Título: Avaliação de questões genéticas, morfológicas e ecológicas no grupo de espécies de peixes anuais *Austrolebias adloffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): abordagens integrativas visando à conservação

Tipo de bolsa solicitada: Bolsa para Pesquisas de Campo de Doutorado

Eixo temático: Conservação, manejo e uso sustentável da fauna e da flora

Instituição de ensino/ programa: Universidade Federal do Rio Grande – FURG/ Programa de Pós Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais – PPGBAC

Dados do aluno:

Nome: Crislaine Barbosa, mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais

Currículo Lattes: http://lattes.cnpq.br/0476111139609060

Endereço profissional: Universidade Federal do Rio Grande - Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética. Av. Itália Km 8 - Campus Carreiros. CEP 96203-900 - Rio Grande, RS, Brasil

Orientador do projeto:

Nome: Lizandra Jaqueline Robe, cargo: Professora de Nível Superior, tipo de vínculo com a IES: Dedicação Exclusiva

Currículo Lattes: http://lattes.cnpq.br/0384455492228279

Endereço profissional: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Av. Roraima, 1000 – Camobi – Santa Maria, RS. CEP 97105-900.

Equipe:

Dr. Matheus Vieira Volcan – http://lattes.cnpq.br/2994231395809686

Dra. Adriana Gava – http://lattes.cnpq.br/9506898111543538

Dr. Ednei Primel – http://lattes.cnpq.br/3259602390948297

MSc. Daiana Kaster Garcez – http://lattes.cnpq.br/1181926474080625

Detalhamento do projeto

Introdução e justificativa

Mais de 85 mil espécies de animais e plantas encontram-se atualmente ameaçadas de extinção (IUCN, 2016), sendo que destas, 3.286 ocorrem em território brasileiro (ICMBio, 2018). No entanto este valor pode estar subestimado, pois faltam dados importantes sobre várias espécies. Apesar de não serem diretamente utilizados no estabelecimento do status de ameaça, dados moleculares permitem uma delimitação mais precisa das espécies, bem como de sua distribuição geográfica, fatores que são cruciais na determinação do status de ameaça. Além disso, a compreensão da

composição e organização da diversidade genética das espécies é de suma importância, pois fornece uma medida do seu potencial adaptativo e evolutivo (Galetti et al., 2009). No entanto, muitas vezes, se faz necessária a avaliação destes resultados em face a características morfológicas, de forma a contribuir na análise da diferenciação efetiva entre populações geneticamente estruturadas, na compreensão de artefatos (como saturação e atração de ramos longos, por exemplo) e fenômenos biológicos (como introgressão e compartilhamento de polimorfismos ancestrais, por exemplo) que podem enviesar os marcadores moleculares e também no estabelecimento de sinapomorfias compartilhadas por diferentes clusters.

Aliado a isso, marcadores moleculares e morfológicos também podem auxiliar na proposição de estratégias de conservação ao propiciarem a compreensão de aspectos ecológicos das espécies ou populações. Uma caracterização importante neste âmbito diz respeito à composição dos itens alimentares consumidos por cada indivíduo ou mesmo às comunidades microbianas que os influenciam. A composição da dieta pode ser avaliada por meio de análises micro-histológicas de fezes ou conteúdo estomacal (Nielsen et al., 2017). Já as análises de microbioma podem ser feitas por estratégias baseadas em sequenciamento de última geração, ou Next Generation Sequencing (NGS), tanto por abordagens metagenômicas ou pela amplificação de marcadores específicos, como o gene de RNA ribossomal 16S (Wong e Rawls, 2012). No último caso, a abundância e a riqueza de reads reflete a diversidade genética de fungos e bactérias encontrada em uma determinada amostra (Lear et al., 2017). É importante ressaltar que, no âmbito da conservação, tanto a dieta utilizada pelos organismos, como seu microbioma, fornecem importantes evidências na avaliação da saúde dos organismos que ocupam um determinado habitat (Wong e Rawls, 2012; Young et al., 2014), e, desta forma, da saúde de todo o ecossistema ali estabelecido (Young et al., 2014).

Os peixes anuais vivem em charcos temporários que secam em alguns períodos do ano. Para viver nestes ambientes, estes peixes apresentam diversas adaptações, dentre as quais se destaca o rápido desenvolvimento (atingem a maturidade sexual entre 6 e 8 semanas) e o seu ciclo de vida diferenciado, razão pela qual são conhecidos como “peixes anuais”. Durante o período chuvoso, esses animais se desenvolvem rapidamente, reproduzem-se e depositam os ovos no substrato; nos períodos de seca, os níveis de oxigênio diminuem, os adultos morrem e por fim o charco seca. Nos ovos, depositados a até 15 cm de profundidade no substrato, os indivíduos entram em estágio de diapausa (pausa no desenvolvimento embrionário) e assim permanecem até a próxima estação chuvosa, quando os ovos eclodem e reinicia-se o ciclo (Podrabsky e Hand, 1999).

Para apresentarem esta rápida maturação sexual, bem como uma alta capacidade reprodutiva, estes animais necessitam de recursos energéticos em grande abundância. De fato, o consumo de recursos alimentares que possuem ácidos graxos como elementos estruturais tem se mostrado bastante

importante para organismos de metabolismo e desenvolvimento rápidos, uma vez que fornecem maior valor energético para os consumidores (Tocher et al., 2003). Neste contexto, a importância da composição da dieta no desenvolvimento de peixes vem sendo reforçada (Olivotto et al., 2011), e a deficiência de nutrientes tem sido associada a déficits de crescimento e até mesmo mortalidade (Olivotto et al., 2006). Em relação aos peixes anuais, sugere-se que sejam animais de hábito generalista (Laufer et al., 2009), característica comum para espécies de água doce sujeitas a alterações na disponibilidade de presas devido a variações ambientais (Abelha et al., 2001). Este hábito é apontado como crucial para a sobrevivência destes peixes (Shibatta e Bennemann, 2003; Arim et al., 2007). Neste sentido, diferentes espécies de peixes-anuais tem sido associadas ao consumo, principalmente, de zooplâncton, insetos e microcrustáceos, mas também de algas e diatomáceas (Laufer et al., 2009; Keppeler et al., 2013).

