



Carolina Lemes Nascimento Costa

Dinâmica Populacional Ancestral de *Poecilia vivipara* (Teleostei:
Poeciliidae): a influência das mudanças paleoclimáticas

CAMPINAS

2014

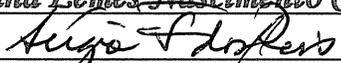


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAROLINA LEMES NASCIMENTO COSTA

"Dinâmica Populacional Ancestral de *Poecilia vivipara* (Teleostei: Poeciliidae): a influência das mudanças paleoclimáticas"

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação defendida pela candidata
Carolina Lemes Nascimento Costa

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de MESTRA em Biologia Animal, na área de Biodiversidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Furtado Reis
Coorientador: Prof. Dr. Sergio Ivan Perez

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C823d Costa, Carolina Lemes Nascimento, 1989-
Dinâmica populacional ancestral de *Poecilia vivipara* (Teleostei: Poeciliidae) : a influência das mudanças paleoclimáticas / Carolina Lemes Nascimento Costa. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Sérgio Furtado dos Reis.
Coorientador: Sergio Ivan Perez.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Demografia - História. 2. DNA mitocondrial. 3. Teoria de coalescência. 4. Paleoclimatologia - Quaternário. 5. Genética de populações. I. Reis, Sérgio Furtado dos, 1952-. II. Perez, Sergio Ivan. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Ancestral population dynamics of *Poecilia vivipara* (Teleostei: Poeciliidae) : the influence of paleoclimatic changes

Palavras-chave em inglês:

Demography - History

DNA, Mitochondrial

Coalescence theory

Paleoclimatology - Quaternary

Populations genetics

Área de concentração: Biodiversidade Animal

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Sérgio Furtado dos Reis [Orientador]

Paulo Roberto Guimarães Júnior

Mathias Mistretta Pires

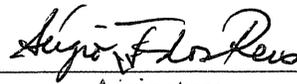
Data de defesa: 29-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Campinas, 29 de julho de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Furtado Reis (orientador)



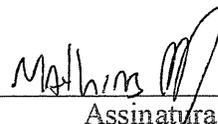
Assinatura

Prof. Dr. Paulo Roberto Guimarães Júnior



Assinatura

Prof. Dr. Mathias Mistretta Pires



Assinatura

Prof. Dr. Wesley Augusto Conde Godoy

Assinatura

Prof. Dr. Arício Xavier Linhares

Assinatura

Resumo

Mudanças climáticas são fenômenos responsáveis por influenciar dinâmicas de populações ao longo da história evolutiva das espécies. Quando mudanças no clima ocorrem de maneira abrupta suas consequências podem ser refletidas na distribuição, no tamanho e na persistência das populações sob o efeito destas mudanças. O Quaternário foi uma época caracterizada por mudanças climáticas rápidas e intensas. Estimar a demografia histórica de populações nesta escala de tempo é uma forma de avaliar como flutuações no clima influenciaram populações ancestrais. Dados genéticos nos permitem recuperar informação sobre o tamanho populacional em escalas de tempo amplas e buscar associações entre flutuações no tamanho das populações e variações no clima. A demografia histórica de populações do peixe de água doce *Poecilia vivipara* habitantes da planície Quaternária do norte do Rio de Janeiro foi estimada com o objetivo de avaliar se fenômenos em escalas de tempo ancestrais deixaram uma assinatura no genoma dos indivíduos de populações contemporâneas. Subsequentemente, foi avaliado se as assinaturas genéticas são reflexo de respostas populacionais às variações climáticas intensas ocorridas no Quaternário. Para estimar a demografia histórica de *P. vivipara*, utilizou-se o método *Skyline-Plot* Bayesiano (*BSP*), sendo o gene mitocondrial citocromo *b* o marcador molecular analisado. A dinâmica populacional ancestral de *P. vivipara* revelou uma mudança de regime nos últimos 75 mil anos, que pode estar associada direta ou indiretamente às variações climáticas do Quaternário. Flutuações no nível do mar, geradas pelas mudanças climáticas do Quaternário, podem estar relacionadas com as flutuações no tamanho populacional de *P. vivipara*. Estudos incluindo outras regiões do genoma e com maior detalhamento sobre variações climáticas locais podem contribuir para gerar estimativas mais confiáveis da história populacional de *P. vivipara* e sua potencial relação com eventos climáticos.

