 1998). Estes resultados indicam que se trata de uma região de cabeceiras suscetível a processos vicariantes de especiação, apresentando alta taxa de endemismo, situação característica da costa brasileira (Bizerril, 1994).

A faixa da costa sul brasileira, onde os levantamentos para este estudo foram realizados, englobando toda a área de distribuição geográfica de *C. itaimbe*, localiza-se na região que se estende do Cabo de Santa Marta (SC) até Tramandaí (RS), onde a

planície costeira é mais estreita e tem seu limite interno marcado pelas escarpas da Serra Geral, borda leste da bacia do rio Paraná (Villwock *et al.*, 2005). Parte do litoral Norte do Rio Grande do Sul é formado por uma seqüência de lagoas paralelas à faixa oceânica, a maioria delas interligadas por pequenos canais e rios compondo a bacia do rio Tramandaí, que tem como principais tributários na porção norte o rio Maquiné que deságua na lagoa dos Quadros e o rio Três forquilhas que deságua na lagoa Itapeva (Ferreira *et al.*, 2006). Em termos geológicos, a região da bacia do rio Tramandaí é formada por rochas sedimentares da formação Botucatu, que se interdigitam e são sobrepostas por rochas vulcânicas da formação da Serra Geral e por sedimentos costeiros não consolidados que formam uma sucessão de terraços pleistocênicos e holocênicos marinhos (Tomazelli & Villwock, 2000).

Por definição, em qualquer ponto no tempo, as bacias de drenagem de água doce são espacialmente desconectadas, e seria esperado que as populações que as habitam estivessem geneticamente estruturadas de acordo. Entretanto, as paisagens e cursos de rios mudam ao longo do tempo geológico e bacias adjacentes podem ser conectadas repetidamente por capturas de cabeceiras, enquanto algumas bacias podem permanecer isoladas. Dessa forma, as espécies de peixes de água doce podem apresentar uma estrutura genealógica que corresponde aproximadamente a estas conexões e desconexões históricas dos cursos d'água (Awise, 2000). O presente trabalho tem como objetivo elucidar se há divergência nas linhagens gênicas entre as populações de *C. itaimbe* presentes em bacias de drenagem distintas, inferindo sobre seu grau de isolamento reprodutivo e sobre os fatores históricos que podem influenciar neste processo.

Material e Métodos

1. Amostragem

Um total de 57 espécimes de peixes do gênero *Cyanocharax* foram utilizados neste estudo, sendo 54 exemplares de *C. itaimbe* (Fig. 1), provenientes de 11 pontos de coleta englobando toda a área de distribuição da espécie nas bacias (Fig. 2), e 1 indivíduo de *C. alburnus* e 2 espécimes de *C. dicropotamicus* obtidos da coleção de tecidos do Laboratório de Ictiologia, Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Todos exemplares coletados foram

depositados na coleção de tecidos da UFRGS. As amostras foram mantidas em etanol 96%.



Fig. 1. Exemplar de *Cyanocharax itaimbe* coletado na localidade de Barra do Ouro, na bacia do rio Maquiné, em 31 de março de 2010.