Por apresentarem uma grande associação a charcos individuais, os peixes anuais normalmente constituem populações pequenas e isoladas, o que instaura um cenário ideal para a atuação de mecanismos evolutivos que tendem a reduzir sua diversidade genética, além de propiciar a diferenciação entre as diferentes populações (Galetti et al., 2009). Além de fatores genéticos, a composição do microbioma destas populações pode fortalecer o isolamento interpopulacional, visto que, mesmo que ocorra algum evento migratório entre os charcos (ex.: períodos de cheias em que os charcos se comunicam, transporte de ovos através de aves), diferenças entre a composição microbiana dos indivíduos nativos e a dos indivíduos migrantes podem resultar na não sobrevivência destes últimos (Redford et al., 2012). Todos esses fatores intrínsecos tornam essas espécies especialmente vulneráveis. Além disso, a perda, degradação e fragmentação dos seus habitats acabam por aumentar ainda mais a vulnerabilidade destas espécies (Volcan et al., 2014), o que explica o elevado número de espécies ameaçadas. De fato, o biótopo ocupado por peixes anuais vem sendo negativamente afetado por diferentes fatores de origem antrópica, como a urbanização e as atividades agropecuárias, que levam ao aterro de charcos temporários, alteram a vegetação natural adjacente e/ou levam ao influxo de contaminantes de natureza doméstica ou de agrotóxicos para os diferentes corpos d'-água. Tudo isto explica o fato de que peixes-anuais figuram entre os grupos mais ameaçados de vertebrados, representando 30% da ictiofauna ameaçada no Brasil (ICMBio, 2018).

Dentre as espécies de peixes anuais que ocorrem no Brasil, destacam-se aquelas do gênero *Austrolebias*, que abrange 43 espécies de peixes anuais (Nielsen e Pillet, 2015; Costa et al., 2017), cuja distribuição se estende pelas bacias La Plata e Patos-Mirim, abrangendo sul do Brasil, Paraguai, sul da Bolívia, Uruguai e norte e nordeste da Argentina, além de algumas espécies da Bacia Amazônica (Costa, 1998; Loureiro e de Sá, 2015; Nielsen e Pillet, 2015). Dentro deste gênero, o grupo de espécies *A. adloffi* compreende onze espécies: *A. adloffi* (Ahl, 1922), *A. viarius* (Vaz-Ferreira et al., 1984), *A. charrua*, *A. minuano*, *A. nigrofasciatus* (Costa e Cheffe, 2001), *A. arachan*

(Loureiro et al., 2004), *A. nachtigalli* (Costa, 2006), *A. reicherti* (Loureiro e García, 2008), *A. bagual* (Volcan et al., 2014), *A. pelotapes* e *A. pongondo* (Costa et al., 2017). Quanto ao status de ameaça, *A. charrua*, *A. minuano* e *A. nigrofasciatus* constam na categoria "em perigo"; *A. arachan* é considerada "criticamente ameaçada"; *A. adloffi* e *A. nachtigalli* são consideradas "em perigo" a nível nacional, e "criticamente em perigo" a nível estadual (ICMBio, 2018; Rio Grande do Sul, 2014); *A. bagual*, *A. pongondo* e *A. pelotapes* não constam nas listas oficiais da fauna ameaçada por terem sido descritas recentemente (Volcan et al., 2014; Costa et al., 2017); *A. viarius*, *A. reicherti*, *A. arachan* e *A. charrua* também constam como ameaçadas na lista de Especies Prioritarias para la Conservación em Uruguay (Uruguay, 2013).

A distribuição destas espécies se dá ao longo do sistema lagunar Patos-Mirim, abrangendo territórios brasileiros e uruguaios (Costa, 2006; Volcan et al., 2014; García et al., 2015). Embora a monofilia do grupo seja bem suportada (Costa, 2006; García et al., 2014), algumas relações filogenéticas internas permanecem indefinidas (Barbosa, 2019). A espécie *A. bagual* (Volcan et al., 2014), por exemplo, apresenta populações morfologicamente distintas (Volcan, comunicação pessoal), uma situação semelhante ao que foi detectado para *A. nigrofasciatus*, que apresenta populações genética e morfologicamente diferenciadas (Barbosa, 2016). *Austrolebias minuano*, por outro lado, parece constituir pelo menos três linhagens distintas, potencialmente pertencentes a pelo menos duas espécies (Fernandes, 2019). Além disso, *A. charrua* se mostrou parafilética com relação às populações de *A. minuano* da localidade tipo, à margem oeste da Laguna dos Patos e *A. nachtigali* se revelou um táxon polifilético (Barbosa, 2019).

A região do sistema de drenagens Patos-Mirim, área geológica habitada pelos peixes do grupo, sofreu grande influência dos eventos de regressão e transgressão marinha que ocorreram durante o Quaternário, período no qual a Planície Costeira do Rio Grande do Sul foi intensamente retrabalhada, formando os sistemas deposicionais Laguna-Barreira (Tomazelli e Villwock, 2005). Segundo Loureiro (2004), muitas espécies de peixes anuais podem ter origem e diversificação recente, relacionadas a estes eventos geológicos. Isso foi demonstrado, por exemplo, para a espécie *A. wolterstorffi,* que apresenta duas linhagens geneticamente distintas nas margens leste e oeste da Lagoa dos Patos, que divergiram, possivelmente, em associação ao segundo evento deposicional Laguna-Barreira (Garcez et al., 2018), responsável pela formação desta lagoa (Tomazelli e Villwock, 2005). No entanto, esta região vem sendo intensamente degradada (Volcan et al., 2015), o que põe em cheque a conservação desta importante parcela da biodiversidade, que compreende predadores de topo que mantêm o equilíbrio do ecossistema em que habitam.

Com a degradação destes ambientes aquáticos temporários, os peixes anuais são impactados tanto direta quanto indiretamente. Sabe-se que as condições ambientais exercem grande influência na

composição das comunidades de invertebrados aquáticos (Young et al., 2014), que são a grande fonte de energia utilizada pelos rivulídeos. Além disso, mudanças nas condições físico-químicas do ambiente podem alterar também a composição do microbioma das espécies que ali vivem o que tem efeito direto na aptidão de tais espécies (Redford et al., 2012). Estes fatores podem figurar entre os principais responsáveis pela extinção de populações em charcos que não foram aterrados. Além disso, a composição da dieta e o microbioma também podem influenciar as taxas de sucesso nas translocações populacionais, que constituem uma das principais estratégias de conservação (Redford et al., 2012).