Abstract

Paleoclimatic changes are responsible to influence population dynamics through the evolutionary history of species. When climatic changes occur suddenly its consequences can be reflected in the distribution, size and persistence of populations. The Quaternary was a time of massive climatic changes. The estimation of the demographic history of populations at such timescales allows the assessment of how climatic fluctuations have influenced ancestral populations. Genetic data are available and allow recovering information about population sizes in wide timescales and searching for associations between population size fluctuations and climatic change. The historical demography of freshwater fish *Poecilia vivipara* populations inhabiting the Rio de Janeiro Northern Quaternary Plain was estimated aiming to evaluate if phenomena in ancestral timescales leaves a signature in the genomes of its modern representatives. Subsequently, we evaluate if the genetic signatures are the result of population responses to massive climatic changes occurred in Quaternary. The Bayesian Skyline-Plot (BSP) was utilized to estimate the demographic history of *P. vivipara*, with the mitochondrial gene cytochrome *b* as molecular marker. The ancestral population dynamics of *P. vivipara* revealed a regime change in the last 75,000 years, which can be direct or indirectly associated to Late Quaternary climatic variations. Sea level fluctuations, generated by Quaternary climatic changes, could be related to population size fluctuations of *P. vivipara*. Studies including other genome regions and with more details about local climatic variations can create more reliable estimations of the *P. vivipara* population history and its potential relationship with climatic events.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Material e Métodos.....	08
Coleta do material biológico.....	08
Geração de dados moleculares.....	11
<i>Métodos laboratoriais: Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento.....</i>	<i>12</i>
Análise dos dados.....	14
1. <i>Teste de Neutralidade Seletiva (Teste D de Tajima).....</i>	<i>18</i>
2. <i>Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA).....</i>	<i>19</i>
3. <i>Skyline-Plot Bayesiano (BSP).....</i>	<i>20</i>
3. Resultados.....	23
<i>Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento.....</i>	<i>23</i>
<i>Análise dos dados.....</i>	<i>26</i>
1. <i>Teste de Neutralidade Seletiva (Teste D de Tajima).....</i>	<i>26</i>
2. <i>Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA).....</i>	<i>26</i>
3. <i>Skyline-Plot Bayesiano (BSP).....</i>	<i>29</i>
4. Discussão.....	31
5. Conclusão.....	36
Referências.....	37

Lista de Ilustrações

Figura 1. Variação climática durante o Quaternário Tardio. O eixo x representa o tempo em milhares de anos antes do presente, e o eixo y representa indiretamente a variação da temperatura atmosférica por meio da proporção do isótopo de oxigênio, sendo que valores menores indicam temperaturas mais baixas e, portanto, períodos mais frios. A) Variação climática dos últimos 140 mil anos. B) Destaque da variação climática dos últimos 30 mil anos. Períodos interglaciais apresentam temperaturas mais elevadas (Eêmio e Holoceno) e período glacial apresenta temperaturas mais baixas (final do Pleistoceno – pós-Eêmio). Em azul, está representado o período do Último Glacial Máximo (UGM), no qual as temperaturas foram as menores da época. Modificado de Hofreiter & Stewart (2009).

Figura 2. Mapa da planície costeira do norte do Rio de Janeiro, destacando em cores distintas a época de formação das diferentes partes que compõem a região, que apresenta sedimentos de origem Quaternária, e exibindo algumas lagoas existentes na região. Modificado de Silva *et al.* (2013).

Figura 3. Indivíduos adultos de *P. vivipara*. À esquerda, uma fêmea da espécie, e à direita, um macho, que possui maior coloração na época reprodutiva. Fotografia de Felipe Aoki Gonçalves.

Figura 4. Distribuição de *P. vivipara*. À esquerda, mapa da distribuição da espécie, com a faixa de ocorrência destacada em amarelo. À direita, planície costeira do norte do Rio de Janeiro, subárea da distribuição de *Poecilia vivipara* na qual foi estudada a dinâmica populacional ancestral.

Figura 5. Aspectos geográficos e topológicos do estado do Rio de Janeiro. A) Mapa físico do estado do Rio de Janeiro dividido em Regiões Hidrográficas. B) Imagem de satélite do estado do Rio de Janeiro, destacando as Regiões Hidrográficas em cores diferentes e algarismos romanos. C) Detalhe da Região Hidrográfica do Baixo Paraíba do Sul (IX), referente à planície costeira onde as amostras foram coletadas. RH I – X: Região Hidrográfica I a X. Retirado de www.inea.rj.gov.br.

Figura 6. Amostragem de populações da planície costeira do norte do Rio de Janeiro. As lagoas amostradas estão representadas pelos marcadores amarelos, com seus respectivos nomes. No total, vinte lagoas foram amostradas, sendo elas Açú, Atafona, Cabiúnas, Cacimba, Campelo, Catingosa, Cima, Comércio, Feia, Furado, Garça, Grussaí, Heliporto, Iquipari, Lagamar, Praia I, Praia II, Santa Clara, Tai Pequeno e Três Vendas. O tamanho amostral de cada lagoa foi $n = 10$, totalizando 200 indivíduos amostrados na região. Imagem de satélite retirada do Google Earth.

