

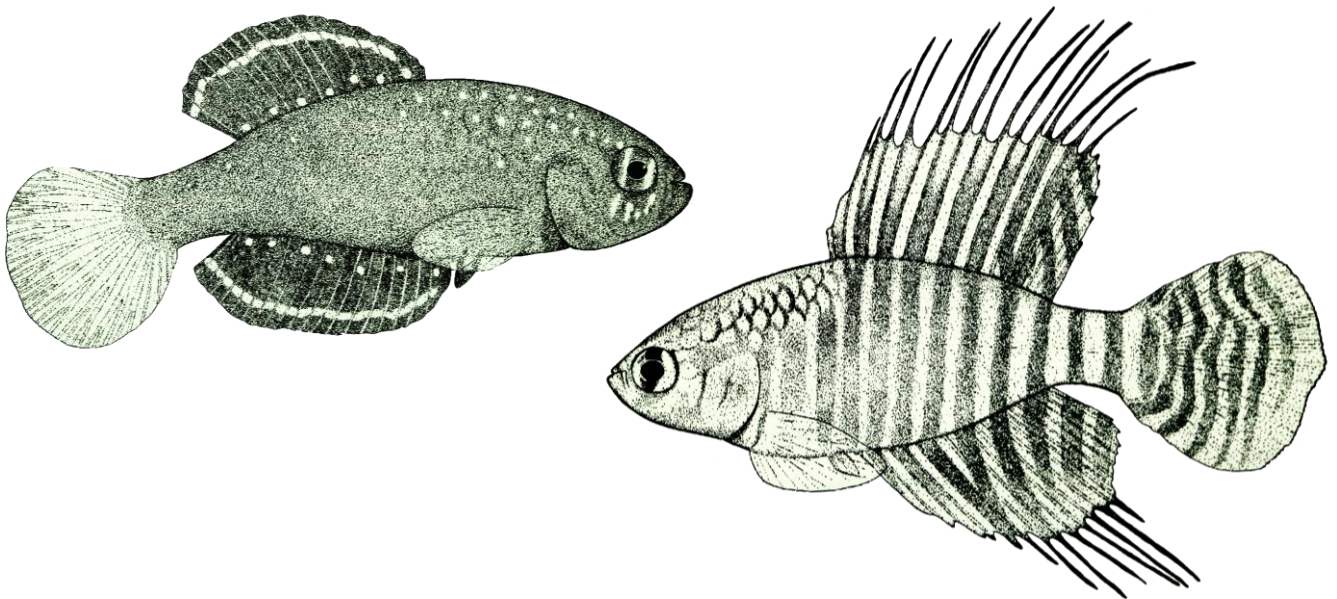
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva

Filogenia molecular da subfamília
Cynolebiasinae (Cyprinodontiformes:
Rivulidae)

Pedro Fasura de Amorim



Orientador: Prof. Dr. Wilson José Eduardo Moreira da Costa

Rio de Janeiro, 2014

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Biologia

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva

Filogenia molecular da subfamília
Cynolebiasinae (Cyprinodontiformes:
Rivulidae)

Pedro Fasura de Amorim

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva para a obtenção do Grau de Mestre pelo Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Orientador: Prof. Dr. Wilson José Eduardo Moreira da Costa

Rio de Janeiro, 2014

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Instituto de Biologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre

Aprovado em 24 de Janeiro de 2014 pela banca examinadora:

Prof. Dr. José Ricardo Miras Mermudes

Prof. Dr. Carlos Eduardo Guerra Schargo

Prof. Dr. Carlos Augusto Assumpção de Figueiredo

Prof. Dr. Sérgio Potchs de Carvalho e Silva

Profa. Dra. Leila Maria Pessôa

Amorim, Pedro Fasura de
Filogenia Molecular da subfamília Cynolebiasinae (Cyprinodontiformes:
Rivulidae) / Pedro Fasura de Amorim. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de
Biologia, 2014.
xiv, 40f, 13il,
Orientador: Wilson José Eduardo Moreira da Costa
Dissertação - UFRJ / Instituto de Biologia / Programa de Pós-graduação
em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, 2014.
Referências bibliográficas: f. 34-39
1. Cynolebiasinae. 2. Rivulidae. 3. Sistemática. 4. Análise Molecular. 5.
Genoma Nuclear. I. Costa, W.J.E.M. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia
Evolutiva. III. Título.

A minha família e meus amigos que colaboraram,
direta ou indiretamente, das mais diversas formas

Agradecimentos

Agradeço ao professor Wilson Costa, pela orientação, a oportunidade e o apoio para realização desse trabalho.

Pelo apoio em campo e coleta de exemplares para a análise agradeço ao professor Wilson Costa, Anais Barbosa, Orlando Conceição, José Leonardo Mattos, Pedro Bragança, Filipe Rangel-Pereira, Axel Katz e Giulia Aranha.

Agradeço a Morevy Cheffe e a Thomas Litz pelo envio de material para o desenvolvimento da dissertação.

Pelo apoio e suporte nos procedimentos de bancada, agradeço a Raisa Rizzieri, José Leonardo Mattos e Pedro Bragança. Pela ajuda com o texto agradeço a Axel Katz.

A toda equipe do Laboratório de Sistemática e Evolução de Peixes Teleosteos, por todo apoio, bom humor, debates e discussões agradeço a Wilson Costa, Anaís Barbosa, Gilvan Joaquim da Silva, Orlando da Conceição, José Leonardo Mattos, Felipe Ottoni, Pedro Henrique Bragança, Axel Katz, Filipe Rangel-Pereira, Elisabeth Henschel, Raisa Rizzieri e Carolina Mello. Aos amigos, de fora do laboratório, que sempre animaram e deram apoio, em especial Letícia Macedo, Beatriz Camisão, Cássio Albernoz, Jean Ribeiro, Rodolfo Souza, Anderson Santos, Diniz Viegas, Alessandra Pavan, Elder Sodré, Alexandre Selvatti, Manuella Andrade, Tainá Stauffer, Ana Luiza Pimenta. Aos amigos de fora da biologia agradeço a Diogo Alencar, Denis Lubian e Diogo Bruce por sempre darem apoio e força. A todos esses agradeço o bom humor, as saídas, os shows e a sinuca.

Agradeço a toda a família por sempre me apoiar, em especial meus pais, Marisa Fasura de Amorim e Paulo Tarso de Amorim, meu irmão, Vitor Fasura de Amorim, e meus avós, Fritz e Édna Fasura e Hélio e Selma Amorim.

Todos esses contribuíram de alguma forma com a realização do trabalho.

Esse projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Resumo

A família Rivulidae se destaca pelos diversificados padrões de colorido apresentados pelos machos de suas espécies. Com aproximadamente 330 espécies, os rivulídeos podem ser encontrados em quase todos os tipos de ambientes neotropicais de água doce. Em meio a tais ambientes, poças temporárias chamam a atenção pela existência de espécies anuais, onde a sobrevivência das espécies só possível graças aos ovos resistentes a seca que eclodem na estação de chuvosa. Cynolebiasinae é a única subfamília de Rivulidae onde todas as espécies são anuais, apresentando também a maior diversidade de espécies com tal adaptação. A subfamília Cynolebiasinae já foi alvo de diferentes análises filogenéticas baseadas em dados morfológicos, entretanto a relação entre alguns de seus gêneros ainda não é firmemente estabelecida. As poucas análises filogenéticas moleculares, para Rivulidae amostraram poucos dos gêneros de Cynolebiasinae. O estudo aqui desenvolvido é a primeira análise molecular abrangendo todos os gêneros de Cynolebiasinae e tem como objetivo testar as propostas filogenéticas apresentadas até o momento. Para o estudo foram utilizados fragmentos de três genes mitocondriais e um de gene nuclear. Foram realizadas as análises de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana a partir de uma matriz com os três marcadores mitocondriais e uma com os quatro marcadores. O monofiletismo da subfamília Cynolebiasinae foi corroborado, assim como o monofiletismo de suas tribos e gêneros. Em Cynopoecilini, *Campellolebias* e *Cynopoecilus* foram recuperados como grupos irmãos e *Notholebias* como linhagem mais basal da tribo. Em Cynolebiasini, *Xenurolebias* e *Nematolebias* se apresentaram como grupos irmãos, formando o clado irmão dos outros gêneros da tribo. As análises também indicaram *Cynolebias* e *Simpsonichthys* como grupos irmãos, formando o clado irmão do ramo contendo *Austrolebias*, *Hypsolebias*, *Ophthalmolebias* e *Spectrolebias*. Nesse último clado, *Hypsolebias* e *Spectrolebias* se mostraram como grupos irmãos.

Palavras-chave: Cynolebiasinae, Rivulidae, Sistemática, Análise Molecular, Genoma Nuclear

Abstract

The family Rivulidae highlight among all other neotropical fishes groups for their elaborate color pattern, found in the males of their species. With a great diversity, about 330 species, the rivulids occupy almost every neotropical freshwater environment. Among those habitats the temporary pools are the most interesting, because they are annual as the fishes. Since the pools dry, the rivulids eggs are able to support the dry seasons and hatch in the next rain seasons. Between the subfamilies of Rivulidae, Cynolebiasinae shows the greatest diversity of annual fishes. There are different phylogenetics analysis for the subfamily Cynolebiasinae based on morphological characters, however the relationship between some of the genera is still not clear. There are few phylogenetics analysis based on molecular data for Cynolebiasinae, and few of its genera are sampled in these analyzes. The current study is the first to use all of the genera of Cynolebiasinae in a phylogenetic analysis based on molecular data, and aims to test the main proposals of phylogenetic relationships for the subfamily. Three fragments from mitochondrial genome and one from nuclear genome were used in this study, amplified by Polymerase Chain Reaction. The analyzes of maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian inference were performed in two data bases, the first only with the mitochondrial fragments, and the second with the four fragments amplified. The monophyly of the subfamily Cynolebiasinae was corroborated, as well as for their tribes. In Cynopoecilini the genus *Notholebias* appears as sister group of the other genera of the tribe. The analyzes indicate the genus *Campellolebias* and *Cynopoecillus* as sisters groups. In Cynolebiasini, *Xenurolebias* and *Nematolebias* appears as related groups, forming the sister group of all of the others genera of Cynolebiasini. The analyzes indicate that *Cynolebias* and *Simpsonichthys* are sister genera, forming the sister clade of the group comprising the genera *Austrolebias*, *Hypsolebias*, *Ophthalmolebias* and *Spectrolebias*. In this last group *Hypsolebias* and *Spectrolebias* appears as sister genera.

Key-words: Cynolebiasinae, Rivulidae, Systematics, Molecular Analysis, Nuclear Genome

Sumário

Agradecimentos	vi
Resumo	vii
Abstract	vii
Lista de Ilustrações	x
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xiv
Introdução	1
Material e Métodos	11
Resultados	14
Discussão	22
Conclusão	33
Referências Bibliográficas	35

Lista de Ilustrações

Figura	Página
1: Exemplos da diversidade de forma de corpo e padrões de colorido encontrados na família Rivulidae: A- <i>Pterolebias phasianus</i> ; B- <i>Maratecoara lacortei</i> ; C- <i>Aphyolebias boticarioi</i> ; D- <i>Pituna compacta</i> ; E- <i>Rivulus scalaris</i> ; F- <i>Moema apurinan</i> ; G- <i>Spectrolebias semiocellatus</i> ; H- <i>Simpsonichthys boitonei</i> ; I - <i>Hypsolebias marginatus</i> (fontes: Costa, 2004; 2005a; b; 2007a; b).	2
2: Distribuição aproximada da família Rivulidae.	4
3: Bacias onde os membros de Cynolebiasinae são encontrados (modificado de Costa, 2010).	5
4: Exemplos de espécies dos gêneros da subfamília Cynolebiasinae: A - <i>Campellolebias brucei</i> ; B - <i>Leptolebias opalescens</i> ; C - <i>Cynopoecilus fulgens</i> ; D - <i>Notholebias vermiculatus</i> ; E - <i>Austrolebias alexandri</i> ; F - <i>Cynolebias parnaibensis</i> ; G - <i>Nematolebias papiliferus</i> ; H - <i>Ophthalmolebias constanciae</i> ; I - <i>Simpsonichthys parallelus</i> ; J - <i>Spectrolebias costae</i> ; K - <i>Hypsolebias carletoi</i> ; L - <i>Xenurolebias myersi</i> (fontes: Costa 2002a; b; 2006a; c; 2007a; 2013; Costa & Amorim, 2013; Costa <i>et al.</i> , 2010).	7
5: Proposta de relações filogenéticas entre os gêneros de Cynolebiasinae apresentado por: A – Costa, 1996; 1998; B – Costa, 2008a; 2010.	9
6: Fig. 6 – Proposta de relações filogenéticas entre os gêneros de Cynolebiasinae apresentado por: A – Murph <i>et al.</i> , 1999 ; B – Hrbek & Larson, 1999.	10

- 7:** Árvore mais parcimoniosa encontrada a partir da matriz com sequências dos genes mitocondriais. Valores nos ramos indicam suporte de 1000 réplicas de bootstrap. Valores inferiores a 50 foram omitidos. 16
- 8:** Árvore mais parcimoniosa encontrada a partir da matriz com sequências dos genes mitocondriais e nuclear. Valores nos ramos indicam suporte de 1000 réplicas de bootstrap. Valores inferiores a 50 foram omitidos. 17
- 9:** Árvore recuperada pela análise de máxima verossimilhança encontrada a partir da matriz com sequências dos genes mitocondriais. Valores nos ramos indicam suporte de 1000 réplicas de bootstrap. Valores inferiores a 50 foram omitidos. 18
- 10:** Árvore recuperada pela análise de máxima verossimilhança encontrada a partir da matriz com sequências dos genes mitocondriais e nuclear. Valores nos ramos indicam suporte de 1000 réplicas de bootstrap. Valores inferiores a 50 foram omitidos. 19
- 11:** Árvore recuperada pela análise de inferência bayesiana encontrada a partir da matriz com sequências dos genes mitocondriais. Valores nos ramos indicam a probabilidade posterior de 1.000.000 de gerações com quatro cadeias de markov. Valores inferiores a 50 foram omitidos. 20
- 12:** Árvore recuperada pela análise de inferência bayesiana encontrada a partir da matriz com sequências dos genes mitocondriais e nuclear. Valores nos ramos indicam a probabilidade posterior de 1.000.000 de gerações com quatro cadeias de markov. Valores inferiores a 50 foram omitidos 21

13: Bacias hidrográficas onde são encontrados os gêneros *Cynolebias*, em amarelo, e *Simpsonichthys*, em vermelho (modificado de Costa, 2010).