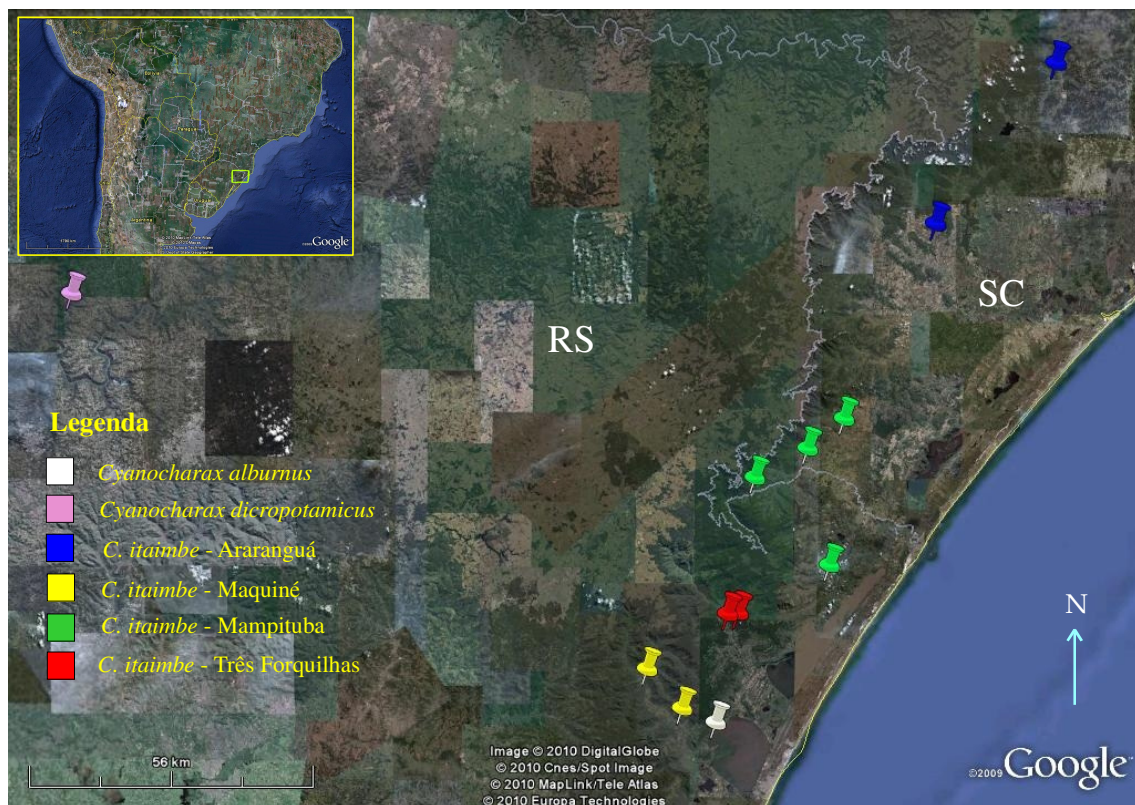


Fig. 2. Locais de captura dos espécimes analisados no estudo (os nomes Araranguá, Maquiné, Mampituba e Três Forquilhas referem-se aos principais rios das bacias hidrográficas amostradas).

2. Extração de DNA, Amplificação e Seqüenciamento

As extrações de DNA, a partir das amostras de tecido, foram realizadas de acordo com o protocolo modificado de precipitação em sal de Medrano *et al.* (1990). Nesta etapa, uma parcela dos produtos gerados foram submetido a uma eletroforese em

gel de Agarose 1% com GelRed, visando certificar-se de que a extração de DNA foi bem sucedida.

A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foi realizada para o fragmento mitocondrial Citocromo Oxidase I (COX I). Os *primers* utilizados foram o L-1490 (“5’-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3’”) e o H2198 (“5’-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT”) (Herbert *et al.*, 2003). As reações de PCR, de 20 μ L, foram realizadas com as seguintes concentrações: 10-50ng de DNA, 0,2 μ M de cada primer, 1x de tampão, 0,2 μ M de dNTP, 1,5mM de Cloreto de Magnésio e 0,5u de *Taq* DNA polimerase *Platinum* (Invitrogen). Novamente, após esta etapa, parcelas de 2 μ L das amostras foram submetidas a eletroforese em gel de Agarose 1% com GelRed, desta vez procurando avaliar a presença do gene pretendido, amplificado por PCR. Em seguida, amostras foram purificadas, utilizando EXOSAP 79 (Exonuclease I e Shrimp Alkaline Phosphatase, GE Healthcare®).

Os fragmentos foram seqüenciados em ambos os sentidos utilizando os mesmos *primers* da PCR. Para isso foi utilizado o kit de terminadores marcados (Amersham Biosciences) no seqüenciador automático *MegaBACE 1000* (GE Healthcare®) no Centro de Biologia Genômica e Molecular - PUCRS.

3. Análises Filogeográficas

Os cromatogramas referentes às seqüências obtidas pelos métodos descritos foram visualizados no programa *FinchTV* (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) e as seqüências consenso foram geradas através do pacote *Phred/Phrap/Consed* (www.phred.org) no sistema operacional *Linux*. No programa *ClustalW Multiple Alignment* (www.ebi.ac.uk), as seqüências consenso foram alinhadas e, posteriormente, corrigidas manualmente no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor 6.0.7* (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html), através da verificação de todos os sítios variáveis nos seus respectivos cromatogramas com o intuito de minimizar possíveis erros na hora do seqüenciamento.

Para avaliar as relações evolutivas entre as seqüências, o programa *DnaSP4.0* (Rozas & Rozas, 1999) foi utilizado para obter-se os diferentes haplótipos para cada um dos genes e, então, foram construídas as redes de haplótipos, com o programa *NETWORK 4.5* (Bandelt *et al.*, 1999) utilizando o algoritmo de *Median-Joining*.

As árvores filogenéticas foram construídas com o auxílio do programa *Mega 3.1* (www.megasoftware.net), para a construção das árvores de *Neighbour Joining* (NJ), com 1000 replicações de *bootstrap*, e do programa *TNT* (<http://www.cladistics.com/aboutTNT.html>) utilizando o método de Máxima Parcimônia (MP). O *bootstrap* da árvore de consenso de Máxima Parcimônia foi calculado através do programa WinNINA, sendo 1.000 o número de replicações e 10.000 árvores mantidas.

Resultados

Foram seqüenciados 57 espécimes de três espécies do gênero *Cyanocharax*, sendo encontrados 22 haplótipos (Tabela 1). A rede de haplótipos (Fig. 3) e as árvores obtidas através do método de *Neighbour Joining* (Fig. 4) e Máxima Parcimônia (Fig. 5) foram semelhantes. A árvore de consenso estrito de Nelsen (Fig. 5) obteve um índice de confiabilidade de 82 e após a análise de *bootstrap* (Fig. 6), de 61.

Tabela 1. Haplótipos encontrados para o gene COX I, com seus respectivos números de coleção, bacias hidrográficas e locais de coleta.