Considerando a ameaça de extinção das espécies do grupo *A. adloffi*, em face à crescente degradação das áreas úmidas que habitam, a realização de estudos genéticos e morfológicos sobre o grupo torna-se especialmente importante, a fim de reconstruir sua história evolutiva e elucidar questões taxonômicas e demográficas, com vistas finais à preservação das espécies. Neste sentido, a análise dos padrões e processos micro e macroevolutivos destas espécies dentro de uma perspectiva integrativa (genética + morfologia) permite não apenas reconstruir a história evolutiva das mesmas e dos seus caracteres, mas também compreender o presente, com fins a otimizar a gestão futura. Afinal, o conhecimento sobre diferenças entre as populações é de extrema importância para sua conservação, uma vez que permite avaliar questões taxonômicas, acessando o real status de ameaça das espécies e traçar estratégias efetivas de conservação. Além da análise das diferenças genéticas entre populações, a avaliação da dieta e do microbioma destes peixes se mostra importante no âmbito da conservação, pois permite avaliar a saúde dos indivíduos e a qualidade de seu ambiente, possibilitando reforçar a urgência na elaboração de estratégias de conservação, de modo a preservar toda a biodiversidade destes ambientes. Em último caso, estas informações são uteis também na delimitação de estratégias de translocação mais efetivas.

Objetivo geral e objetivos específicos:

Objetivo geral

Avaliar diferenças genéticas, morfológicas e ecológicas entre populações e espécies do grupo *Austrolebias adloffi* ao longo do sistema de drenagens Patos-Mirim e associá-las ao grau de conservação de seus habitats.

Objetivos específicos

1 - Avaliar a presença de monofilia recíproca nas espécies do grupo, validando seu status taxonômico;

2 - Avaliar a presença de diversidade críptica e descrever as espécies novas, quando necessário;

3 - Avaliar os níveis de diversidade genética em diferentes populações de cada espécie;

4 - Analisar a estruturação interpopulacional destes peixes anuais ao longo do sistema de drenagens Patos-Mirim;

5 - Avaliar a presença e a amplitude das diferenças morfológicas entre espécies e populações;

6- Avaliar as relações filogenéticas entre as espécies através da reconstrução de uma árvore de evidências totais (marcadores moleculares + morfológicos);

7- Reconstruir os estados ancestrais para diferentes caracteres morfológicos, a fim de inferir sinapomorfias para os diferentes grupos;

8 - Reconstruir o cenário espaço-temporal associado à invasão/colonização das espécies no sistema de drenagens Patos-Mirim;

9 – Analisar de modo comparativo a composição da dieta dos indivíduos em escala intra e interespecífica;

10 – Analisar a composição do microbioma intestinal das diferentes espécies e populações;

11- Averiguar a relação entre a diversidade genética, microbioma e dieta das espécies, buscando relacionar com a qualidade do seu respectivo ambiente.

Metodologia

Os peixes serão coletados em charcos temporários situados nas cidades de Pelotas, Rio Grande, Arroio Grande, Capão do Leão, Santa Vitória do Palmar, Chuí, Encruzilhada do Sul, São José do Norte, Tavares, Eldorado do Sul, Porto Alegre, Pedras Altas e Jaguarão, onde constam registros das espécies foco. As coletas estão de acordo com a licença de coleta número 44834-2, obtida junto ao ICMBio, e a autorização número 23116.008163/2015-23 Pq036/2015, junto ao CEUA-FURG. Os peixes serão capturados com auxílio de puçá (60 x 40cm, malha de 2mm). Os indivíduos serão identificados por análise morfológica (Costa, 2006; Volcan et al., 2014; Costa et al., 2017) e após, anestesiados em eugenol (3.000 mg/ L^{-1}). Imediatamente após a coleta, parte dos indivíduos será fixada em etanol absoluto (para as análises moleculares), e parte será fixada em formaldeído a 4% (destinado às análises morfológicas). Serão capturados cerca de vinte exemplares de cada espécie, priorizando a amostragem de populações diversas, contabilizando uma média total de 200 espécimes. Em cada charco também será feita uma amostragem de água, destinada à determinação dos compostos e concentrações ambientais de agrotóxicos. Após a coleta, os exemplares serão transportados para o Laboratório de Evolução e Ecologia Molecular da

Universidade Federal do Rio Grande (FURG) para análises posteriores. No dia seguinte a coleta, os exemplares fixados em etanol serão posicionados em papel milimétrico e fotografados por meio de uma câmera digital, posicionada sempre à mesma distância do espécime. Após uma semana, os indivíduos em formaldeído serão lavados e transferidos para solução de etanol 70%.

Os indivíduos coletados terão seu DNA genômico total extraído a partir do tecido muscular do pedúnculo caudal, seguindo o protocolo de extração por fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989). Serão amplificados fragmentos dos genes mitocondriais citocromo b (cytb) e citocromo oxidase subunidade I (COI), junto dos genes nucleares rodopsina (Rho), córtex ectodérmico-neural 1(ENC 1) e recombinação-ativação 1 (RAG1) utilizando primers previamente descritos na literatura (Chen et al., 2003, Costa e Amorim, 2011, Folmer et al.,1994, Li et al., 2007, Palumbi et al., 1991, Wolf et al., 1999). Os amplicons obtidos serão purificados utilizando o protocolo de precipitação por Acetato de Amônio 7,5M, e sequenciados com o uso de um sequenciador automático. Os eletroferogramas serão analisados e montados através do programa Gap4 do pacote Staden (Staden, 1996). Sítios polimórficos serão individualmente checados, e, uma vez confirmados, apropriadamente codificados de acordo com o código de degeneração de bases.