Figura 7. Representação esquemática da Teoria da Coalescência. A) Diagrama representando dez gerações populacionais. A primeira linha corresponde à geração contemporânea, sendo os círculos vermelhos os indivíduos (ou sequências) amostrados e os círculos azuis os indivíduos da população que não foram amostrados. Os círculos vermelhos nas linhas subsequentes

representam os ancestrais dos indivíduos amostrados no presente. B) Representação gráfica de um evento de coalescência. Nós representam os indivíduos/sequências e arestas representam as linhagens das amostras contemporâneas. C) Genealogia da amostra, representando relações entre indivíduos/sequências contemporâneas. Os tempos t_1 , t_2 e t_3 representam os intervalos de coalescência. Adaptado de Nielsen & Slatkin (2013).

Figura 8. Géis de agarose 1% corados com SYBR Safe. A) DNA extraído de seis indivíduos (amostras). Pesos moleculares: $\lambda 500$ e $\lambda 100$ ng/ μ l. B) DNA amplificado de oito indivíduos. Padrão molecular (*ladder*): 100 bp. C) DNA purificado de sete indivíduos. Pesos moleculares: $\lambda 100$ e $\lambda 250$ ng/ μ l.

Figura 9. Trecho do sequenciamento do gene citocromo *b* (*forward* e *reverse*) de um indivíduo amostrado.

Figura 10. Sequência editada do gene mitocondrial citocromo *b* a partir das sequências *forward* e *reverse* de um indivíduo amostrado.

Figura 11. Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA) do gene citocromo *b* de *P. vivipara*. Gráfico dos valores de F_{CT} representando variação entre grupos para cada valor de K .

Figura 12. Gráfico BSP exibindo mudanças temporais no tamanho populacional efetivo de *P. vivipara*. O eixo x representa o tempo em milhares de anos antes do presente. Note que zero (0) representa o presente, e os valores subsequentes (50 a 250) representam o tempo no passado. O eixo y representa o tamanho populacional efetivo das fêmeas, multiplicado pelo tempo de geração da espécie. Linhas azuis são os intervalos de credibilidade para os tamanhos populacionais efetivos em cada instante de tempo, representando a incerteza das estimações filogenética e coalescente.

Figura 13. Gráfico BSP exibindo mapeamento das mudanças climáticas nas mudanças temporais no tamanho populacional efetivo de *P. vivipara*. Faixas vermelhas representam períodos de clima quente e faixas azuis representam períodos de clima frio. LGM: Último Glacial Máximo, delimitado pela faixa azul escura; LMT – Última Transgressão Marinha; SLMT – Penúltima Transgressão Marinha.

Figura 14. Variações no nível do mar durante o Quaternário Tardio. À esquerda, mapa do continente Sul Americano, no qual linha preta delineando o continente representa a linha da costa no período do Último Glacial Máximo. À esquerda (imagem superior), destaque em vermelho da região da planície costeira do norte do Rio de Janeiro, mostrando que a área exposta do continente era maior no período do UGM. A imagem inferior representa o nível do mar nos últimos 50 mil anos para diversas regiões do planeta. A faixa cinza do gráfico corresponde ao período do UGM, sendo este o momento em que o nível do mar foi mais baixo em todas as regiões, cerca de 120 metros abaixo do nível do mar atual. Mapa modificado de Mayle *et al.* 2009 e gráfico modificado de Clark *et al.* 2009.

1. Introdução

A variação global do clima ao longo da história da Terra é um importante fator a influenciar dinâmicas de populações. Mudanças climáticas rápidas podem alterar os padrões de distribuição, o tamanho e a persistência das populações de uma espécie (Hofreiter & Stewart 2009), alterando, conseqüentemente, sua diversidade genética. O Pleistoceno (2,6 milhões – 11,7 mil anos atrás) foi uma época caracterizada por mudanças climáticas rápidas e intensas, com períodos de clima quente e frio ocorrendo em intervalos irregulares e durações variadas (Figura 1). As flutuações na temperatura refletem os períodos glaciais da época – dentre eles, o Último Glacial Máximo (UGM) – que se intercalavam com períodos interglaciais. O efeito das glaciações do Pleistoceno sobre a diversidade genética de vários *taxa* foi bem documentado (Hewitt 2000), revelando que dinâmicas de populações de diversas espécies possuem uma história complexa, com populações distintas exibindo reações particulares às mudanças climáticas. Um padrão que emerge entre as populações é a tendência à perda de diversidade genética e à extinção durante tempos de mudanças climáticas rápidas. Uma maneira de entender como as flutuações no clima influenciaram populações ancestrais é avaliar sua demografia histórica. Dados genéticos nos permitem recuperar

informação sobre o tamanho populacional em escalas de tempo ancestrais e buscar associações entre flutuações no tamanho das populações e variações no clima (Gattepaille *et al.* 2013).