Espécie	Haplot. COX I	Nº da Coleção	Bacia hidrográfica/ Estado	Latitude	Longitude
<i>C. itaimbe</i>	H1	UFRGS 12634 C,E,F,G,H	Maquiné/RS	29°35'02"S	50°16'51"O
	H2	UFRGS 12634 A	Maquiné/RS	29°35'02"S	50°16'51"O
	H3	UFRGS 12634 B	Maquiné/RS	29°35'02"S	50°16'51"O
	H4	UFRGS 12084 E	Maquiné/RS	29°39'07"S	50°12'34"O
	H5	UFRGS 12084 F	Maquiné/RS	29°39'07"S	50°12'34"O
	H6	UFRGS 12084 G	Maquiné/RS	29°39'07"S	50°12'34"O
	H7	UFRGS 12585 B	Três Forquilhas/RS	29°29'09"S	50°07'15"O
	H8	UFRGS 12585 E	Três Forquilhas/RS	29°29'09"S	50°07'15"O
	H9	UFRGS 12585 H	Três Forquilhas/RS	29°29'09"S	50°07'15"O
	H10	UFRGS 12587 A	Três Forquilhas/RS	29°29'01"S	50°05'59"O
	H10	UFRGS 12600 E,H	Mampituba/RS	29°23'53"S	49°55'04"O
	H11	UFRGS 12587 B,C,D,E,F,G	Três Forquilhas/RS	29°29'01"S	50°05'59"O
	H11	UFRGS 12600 A,C	Mampituba/RS	29°23'53"S	49°55'04"O
	H11	UFRGS 12534 E	Mampituba/SC	29°14'49"S	50°04'12"O
	H11	UFRGS 12620 A,D,G	Mampituba/SC	29°11'41"S	49°57'55"O
	H11	UFRGS 12635 A,C	Mampituba/SC	29°08'29"S	49°53'35"O
	H12	UFRGS 12587 H	Três Forquilhas/RS	29°29'01"S	50°05'59"O
	H13	UFRGS 12635 D,F,H	Mampituba/SC	29°08'29"S	49°53'35"O
	H14	UFRGS 12635 E	Mampituba/SC	29°08'29"S	49°53'35"O
	H14	UFRGS 12620 E	Mampituba/SC	29°11'41"S	49°57'55"O
H15	UFRGS 12635 G	Mampituba/SC	29°08'29"S	49°53'35"O	
H15	UFRGS 12620 C,F,H	Mampituba/SC	29°11'41"S	49°57'55"O	
H16	UFRGS 12534 G	Mampituba/SC	29°14'49"S	50°04'12"O	
H17	UFRGS 12600 D	Mampituba/RS	29°23'53"S	49°55'04"O	
H18	UFRGS 12620 B	Mampituba/SC	29°11'41"S	49°57'55"O	
H19	UFRGS 12625 A,D,E,F	Araranguá/SC	28°47'53"S	49°42'57"O	
H19	UFRGS 12627 A,B,C,E,H	Araranguá/SC	28°30'39"S	49°28'44"O	
H20	UFRGS 12627 D	Araranguá/SC	28°30'39"S	49°28'44"O	
<i>C. dicropotamicus</i>	H21	UFRGS 12727 A,B	Rio da Prata/RS	28°56'07"S	51°26'35"O
<i>C. alburnus</i>	H22	UFRGS 12087 A	Lagoa dos Quadros/RS	29°40'35"S	50°08'29"O