Inicialmente, para os genes nucleares, os alelos encontrados em cada indivíduo serão determinados por uma análise no "unphase", conforme executado no DnaSP 5.10 (Librado e Rozas, 2009). Este programa também será utilizado para estimar o número mínimo de eventos de recombinação (Rm) e os sítios recombinantes para cada um dos genes nucleares. Através dos programas DnaSP 5.10 e Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 1993), serão estimados os números de haplótipos (h) ou alelos (a), os número de sítios polimórficos (s), além dos valores de diversidade haplotípica (Hd) ou heterozigozidade esperada (He) e diversidade nucleotídica (π), a fim de analisar a diversidade genética dentro de cada espécie ou população. As relações espaço-temporais entre os haplótipos serão inferidas através de uma rede de haplótipos, construída no programa Network 4.510 (Bandelt et al., 1999). Os níveis de diferenciação genética entre as espécies serão estimados através do Fst, utilizando o programa Arlequin 3.5. Ainda neste programa, será realizado um teste de Mantel, com o intuito de avaliar a relação entre as distâncias genética e geográfica.

A fim de avaliar a presença de diversidade críptica, será implementado o método de DNA-Barcode (Hebert et al., 2003). Para tal, no software MEGA 6 (Tamura et al., 2013), serão mensuradas as distâncias par-a-par entre as populações, para os marcadores mitocondriais e nucleares, utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980). Além disso, serão calculados os valores médios de distância intraespecífica, interpopulacional e interespecífica, ao que se seguirá a construção de uma árvore de Neighbor-Joining, para avaliar as questões de monofilia recíproca.

No que se refere às análises morfológicas, os peixes serão medidos utilizando paquímetro digital para estabelecer o comprimento padrão (SL) e o comprimento da cabeça de cada espécime. As medições e contagens se darão segundo Costa (1995), sendo as medidas apresentadas como porcentagens de comprimento padrão, exceto as referentes à cabeça, as quais serão expressas como porcentagens do comprimento da cabeça. Todos os raios das nadadeiras serão contabilizados, bem como as vértebras. No que se refere ao número de vértebras, estas serão contabilizadas a partir das amostras limpas e coradas, segundo preparação osteológica (Taylor e Van Dyke, 1985). A terminologia a ser utilizada para a série de neuromastos cefálicos seguirá Costa (2006) e a nomenclatura referente à escamação seguirá Hoedeman (1958).

Serão realizadas análises comparativas interpopulacionais de forma e tamanho. Para isto, 12 marcos anatômicos homólogos em vista lateral serão digitalizados para cada espécime fotografado. As coordenadas serão alinhadas e submetidas a uma Análise Generalizada de Procrustes (GPA). Diferenças no tamanho do centroide serão observadas através de boxplots e sua significância confirmada por análise de variância (ANOVA). Será realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) e uma Análise de Variáveis Canônicas (CVA), a fim de identificar possíveis variações na forma do corpo entre as diferentes populações. A similaridade fenotípica entre as espécies e populações será analisada através de um fenograma. Todas as análises serão realizadas no programa R (R Core team, 2012).

As análises filogenéticas serão realizadas individualmente para cada um dos marcadores moleculares, para o conjunto de marcadores moleculares, para o conjunto de marcadores morfológicos e para os caracteres totais. As análises moleculares serão realizadas através de Análise Bayesiana, utilizando o BEAST 1.5.4 (Drummond e Rambaut, 2007). Com base nesta análise, será estimada a idade do ancestral comum mais recente (tMRCA) das espécies amostradas, além dos tempos de divergência entre elas. Quanto às análises morfológicas, a matriz de dados obtida será adicionada à matriz morfológica de Costa (2006) e as relações filogenéticas serão inferidas a partir de uma análise de máxima parcimônia, a ser realizada no programa TNT (Goloboff et al., 2008). Este programa também será empregado para a análise filogenética de evidências totais (morfologia + dados moleculares).

A congruência entre os diferentes marcadores moleculares também será testada através de uma Análise de Concordância Bayesiana (BCA), a ser implementada com o uso dos programas MrBayes versão 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) e Bucky versão 1.4.4 (Larget et al., 2010). Por fim, a árvore das espécies será estimada através da BCA acima referida, que permite a obtenção da árvore de concordância primária suportada pela maior parte dos caracteres. Os caracteres morfológicos serão finalmente plotados sobre a árvore das espécies, a fim de reconstruir estados ancestrais e encontrar

sinapomorfias para os diferentes clusters de espécies. Essas análises serão realizadas no programa RASP (Yu et al., 2015).

No que se refere às análises da dieta, será removido o trato estomacal de cerca de 10 peixes/população e seu conteúdo será observado através de estereomicroscópio. Os invertebrados encontrados serão identificados até o menor nível taxonômico possível, de acordo com bibliografia especializada (Merritt e Cummins 1996; Mugnai et al. 2010; Pérez 1998; Triplehorn e Johnson 2011). A seguir os invertebrados identificados serão classificados, de acordo com seu papel como bioindicadores, em três grupos: organismos sensíveis/intolerantes (próprios de águas limpas, intolerantes à poluição); organismos tolerantes (capazes de tolerar concentrações reduzidas de poluição); organismos resistentes (capazes de viver em águas poluídas). Com base nas presas observadas no conteúdo estomacal, serão calculados os valores de frequência de ocorrência (FO), frequência de ocorrência relativa (FO%), contribuição numérica (N) e contribuição numérica relativa (N%). Cada uma das presas caracterizadas será ainda coletada no ambiente natural e pesada em uma balança de precisão, a fim de estimar o peso bruto da dieta encontrada em cada indivíduo, e com isso obter uma estimativa do potencial nutricional médio da dieta em cada população.

Para as análises do microbioma, fragmentos do intestino dos peixes serão cortados e o conteúdo isolado por população (*pool*). O DNA será extraído com kit específico para fezes, seguindo as orientações do fabricante. A seguir, serão amplificados fragmentos do gene 16S de rRNA e o resultado será observado em gel de agarose. Os amplicons serão purificados e enviados para sequenciamento através da técnica de Sequenciamento de Última Geração (NGS) na empresa Neoprospecta. Os dados brutos serão trimados no programa FastQC (Brown et al., 2017), e as sequências obtidas serão clusterizadas utilizando o programa vSearch (Rognes et al., 2016). A identificação das OTU's será então realizada por Blastn usando um banco de dados de propriedade da empresa, que contêm apenas sequências de táxons validados, permitindo uma classificação precisa em nível de espécie.