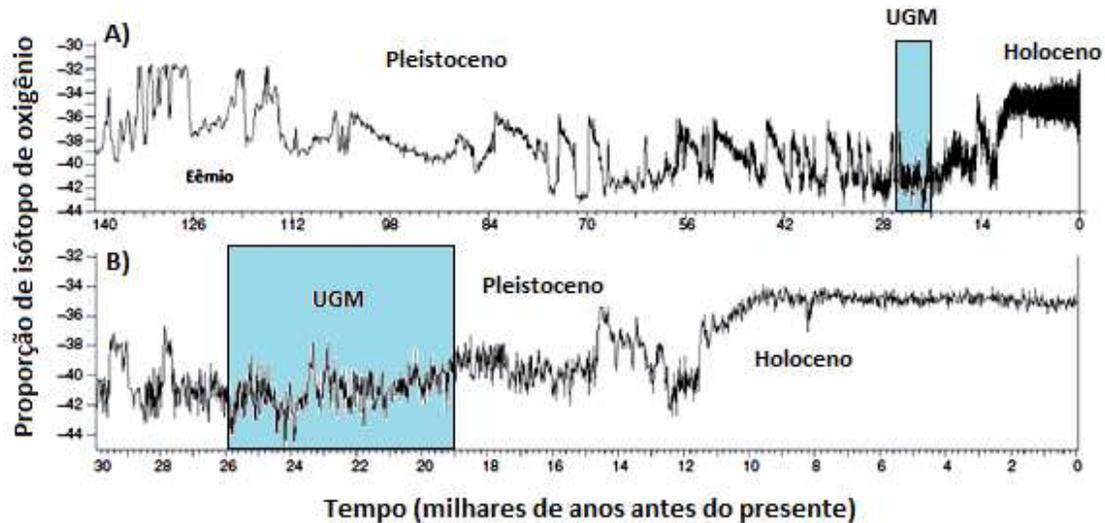


Figura 1. Variação climática durante o Quaternário Tardio. O eixo x representa o tempo em milhares de anos antes do presente, e o eixo y representa indiretamente a variação da temperatura atmosférica por meio da proporção do isótopo de oxigênio, sendo que valores menores indicam temperaturas mais baixas e, portanto, períodos mais frios. A) Variação climática dos últimos 140 mil anos. B) Destaque da variação climática dos últimos 30 mil anos. Períodos interglaciais apresentam temperaturas mais elevadas (Eêmio e Holoceno) e período glacial apresenta temperaturas mais baixas (final do Pleistoceno – pós-Eêmio). Em azul, está representado o período do Último Glacial Máximo (UGM), no qual as temperaturas foram as menores da época. Modificado de Hofreiter & Stewart (2009).

Diversos estudos sobre o impacto das mudanças climáticas em dinâmicas de populações foram realizados no Hemisfério Norte, porém, há pouca informação sobre seu efeito em populações do Hemisfério Sul (Ruzzante *et al.* 2008). Estudos na América do Sul mostraram que a duração das glaciações do período Quaternário (2,6 milhões de anos atrás – presente) variou de maneira significativa neste continente. Nos locais onde ocorreram glaciações, geleiras alteraram os

padrões de drenagem de rios e a distribuição de lagos, além de gerar quedas consideráveis no nível do mar, aumentando os habitats terrestres e de água doce em algumas regiões (Clapperton 1993, Turner *et al.* 2005, Ruzzante *et al.* 2008, Zemlak *et al.* 2011). Neste contexto, a Patagônia é uma das poucas regiões estudadas na América do Sul, com informações sobre a demografia histórica da fauna e flora da região (Ruzzante *et al.* 2008, Zemlak *et al.* 2010, Pardiñas *et al.* 2011, Sérsic *et al.* 2011, Ruzzante *et al.* 2011). No Brasil, Hollatz *et al.* (2011) associaram as mudanças climáticas pleistocênicas a padrões de diversificação e a flutuações no tamanho populacional de linhagens de golfinhos do gênero *Inia*, sendo um dos poucos trabalhos a investigar o efeito das mudanças climáticas sobre dinâmicas populacionais ancestrais nesta região do continente Sul Americano.