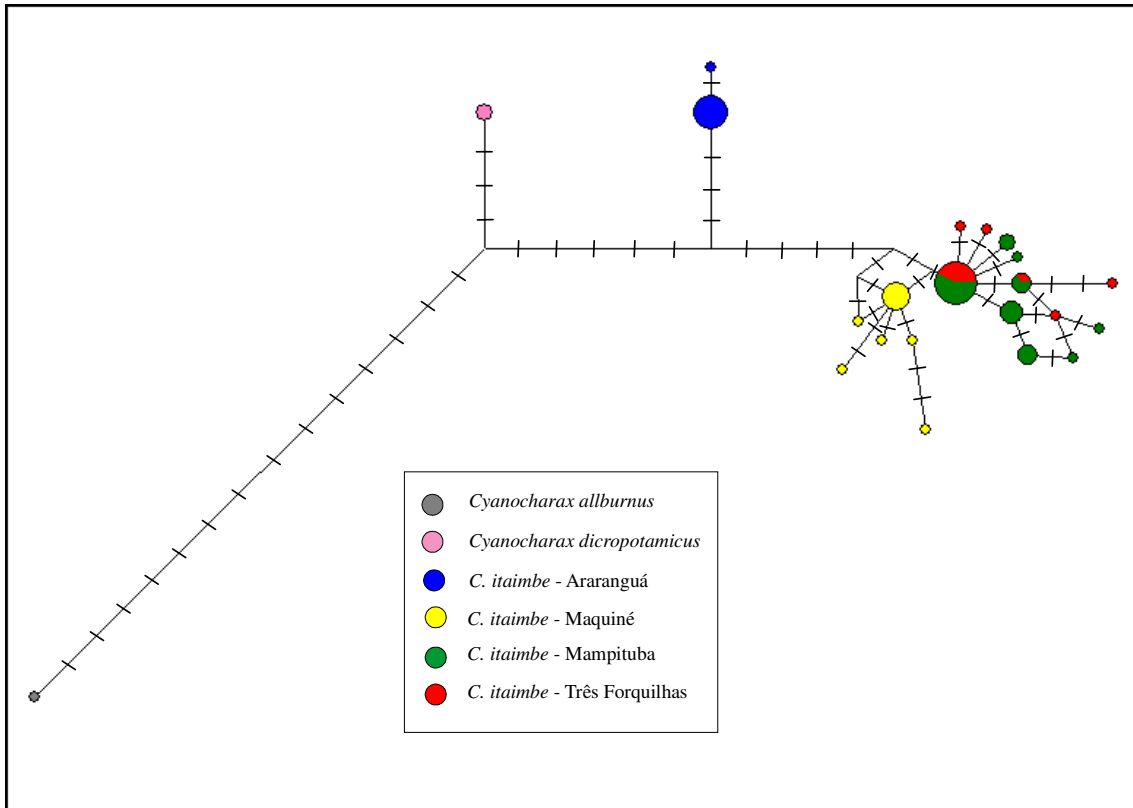


Fig. 3. Rede de haplótipos do gene COX I para as espécies de *Cyanocharax itaimbe*, *C. alburnus* e *C. dicropotamicus*. Cada círculo representa um haplótipo. O diâmetro do círculo é proporcional ao número de indivíduos que possuem o haplótipo. Cada traço perpendicular as linhas de conexão entre os haplótipos, representa um passo mutacional.

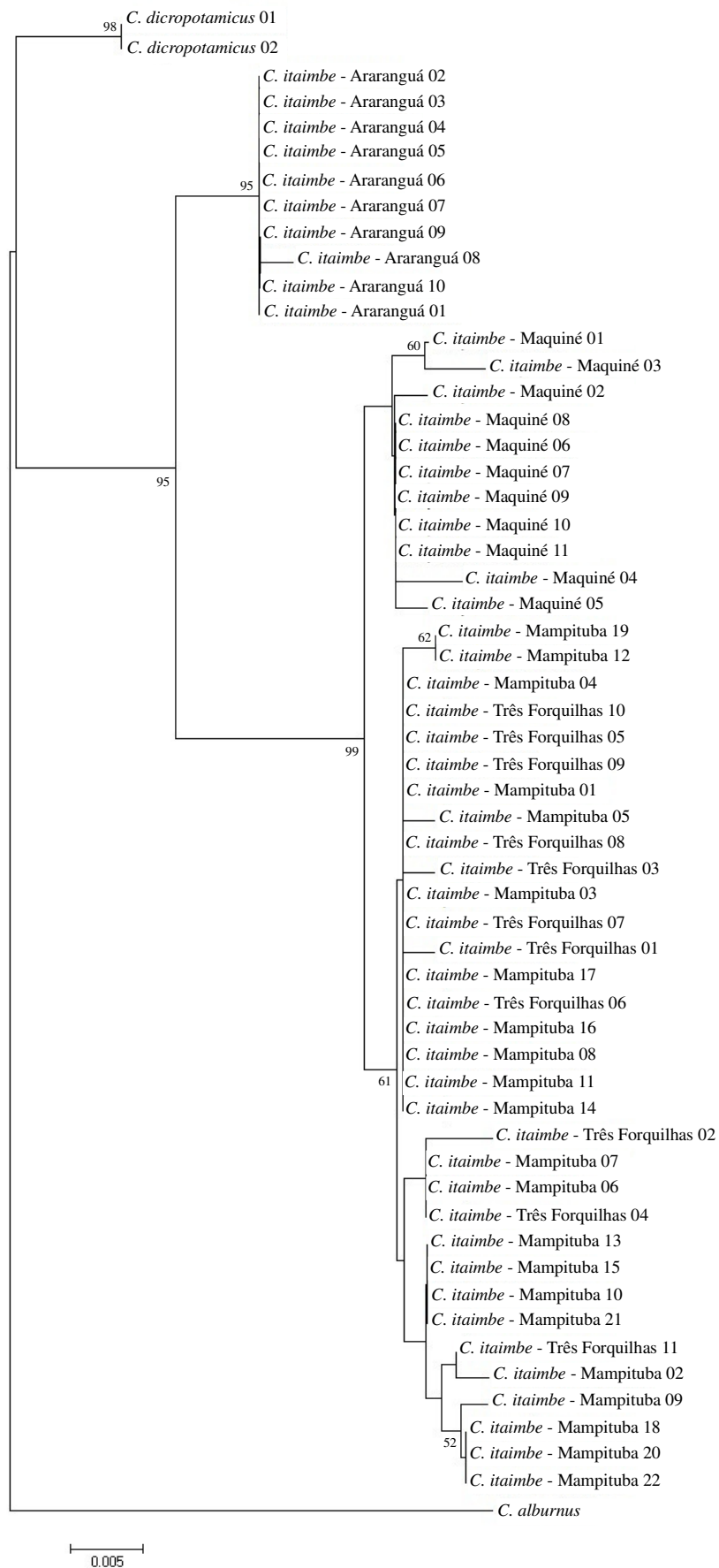


Fig. 4. Árvore de *Neighbour Joining* do gene COX I para a espécie de *C. itaimbe*. Os valores nos ramos representam o *bootstraps* maiores de 50%.