Por fim, cada charco será caracterizado quanto ao percentual de conservação do seu entorno e quanto à concentração de agrotóxicos. A caracterização do habitat será feita com base na observação de um raio de 5 quilômetros em torno do charco, que será avaliado quanto a presença de vegetação nativa, área destinada à agricultura ou pecuária ou área urbana. Esta caracterização, seguida da quantificação do percentual da área ocupado por vegetação nativa, será feita *in loco* ou com a ajuda de imagens obtidas no Google Earth. Estes dados serão convertidos em valores percentuais, a fim de obter um escalonamento dos charcos quanto ao percentual de conservação do seu entorno.

Os charcos também serão avaliados quanto à concentração dos agrotóxicos mais comumente empregados na região. Para tanto, a técnica de DLLME-SFO (microextração líquido-líquido

dispersiva com solidificação da gota orgânica flutuante) será aplicada conforme metodologia desenvolvida pelo grupo do Laboratório de Contaminantes Orgânicos e Metais (LACOM), da Escola de Química e Alimentos (EQA) da FURG (Bolzan et al. 2015a,b, Caldas et al. 2013, Cardoso et al. 2011, Marube et al. 2015, Silveira et al. 2013). Em tubo de centrífuga de vidro com fundo cônico com capacidade para 15 mL, serão adicionados 10 mL de amostra de água. Serão testados diferentes tipos e volumes (0,5 a 2,5 mL) de solvente dispersor (acetonitrila, metanol ou acetona) e diferentes tipos e volumes de solvente extrator (10 a 200 μL) (1-dodecanol, 1-undecanol, 2-dodecanol). Além disso, será avaliado o efeito de sais na extração (ex. NaCl). Após a centrifugação, o tubo será colocado em um banho de gelo dentro do freezer para que ocorra a solidificação da gota orgânica flutuante. Posteriormente, a gota orgânica congelada será coletada com auxílio de uma espátula e colocada em eppendorf para que o solvente orgânico retorne ao estado líquido. Os experimentos serão realizados em triplicada. A determinação cromatográfica ocorrerá por LC-MS/MS, através de um Cromatógrafo a líquido Alliance Separations Module 2695 (Waters, EUA).

Por fim, a associação entre medidas de potencial nutricional da dieta, diversidade de microbioma e diversidade genética obtidos para cada população, bem como de percentual de conservação do seu entorno e concentração de agrotóxicos será avaliada aos pares através de análises de correlação, realizadas no R. Estes parâmetros também serão submetidos a análises de regressão múltipla, utilizando o percentual de conservação do entorno e a concentração de agrotóxicos como variáveis independentes, e a diversidade genética, o potencial nutricional da dieta e a diversidade do microbioma como variáveis dependentes.

Atividades previstas

A realização deste projeto consistirá nas seguintes atividades:

a) Coletas de peixes anuais, fotografia e fixação para análises subsequentes;
b) Procedimentos de biologia molecular (extração do DNA total e de fezes, amplificação dos marcadores específicos, purificação e sequenciamento), com caracterização de sequências para dois marcadores mitocondriais e três nucleares para um conjunto de cerca de 200 indivíduos, e caracterização do microbioma de cerca de 50 populações;
c) Caracterização morfológica;
d) Caracterização do conteúdo estomacal e do potencial nutricional da dieta;
e) Caracterização do habitat no entorno de cada charco coletado;
f) Avaliação da presença e concentração de agrotóxicos nas amostras aquosas obtidas nos charcos;
g) Análises de bioinformática associadas a:

- medidas de diversidade e estruturação populacional;
- reconstrução das relações filogenéticas;
- reconstrução do cenário evolutivo espaço-temporal;
- digitalização de marcos anatômicos e análise de diferenciação morfométrica entre espécies e populações;
- reconstrução de caracteres ancestrais para caracteres morfológicos descontínuos;
- medidas de diversidade e diferenciação de microbioma;
- avaliação da associação entre diversidade genética, potencial nutricional da dieta, diversidade do microbioma, percentual de conservação e concentração de agrotóxicos de cada charco.

Infraestrutura utilizada

Para a realização deste projeto, contamos com a estrutura do Laboratório de Evolução e Ecologia Molecular (LABEEM) da FURG, que conta com um espaço físico de aproximadamente 100 m2 e contém os seguintes equipamentos permanentes necessários à implementação das técnicas básicas de biologia molecular (valor estimado R$ 165.000,00): nanoespectrofotômetro, microcentrífuga refrigerada de bancada, microcentrífuga não refrigerada, microcentrífuga de spin, dois banhos-maria, um shaker, uma mesa de fluxo laminar, uma balança-analítica, um pH-metro de bancada, duas estufas, um termociclador com gradiente de temperatura, um termociclador sem gradiente, uma fonte de eletroforese, dois transiluminadores UV, dois estereomicroscópios, dois microscópios, um microscópio de fluorescência, uma autoclave vertical, um forno de microondas, três freezers e duas geladeiras, duas incubadoras BOD, além de três jogos de pipetas e das vidrarias necessárias para as técnicas de Biologia Molecular. Este laboratório conta com o apoio da técnica oceanóloga Dra. Daiane Carrasco.

Além disso, o Laboratório de Contaminantes Orgânicos e Metais (LACOM) da FURG conta com um Cromatógrafo a líquido Alliance Separations Module 2695 (Waters, EUA) equipado com amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de desgaseificação; colunas analíticas, Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API (Waters, Inglaterra) com fonte API e ionização por Electrospray ou APCI; sistema de aquisição de dados através do software MassLynx e QuanLynx 4.0 (Waters, Inglaterra); sistema gerador de nitrogênio Peak Scientifics (Instruments Ltda., Escócia).

Por fim, a FURG também dispõe de viatura para transporte em pelo menos parte das saídas de campo.