29

Lista de Tabelas

Tabela	Página
1: Lista dos primers utilizados na análise.	13
2: Espécies utilizadas na análise e marcadores amplificados.	15

Lista de Abreviaturas e Siglas

16S – Ribossomo mitocondrial 16s

COx1 – Citocromo Oxidase c subunidade 1

IB – Inferência Bayesina

MP – Análise de Máxima Parcimônia

MV – Análise de Máxima Verossimilhança

ND2 – NADH desidrogenase 2

UFBA – Universidade Federal da Bahia

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

S7 – Íntron 1 e exon 2 da proteína ribossomal nuclear S7

Introdução

A família Rivulidae Myers, 1925 se destaca na ictiofauna neotropical pelos diversificados e exuberantes padrões de colorido apresentados pelos machos de suas espécies (Fig. 1), o que a tornou popular na aquarofilia, com muitas espécies conhecidas e admiradas por todo o mundo (Costa, 2003a). Tamanho colorido só é similar ao das espécies africanas e asiáticas das outras famílias relacionadas à família Rivulidae, componentes da subordem Aplocheiloidei. Sendo a quarta família mais diversa dentre os peixes neotropicais de água doce (Reis *et al.*, 2003), Rivulidae apresenta cerca de 330 espécies com uma grande variedade de formas e tamanhos de corpo, desde espécies miniaturas, que não ultrapassam 30mm de comprimento padrão, até espécies com mais de 200mm (Costa, 2003a). A distribuição da família é ampla (Fig. 2), havendo representantes em praticamente todas as bacias hidrográficas cis-andinas ao Norte de Mar del Plata, na Argentina, ao longo da região trans-andina entre Colômbia e Peru, e ao longo de toda a América Central, ilhas caribenhas e sul da América do Norte, onde alcança as planícies costeiras da Flórida (Costa, 1998; 2008a).

Esta ampla distribuição se manifesta na diversidade de habitats ocupados por rivulídeos, havendo espécies tanto exclusivas de ambientes estuarinos como espécies de água doce, onde se encontra a grande diversidade da família. Na água doce são encontrados em todos os ambientes continentais, de planícies costeiras a áreas acima de 1000m acima do nível do mar, de florestas tropicais a ambientes semi-áridos (Costa, 2003a). Em meio a tal variedade de ambientes surgiram adaptações biológicas raras entre vertebrados, como hermafroditismo com autofecundação (Harrington, 1961; Costa, 2011a) e anualismo, que ocorre em cerca de metade das espécies de Rivulidae

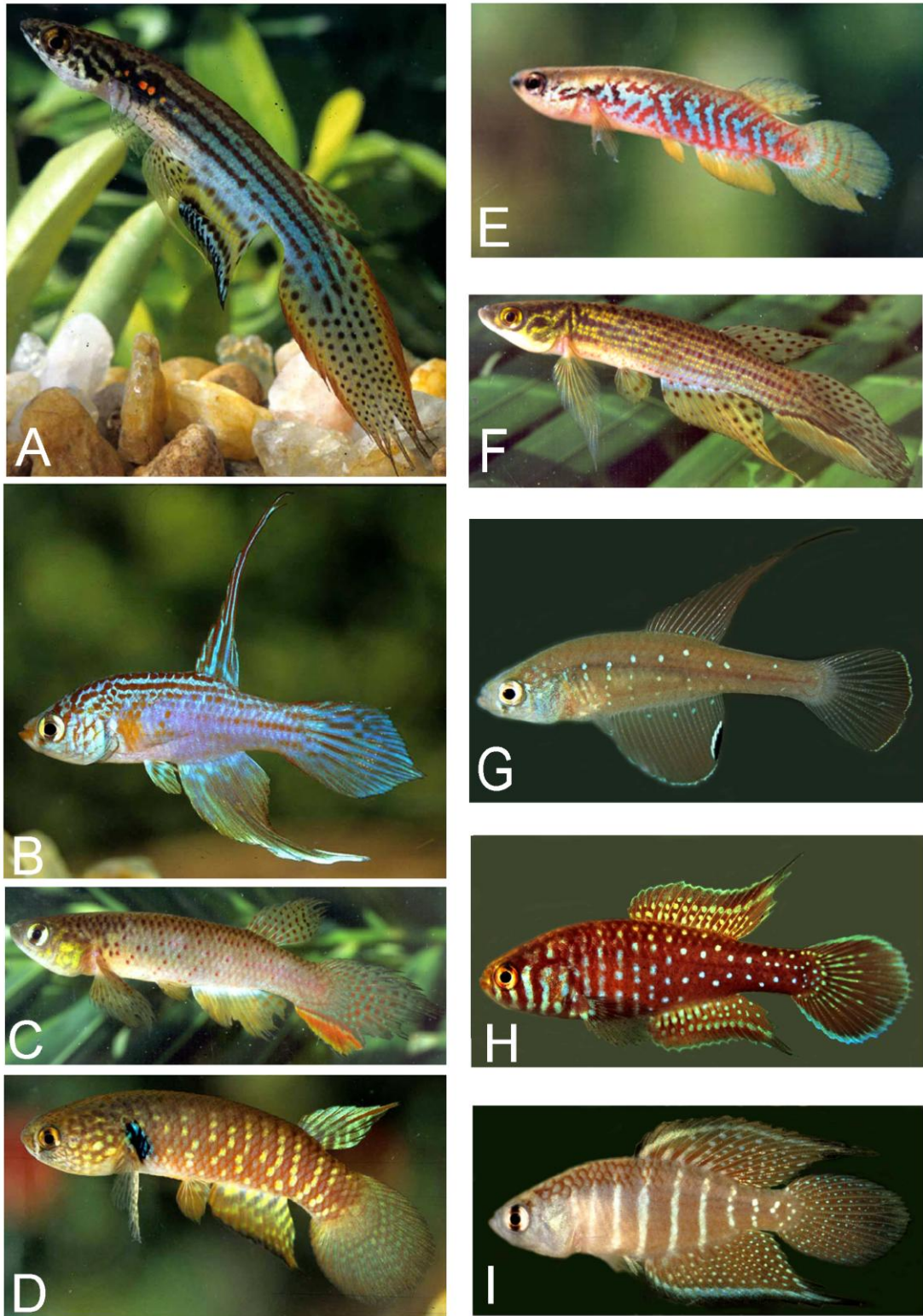


Fig. 1 – Exemplos da diversidade de forma de corpo e padrões de colorido encontrados na família Rivulidae: A- *Pterolebias phasianus*; B- *Maratecoara lacortei*; C- *Aphyolebias boticarioi*; D- *Pituna compacta*; E- *Melanorivulus scalaris*; F- *Moema apurinan*; G- *Spectrolebias semiocellatus*; H- *Simpsonichthys boitonei*; I - *Hypsolebias marginatus* (fontes: Costa, 2004; 2005a, b; 2007a, b)

(Costa 1998). Espécies anuais são encontradas em áreas onde, ao longo do ano, há uma estação chuvosa seguida por uma estação de seca, de modo que este ciclo pode ocorrer uma ou duas vezes ao ano, de acordo com a região. Tais espécies habitam brejos, poças e alagados temporários que só existem durante as estações chuvosas, uma vez que durante as estações de seca esses ambientes desaparecem completamente (Myers, 1942; Costa, 2002a). A sobrevivência dessas espécies só é possível devido aos ovos resistentes a seca e seus embriões que entram em diapausa, de modo que os embriões podem sobreviver no solo por meses em estado latente até que se inicie a nova estação chuvosa (Costa e Leal, 2009). Ao se iniciar a nova estação chuvosa, os ovos eclodem, e o desenvolvimento se dá rapidamente, algumas espécies podendo atingir a maturidade sexual em apenas um mês (Costa, 2009). Apesar de ser uma adaptação rara, o anualismo teria surgido de forma independente em três diferentes linhagens de Rivulidae, duas na subfamília Rivulinae e uma em Cynolebiasinae (Costa, 2011b). Da mesma forma, essa adaptação surge independentemente em Nothobranchidae, família irmã de Rivulidae (Parenti, 1981, Costa, 1998; Hrbek & Larson, 1999; Murphy et al., 1999).

Com aproximadamente 120 espécies, Cynolebiasinae Hoedeman, 1960 apresenta a maior diversidade de espécies anuais dentre as subfamílias de Rivulidae, sendo, também, a única onde todas são anuais (Costa, 2008a; 2010). Estas se distribuem por uma área aproximadamente coincidente ao Escudo Brasileiro, ocorrendo majoritariamente no Brasil, mas também na Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina (Fig. 3) (Costa, 2008b; 2010). Além do anualismo, algumas linhagens de Cynolebiasinae apresentam outras características biológicas raras em peixes, como produção de som no gênero *Cynolebias* (Costa et al., 2010) e fecundação interna nos gêneros *Campellolebias* e *Cynopoecilus* (Costa, 1995a;b). Cynolebiasinae é composta

por duas tribos (Costa, 1990a; b; 1998), Cynopoecilini Costa, 1990, contendo quatro gêneros (Costa, 2008), *Cynopoecilus* Regan, 1912, *Leptolebias* Myers, 1952, *Campellolebias* Vaz-Ferreira & Sierra, 1974 e *Notholebias* Costa, 2008; e Cynolebiasini Hoedeman, 1961, composta por oito gêneros (Costa, 2010), *Cynolebias* Steindachner, 1876, *Simpsonichthys* Carvalho, 1959, *Spectrolebias* Costa & Nielsen, 1997, *Nematolebias* Costa, 1998, *Austrolebias* Costa, 1998, *Xenurolebias* Costa, 2006, *Ophthalmolebias* Costa, 2006 e *Hypsolebias* Costa, 2006 (Fig. 4).



Fig. 2 – Distribuição aproximada da família Rivulidae.

Historicamente, a taxonomia dos atuais cynolebiasíneos começou com Hoedeman (1960) propondo as tribos Rivulini e Cynolebiatini para a subfamília Rivulinae, o que hoje corresponde à família Rivulidae. Parenti (1981), na primeira revisão taxonômica da ordem Cyprinodontiformes, redefiniu o gênero *Cynolebias*, que

passou a incluir em sua sinonímia os nomes *Cynopoecilus*, *Leptolebias*, *Simpsonichthys*, *Campellolebias* e *Terranatos*. Posteriormente Costa (1990a; b) demonstrou o monofiletismo dos gêneros *Cynopoecilus*, *Leptolebias*, *Campellolebias* e *Terranatos*, revalidando-os e posicionando o último em uma tribo própria e os três primeiros na subtribo Cynopoecilina, clado irmão de Cynolebiatina, composto apenas por *Cynolebias*, pois *Simpsonichthys* foi mantido como seu sinônimo. O número de gêneros relacionados a *Cynolebias* começou a aumentar logo após a descrição do gênero *Spectrolebias* Costa & Nielsen, 1997, a partir da coleta de espécies até então desconhecidas.

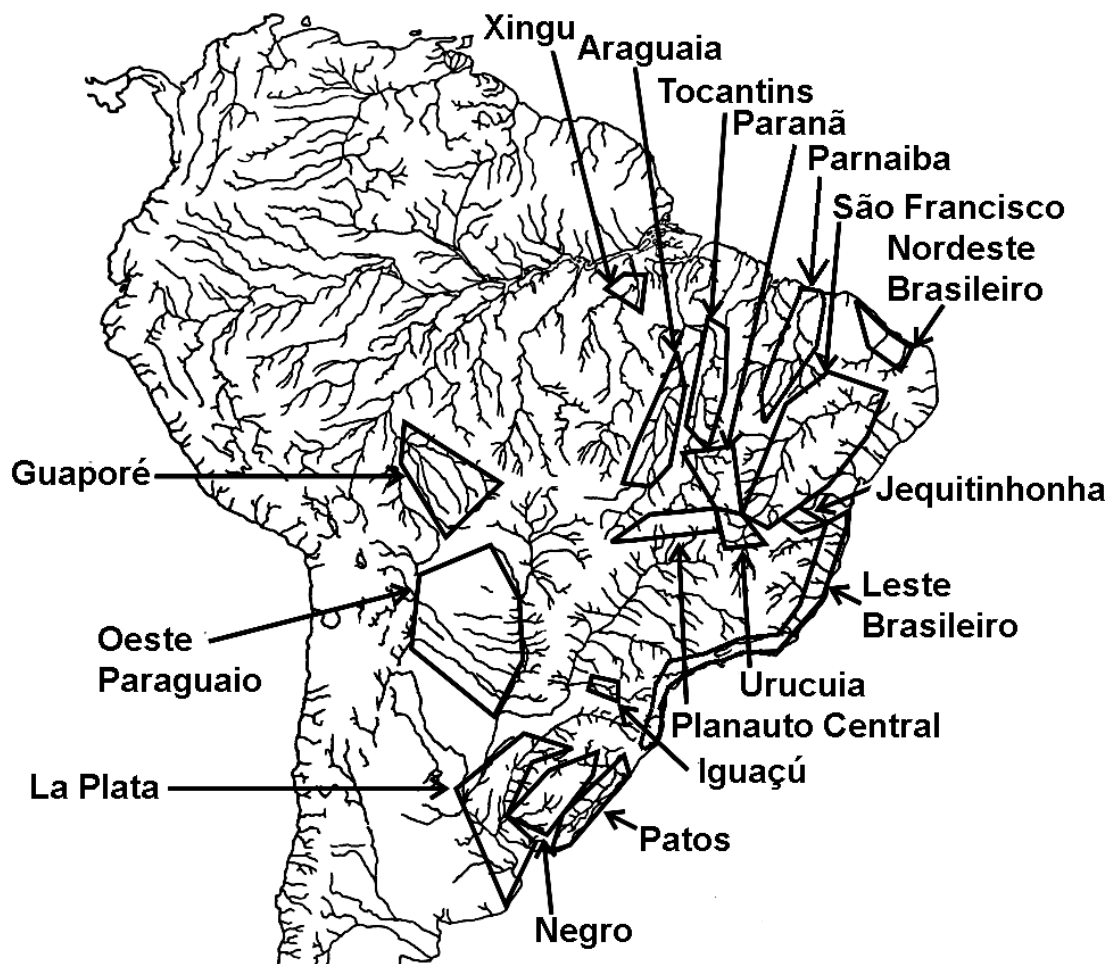


Fig. 3 – Bacias onde os membros de Cynolebiasinae são encontrados (modificado de Costa, 2010).