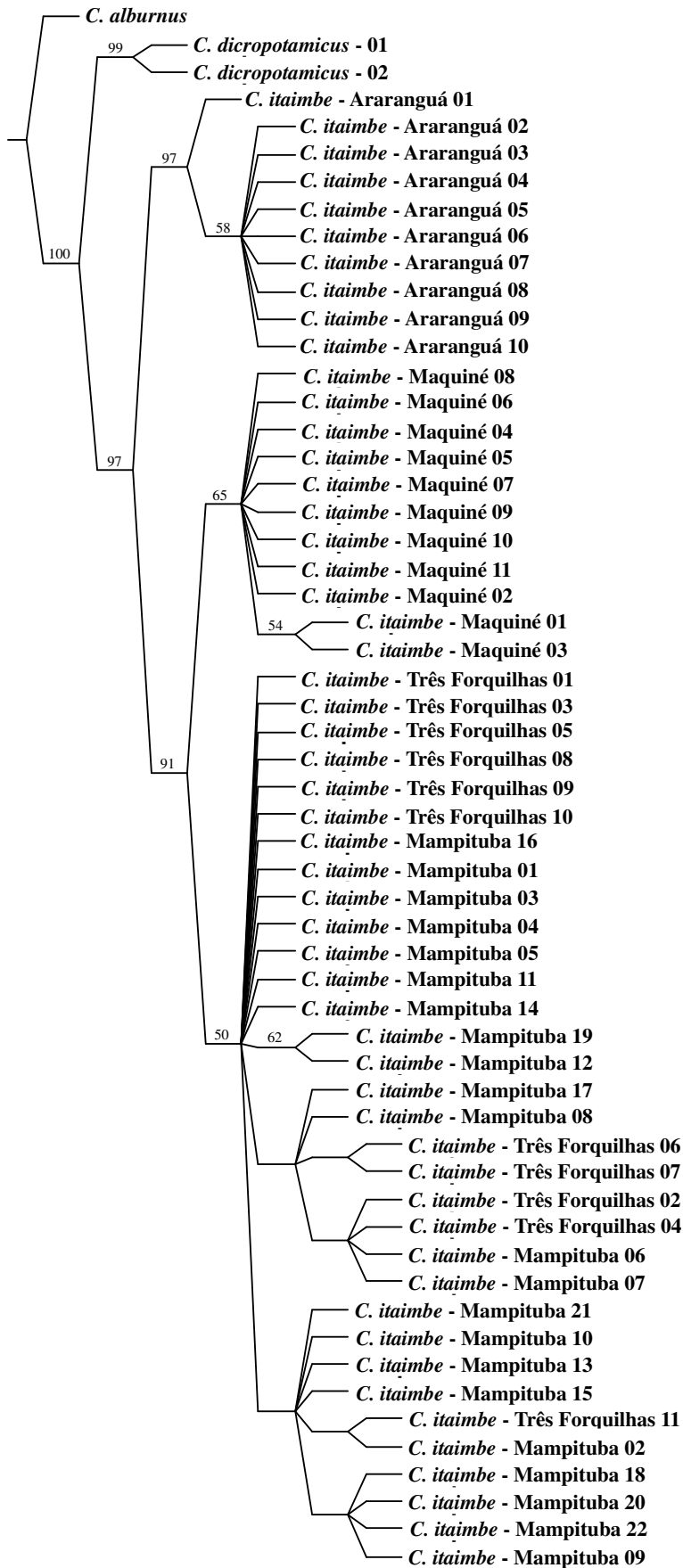


Fig. 5. Árvore de Máxima Parcimônia (Ic=82) COX I para a espécie de *C. itaimbe*. Os valores nos ramos indicam índices de suporte (bootstrap) maiores que 50%.

Verificou-se que a população de *C. itaimbe* da bacia do Araranguá formou um grupo distinto, com *bootstrap* de 97% para Máxima Parcimônia (MP) e de 95% para *Neighbour Joining* (NJ), em relação às populações das três outras bacias (rios Maquiné, Mampituba e Três Forquilhas) agrupadas com *bootstrap* de 91% (MP) e 99% (NJ). Entre estas três bacias, por sua vez, as populações dos rios Três Forquilhas e Mampituba agruparam-se com *bootstrap* de 50% (MP) e 61% (NJ) e separadamente dos indivíduos do rio Maquiné, agrupados com *bootstrap* de 65% (MP). Na análise da rede de haplótipos, a população de *C. itaimbe* da bacia do rio Araranguá apresentou uma distância em relação às outras populações de *C. itaimbe*, semelhante à observada entre a população de *C. itaimbe* da bacia do rio Araranguá em relação à *C. dicropotamicus* em termos de passos mutacionais.

Discussão

Em todas as análises, *C. itaimbe* ficou mais proximamente relacionada à *C. dicropotamicus* do que com *C. alburnus*. Isto está de acordo com o que foi encontrado por Malabarba & Weitzman (2003) na análise filogenética do gênero. *Cyanocharax alburnus* foi considerada a espécie mais basal do gênero e *C. dicropotamicus* proximamente relacionada com *C. itaimbe* por compartilharem uma nadadeira adiposa preta (Malabarba & Weitzman, 2003).