Cronograma

O presente projeto está previsto para ser realizado em quatro anos, conforme a seguinte distribuição de atividades:

Ano/Bimestre / Atividade	Ano I						Ano II						Ano III						Ano IV						Ano V
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I
Revisão bibliográfica																									
Redação do projeto																									
Entrega e defesa do projeto																									
Coletas																									
Extração do DNA dos peixes																									
Fotografias																									
Amplificação e purificação																									
Digitalização dos landmarks																									
Análises morfométricas																									
Sequenciamento																									
Análise dos dados moleculares																									
Análises morfológicas																									
Observação do conteúdo estomacal																									
Análise dos resultados de conteúdo estomacal																									
Extração do DNA do microbioma																									
Análise dos dados do microbioma																									
Escrita do artigo 1																									
Qualificação																									
Escrita do artigo 2																									
Escrita do artigo 3																									
Escrita do artigo 4																									
Doutorado sanduíche																									
Escrita da tese																									
Defesa do doutorado																									

Orçamento

Categoria de despesa	Descrição dos itens	Material será cedido para Instituição (Sim ou Não)	Quantidade	Unidade (un; litro; metro; dia; km)	Valor Unitário (R$)	Valor Total (R$)
Uso e consumo (descrever cada item)	Taq DNA polimerase recombinante - 5U/ul, 500 reações		5	frasco com 100 ul	R$ 120.00	**600.00**
	Taq DNA polimerase - Hot start - 5U/ul, 500 reações		2	frasco com 100 ul	R$ 400.00	**800.00**
	Fenol ultrapuro - ph 8,00		1	frasco com 500 ml	R$ 1,400.00	**1,400.00**
	Agarose ultrapura		1	frasco com 100 gr	R$ 850.00	**850.00**
	Kit de extração de DNA a partir de fezes		1	kit para 50 amostras	R$ 1,500.00	**1,400.00**
	Coluna Kinetex 2,6µM C18 50 X 3 MM (código REF 00B-4462-Y0)		1	unidade	R$ 4,700.00	**4,700.00**
	Cartuchos (Tubo) para SPE-Tubos SPE Discovery DSC-18, 6ml		10	pacote com 30 unidades	R$ 351.00	**3,510.00**
	Memb. Filt. Mistura Esteres HA Diam. 47mm Poro 0,45um - branca lisa		10	caixa com 100 unidades	R$ 205.00	**2,050.00**
Serviço de terceiros Pessoa Jurídica	Serviços de sequenciamento de microbioma por NGS (Next Generation Sequencing)		50	amostra	R$ 300.00	**15,000.00**
	Serviços de sequenciamento de marcadores molecular por Sanger		5	placa com 96 amostras	R$ 1,000.00	**5,000.00**
Viagens	Hospedagem		6	pernoites	R$ 150.00	**900.00**
	Alimentação		30	refeições	R$ 15.00	**450.00**
	Combustível		400	litros	R$ 4.75	**1,900.00**
TOTAL						**37,960.00**

Resultados esperados e impacto previsto

Do ponto de vista taxonômico, espera-se validar a maior parte das espécies do grupo *A. adloffi*, embora possivelmente tenhamos casos de subdivisão (espécies crípticas) e sinonimização para alguns dos táxons. Esses dados, em conjunto com a reavaliação da distribuição das espécies-alvo, permitirá um acesso mais adequado do real status de conservação das espécies. Finalmente, quando avaliados em conjunto com dados morfológicos, esses dados devem fornecer uma base sólida para o convencimento da comunidade científica e técnica acerca das modificações taxonômicas necessárias. Em nível microevolutivo, espera-se inferir os níveis de diversidade e estruturação das espécies e suas populações, o que deve refinar inferências acerca das unidades de manejo cuja conservação deve ser priorizada. A partir destes padrões, deve ser possível avaliar a influência de diferentes eventos na demografia das espécies, o que pode ser útil não apenas na caracterização do passado, mas também na compreensão do presente e até mesmo na gestão do futuro. Além disso, em nível macroevolutivo, a análise das relações filogenéticas permite avaliar os cenários espaço-temporais associados a diferentes eventos de diversificação/extinção dentro de um grupo de espécies. Pretende-se, pois, através da implementação deste projeto, obter informações dos cenários e eventos comuns que vem influenciando a evolução do grupo *A. adloffi*, a fim de traçar estratégias que auxiliem na conservação destas espécies, dentro de nossa unidade amostral, constituída essencialmente pelo sistema de drenagens Patos-Mirim. Por fim, as avaliações relacionadas às associações entre diversidade genética, potencial nutricional da dieta, diversidade do microbioma, percentual de conservação e concentração de agrotóxicos de cada charco devem auxiliar na compreensão dos reais e potenciais impactos enfrentados pelas diferentes populações de peixes anuais. Neste âmbito, é bastante provável que sejam encontradas medidas de associação direta entre estas diferentes variáveis, que demonstrem a importância da conservação da área de entorno dos charcos e da redução no uso de agrotóxicos para a efetiva conservação das espécies. Efetivamente, no âmbito da conservação, a implementação deste projeto deve, pois, fornecer subsídios para uma avaliação mais precisa do real status de vulnerabilidade apresentado por cada espécie (junto ao Ministério do Meio Ambiente e a Secretaria do Meio Ambiente do RS), bem como para a delimitação e criação de Unidades de Conservação. O projeto deve ainda auxiliar na proposição de medidas protetivas mínimas que devam ser adotadas dentro destas unidades, de modo a propiciar a efetiva conservação da diversidade.

Por fim, no âmbito acadêmico/científico, a implementação deste projeto auxiliará no desenvolvimento de uma tese vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGBAC) da FURG. Os produtos finais desses trabalhos devem, pois, não apenas auxiliar no aumento da produção docente e discente do Programa, como também na sua divulgação e na difusão do conhecimento associado aos rivulídeos e a área do estudo. A

implementação deste projeto deve, pois, possibilitar o desenvolvimento de, no mínimo, quatro manuscritos a serem publicados em periódicos qualificados da área de Biodiversidade, com os seguintes títulos provisórios:

1- Integrative approaches sheding light into phylogenetic and taxonomic questions involving the *Austrolebias adloffi* group of anual fish

2- Diet differences among species and populations of anual fish of the *Austrolebias adloffi* group

3- Microbiome differences among species and populations of anual fish of the *Austrolebias adloffi* group

4- Association of parameters related to genetic diversity, diet and microbiome composition with the conservation status of anual fish

Referências bibliográficas

Abelha, M. C. F., Agostinho, A. A., Goulart, E. Plasticidade trófica em peixes de água doce. Acta Scientiarum, v.23, p.425–434, 2001.

Arim, M., Bozinovic, F., Marquet, P. A. On the relationship between trophic position, body mass and temperature: reformulating the energy limitation hypothesis. Oikos, v.116, p.1524–1530, 2007.