Os gêneros *Nematolebias* Costa, 1998, *Austrolebias*, Costa, 1998 e *Megalebias* Costa, 1998 foram propostos a partir de uma nova análise filogenética baseada em caracteres morfológicos (Costa 1998), nesse mesmo trabalho *Simpsonichthys* se demonstrou como uma linhagem independente de *Cynolebias*, sendo assim revalidado. Em uma análise filogenética do gênero *Simpsonichthys* (Costa, 2003b), *Nematolebias* se apresentou como uma linhagem interna de *Simpsonichthys*, sendo assim considerado um subgênero, o mesmo ocorreu com *Megalebias*, após uma revisão taxonômica do gênero *Austrolebias*, *Megalebias* mostrou-se como uma linhagem relacionada à parte das espécies de *Austrolebias*, tornando-se assim um subgênero do último (Costa 2006a). Nesse mesmo ano, uma nova análise morfológica sustentou *Nematolebias* como um gênero independente de *Simpsonichthys*, e *Spectrolebias* como uma linhagem interna do último, além disso, foram propostos nessa análise novos subgêneros para *Simpsonichthys*, de modo que o gênero passou a ser dividido nos seguintes subgêneros: *Ophthalmolebias*, *Xenurolebias*, *Hypsolebias*, *Simpsonichthys* e *Spectrolebias* (Costa, 2006b). Em seguida *Notholebias* foi descrito a partir de espécies até então posicionadas no gênero *Leptolebias* (Costa 2008b). Já em uma mais recente análise filogenética da tribo Cynolebiasini, os cinco subgêneros de *Simpsonichthys* foram elevados a gêneros (Costa, 2010).

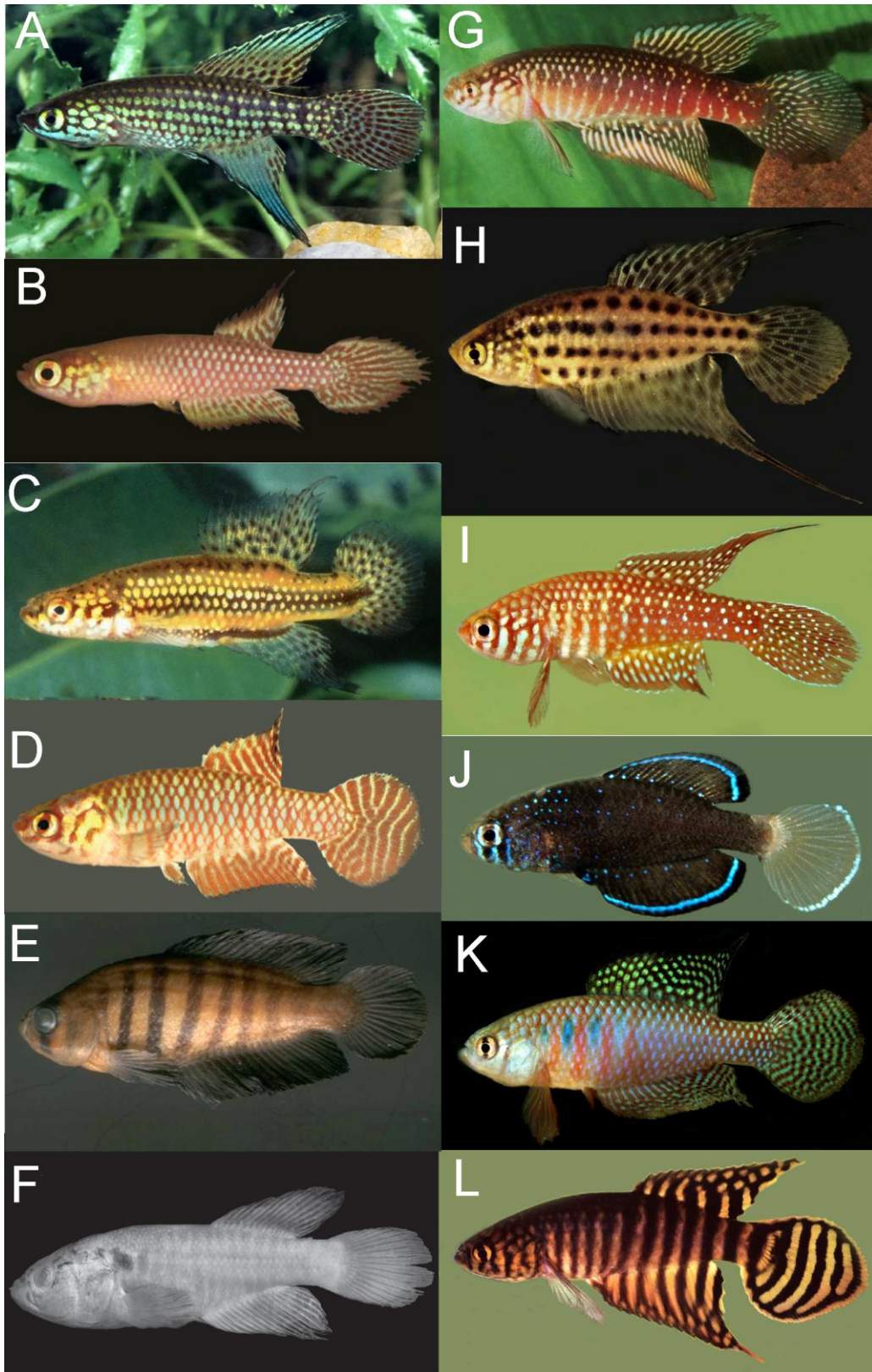


Fig. 4 – Exemplos de espécies dos gêneros da subfamília Cynolebiasinae: A - *Campellolebias brucei*; B - *Leptolebias opalescens*; C - *Cynopoecilus fulgens*; D - *Notholebias vermiculatus*; E - *Austrolebias alexandri*; F - *Cynolebias parnaibensis*; G - *Nematolebias papiliferus*; H - *Ophthalmolebias constanciae*; I - *Simpsonichthys parallelus*; J - *Spectrolebias costae*; K - *Hypsolebias carletoi*; L - *Xenurolebias myersi* (fontes: Costa 2002a; b; 2006a; c; 2007a; 2013; Costa & Amorim, 2013; Costa *et al.*, 2010).

As diferentes análises filogenéticas dos trabalhos explorando a morfologia dos Cynolebiasinae (Costa, 1990a; 1996; 1998; 2003b; 2006a; b; 2008a; 2010), corroboram o monofiletismo da subfamília e de suas tribos por diversos caracteres morfológicos, entretanto ainda não há um consenso sobre as relações filogenéticas entre seus gêneros. De acordo com as principais análises filogenéticas para a subfamília (Costa, 1996; 1998; 2008a; 2010) *Campellolebias* e *Cynopoecilus* se apresentam como gêneros relacionados entre si dentro de Cynopoecilini, assim como *Austrolebias* e *Cynolebias* em Cynolebiasini, entretanto as relações dos outros gêneros não são claras dentro de suas respectivas tribos (Fig. 5 A e B).

Com relação a dados moleculares, Cynolebiasinae possui escassez de informação. Até o momento há poucas análises disponíveis na literatura, todas baseadas em DNA mitocondrial. Isso inclui estudos sobre relacionamentos intragenéricos de *Austrolebias* (García *et al.*, 2002), *Hypsolebias* (Costa & Amorim, 2011; Costa *et al.*, 2012) e *Notholebias* (Costa & Amorim, 2013). Sobre as relações intergenéricas dos cynolebiasíneos, o foco principal dos estudos é para a subfamília Rivulinae e apenas DNA mitocondrial é utilizado. (Hrbek & Larson, 1999; Murphy *et al.*, 1999), Assim, poucas espécies e poucos dos atuais gêneros de Cynolebiasinae foram amostrados nessas duas análises que utilizaram diferentes conjuntos de DNA mitocondrial, a primeira incluindo oito espécies de oito dos atuais gêneros (Murphy *et al.*, 1999) e a outra nove espécies de oito dos atuais gêneros (Hrbek & Larson, 1999) (Fig. 6 A e B). Nesses estudos apenas cinco gêneros foram coincidentes entre eles, tornando os dados pouco comparáveis aos estudos baseados em dados morfológicos. Em ambos os trabalhos citados, nenhum representante dos atuais gêneros *Cynolebias* e *Simpsonichthys* foi analisado. Havendo tal carência de dados de DNA para os cynolebiasíneos, o presente estudo se mostra inédito tanto por ser a primeira análise

filogenética baseada em dados moleculares amostrando espécies representantes de diferentes linhagens de todos os gêneros da subfamília, como por ser também a primeira, para a família Rivulidae a utilizar informações do genoma nuclear. Dessa forma o atual trabalho tem como objetivo testar as atuais hipóteses de relações filogenéticas dos gêneros da subfamília Cynolebiasinae, baseando-se em sequências dos genomas mitocondrial e nuclear.

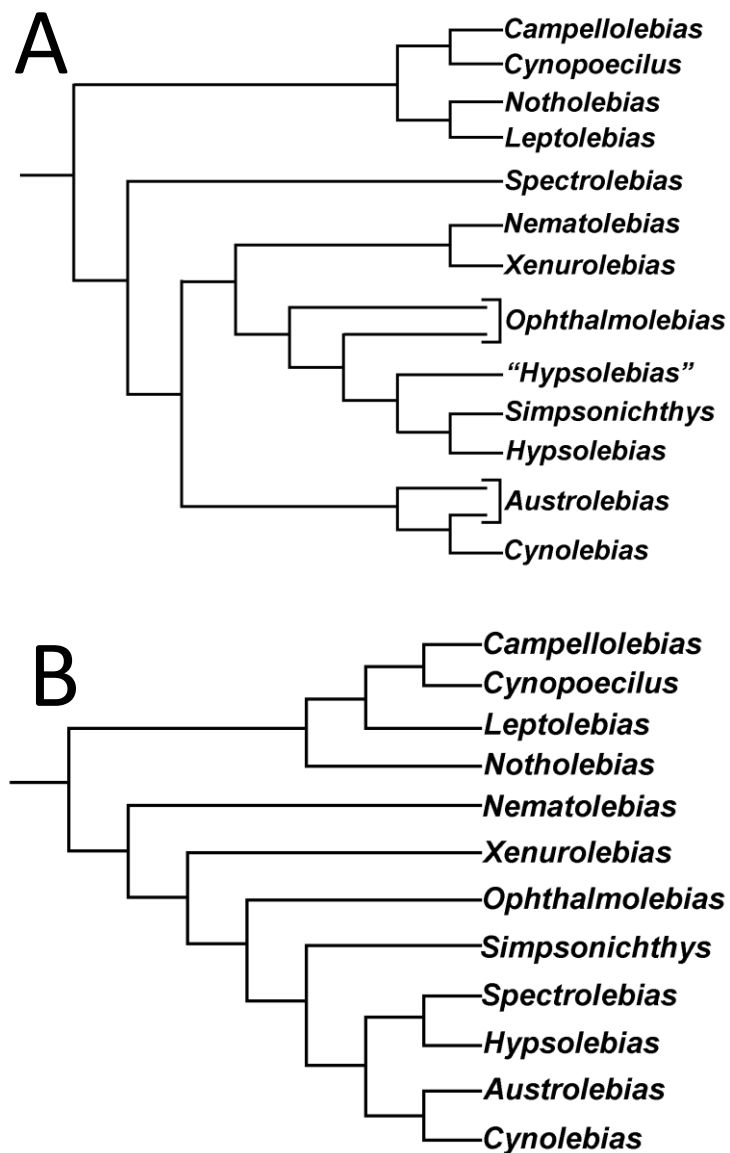


Fig. 5 – Proposta de relações filogenéticas entre os gêneros de Cynolebiasinae apresentado por: A – Costa, 1996; 1998; B – Costa, 2008a; 2010.

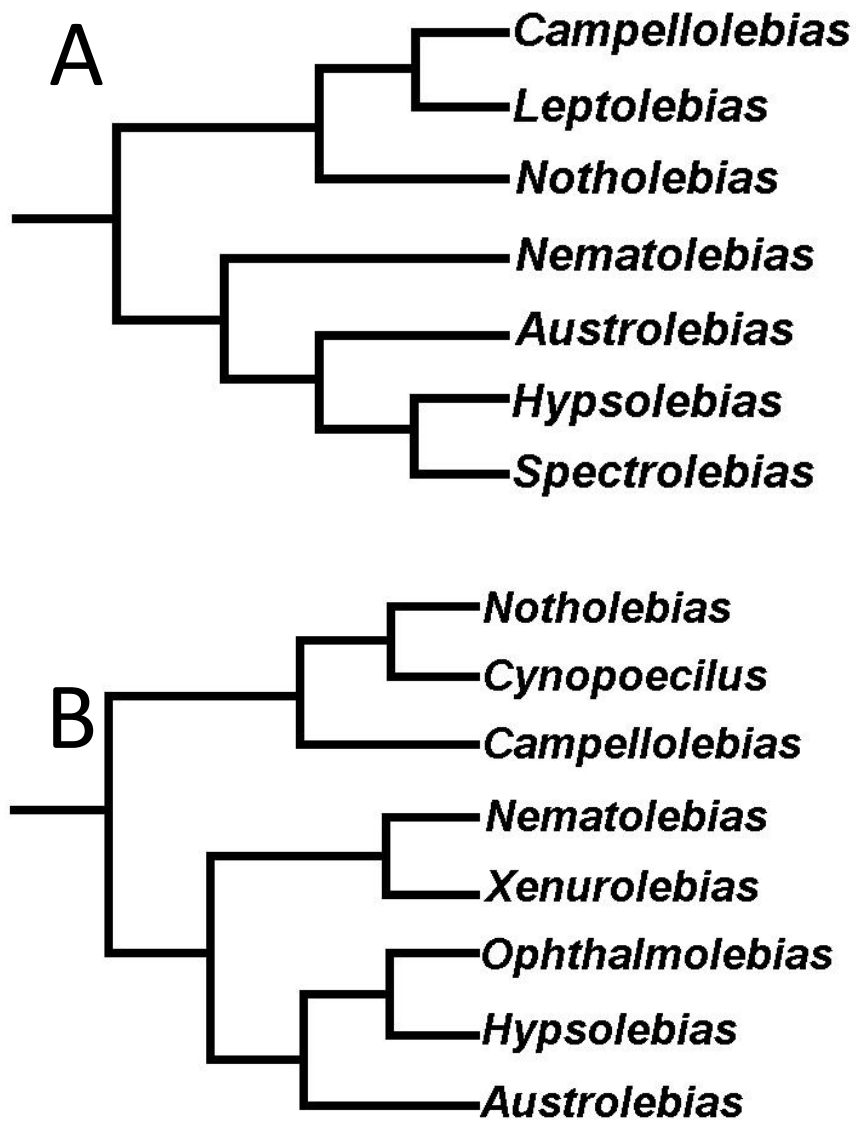


Fig. 6 – Proposta de relações filogenéticas entre os gêneros de Cynolebiasinae apresentado por: A – Murph *et al.*, 1999 ; B – Hrbek & Larson, 1999.