Sistemas costeiros são particularmente relevantes para avaliar respostas populacionais às mudanças climáticas. Flutuações no nível do mar alteram estes sistemas de maneira significativa, aumentando ou diminuindo sua extensão, e, por conseguinte, alterando sua disponibilidade de habitats. A variação de habitats disponíveis, por sua vez, pode alterar o tamanho das populações. A planície costeira situada ao norte do estado do Rio de Janeiro é uma região formada a partir de flutuações do nível do mar associadas às mudanças climáticas do Quaternário (Martin *et al.* 1997) (Figura 2). A região possui um complexo de lagoas gerado por processos geomorfológicos relacionados à formação do delta do Rio Paraíba do Sul

(Martin *et al.* 1997). A deposição de sedimentos fluviais e marinhos transportados pelo rio e a ação de correntes oceânicas levaram ao fechamento de canais fluviais antigos, processo que deu origem as lagoas há cerca de 5100 anos (Martin *et al.* 1997; Neves & Monteiro 2003) (Figura 2). As lagoas possuem habitats similares, devido a sua origem comum, diferindo, entretanto, em tamanho. As lagoas exibem gradientes de salinidade de acordo com sua proximidade ao oceano, responsáveis pela composição da sua vegetação marginal e da comunidade de peixes.

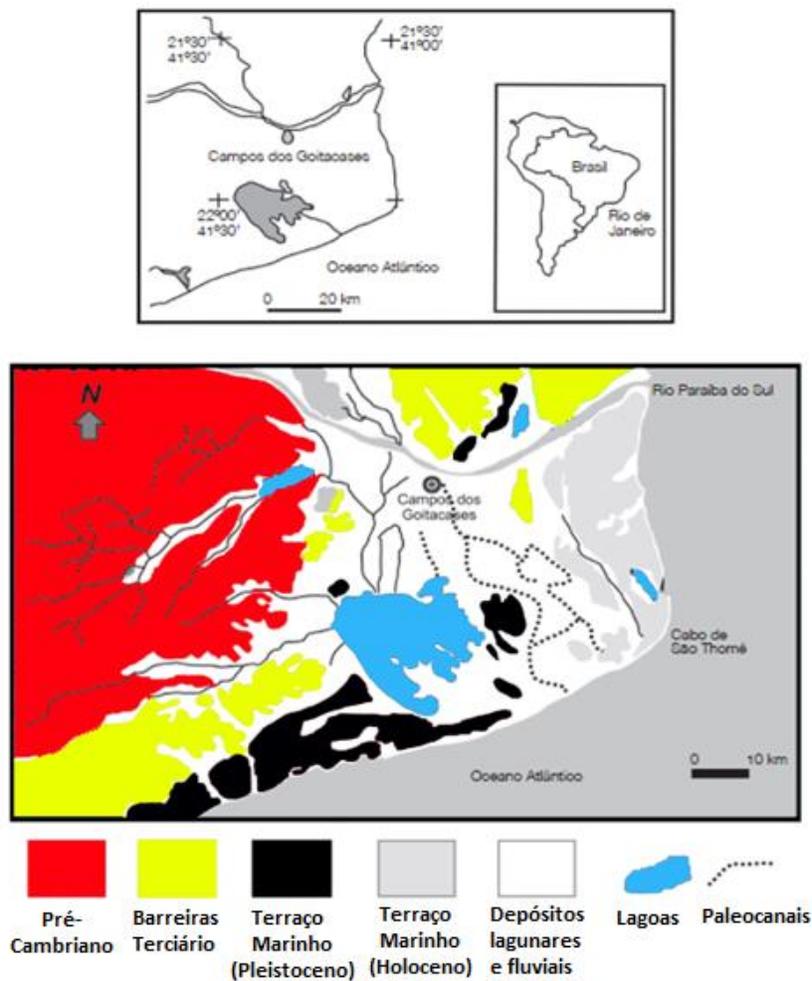


Figura 2. Mapa da planície costeira do norte do Rio de Janeiro, destacando em cores distintas a época de formação das diferentes partes que compõem a região, que apresenta sedimentos de origem Quaternária, e exibindo algumas lagoas existentes na região. Modificado de Silva *et al.* (2013).

Dentre as espécies que habitam as lagoas da planície Quaternária do norte Rio de Janeiro, encontra-se *Poecilia vivipara* (Teleostei: Poeciliidae) (Figura 3). Os peixes vivíparos de água doce da família Poeciliidae (Rosen & Bailey 1963) são um grupo endêmico do Novo Mundo e compreendem cerca de 220 espécies incluídas em 28 gêneros (Lucinda 2003; Lucinda & Reis 2005). Dentre os diversos gêneros do grupo, o gênero *Poecilia* é um excelente sistema modelo para estudos de evolução de ciclos vitais (Auer *et al.* 2010), seleção natural e sexual (Houde 1997), evolução e coevolução experimentais (Palkovacs *et al.* 2009; Bassar *et al.* 2010, Langerhans 2010) e evolução fenotípica em gradientes ecológicos (Hendry *et al.* 2006; Burns 2009). *Poecilia* também é um excelente modelo para o estudo de processos ecológicos e evolutivos associados com a invasão e colonização de novos ambientes (Tobler 2008), podendo se adaptar rapidamente a novos habitats (Kotler *et al.* 2013).