Bandelt, H. J., Forster, P., Röhl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol., v.16, p.37-48, 1999.

Barbosa, C. Diversidade e estruturação genética do peixe anual *Austrolebias nigrofasciatus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 2016.

Barbosa, C. Avaliações filogenéticas e taxonômicas no grupo de espécies de peixes anuais *Austrolebias adloffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 2019.

Bolzan, C. M., Caldas, S. S., Soares, B. M., Primel, E. G. Dispersive liquid-liquid microextraction parameters for the pre-concentration of multiclass pesticides in water. *Anal. Lett.*, v.48, p.2754-2772, 2015a.

Bolzan, C. M., Caldas, S. S., Guimarães B.S., Primel, E. G. Dispersive Liquid Microextraction with Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry for the determination of triazine, neonicotinoid, triazole and imidazolinone pesticides in mineral water samples. J. Brazil. Chem. Soc., v.26, p.1902-1913, 2015b.

Brown, J., Pirrung, M., McCue, L. A. FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. Bioinformatics, v.33, n.19, p.3137–3139, 2017.

Caldas, S. S., Bolzan, C. M., Guilherme, J. R., Silveira, M. A. K., Escarrone, A. L., Primel, E. G. Determination of pharmaceuticals, personal care products, and pesticides in surface and treated waters: method development and survey. Environ. Sci. Pollut. Res. Int., v.2013, p.5855-5863, 2013.

Cardoso, L. V., Tomasini, D., Sampaio, M. R. F., Caldas, S. S., Kleemann, N., Primel, E. G., Gonçalves, F. F. Optimization and validation of a method using SPE and LC-APCI-MS/MS for determination of pharmaceuticals in surface and public supply water. J. Brazil. Chem. Soc., v.22, n.10, p.1944-1952, 2011.

Costa, W. J. E. M. Pearl killifishes—the Cynolebiatinae: systematics and biogeography of the neotropical annual fish subfamily. TFH, Neptune City. 1995.

Costa, W. J. E. M. Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). J. Comp.Biol., v.3, p.33-92, 1998.

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

Costa, W., Amorim, P. A. New annual killifish species of the *Hypsolebias flavicaudatus* complex from the São Francisco River basin, Brazilian Caatinga (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Vertebr. Zool., n.61, v.1,p.99-104, 2011.

Costa, W. J. E. M., Cheffe, M. M., Amorim, P. F. Two new seasonal killifishes of the *Austrolebias adloffi* group from the Lagoa dos Patos basin, southern Brazil (Cyprinodontiformes: Aplocheilidae). Vertebr. Zool., v. 67, p. 139–149, 2017.

Drummond, A. J. , Rambaut, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC* Evol. Biol., v.7, 2007. doi: 10.1186/1471-2148-7-214.

Excoffier, L., Lischer, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Ecol. Resour., v.10, p.564-567, 1993.

Fernandes, M. O. Conservação de *Austrolebias minuano*, peixe anual endêmico da planície costeira do Rio Grande do Sul ameaçado de extinção. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 2019.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. , Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., v.3, n.5, p.294-299,1994.

Galetti, M., Giacomini, H. C., Bueno, R. S., Bernardo, C. S. S., Marques, R. M., Bovendorp, R. S., Steffler, C. E., Rubim, P., Gobbo, S. K., Donatti, C. I., Begotti, R. A., Meirelles, F., Nobre, R. A., Chiarello, A. G., Peres, C. A. Priority areas for the conservation of Atlantic forest large mammals. Biol. Cons., v. 142, p. 1229-1241, 2009.

Garcez, D. K., Barbosa, C., Loureiro, M., Volcan, M., Loebmann, D., Quintela, F. & Robe, L. Phylogeography of the critically endangered neotropical annual fish, *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Aplocheilidae): genetic and morphometric evidence of a new species complex. Environ. Biol. Fishes, v.101. p.1-13, 2018.

García, G., Gutiérrez, V., Ríos, N., Turner, B.; Santiñaque, F., Lópezcarro, B., Folle, G. Burst speciation processes and genomic expansion in the neotropical annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Genetica, v. 142, p. 87-98, 2014.

García, G., Gutiérrez, V., Ríos, N., de Sá, R. O. Comparative Phylogeographic Patterns in *Austrolebias* from Different South American Basins. In: Berois, N., García, G., de Sá, R.O. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis group. p. 259-279, 2015.

Goloboff, P. A., Farris, J. S., Nixon, K. C. TNT, a free program for phylogenetic analysis. Cladistics, v.24, p. 1-13, 2008.

Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L.; Dewaard, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci., v. 270, p. 313-322, 2003.

Hoedeman, J. J. The frontal scalation patter in some groups of toothcarps (Pisces, Cyprinodontiformes). Bull. Aq. Biol., v. 1, p. 23-28, 1958.

ICMBio. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. 2018.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-3. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em 14 de maio de 2019. 2016.

Keppeler, F. W., Lanés, L. E. K., Rolon, A. S., Stenert, C., Maltchik, L. The diet of *Cynopoecilus fulgens* Costa, (Cyprinodontiformes: Rivulidae) in Southern Brazil wetlands, Ital. J. Zool., v.80, n.2, p.291-302, 2013.

Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol.,v.16, n.2**,** p.111-120,1980.

Larget, B. R., Kotha, S. K., Dewey, C. N., Ane, C. BUCKy: gene tree/species tree reconciliation with Bayesian concordance analysis. Bioinformatics, v. 26, p.2910–2911, 2010.

Laufer, G. L., Arim, M., Loureiro, M., Piñeiro-Guerra, J. M., Clavijo-Baquet, S., Fagúndez, C. Diet of four annual killifishes: an intra and interspecific comparison. Neotrop. Ichthyol., v.7, n.1, p.77-86, 2009.

Lear, G., Dickie, I., Banks, J., Boyer, S., Buckley, H. L., Buckley, T. R., Cruickshank, R., Dopheide, A., Handley, K. M., Hermans, S., Kamke, J., Lee, C. K., MacDiarmid, R., Morales, S. E., Orlovich, D. A., Smissen, R., Wood, J., Holdaway, R. Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. N. Z. J. Ecol., v.42, n.1, p.10–50, 2018.