Material e Métodos

Para a obtenção do genoma foram utilizados indivíduos fixados em etanol 99,8% e preservados nas mesmas condições. A análise conta com um indivíduo de cada espécie amostrada, foram utilizadas seis espécies da tribo Cynopoecilini: *Campellolebias brucei* (UFRJ 8383), *Cynopoecilus melanotaenia* (UFRJ 8974), *Leptolebias citrinipinnis* (UFRJ 8805), *L. aureoguttatus* (UFRJ não catalogado), *Notholebias fractifasciatus* (UFRJ 8802) e *N. minimus* (UFRJ 8270); para a tribo Cynolebiasini foram utilizadas 38 espécies: *Austrolebias alexandri* (UFRJ 9704), *A. luteoflammulatus* (UFRJ 9698), *A. melanorus* (UFRJ 9696), *A. nigripinnis* (UFRJ 9703), *A. nigrofasciatus* (UFRJ 8884), *A. sp* (UFRJ material não catalogado), *A. viarius* (UFRJ 9699), *A. wolterstoffi* (UFRJ 8978), *Cynolebias gilbertoi* (UFRJ 6799), *C. perforatus* (UFRJ 6699), *C. vazabarrisensis* (UFRJ 6831), *Hypsolebias longignatus* (UFRJ 8764), *H. adornatus* (UFRJ 6706), *H. antenori* (UFRJ 8765), *H. carlettoi* (UFRJ 6780), *H. fulminantis* (UFRJ 6726), *H. hamonicus* (UFRJ 6705), *H. hellneri* (UFRJ 6700), *H. ocellatus* (UFRJ 6729) *H. sertanejo* (UFRJ 6722), *H. stellatus* (UFRJ 8883), *Nematolebias papiliferus* (UFRJ 8503), *N. whitei* (UFRJ 6844), *Ophthalmolebias constanciae* (UFRJ 6730), *O. ilheusensis* (UFBA 5297), *O. rosaceus* (UFRJ 8267), *Simpsonichthys parallelus* (UFRJ 8865), *S. punctulatus* (UFRJ 6819), *Spectrolebias costae* (UFRJ 9298), *S. semiocellatus* (UFRJ 9297), *Xenurolebias myersi* (UFRJ 8200) e *X. izecksohni* (UFRJ 8204). A seleção das espécies levou em conta a diversidade de cada um dos gêneros, tendo sido amostradas todas as linhagens internas de cada um deles. Como grupo externo foram utilizadas três espécies das outras duas subfamílias de Rivulidae: *Atlantirivulus janeiroensis* (UFRJ 8793), *Laimosemion strigatus* (UFRJ 7980) e *Kryptolebias brasiliensis* (UFRJ 8807).

A extração e purificação do genoma dos indivíduos foi realizada com o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Para a amplificação dos fragmentos analisados foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizados primers específicos para a amplificação de fragmentos dos genes citocromo oxidase c subunidade I (COxI), de ribossomo mitocondrial 16s (16s), NADH desidrogenase 2 (ND2), do genoma mitocondrial, e para fragmento do íntron 1 e exon 2 da proteína ribossomal S7 (S7), do genoma nuclear. Os primers utilizados encontram-se na Tabela 1. As reações de PCR foram realizadas em volumes de 15µL contendo 5 × Green GoTaq Reaction Buffer (Promega), 3.2 mM MgCl₂, 1 µM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTP e 1U de Taq polymerase (Promega). O Protocolo de termociclagem utilizado foi: (1) 1 ciclo de 4 minutos a 94 °C; (2) 35 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 1 minuto a 47°C - 60°C (variando de acordo com o fragmento e a amostra), 1 minuto a 72 °C; e (3) 1 ciclo de 4 minutos a 72 °C. Em todas as reações de PCR foram utilizados controles negativos, não contendo DNA, visando verificar alguma eventual contaminação. Os produtos de PCR amplificados foram purificados utilizando o Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Para as reações de seqüenciamento foi utilizado o BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix (Applied Biosystems). As reações de seqüenciamento, após purificadas e desnaturadas, foram lidas no seqüenciador 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems).

As seqüências foram editadas utilizando o programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) e foram alinhadas utilizando ClustalW (Chenna *et al.*, 2003). Após o alinhamento automático esse foi otimizado manualmente. Áreas do alinhamento com excesso de inserções e deleções, onde não foi possível observar homologia entre os taxa, foram excluídas da análise. Partes do alinhamento, onde não havia informação referente a algum dos marcadores, foram preenchidos com o símbolo “?”. A busca do modelo

evolutivo mais adequado para a análise foi calculada para cada um dos marcadores obtidos utilizando programa jModelTest0.1.1 (Posada, 2008). Para a análise filogenética foram utilizados os métodos de máxima parcimônia (MP), executada no programa TNT 1.1 (Goloboff *et al.*, 2008), máxima verossimilhança (MV), executada no programa, Garli (Zwickl, 2006) e inferência bayesiana (IB), executada no programa MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2011). Para as análises de máxima parcimônia e máxima verossimilhança foram realizados testes de Bootstrap, com 1000 réplicas, para avaliar a confiança dos clados. A análise de inferência bayesiana foi executada com 1.000.000 de gerações com quatro cadeias de markov e consenso de maioria das árvores que ocupam o intervalo de 95% de confiança para topologias. As análises filogenéticas foram realizadas com os genes concatenados de duas formas, a primeira utilizando apenas os marcadores mitocondriais Cox1, 16s e ND2, e a segunda utilizando, além desses, o marcador nuclear S7.

Tabela 1 - Lista dos primers utilizados na análise.

Primers utilizados	Fragmento amplificado	Sequência	Referência
COX1F	Cox1	5'-CATAAAGAYATYGGCACCCCTY-3'	Costa & Amorim, 2011
COX1R	Cox1	5'-GGYTCTTCRAARGTGTGATASG-3'	Costa & Amorim, 2011
LCO1490	Cox1	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer <i>et al.</i> , 1994
HCO2198	Cox1	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'	Folmer <i>et al.</i> , 1994
16sar-L	16s	5'-CGCCTGTTTAYCAAAAACAT-3'	Palumbi <i>et al.</i> , 2002
16sbr-H	16s	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	Palumbi <i>et al.</i> , 2002
R16sin	16s	5'-GGATGTCCTGATCCAACATCGAGGTCGTA-3'	Elaborado durante o estudo
L4299	ND2	5'-AAGGRTTACTTTGATAGAGT-3'	Hrbek & Larson, 1999
L4419	ND2	5'-AAGCTTTTCGGGCCCATACC-3'	Hrbek & Larson, 1999
L4882a	ND2	5'-TGACAAAARCTAGCMCC-3'	Hrbek & Larson, 1999
L4882c	ND2	5'-TGACAAAARCTAGCMCC-3'	Hrbek & Larson, 1999
H5540a	ND2	5'-TTTAGRGCTTTGAAGG-3'	Hrbek & Larson, 1999
H5540c	ND2	5'-TTTAAAGCTTTGAAGG-3'	Hrbek & Larson, 1999
R5859	ND2	5'-GGCTTTGAAGGCYYTTGGTC-3'	Elaborado durante o estudo
S7RPEX1F	S7	5'-TGGCCTCTCCTTGCCGTC-3'	Chow & Hazama, 1998
S7RPEX2R	S7	5'-AACTCGTCTGGCTTTTCGCC-3'	Chow & Hazama, 1998

Resultados

Dentre as 41 espécies incluídas na análise, foram obtidas sequências dos marcadores mitocondriais COx1 e 16s para todas elas, para o marcador ND2 foram obtidas sequências para 34 espécies e para o marcador nuclear S7 foram obtidas sequências para 31 espécies (Tabela 2). Para o fragmento do gene COx1 foram obtidos 688 nucleotídeos, sendo 375 (54,5%) conservados e 290 (42,2%) informativos para parcimônia, para o fragmento de 16s 610 nucleotídeos, 290 (47,5%) conservados e 237 (38,9%) informativos para parcimônia, para o fragmento de ND2 1186 nucleotídeos, 325 (27,4) conservados e 733 (61,8%) informativos para parcimônia, e para o gene nuclear S7 777 pares de base, onde 328 (45,3%) são conservados e 137 (17,6%) informativos para parcimônia. O modelo evolutivo encontrado como o mais adequado para cada um dos marcadores analisados foi o General Time Reversible com distribuição Gamma e sítios invariáveis (GTR+G+I).

Para as análises de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e inferência bayesiana os genes foram analisados concatenados. Foram utilizadas duas matrizes para as análises, a primeira contendo apenas os genes mitocondriais Cox1, 16s e ND2, e a segunda contendo também o marcador nuclear S7. Dessa forma a primeira base de dados contém 2484 nucleotídeos, sendo 990 (39,9%) conservados e 1260 (50,7%) informativos para parcimônia, e a segunda matriz contém 3261 nucleotídeos, sendo 1319 (40,4%) conservados e 1397 (42,8%) informativos para parcimônia. Em ambas as análises de máxima parcimônia, apenas uma árvore mais parcimoniosa foi encontrada para cada uma das bases de dados. Dessa forma são apresentadas seis árvores filogenéticas (Fig. 6 - 11), referentes a cada um dos três métodos utilizados com cada uma das duas matrizes. Nas árvores de máxima parcimônia e máxima verossimilhança são apresentados apenas os valores de Bootstrap superiores a 50, para as árvores de

inferência bayesiana são apresentados apenas os valores de probabilidade posterior superiores a 50.

Tabela 2 – Espécies utilizadas na análise e marcadores amplificados.

Número de tombo	Espécies analisadas	Marcadores analisados			
		COx1	16s	ND2	S7
Grupos externos					
UFRJ 8807	<i>Kryptolebias brasiliensis</i>	X	X	X	X
UFRJ 8793	<i>Atlantirivulus janeiroensis</i>	X	X	X	-
UFRJ 7980	<i>Laimosemion strigatus</i>	X	X	X	X
Grupos internos					
Tribo Cynopoecilini					
UFRJ 8974	<i>Cynopoecilus melanotaenia</i>	X	X	X	-
UFRJ 8383	<i>Campellolebias cf brucei</i>	X	X	X	-
UFRJ não catalogado	<i>Leptolebias aureoguttaatus</i>	X	X	-	X
UFRJ 8805	<i>Leptolebias citrinipinnis</i>	X	X	X	-
UFRJ 8802	<i>Notholebias fractifasciatus</i>	X	X	X	X
UFRJ 8270	<i>Notholebias minimus</i>	X	X	X	X
Tribo Cynolebiasini					
UFRJ 9704	<i>Austrolebias alexandri</i>	X	X	-	X
UFRJ 9698	<i>Austrolebias luteoflammulatus</i>	X	X	X	X
UFRJ 9696	<i>Austrolebias melanorus</i>	X	X	X	-
UFRJ 9703	<i>Austrolebias nigripinnis</i>	X	X	-	X
UFRJ 8884	<i>Austrolebias nigrofasciatus</i>	X	X	X	X
UFRJ não catalogado	<i>Austrolebias sp</i>	X	X	X	X
UFRJ 9699	<i>Austrolebias viarius</i>	X	X	X	X
UFRJ 8978	<i>Austrolebias wolterstofii</i>	X	X	X	X
UFRJ 6799	<i>Cynolebias gilbertoi</i>	X	X	X	X
UFRJ 6699	<i>Cynolebias perforatus</i>	X	X	-	X
UFRJ 6831	<i>Cynolebias vazabarrisensis</i>	X	X	X	X
UFRJ 6706	<i>Hypsolebias adornatus</i>	X	X	X	X
UFRJ 8765	<i>Hypsolebias antenori</i>	X	X	X	X
UFRJ 6780	<i>Hypsolebias carlettoi</i>	X	X	X	X
UFRJ 6726	<i>Hypsolebias fulminantis</i>	X	X	-	-
UFRJ 6705	<i>Hypsolebias hamonicus</i>	X	X	X	X
UFRJ 6700	<i>Hypsolebias hellneri</i>	X	X	X	X
UFRJ 8764	<i>Hypsolebias longignatus</i>	X	X	X	X
UFRJ 6829	<i>Hypsolebias ocellatus</i>	X	X	X	X
UFRJ 6722	<i>Hypsolebias sertanejo</i>	X	X	X	X
UFRJ 8883	<i>Hypsolebias stellatus</i>	X	X	-	X
UFRJ 8503	<i>Nematolebias papiliferus</i>	X	X	X	X
UFRJ 6844	<i>Nematolebias whitei</i>	X	X	X	X
UFRJ 6730	<i>Ophthalmolebias constanciae</i>	X	X	-	-
UFBA 5297	<i>Ophthalmolebias ilheusensis</i>	X	X	X	X
UFRJ 8267	<i>Ophthalmolebias rosaceus</i>	X	X	X	X
UFRJ 8865	<i>Simpsonichthys parallelus</i>	X	X	X	-
UFRJ 6819	<i>Simpsonichthys punctulatus</i>	X	X	X	X
UFRJ 9298	<i>Spectrolebias costae</i>	X	X	X	X
UFRJ 9297	<i>Spectrolebias semiocellatus</i>	X	X	X	X
UFRJ 8204	<i>Xenurolebias izecksohni</i>	X	X	X	-
UFRJ 8200	<i>Xenurolebias myersi</i>	X	X	X	-