O mesmo estudo (Malabarba & Weitzman, 2003) levanta a hipótese de que *C. itaimbe* possa agrupar mais de uma espécie, descrevendo diferenças estatisticamente significativas na contagem de raios ramificados da nadadeira anal entre a população da bacia do rio Araranguá (21-25; mediana = 23; média = 22,9; n = 104) e às populações dos rios Maquiné (22-27; mediana = 25; média = 24,7; n = 121), Três Forquilhas (22-27; mediana = 25; média = 24,6; n = 76) e Mampituba (22-27; mediana = 24; média = 23,9; n = 88). As análises moleculares corroboram a hipótese da população da bacia do rio Araranguá constituir uma espécie distinta, já que todas as árvores filogenéticas e a rede de haplótipos posicionaram este grupo em um clado separado em relação às outras populações. Este resultado sugere um processo de especiação alopátrica para esta população. O rio Araranguá pode representar uma área de endemismo, demonstrado pela ocorrência de outras espécies exclusivas nesta bacia, como *Epactionotus gracilis* e *Jenynsia sanctaecatarinae* (Reis & Schaefer, 1998; Ghedotti *et al.*, 2001, respectivamente).

A população da bacia do rio Três Forquilhas agrupou-se com a população do rio Mampituba. A população da bacia do rio Maquiné ficou separada da população do rio Três Forquilhas a ponto de não compartilharem nenhum haplótipo, apesar de ambos os rios apresentarem conexões atuais através das lagoas costeiras. Estes rios nascem em uma altitude de 900 m na Serra Geral. O rio Maquiné deságua na lagoa dos Quadros e o rio Três Forquilhas na lagoa Itapeva. Ambas as lagoas encontram-se interligadas por um canal e vão desaguar no estuário do rio Tramandaí (Ferreira *et al.*, 2006). A distribuição de *C. itaimbe* está restrita a rios e arroios de águas frias e transparentes (Malabarba & Weitzman, 2003) e esta espécie não ocorre em lagoas. Por esta razão, o fato de haver uma ligação entre as lagoas costeiras não resulta em fluxo gênico entre as espécies. Apesar de conectadas, as lagoas costeiras parecem estar agindo como uma barreira entre essas duas populações.

Já as populações do rio Três Forquilhas e do Mampituba apresentam indícios de fluxo gênico recente. Isto pode ser devido à captura de cabeceiras, um processo ainda ativo na região costeira de tributários do oceano Atlântico (Ribeiro, 2006). Ambas as bacias apresentam uma região de planície, o que pode favorecer a troca gênica durante eventos de enxurradas.

É amplamente reconhecido que a fragmentação de rios e lagos da rede continental de água doce leva a uma maior estruturação genética entre as populações e uma mais profunda divergência entre haplótipos do que no habitat marinho (Hubert *et al.*, 2008). A região costeira brasileira, particularmente, apresenta uma alta taxa de endemismo devido ao fato de que os peixes de água doce dependem de conexões diretas entre os sistemas de drenagens para sua dispersão (Bizerril, 1994).

O gene COXI pode ser útil para identificar a possibilidade de uma nova espécie, o que deve ser corroborado com estudos morfológicos e de distribuição geográfica (Ward *et al.*, 2009). Sendo assim, por apresentar diferenças na contagem de raios ramificados da nadadeira anal e de distribuição geográfica, existem fortes indícios que a população de *Cyanocharax* da bacia do rio Araranguá deva ser reconhecida como uma espécie distinta das demais populações de *C. itaimbe*.

Literatura Citada

- Avise, J. C. 1998. The history and purview of the phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7: 371-379.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. London, Harvard University Press, 447p.
- Bandelt, H. J., P. Forster & A. Rohl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific 457 phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Bermingham, E. & A. P. Martin. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, 7: 499-517.
- Bermingham, E. & C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7: 367-369.
- Bizerril, C. R. S. 1994. Análise taxonômica e biogeográfica da ictiofauna de água doce do leste brasileiro. *Acta Biológica Leopoldensia*, 16(1): 51-80.
- Ferreira, F., I. I. Leipnitz, C. J. Leão & M. A. F. Hansen. 2006. Tecamebas em sedimentos do rio Tramandaí e da lagoa do Passo, planície costeira norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *GAEA*, 2(2): 66-74.
- Géry, J. 1969. The fresh-water fishes of South America. Pp. 66-74. *In*: E. J. Fittkau; J., Illies; H. H., Klinge; G. H., Schwabef; H., Sioli *Biogeography and Ecology in South America*. Dr. W. Junk N. V. (Publisher), The Hague.
- Ghedotti, M. J. & S. H. Weitzman. 1996. A new species of *Jenynsia* (Cyprinodontiformes: Anablepidae) from Brazil with comments on the composition and taxonomy of the genus. *Occasional Papers of the Natural History Museum, The University of Kansas*, 179: 1-25.
- Ghedotti, M. J., A. D. Meisner & P. H. F. Lucinda. 2001. New species of *Jenynsia* (Teleostei: Cyprinodontiformes) from Southern Brazil and its phylogenetic relationships. *Copeia* 2001, 3: 726-736.
- Herbert, P. D. N., A. Cywinska, S. Ball & J. R. Dewaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270: 313-321.
- Hubert, N., R. Hanner, E. Holm, N. E. Mandrak, E. Taylor, M. Burrige, D. Watkinson, P. Dumont, A. Curry, P. Bentzen, J. Zhang, J. April & L. Bernatchez. 2008. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *Plus One*, 3(6): e2490.