Li, C., Ortí, G., Zhang, G., Lu, G. A practical approach to phylogenomics: The phylogeny of ray-finned fish (Actinopterygii) as a case study. BMC Evol Biol, v.7, p.1-11, 2007.

Librado, P. , Rozas, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics,v. 25, p1451-1452, 2009.

Loureiro, M. Sistemática y biogeografía de los peces anuales de la subtribu Cynolebiatina (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae). Tese de Doutorado - Universidad de La Republica, Montevidéu. 2004.

Loureiro, M., de Sá, R. O. Diversity of Aplocheiloidei. In: Berois, N.; García, G.; de Sá, R.O. (Eds) Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis group. p. 3-31. 2015.

Marube, L. C., Caldas, S. S., Soares, K. L., Primel, E. G. Dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplet for simultaneous extraction of pesticides, pharmaceuticals and personal care products. Mikrochim. Acta, v.182, p.1765-1774, 2015.

Merritt, R. W., Cummins, K. W. Aquatic Insects of North America. Dubuque: Kendal/Hunt Publishing Company. 1996.

Mugnai, R., Nessimian, J. L., Baptista, D. F. Manual de Identificação de Macroinvertebrados Aquáticos do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Technical Books. 2010.

Nielsen, D. T. B., Pillet, D. *Austrolebias accorsii*, a new annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae) from the upper río Grande basin, Amazon basin, Bolivia. Internat. J. Ichthyol., v.21, p.172-179, 2015.

Nielsen, J. M.; Clare, E. L.; Hayden, B.; Brett, M. T.; Kratina, P. Diet tracing in ecology: Method comparison and selection. Methods Ecol. Evol.,v.9, p.278–291, 2017.

Olivotto, I., Rollo, A., Sulpizio, R., Avella, A. M., Tosti, L., Carnevali, O. Breeding and rearing the Sunrise Dottyback Pseudochromis flavivertex: The importance of live prey enrichment during larval development. Aquaculture, v.255, p.480–487. 2006.

Olivotto, I., Stefano, M. D., Rosetti, S., Cossignani, L., Pugnaloni, A., Giantomassi, F., Carnevali, O. Live prey enrichment, with particular emphasis on HUFAs, as limiting factor in False percula clownfish (*Amphiprion ocellaris*, Pomacentridae) larval development and metamorphosis: Molecular and biochemical implications. Comp. Biochem. Physiol., Part A, v.159, p.207–218, 2011.

Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., Mcmillan, W. O., Stice, L., Grabowaki, G. The simple fool's guide to PCR version 2.0. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Honolulu, 1991.

Pérez, G. R. Guía para el Estudio de los Macroinvertebrados del Departamento de Antioquia. Bogotá: Editorial Presencia Ltda. 1998.

Podrabsky, J. E., Hand, S. The bioenergetics of embryonic diapause in anual killifish *Austrofundulus limnaeus*. J. Exp. Biol., v. 202, p. 2567-2580, 1999.

R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Redford, K. H., Segre, J. A., Salafsky, N., del Rio, C. M., McAloose, D. Conservation and the Microbiome Conserv. Biol., v.26, n.2, 2012.

Rio Grande do Sul. Decreto nº51797, de 8 de setembro de 2014.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ 4:e2584 doi: https://doi.org/10.7717/peerj.2584

Shibatta, O. A., Bennemann, S. T. Plasticidade alimentar em *Rivulus pictus* Costa (Osteichthtyes, Cypridontiformes, Rivulidae) de uma pequena lagoa em Brasília, Distrito federal, Brasil. Rev. Bras. Zool., v. 20, p.615–618, 2003.

Silveira, M. A. K., Caldas, S. S., Guilherme, J. R., Costa, P. F., Guimarães, B. S., Cerqueira, M. B. R., Soares, B. M., Primel, E. G. Quantification of Pharmaceuticals and Personal Care Product Residues in Surface and Drinking Water Samples by SPE and LC-ESI-MS/MS. J.Brazil. Chem. Soc., v.24, p.1385-1395, 2013.

Staden, R. The Staden sequence analysis package. Mol.Biotechnol., v.5, p.233-241, 1996.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Alanysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol.,,v.30, p.2725-2729, 2013.

Taylor, W. R., Van Dyke, G. C. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. Cybium, v. 9, p. 107–109, 1985.

Tocher, D. R., Bell, J. G., Dick, J. R., Crampton, V.O. Effects of dietary vegetable oil on Atlantic salmon hepatocyte fatty acid desaturation and liver fatty acid compositions. Lipids, v.38, p.723–732, 2003.

Tomazelli, L. J., Villwock, J. A. Mapeamento Geológico de Planícies Costeiras: o Exemplo da Costa do Rio Grande do Sul. GRAVEL, v. 3, p. 109-115, 2005.

Triplehorn, C. A., Johnson, N. F. Estudo dos Insetos. São Paulo: Cengage Learning. 2011.

Uruguay. Especies prioritarias para la conservación em Uruguay. 2013.

Volcan, M. V., Lanés, L. E. K., Gonçalves, A. C. *Austrolebias bagual*, a new species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from southern Brazil. Aqua, v. 20, n. 4, p. 161-172, 2014.

Volcan, M. V., Lanés, L. E. K., Gonçalves, A. C., Guadagnin, D. L. Annual fishes (Rivulidae) from Southern Brazil: A broad-scale assessment of their diversity and conservation. In: Berois, N., García, G., de Sá, R.O. Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis group. p. 185-203, 2015.

Wolf, C., Rentsch, J., Hübner, P. PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification. J. Agric. Food. Chem., v. 47, p.1350-1355, 1999.

Wong, S., Rawls, J. F. Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment. Mol. Ecol., v. 21, p.3100–3102, 2012.

Young, S. S., Yang, H. N., Huang, D. J., Liu, S. M., Huang, Y. H., Chiang, C.T., Liu, J.W. Using benthic macroinvertebrate and fish communities as bioindicators of the Tanshui River basin around the greater Taipei area - multivariate analysis of spatial variation related to levels of water pollution Int. J. Environ. Res. Public Health, v.11, n.7, p.7116-7143, 2014.

Yu, Y., Harris, A. J., Blair, C., He, X. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): A tool for historical biogeography. Mol. Phylogenetic. Evol., v. 87, p. 46-49, 2015.