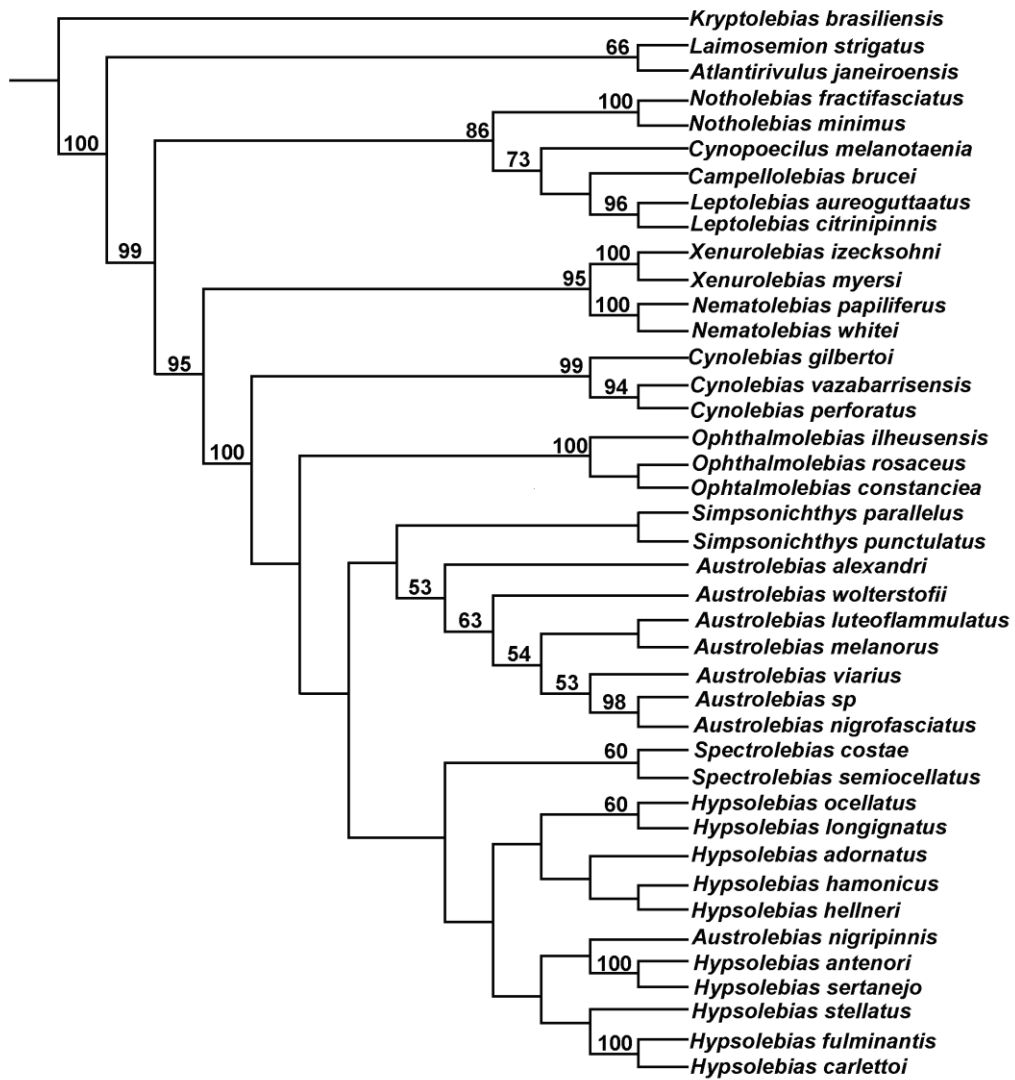


Fig. 7 - Árvore mais parcimoniosa encontrada a partir da matriz com seqüências dos genes mitocondriais. Valores nos ramos indicam suporte de 1000 réplicas de bootstrap. Valores inferiores a 50 foram omitidos.

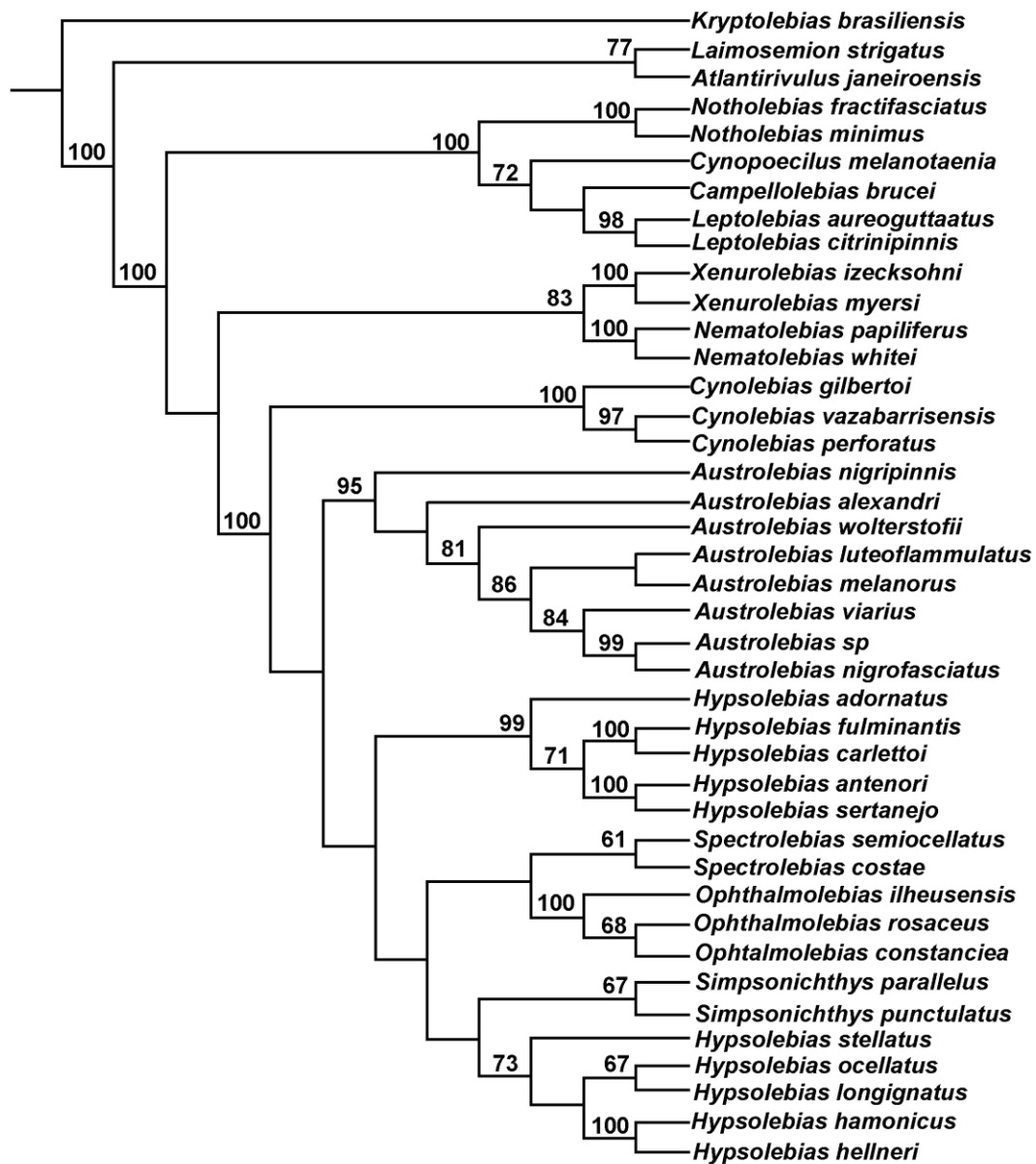


Fig. 8 - Árvore mais parcimoniosa encontrada a partir da matriz com seqüências dos genes mitocondriais e nuclear. Valores nos ramos indicam suporte de 1000 réplicas de bootstrap. Valores inferiores a 50 foram omitidos.

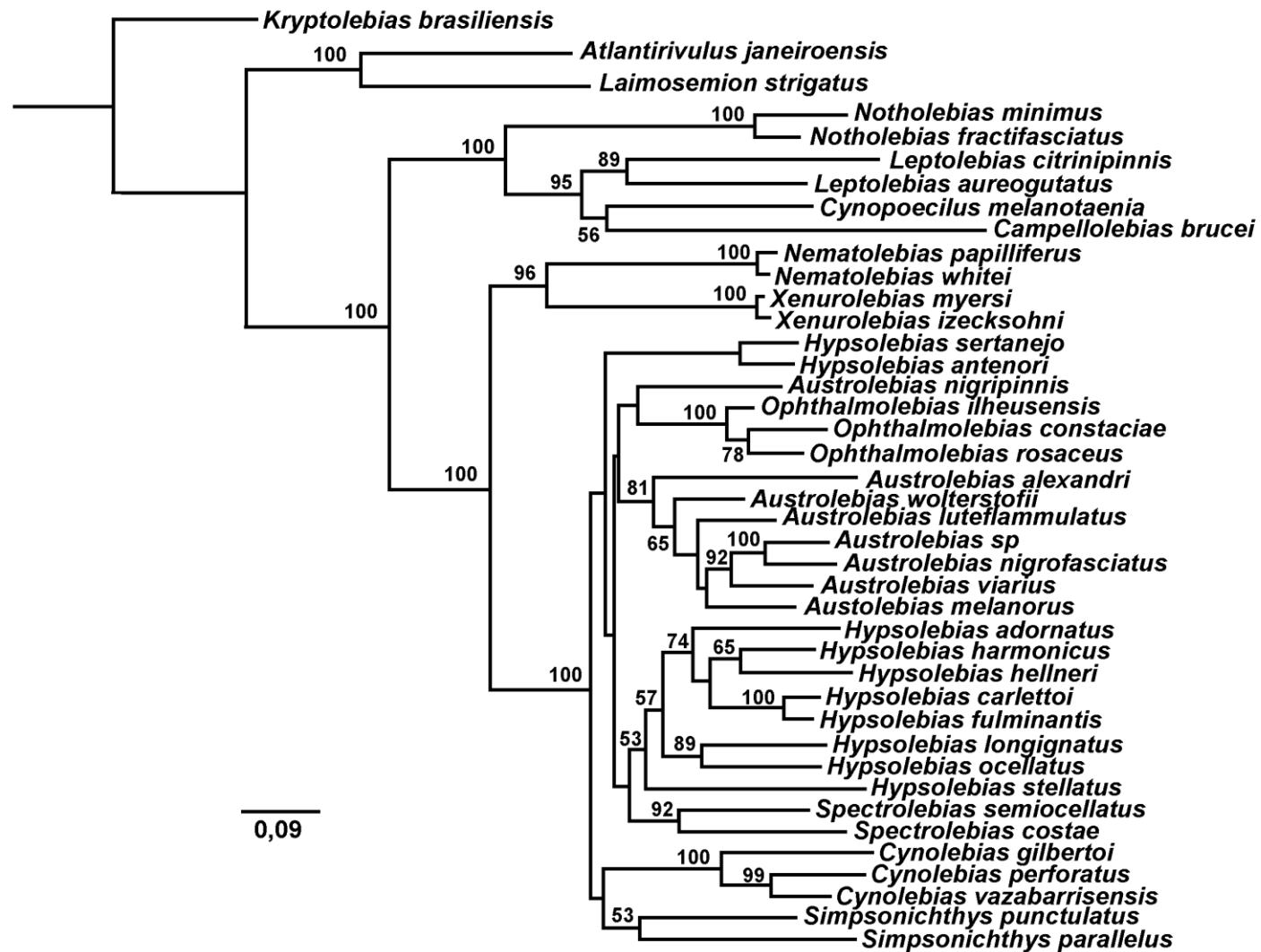


Fig. 9 - Árvore recuperada pela análise de máxima verossimilhança encontrada a partir da matriz com seqüências dos genes mitocondriais. Valores nos ramos indicam suporte de 1000 réplicas de bootstrap. Valores inferiores a 50 foram omitidos.

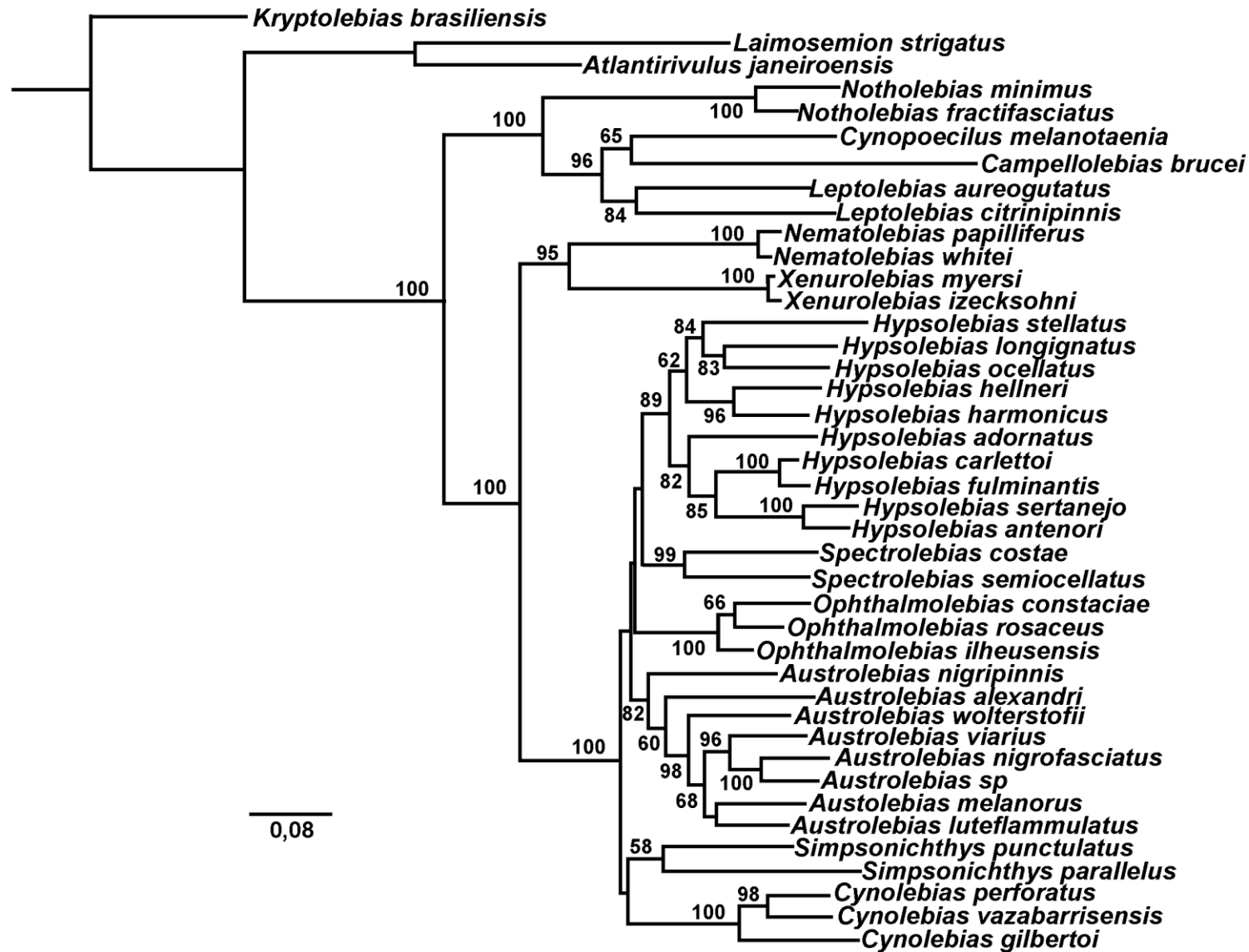


Fig. 10 - Árvore recuperada pela análise de máxima verossimilhança encontrada a partir da matriz com sequências dos genes mitocondriais e nuclear. Valores nos ramos indicam suporte de 1000 réplicas de bootstrap. Valores inferiores a 50 foram omitidos.