Figura 3. Indivíduos adultos de *P. vivipara*. À esquerda, uma fêmea da espécie, e à direita, um macho, que possui maior coloração na época reprodutiva. Fotografia de Felipe Aoki Gonçalves.

P. vivipara é amplamente distribuída por regiões costeiras da América do Sul, vivendo em ambientes de água doce como lagoas e cursos baixos de rios (Parenti & Rauchenberger 1989) desde a Venezuela até a Argentina (Figura 4). Sua dieta é composta principalmente de matéria orgânica vegetal (Bizerril & Primo 2001). *P. vivipara* destaca-se como organismo modelo para estudos de evolução fenotípica em gradientes ambientais e ecológicos, revelando como gradientes de salinidade e predação podem influenciar a forma e o tamanho do corpo dos indivíduos (Neves & Monteiro 2003; Gomes Jr. & Monteiro 2007; Araújo & Monteiro 2013). Gomes Jr. & Monteiro (2007) demonstraram como gradientes de salinidade e predação influenciaram caracteres reprodutivos da espécie, mostrando que o tamanho das fêmeas adultas, a fecundidade e o tamanho dos descendentes variam entre os extremos destes gradientes. Estudos também revelaram que, dentre os possíveis fatores a influenciar a variação fenotípica observada em gradientes ambientais e ecológicos, a seleção natural é o mecanismo mais plausível para explicar a variação observada em *P. vivipara* (Monteiro & Gomes Jr. 2005; Gomes Jr. & Monteiro 2007).

Em decorrência da história geológica recente da região, caracterizada pela deposição de sedimentos transportados pelo Rio Paraíba do Sul, uma hipótese de colonização das lagoas por *P. vivipara* é que tais populações são provenientes de estoques populacionais do Rio Paraíba do Sul (Neves & Monteiro 2003). O fato do

Rio Paraíba do Sul ter sua origem antes do Quaternário possibilita que, desde o Pleistoceno, populações de *P. vivipara* habitassem a região, sendo suscetíveis às variações climáticas atuantes nessa época. Uma hipótese a ser explorada é que as flutuações no nível do mar, geradas por mudanças climáticas do Quaternário, influenciaram a demografia de populações de *P. vivipara* da planície costeira do norte do Rio de Janeiro. Para avaliar esta hipótese, foi investigado se fenômenos populacionais ancestrais deixaram uma assinatura no genoma dos representantes modernos de *P. vivipara*, revelando como populações ancestrais responderam as variações climáticas intensas ocorridas no Quaternário.

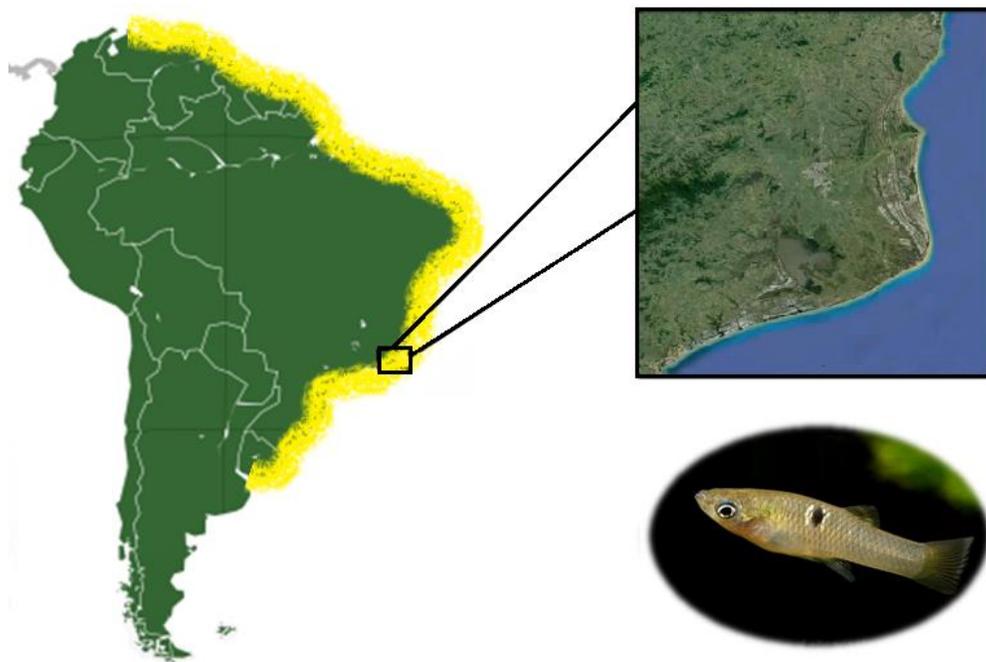


Figura 4. Distribuição de *P. vivipara*. À esquerda, mapa da distribuição da espécie, com a faixa de ocorrência destacada em amarelo. À direita, planície costeira do norte do Rio de Janeiro, subárea da distribuição de *Poecilia vivipara* na qual foi estudada a dinâmica populacional ancestral.