- Malabarba, L. R. & S. H. Weitzman. 2003. Description of a new genus with six new species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoológica*, 16(1): 67-151.
- Medrano, J. F., E. Aasen & L. Sharrow. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *346 Biotechniques*, 8(1): 43.
- Reis, R. E. & S. A. Schaefer. 1998. New Cascudinhos from Southern Brazil: Systematics, Endemism, and Relationships (Siluriformes, Loricariidae, Hypoptopomatinae). *American Museum Novitates*, 3254: 1-25.
- Ribeiro, A. C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, 4(2): 225-246.
- Rozas, J. & R. Rozas. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15: 174-175.
- Sunnucks P., A. C. C. Wilson, L. B. Beheregay, K. Zenger, J. French & A. C. Taylor. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9: 1699-1710.
- Swofford, D. L. 1999. PAUP*: Phylogenetic Analysis using Parsimony (*and other methods). Sunderland/Massachusetts, Sinauer.
- Tomazelli L. J. & J. A. Villwock. 2000. O Cenozóico no Rio Grande do Sul: geologia da planície costeira. Pp. 375-406. In: Holz, M. & L. F. De Ros (Eds.). *Geologia do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, CIGO/UFRGS.
- Vari, R. P. & S. H. Weitzman. 1990. A review of the phylogenetic biogeography of the freshwater fishes of South America. Pp. 381-392. In: Peters, G. & R. Hutterer. *Vertebrates in the tropics*. Bonn, Museum Alexander Koenig, 424p.
- Villwock, J. A., G. C. Lessa, K. Suguio, R. J. Angulo & S. R. Dilenburg. 2005. Geologia e Geomorfologia de Regiões Costeiras. Pp. 94-113. In: Souza, C. R. G., K. Suguio, A. M. S. Oliveira & P. E. Oliveira (Eds.). *Quaternário do Brasil*. Ribeirão Preto, Holos Editora, 378p.
- Ward, R. D., R. Hanner & P. D. N. Hebert. 2009. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology*, 74: 329-356.

Weitzman, S. H., N. A. Menezes & M. J. Weitzman. 1988. Phylogenetic biogeography of the Glandulocaudini (Teleostei: Characiformes: Characidae) with comments on the distributions of other freshwater fishes in eastern and southeastern Brazil. Pp. 379-427. In: P.E. Vanzolini; W.R. Heyer (Eds.). Proceedings of a Workshop on Neotropical distribution patterns. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 488p.

ANEXO

INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

A submissão de manuscritos para publicação na revista *Neotropical Ichthyology* é inteiramente eletrônica.

Acesse o sítio <http://submission.scielo.br/index.php/ni>, registre-se como autor e siga os procedimentos lá descritos de submissão.

Em caso de dúvidas, escreva para:

Luiz R. Malabarba
Editor Científico
neoichth@ufrgs.br

Manuscritos

- Os manuscritos devem ser submetido em arquivos Word para Windows ou em arquivos rtf. Fotos devem ser submetidas em arquivos tif ou jpg separadamente.

Formato

- Para artigos de sistemática consulte também: [Neotropical Ichthyology taxonomic contribution style sheet](#)
- O texto deve ser submetido em Inglês.
- O manuscrito deve conter, nesta ordem: Título, nome dos autores (*), endereço (não utilizar rodapé), palavras-chave (até cinco – não devem repetir palavras do título), Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas, Tabelas, Legendas das Figuras.
- Manuscritos não devem exceder 60 páginas, incluindo Figuras e Tabelas. Exceções serão analisadas pelo Corpo Editorial.
- Notas Científicas devem conter, nesta ordem: Título, nome dos autores (*), endereço (não utilizar rodapé), palavras-chave (até cinco – não devem repetir palavras do título), Abstract, Texto sem subtítulos, incluindo Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão. Seguem Referências Bibliográficas, Tabelas, Legendas das Figuras. Notas Científicas somente serão aceitas caso contenham informações inéditas que justifiquem sua publicação imediata.

Texto

- O texto não deve conter cabeçalho e rodapé (exceto número de página), ou qualquer formatação de parágrafo. Nunca use hífen para a separação de sílabas ao longo do texto. Nunca use a tecla "Tab" ou "espaço" para formatar referências bibliográficas. O texto deve estar alinhadas à esquerda, não justificado.
- Nomes de espécies, gêneros, e termos em latim (*et al.*, *cf.*, *aff.*, *in vitro*, *in vivo*, etc.) devem ser apresentados em itálico. Não sublinhe nada no texto.
- Somente os títulos das seguintes seções do manuscrito devem ser marcadas em Negrito: **Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas.**
- As abreviaturas utilizadas no texto devem ser referidas em Material e Métodos, exceto abreviaturas de termos de uso comum como min, km, mm, kg, m, Seg, h, ml, L, g.
- Todas as medidas apresentadas devem empregar o sistema métrico.
- Todos os artigos devem obrigatoriamente conter a indicação (número de catálogo e instituição depositária) de espécimes-testemunho ("voucher specimens") dos organismos estudados.
- Agradecimentos devem ser concisos, com nome e sobrenome.
- Figuras e Tabelas devem ser numeradas sequencialmente na ordem em que aparecem no texto, e citadas nos seguintes formatos: Fig. 1, Figs. 1-2, Fig. 1a, Figs. 1a-b, Tabela 1, Tabelas 1-2.
- Nas legendas, as palavras **Tabela** e **Fig.** devem ser marcadas em negrito.