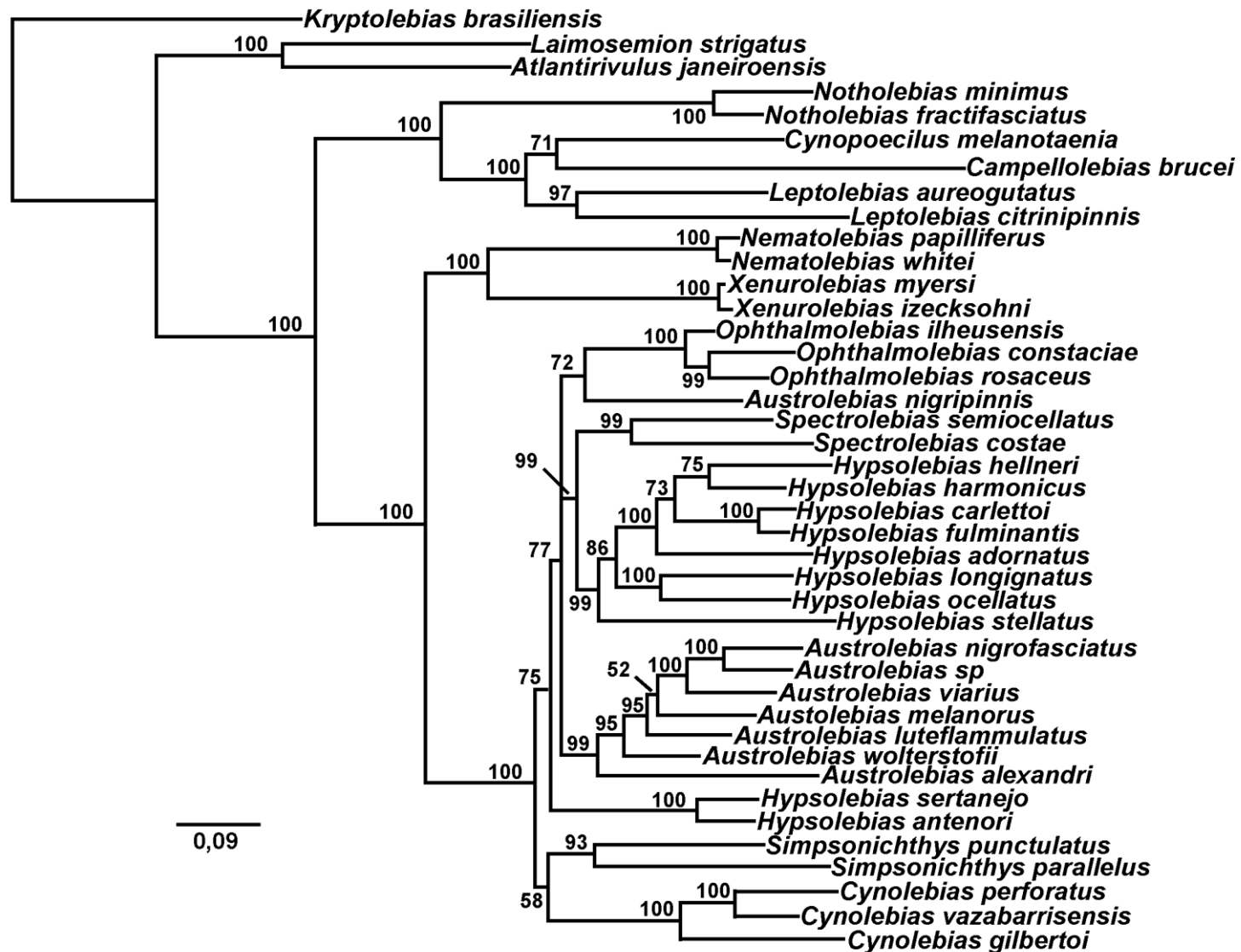


Fig. 11 - Árvore recuperada pela análise de inferência bayesiana encontrada a partir da matriz com sequências dos genes mitocondriais. Valores nos ramos indicam a probabilidade posterior de 1.000.000 de gerações com quatro cadeias de markov. Valores inferiores a 50 foram omitidos.

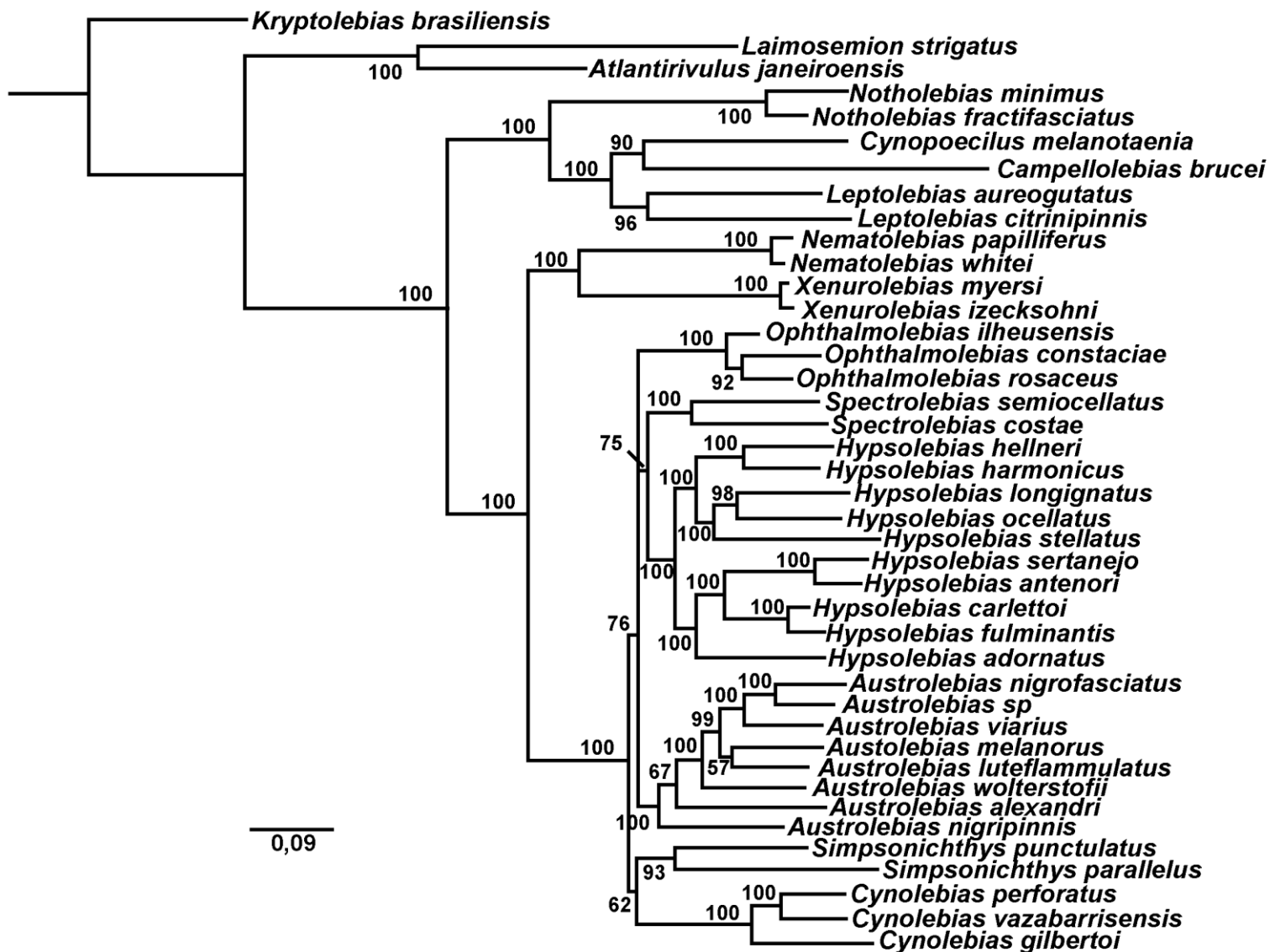


Fig. 12 - Árvore recuperada pela análise de inferência bayesiana encontrada a partir da matriz com sequências dos genes mitocondriais e nuclear. Valores nos ramos indicam a probabilidade posterior de 1.000.000 de gerações com quatro cadeias de markov. Valores inferiores a 50 foram omitidos

Discussão

1- Monofiletismo da subfamília Cynolebiasinae de das tribos Cynolebiasini e Cynopoecilini

As análises realizadas, utilizando ambas as matrizes, recuperaram com alto suporte o monofiletismo da subfamília Cynolebiasinae, o que corrobora as propostas anteriores baseadas tanto em caracteres morfológicos quanto caracteres moleculares (Costa, 1990a; b; 1998; Hrbek & Larson, 1999; Murph *et al.*, 1999). As tribos Cynolebiasini e Cynopoecilini também foram recuperadas nas seis análises realizadas com elevado suporte, a única exceção foi a análise de máxima parcimônia utilizando a matriz com os quatro marcadores analisados, contendo informações dos genomas mitocondrial e nuclear, essa análise recuperou o monofiletismo das tribos e corroborou com elevado suporte de bootstrap a tribo Cynopoecilini, porém não obteve suporte para a tribo Cynolebiasini. Apesar do baixo suporte encontrado por essa análise os resultados encontrados corroboram o monofiletismo das duas tribos de Cynolebiasinae, como já proposto em estudos anteriores baseados em dados morfológicos e moleculares (Costa 1996, 1998, 2008b, 2010, Hrbek & Larson, 1999; Murph *et al.*, 1999).

2- Relações internas da tribo Cynopoecilini

O monofiletismo de Cynopoecilini foi recuperado e corroborado com elevado suporte nas três análises realizadas com ambas as matrizes. Todas as árvores filogenéticas obtidas recuperaram com elevado suporte a relação de *Notholebias* como grupo irmão do clado contendo os gêneros *Campellolebias*, *Cynopoecilus* e *Leptolebias*, tal relação também é corroborada por análises realizadas a partir de dados morfológicos e moleculares (Murph *et al.*, 1999; Costa, 2008).

As análises de máxima parcimônia apresentaram uma topologia congruente entre si, entretanto diferente da encontrada pelas análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana. Nessas análises *Campellolebias* se mostrou mais relacionado a *Leptolebias* e esse clado como irmão de *Cynopoecilus*. Apesar de recuperar essa topologia, as análises de parcimônia apresentam valores de bootstrap muito baixos para as relações entre *Campellolebias*, *Cynopoecilus* e *Leptolebias*. De modo que entre as relações apresentadas pelas análises de máxima parcimônia para a tribo Cynopoecilini, apenas a relação de *Notholebias* como grupo irmão do clado composto por *Campellolebias*, *Cynopoecilus* e *Leptolebias* é clara e bem corroborada.

As análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana, utilizando ambas as bases de dados, recuperaram topologias congruentes para as relações entre *Campellolebias*, *Cynopoecilus* e *Leptolebias*, onde *Campellolebias* e *Cynopoecilus* se mostram mais relacionados entre si e *Leptolebias* como grupo irmão desse clado. As análises de máxima verossimilhança obtiveram valores de bootstrap relativamente baixos para a relação de *Campellolebias* e *Cynopoecilus*, 56% para a matriz apenas com os marcadores mitocondriais e 65% para a matriz com os quatro marcadores utilizados. A análise de inferência bayesiana, utilizando os quatro marcadores analisados, foi a análise que corroborou com maior suporte tal relação, com o valor de probabilidade posterior de 95,9%. O clado formado por *Campellolebias* e *Cynopoecilus* é corroborado por análises baseadas em morfologia (Costa, 1990, 1998, 2008), entretanto a única análise molecular que conta com esses gêneros não recupera tal relação (Hrbek & Larson, 1999).

3- Relações internas da tribo Cynolebiasini

Todas as análises realizadas recuperaram o monofiletismo da tribo Cynolebiasini e foram congruentes com relação a sua divisão em dois grupos principais. As análises realizadas corroboram o monofiletismo da tribo com elevado suporte, a única exceção foi a análise de máxima parcimônia, utilizando a matriz com os quatro marcadores analisados, que recuperou esse clado, mas não obteve suporte no teste de bootstrap.