2. Material e Métodos

Coleta do Material Biológico

As lagoas da planície costeira do norte do Rio de Janeiro (Região Hidrográfica do Baixo Paraíba do Sul – Figura 5) foram formadas no final do Quaternário (Martin *et al.* 1997) e apresentam grandes diferenças ambientais determinadas pela localização dentro da planície costeira (Suzuki *et al.* 1998; 2002). Lagoas mais próximas da costa são salobras e apresentam um gradiente de salinidade que decresce em direção ao interior do continente (Suzuki *et al.* 1998; 2002). Lagoas localizadas no interior da planície costeira possuem água doce e uma composição da ictiofauna diferente das lagoas salobras (Bizerril & Primo 2001). Nas lagoas de água doce, *P. vivipara* co-ocorre com a traíra (*Hoplias malabaricus*), considerada um de seus predadores potenciais (Mazzoni & Iglesias-Rios 2002). Vinte lagoas da planície costeira do norte do Rio de Janeiro foram amostradas, com dez indivíduos coletados por lagoa ($n = 10$) (Figura 6). Os espécimes foram capturados com uma rede de arrasto de malha fina (tela de mosquito), anestesiados em gelo e logo após a captura, fixados em álcool absoluto.

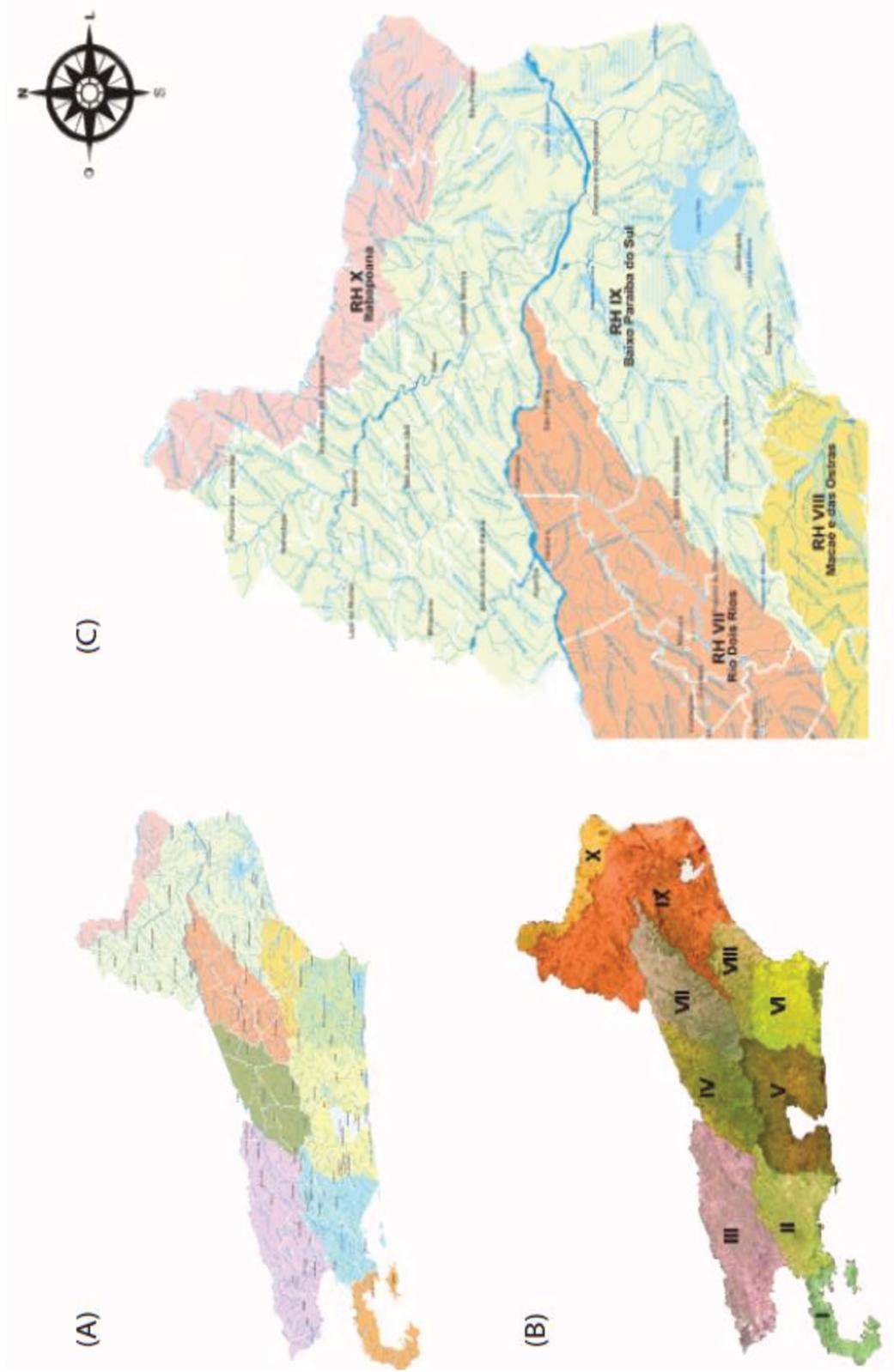


Figura 5. Aspectos geográficos e topológicos do estado do Rio de Janeiro. A) Mapa físico do estado do Rio de Janeiro, dividido em Regiões Hidrográficas. B) Imagem de satélite do estado do Rio de Janeiro, destacando as Regiões Hidrográficas em cores diferentes e algarismos romanos. C) Detalhe da Região Hidrográfica do Baixo Paraíba do Sul (IX), referente à planície costeira onde as amostras foram coletadas. RH I – X: Região Hidrográfica I a X. Retirado de www.inea.rj.gov.br.



Figura 6. Amostragem de populações da planície costeira do norte do Rio de Janeiro. As lagoas amostradas estão representadas pelos marcadores amarelos, com seus respectivos nomes. No total, vinte lagoas foram amostradas, sendo elas Açú, Atafona, Cabiúnas, Cacimba, Campelo, Catingosa, Cima, Comércio, Feia, Furado, Garça, Grussaí, Heliporto, Iquipari, Lagamar, Praia I, Praia II, Santa Clara, Tai Pequeno e Três Vendas. O tamanho amostral de cada lagoa foi $n = 10$, totalizando 200 indivíduos amostrados na região. Imagem de satélite retirada do Google Earth.

Geração de dados moleculares