- ▪ Legendas de Figuras devem ser apresentadas no final do manuscrito.
- ▪ Tabelas devem ser construídas com linhas e colunas, não utilizando as teclas "Tab" ou "espaço". Tabelas não devem conter linhas verticais ou notas de rodapé. Arquivos digitais de Tabelas devem ser obrigatoriamente apresentados formatados em células. Arquivos digitais de Tabelas com colunas separadas por marcas de tabulação ou espaços vazios não serão aceitos.
- ▪ As Tabelas e suas respectivas legendas devem ser apresentadas ao final do manuscrito, no seguinte formato: **Table 1.** Variação mensal do IGS médio em *Diapoma speculiferum* Cope....
- ▪ Indicar ao longo do texto os locais sugeridos para inserção de Tabelas e Figuras.

Nomenclatura

- ▪ Nomes científicos devem ser citados de acordo com o ICZN (2000).
- ▪ Fornecer autoria no título e na primeira citação de cada nome científico de espécie ou gênero no texto em trabalhos taxonômicos. Não é necessário informar autoria no abstract.

Figuras

- ▪ Figuras devem conter alta qualidade e definição para serem aceitas. Não submeta figuras impressas em dot-matrix.
- ▪ Fotos digitais serão somente se apresentarem alta definição. Poderá ser solicitada uma cópia impressa de alto contraste e definição.
- ▪ Textos contidos em gráficos ou figuras devem ter tamanho de fonte compatível com a redução para impressão na largura da página (175 mm) ou coluna (85 mm). Gráficos serão impressos preferencialmente em uma coluna (85 mm).
- ▪ Fotos coloridas somente serão aceitas se plenamente justificada a necessidade de impressão a cores. O custo adicional para a impressão será cobrado dos autores.
- ▪ Figuras compostas devem ser identificadas com as letras **a, b, ...**, em minúsculas, no canto esquerdo inferior de cada ilustração. As figuras compostas devem ser preparadas fazendo-se uso apropriado do espaço disponível (largura da página - 175 mm; coluna - 85 mm).
- ▪ Ilustrações devem conter escalas de tamanho ou indicação de tamanho na legenda.

Referências Bibliográficas

- ▪ Citar no texto nos seguintes formatos: Eigenmann (1915, 1921) ou (Eigenmann, 1915, 1921; Fowler, 1945, 1948) ou Eigenmann & Norris (1918) ou Eigenmann *et al.* (1910a, 1910b).
- ▪ Resumos de Eventos Científicos ou relatórios não devem ser citados e listados nas Referências Bibliográficas.
- ▪ Referências devem ser listadas em ordem alfabética, nos seguintes formatos:

Livros:

Campos-da-Paz, R. & J. S. Albert. 1998. The gymnotiform "eels" of Tropical America: a history of classification and phylogeny of the South American electric knifefishes (Teleostei: Ostariophysi: Siluriphysi). Pp. 419-446. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.

Dissertações/Teses:

Langeani, F. 1996. Estudo filogenético e revisão taxonômica da família Hemiodontidae Boulenger, 1904 (*sensu* Roberts, 1974) (Ostariophysi, Characiformes). Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo. 171 p.

Artigo em revistas (listar nome do periódico por extenso):

Lundberg, J. G., F. Mago-Leccia & P. Nass. 1991. *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) from deep river channels of South America and delimitation of the subfamily Pimelodinae. Proceedings of the Biological Society of Washington, 104(4): 840-869.

Documentos necessários após o aceite:

- ▪ Uma cópia digital da versão definitiva do manuscrito com:
 - ▪ as devidas correções editoriais (mudanças em estilo e formato solicitadas pelo editor não são negociáveis e o seu não atendimento irá resultar da rejeição do manuscrito).
 - ▪ as correções sugeridas pelos **Assessores Científicos** ou justificativa do autor para a não adoção de eventuais sugestões feitas pelos **Assessores Científicos**
 - ▪ Figuras originais digitais ou impressas.
- ▪ A não observância de qualquer dos requisitos acima resultará na recusa do manuscrito. Se a versão definitiva do manuscrito retornar aos editores dois meses ou mais após o envio dos comentários dos **Assessores Científicos** aos autores, este será considerado como re-submetido.

Provas

- ▪ As provas do artigo serão enviadas ao autor responsável pela correspondência, devendo ser conferida e devolvida no prazo máximo de uma semana. Provas não devolvidas no prazo serão corrigidas pelo editor.