3.1 - Relações de *Nematolebias* e *Xenurolebias*

Dos grupos recuperados em Cynolebiasini, o primeiro é formado pelos gêneros *Nematolebias* e *Xenurolebias*. A relação desses gêneros como grupos irmãos já havia sido apresentada em análises realizadas a partir de dados morfológicos e moleculares (Costa 1996; 1998; Hrbek & Larson, 1999). A relação desse clado, formado por gêneros *Nematolebias* e *Xenurolebias*, como grupo irmão dos outros gêneros Cynolebiasini foi indicada pela análise molecular de Hrbek & Larson (1999), entretanto esse estudo não contou com os gêneros *Cynolebias*, *Simpsonichthys* e *Spectrolebias*, o que deixa apenas um indício de tal relação. Em análises morfológicas, a relação de *Nematolebias* e *Xenurolebias* como grupos basais em relação aos outros gêneros da tribo só foi apresentada em um estudo (Costa, 2010), porém esses gêneros não são apresentados como grupos irmãos, pois *Xenurolebias* aparece mais relacionado aos outros gêneros de Cynolebiasini do que a *Nematolebias*. Geograficamente tal relação é interessante, pois ambas as espécies são encontradas em bacias costeiras do leste brasileiro (Fig. 3), entretanto *Nematolebias* só é encontrado em poças temporárias nas bacias costeiras da Região dos Lagos, no estado do Rio de Janeiro, e *Xenurolebias* em ambientes temporários em áreas de restinga entre as bacias dos rios Jucuruçu, no sul da Bahia, e Doce, no Espírito Santo (Costa, 2008a; 2009)

3.2 - Topologia interna do clado incluindo os gêneros *Austrolebias*, *Cynolebias*, *Hypsolebias*, *Ophthalmolebias*, *Simpsonichthys* e *Spectrolebias*

O segundo grupo da tribo Cynolebiasini recuperado por todas as análises é composto pelos gêneros *Austrolebias*, *Cynolebias*, *Hypsolebias*, *Ophthalmolebias*, *Simpsonichthys* e *Spectrolebias*. A organização interna entre os gêneros desse grupo apresentou poucas congruências, variando de acordo com a matriz utilizada e a análise realizada. Os valores de suporte para algumas das relações apresentadas também foi baixo.

Em relação às topologias encontradas para esse grupo, as análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana apresentaram resultados mais congruentes entre si. As topologias apresentadas por essas análises foram mais congruentes de acordo com a matriz utilizada, isso é, os resultados encontrados a partir da matriz que continha apenas os marcadores mitocondriais apresentaram topologias mais similares entre si, ocorrendo o mesmo com os resultados apresentados a partir da matriz com os quatro marcadores utilizados. As análises de máxima parcimônia apresentaram os resultados menos congruentes entre os métodos utilizados, isso com ambas as bases de dados. Um fator que pode causar essa diferença entre os resultados da análise de máxima parcimônia e os resultados das análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana é a forma a qual cada método utiliza para encontrar a melhor árvore filogenética. A análise de máxima parcimônia busca a topologia que exija o menos número de mudanças evolutivas, enquanto as análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana utilizam algoritmos que se baseiam no modelo evolutivo para a busca da melhor árvore.

3.3 - Posicionamento de *Austrolebias nigripinnis*

Nas análises realizadas apenas com os marcadores mitocondriais a espécie *Austrolebias nigripinnis* se apresentou em locais inesperados nos cladogramas. Nas análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana essa espécie se posicionou como mais relacionada ao gênero *Ophthalmolebias* do que ao gênero *Austrolebias*, na análise de máxima parcimônia *A. nigripinnis* se apresentou como um ramo mais relacionado a algumas das espécies de *Hypsolebias*. Nas análises realizadas com a adição do marcador nuclear, S7, *A. nigripinnis* se mostrou relacionada às outras espécies de *Austrolebias*, como espécie irmã do clado formado por todas as outras espécies amostradas para o gênero. Tal posicionamento é corroborado por dados morfológicos (Costa, 2010).

A causa do posicionamento inesperado de *A. nigripinnis* nas análises utilizando apenas o genoma mitocondrial pode estar relacionada à diversidade do gênero *Austrolebias* e falta do fragmento do marcador ND2 para essa espécie (Tabela 2). O gênero *Austrolebias* contém cerca de 40 espécies, havendo uma grande variedade de formas, tamanhos e especializações tróficas (Costa, 2006a; 2011c). Informações morfológicas corroboram *A. nigripinnis* como representante de uma linhagem mais basal em do gênero, sendo essa o grupo irmão do amplo agrupamento que reúne todas as outras linhagens de *Austrolebias* (Costa, 2010). A amostragem aqui empregada, apesar de ampla, não parece ter sido suficiente para que as análises recuperassem seu posicionamento a partir das sequências apenas de COx1 e 16s.

3.4 - Monofiletismo de *Hypsolebias*

Nem todas as análises recuperaram o monofiletismo do gênero *Hypsolebias*. Dentre as realizadas utilizando os marcadores mitocondriais, apenas a análise de máxima parcimônia recuperou o monofiletismo do gênero, mas com *A. nigripinnis* posicionada como uma linhagem pertencente ao gênero *Hypsolebias*. As análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana, realizadas com essa base de dados, apresentaram, de forma congruente, *Hypsolebias* dividido em dois grupos. O primeiro grupo é formado pelas espécies *H. antenori* e *H. sertanejo* e o segundo formado pelas outras espécies do gênero. Em ambas as análises o segundo grupo se posicionou como grupo irmão de *Spectrolebias*, e o primeiro se mostrou como irmão do clado formado pelos gêneros *Austrolebias*, *Ophthalmolebias*, *Spectrolebias* e o segundo grupo de *Hypsolebias*.

Quando utilizado também o marcador nuclear, as análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana recuperaram o monofiletismo de *Hypsolebias*, porém a análise de máxima parcimônia passa a apresentá-lo em dois grupos separados. O primeiro grupo apresentado pela análise de máxima parcimônia se mostra como irmão do gênero *Simpsonichthys* e o segundo como irmão do clado formado por *Ophthalmolebias*, *Simpsonichthys*, *Spectrolebias* e o primeiro grupo de *Hypsolebias*. Utilizando a matriz com os quatro marcadores, as análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana além de recuperarem o monofiletismo de *Hypsolebias* com elevado suporte, também recuperaram o monofiletismo dos dois grupos indicados pela análise de máxima parcimônia.

A causa de algumas das análises não recuperarem o monofiletismo de *Hypsolebias* pode ser similar ao que ocorre com *Austrolebias nigripinnis*, como discutido acima. *Hypsolebias* também é um gênero diverso, com cerca de 40 espécies, e

apesar da ampla amostragem realizada para o trabalho, abrangendo todas suas diferentes linhagens, o monofiletismo não recuperado pode ter sido causado pela não inclusão de amostragens ainda mais abrangentes na análise.

3.5 - Subgênero *Megalebias*

A posição de *Megalebias* como um grupo mais relacionado a algumas espécies de *Austrolebias* foi corroborada. Todas as análises realizadas, com ambas as matrizes, posicionaram sua espécie tipo, *Austrolebias wolterstorffi*, como um ramo interno de *Austrolebias*, corroborando propostas filogenéticas anteriores baseadas em caracteres morfológicos (Costa, 2006a; 2010).

3.6 - Relações de *Cynolebias* e *Simpsonichthys*

Em relação ao posicionamento de *Cynolebias*, as seis análises realizadas corroboram que o gênero faça parte de uma linhagem mais basal em relação a *Austrolebias*, *Hypsolebias*, *Ophthamolebias*, e *Spectrolebias*. As análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana foram congruentes apontando de maneira inédita a relação de *Cynolebias* e *Simpsonichthys* como grupos irmãos. Geograficamente os dois gêneros são encontrados em áreas adjacentes (fig. 12), com *Simpsonichthys* ocupando áreas no alto rio Paraná, alto rio Araguaia e alto rio São Francisco (Costa 2010; 2012), e as espécies de *Cynolebias* sendo encontradas nas bacias dos rios Tocantins, Parnaíba, São Francisco e outras drenagens menores do nordeste do Brasil (Costa,2001; 2010; Costa *et al.*, 2010). Importante notar que a relação de *Cynolebias* e *Simpsonichthys* como grupos irmãos não foi corroborada por caracteres morfológicos, o que pode ser devido às destacadas adaptações apresentadas por ambos os gêneros.

Cynolebias compreende espécies gigantes, atingindo até cerca de 200mm de comprimento total, muito a cima de outros *Cynolebiasinae*, que apresentam em média 50mm (Costa, 2003a). Por sua vez, *Simpsonichthys* possui espécies pequenas ou miniaturas, com algumas chegando a cerca de 30mm de comprimento padrão (Costa, 2003a; 2012).

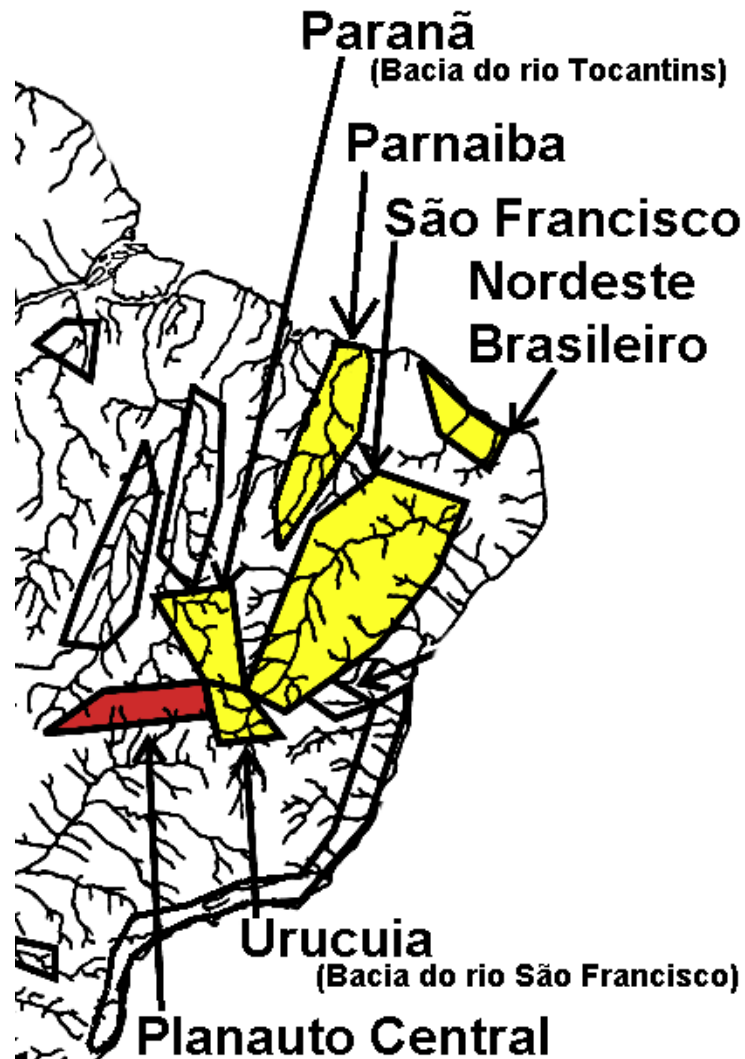


Fig. 13 - Bacias hidrográficas onde são encontrados os gêneros *Cynolebias*, em amarelo, e *Simpsonichthys*, em vermelho (modificado de Costa, 2010).

Tais divergências adaptativas, que inevitavelmente causam grandes modificações estruturais e osteológicas (Costa, 2011c), poderiam mascarar evidências

morfológicas, assim não sendo detectados caracteres que corroborassem esse clado (Costa, 1996; 1998; 2006; 2010). Em relação as análises moleculares (Hrbek & Larson, 1999; Murph *et al.*, 1999) tal relação não é apresentada, já que em qualquer dessas análises representantes de *Cynolebias* ou *Simpsonichthys* não foram incluídos.

Considerando as análises filogenéticas anteriores (Costa, 1996; 2003; 2006; 2010), não há um consenso para o posicionamento do gênero *Simpsonichthys*. As análises de máxima parcimônia, aqui realizadas, recuperaram *Simpsonichthys* em posições diferentes da proposta pelas análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana, posicionando o gênero como grupo irmão de *Austrolebias*, quando utilizado apenas os genes mitocondriais, ou como mais relacionado a parte das espécies de *Hypsolebias*, quando utilizados os quatro genes analisados. Dentre as topologias apresentadas pelas análises de máxima parcimônia para a posição de *Simpsonichthys*, apenas a relação com *Hypsolebias* é a única já apresentada na literatura (Costa 1996).

Em relação ao posicionamento de *Cynolebias*, as análises morfológicas anteriores são congruentes entre si, propondo *Cynolebias* como grupo irmão de *Austrolebias* (Costa, 1996; 2003; 2006; 2010), entretanto nenhuma das análises aqui realizadas corroborou tal relação. Dessa forma, o agrupamento proposto pelas análises morfológicas pode ser causado por homoplasias.

3.7 - Relações entre *Austrolebias*, *Hypsolebias*, *Ophthalmolebias* e *Spectrolebias*

As análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana, utilizando ambas as bases de dados, apresentaram topologias similares, onde os gêneros *Austrolebias*, *Hypsolebias*, *Ophthalmolebias* e *Spectrolebias* formam um clado.

Diferente do apresentado por essas análises, as de máxima parcimônia apresentaram topologias onde *Simpsonichthys* também estaria relacionado a esses gêneros, dessa forma, utilizando apenas os marcadores mitocondriais, *Simpsonichthys* foi posicionado como grupo irmão de *Austrolebias* ou, quando utilizando também o marcador nuclear, *Simpsonichthys* se apresentou como mais relacionado a algumas das espécies de *Hypsolebias*. As análises de máxima parcimônia não apresentaram topologias congruentes para as relações entre os gêneros *Austrolebias*, *Hypsolebias*, *Ophthalmolebias*, *Simpsonichthys* e *Spectrolebias*. Além disso, também não obtiveram valores de suporte para as relações entre os gêneros mencionados e para a relação deles com o gênero *Cynolebias*.

3.8 - Relação entre *Hypsolebias* e *Spectrolebias*

A relação entre os gêneros *Hypsolebias* e *Spectrolebias* como grupos irmãos foi apresentada por ambas as análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana e pela análise de máxima parcimônia baseada nos marcadores mitocondriais. Mesmo quando as análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana foram realizadas apenas com os genes mitocondriais, onde o monofiletismo de *Hypsolebias* não foi recuperado, o relacionamento com *Spectrolebias* se manteve para parte das espécies de *Hypsolebias*. Morfologicamente tal relacionamento também é corroborado (Costa, 2010). As análises de inferência bayesiana foram as únicas que apresentaram elevado suporte para a relação de *Hypsolebias* e *Spectrolebias* como grupos irmãos, com 98,5% de probabilidade posterior, utilizando os marcadores mitocondriais, e 75,3%, utilizando também o marcador nuclear. Apesar do baixo valor de suporte apresentado para o relacionamento entre esses gêneros pelas análises de máxima verossimilhança e pela análise de parcimônia, a congruência entre os três métodos utilizados e a informação

morfológica (Costa, 2010) são indícios de que com a adição de outras informações, como outros marcadores ou uma maior amostragem, tal relação pode ser corroborada com valores de suporte mais elevados.

3.9 - Posicionamento de *Austrolebias* e *Ophthalmolebias*

Os gêneros *Austrolebias* e *Ophthalmolebias* se mostraram relacionados ao clado formado por *Hypsolebias* e *Spectrolebias*, entretanto a relação entre esses três grupos ainda não é clara. A análise de máxima verossimilhança, utilizando somente os marcadores mitocondriais, apresentou *Ophthalmolebias* e *Austrolebias* formando um grupo monofilético, sendo o grupo irmão do ramo formado por *Hypsolebias* e *Spectrolebias*. Essa mesma análise incluindo o marcador nuclear S7 indicou *Ophthalmolebias* como grupo irmão do clado (*Hypsolebias* + *Spectrolebias*), e *Austrolebias* como o grupo irmão do clado (*Ophthalmolebias* (*Hypsolebias* + *Spectrolebias*)). As análises de inferência bayesiana, com ambas as bases de dados, apresentaram uma politomia entre *Ophthalmolebias*, *Austrolebias* e (*Hypsolebias* + *Spectrolebias*), de forma que ainda não é clara a relação entre as três linhagens. Apesar disso, a congruência entre os métodos de máxima verossimilhança e inferência bayesiana indicam que a adição de novos marcadores ou adição de mais terminais, poderá esclarecer tal relacionamento.

Conclusão

Os resultados obtidos a partir das análises realizadas foram congruentes em relação ao monofiletismo da subfamília Cynolebiasinae, recuperando-a com elevado suporte, como o proposto por análises morfológicas e moleculares (Costa, 1998; Hrbek & Larson, 1999; Murph *et al.*, 1999). O monofiletismo das tribos Cynolebiasini e Cynopocilini foi recuperado e corroborado com alto suporte por todas as análises realizadas, com exceção da análise de máxima parcimônia com os quatro marcadores analisados. Na análise de máxima parcimônia, com a adição do marcador nuclear, ambas as tribos foram recuperadas, mas a tribo Cynolebiasini teve seu suporte de bootstrap reduzido de 95% para 14%, enquanto Cynopocilini. obteve valor de suporte de bootstrap elevado de 86% para 100%. Na tribo Cynolebiasini, todas as análises realizadas recuperaram a formação de dois clados internos, o primeiro formado por *Nematolebias* e *Xenurolebias* e o segundo por *Austrolebias*, *Cynolebias*, *Hypsolebias*, *Ophthalmolebias*, *Simpsonichthys* e *Spectrolebias*. Em todas as análises esses clados foram recuperados com elevado suporte.

Em relação às topologias encontradas, a adição de informação do genoma nuclear corroborou os resultados encontrados pelos marcadores mitocondriais isolados. A única exceção foi a análise de máxima parcimônia, onde as relações entre os gêneros *Austrolebias*, *Cynolebias*, *Hypsolebias*, *Ophthalmolebias*, *Simpsonichthys* e *Spectrolebias* apresentou pouca congruência entre as matrizes utilizadas. Em relação aos suportes encontrados, a inclusão de informação do genoma nuclear foi positiva para o estudo, de uma forma geral os suportes encontrados pelas análises com o marcador nuclear se mostraram iguais ou maiores do que os suportes encontrados pelas análises apenas com os marcadores mitocondriais.

O monofiletismo dos gêneros analisados foi corroborado por todas as análises, as únicas exceções foram os gêneros *Austrolebias* e *Hypsolebias*. As análises apenas com marcadores mitocondriais, não recuperaram *A. nigripinnis* no mesmo ramo das outras espécies do gênero, e *Hypsolebias* se apresentou dividido em dois grupos nas análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana, com marcadores mitocondriais, e máxima parcimônia, com os quatro marcadores analisados. Entretanto esses gêneros são os mais diversos da subfamília, de forma que a ausência de monofiletismo pode ser um artefato das análises, como discutido anteriormente.

Os resultados do estudo propõem relações inéditas para alguns dos gêneros analisados, como o posicionamento do clado (*Nematolebias* + *Xenurolebias*) como grupo irmão de todos os outros gêneros da tribo Cynolebiasini, assim como a relação de *Cynolebias* e *Simpsonichthys* como grupos irmãos, que também é apresentada pela primeira vez, uma vez que as principais análises corroboram a relação de *Cynolebias* e *Austrolebias* como grupos irmãos (Costa, 1996; 1998; 2006; 2010). Entretanto o baixo valor de suporte encontrado para tais relações indicam a necessidade de se incluir mais dados e taxa na análise.

O estudo realizado também corrobora para alguns dos gêneros algumas relações já apresentadas na literatura, a partir de informações morfológicas, como o posicionamento dos gêneros da tribo Cynopoecilini, onde *Campellolebias* e *Cynopoecilus* se apresentam como grupos irmãos, *Leptolebias* como irmão desses e *Notholebias* como o grupo irmão do clado com os outros gêneros da tribo (Costa, 2008). A relação entre *Hypsolebias* e *Spectrolebias* como grupos irmãos também foi recuperada pelo estudo e corrobora resultados apresentados anteriormente (Costa, 2010).

Referências

Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., Thompson, J.D. 2003. **Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs.** Nucleic Acids Research, 31 (13): 3497-500.

Chow, S., Hazama, K. 1998. **Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish.** Molecular Ecology, 7: 1255-1256.

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

Costa, W.J.E.M. 1990b. **Classificação e distribuição da família Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei).** Revista Brasileira de Biologia, 50: 83-89.

Costa, W.J.E.M. 1995a. **Revision of the Neotropical Fish Genus Campellolebias (Cyprinodontiformes: Rivulidae), with Notes on Phylogeny and Biogeography of the Cynopocilina.** Cybium, 19 (4): 349-369.

Costa, W.J.E.M. 1995. **Revision Of The Neotropical Annual Fish Genus Cynopocilus (Cyprinodontiformes : Rivulidae).** Copeia, 1995 (2): 456-465.

Costa, W. J. E. M. 1996. **Phylogenetic and biogeographic analysis of the Neotropical annual fish genus *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Rivulidae).** Journal of Comparative Biology, 1: 129-140.

Costa, W.J.E.M. 1998. **Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei)** Journal of Comparative Biology, 3(1): 33-92.

Costa, W. J. E. M. 2001. **The neotropical annual fish genus Cynolebias (Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, taxonomic revision and biogeography.** Ichthyological Exploration of Freshwaters, 12 (4): Ichthyological Exploration of Freshwaters, 12: 333-383.

Costa, W.J.E.M. 2002a. **The Neotropical seasonal fish genus *Nematolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae): taxonomic revision, with description of a new species.** Ichthyological Exploration of Freshwaters, 13 (1): 41-52.

Costa, W.J.E.M. 2002b. **The annual fish genus *Cynopoecilus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): taxonomic revision, with description of four new species.** Ichthyological Exploration of Freshwaters, 13 (1): 11-24.

Costa, W.J.E.M. 2003a. **Family Rivulidae (South American Annual Fishes).** In Reis, R.E., Kullander, S.O. & Ferraris, C.J. 2003. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America.** Edipucrs, Porto Alegre: 526-548.

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

Costa, W.J.E.M. 2004. ***Moema apurinan* sp. n. and *Aphyolebias boticarioi* sp. n. (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): two new annual killifishes from the Rio Purus basin, Brazilian Amazon.** Zootaxa, 707: 1-12.

Costa, W.J.E.M. 2005a. **The Neotropical annual killifish genus *Pterolebias* Garman (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology, and taxonomic revision.** Zootaxa, 1067: 1-36.

Costa, W.J.E.M. 2005b. **Seven new species of the killifish genus *Rivulus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from the Paraná, Paraguay and upper Araguaia river basins, central Brazil.** Neotropical Ichthyology, 3 (1): 69-82.

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

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

Costa, W.J.E.M. 2006c. **Taxonomy and phylogenetic relationships among species of the seasonal, internally inseminating, South American killifish genus**

***Campellolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae), with the description of a new species.** Zootaxa, 1227: 31-55.

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

Costa, W.J.E.M. 2007b. **Taxonomy of the plesiolebiasine killifish genera *Pituna*, *Plesiolebias* and *Maratecoara* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae), with descriptions of nine new species.** Zootaxa, 1410: 1-41.

Costa, W.J.E.M. 2008a. **Monophyly and taxonomy of the Neotropical seasonal killifish genus *Leptolebias* (Teleostei: Aplocheiloidei: Rivulidae), with the description of a new genus.** Zoological Journal of the Linnean Society, 153: 147-160.

Costa, W.J.E.M. 2008b. **Catalog of aplocheiloid killifishes of the world.** Reproarte, Rio de Janeiro.

Costa, W.J.E.M. 2009. **Peixes aploqueilóideos da Mata Atlântica brasileira; história, diversidade e conservação/Aplocheiloidei fishes of the Brazilian Atlantic Forest: history, diversity and conservation.** 172 p. Rio de Janeiro: Museu Nacional

Costa, W.J.E.M. 2010. **Historical biogeography of cynolebiasine annual killifishes inferred from dispersal–vicariance analysis.** Journal of Biogeography, 37: 1995-2004.

Costa, W.J.E.M. 2011a. **Identity of *Rivulus ocellatus* and a new name for a hermaphroditic species of *Kryptolebias* from south-eastern Brazil (Cyprinodontiformes: Rivulidae)** Ichthyological Exploration of Freshwaters, 22 (2): 185-192.

Costa, W. J. E. M 2011b. **Phylogenetic position and taxonomic status of *Anablepsoides*, *Atlantirivulus*, *Cynodonichthys*, *Laimosemion* and *Melanorivulus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)** Ichthyological Exploration of Freshwaters, 22 (3): 233-249.

Costa, W.J.E.M. 2011c. **Parallel evolution in ichthyophagous annual killifishes of South America and Africa.** *Cybium*, 35(1): 39-46.

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

Costa, W.J.E.M 2013. ***Leptolebias opalescens*, a supposedly extinct seasonal killifish from the Atlantic Forest of south-eastern Brazil, rediscovered 31 years after its last Record (Cyprinodontiformes: Rivulidae).** *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 23 (4): 357-358

Costa, W.J.E.M. & Amorim, P.F. 2011. **A new annual killifish species of the *Hypsolebias flavicaudatus* complex from the São Francisco River basin, Brazilian Caatinga (Cyprinodontiformes: Rivulidae).** *Vertebrate Zoology*, 61 (1): 99-104.

Costa, W.J.E.M. & Amorim, P.F. 2013. **Delimitation of cryptic species of *Notholebias*, a genus of seasonal miniature killifishes threatened with extinction from the Atlantic Forest of south-eastern Brazil (Cyprinodontiformes: Rivulidae).** *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 21 (1): 63-72.

Costa, W.J.E.M., Amorim, P.F. & Mattos, J.L.O. 2012. **Species delimitation in annual killifishes from the Brazilian Caatinga, the *Hypsolebias flavicaudatus* complex (Cyprinodontiformes: Rivulidae): implications for taxonomy and conservation.** *Systematics and Biodiversity*, 10(1): 71-91.

Costa W.J.E.M. & Leal F. 2009. **Egg surface morphology in the Neotropical seasonal killifish genus *Leptolebias* (Teleostei: Aplocheiloidei: Rivulidae).** *Vertebrate Zoology*, 59(1): 25-29.

Costa, W.J.E.M., & Nielsen, D. T. B. 1997. **A new genus and species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from the Araguaia basin, central Brazil.** *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 7: 257-266.

Costa, W.J.E.M., Ramos, T. P.A., Alexandre, L. C. & Ramos, R. T. C. 2010. ***Cynolebias parnaibensis*, a new seasonal killifish from the Caatinga, Parnaíba River**

basin, northeastern Brazil, with notes on sound producing courtship behavior (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Neotropical Ichthyology*, 8(2): 283-288.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. **DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.** *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.

García, G., Alvarez-Valin, F. & Gomez, N. 2002. **Mitochondrial genes: signals and noise in the phylogenetic reconstruction of the annual killifish genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae).** *Biological Journal of the Linnean Society*, 76: 49–59.

Goloboff, P.A., Farris, J.S. & Nixon, K.C. 2008. **TNT, a free program for phylogenetic analysis.** *Cladistics*, 24(5): 774-786.

Harrington, R.W.Jr. 1961. **Oviparous hermaphroditic fish with internal self-fertilization.** *Science*, 134: 1749-1750.

Hoedeman, J.J. 1961. **Preliminary key to the species and subspecies of the genus *Rivulus*.** *Bulletin of Aquatic Biology* 2 (18): 65-74

Hrbek, T. & A. Larson. 1999. **The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): A molecular phylogenetic and biogeographic perspective.** *Evolution* 53 (4): 1200-1216.

Myers, G.S. 1942. **Studies on South American freshwater fishes I -** *Stanford Ichthyological Bulletin*, 1942.

Murphy, W.J., Thomerson, J.E. & Collier, G.E. 1999. **Phylogeny of the neotropical killifish family Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei) inferred from mitochondrial DNA sequences.** *Molecular and Phylogenetic Evolution*, 13: 289-301.

Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G. 2002. **The simple fool's guide to PCR Volume 2.0.** Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu.

Parenti, L.R. 1981. **A Phylogenetic and Biogeographic Analysis of Cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha)**. Bulletin of the American Museum of Natural History, 168(4) : 335-557.

Posada, D. 2008. **jModelTest: Phylogenetic Model Averaging**. Molecular Biology and Evolution, 25 (7): 1253-1256.

Reis, R.E., Kullander, S.O. & Ferraris, C.J. 2003. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck J. P. 2011. **MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space**. Systematic Biology, 61: 539-42.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods**. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739.

Zwickl, D. J. 2006. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion**. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.