A região do genoma escolhida para investigar a dinâmica populacional ancestral de *P. vivipara* foi o gene mitocondrial citocromo *b*. O DNA mitocondrial é utilizado para estimar demografias históricas (Ho & Shapiro 2011) pois contém algumas características que o tornam pertinente para tal abordagem: 1) possui maiores taxas de substituição com relação a outras regiões do genoma, evoluindo mais rapidamente e permitindo que sejam observadas variações no nível dos indivíduos; 2) região não sofre recombinação genética, garantindo que a informação recuperada nos indivíduos é produto de variações obtidas em sua linhagem. Outro atributo do DNA mitocondrial é sua herança materna. O fato de ser herdado maternalmente significa que a partir do DNA mitocondrial é possível recuperar apenas aspectos da história populacional que ficaram registrados no genoma das fêmeas, o que pode ser problemático se os processos subjacentes a dinâmica das populações avaliadas são influenciados pelo sexo. Como não há evidências que este tipo de viés ocorra em *P. vivipara*, este fator não parece ser relevante, permitindo que a estimação da demografia histórica das fêmeas seja equivalente a estimação da demografia histórica da população.

O método de extração com sal de Aljanabi & Martinez (Aljanabi & Martinez, 1997) foi utilizado, com algumas modificações, para extrair DNA total a partir de músculo esquelético. O tampão de lise contém 80 µl de TNE (Tris-HCl 50 mM – pH 8.0; NaCl 100 mM; EDTA 6,3 mM – pH 8.0), 20 µl de SDS 10% e 10 µl de proteinase K 20 ng/ml. Para concentrar o DNA foram utilizados 35 µl de NaCl 5M e a ressuspensão foi feita em 30 – 50 µl de TE (1 mM Tris-HCl – pH 8.0; 0,1 mM EDTA).

O gene mitocondrial citocromo *b* foi amplificado através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os primers utilizados foram: (F) L14724 (5' CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G 3') e (R) H15982 (5' CCT AGC TTT GGG AGY TAG G 3') (Schories *et al.*, 2009). O PCR foi realizado em solução de 25 µl, contendo: 11 µl de ddH₂O, 2,5 µl de 10X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl – pH 8.4; 500 mM KCl), 0,26 mM de cada dNTP, 0,75 mM de BSA (Albumina Bovina Sérica), 2 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada primer e 1,25 unidades de Taq DNA Polimerase (invitrogen) (modificado de Breden *et al.* 1999). Os ciclos de PCR seguiram o protocolo (Meredith *et al.* 2010): desnaturação inicial em 94 °C por 120 s; 35 ciclos de 60 s em 94 °C (desnaturação), 60 s em 50 °C (anelamento) e 60 s em 72 °C (extensão); e uma extensão final de 600 s em 72 °C. Os produtos do PCR

foram aplicados em gel de agarose 1% (80 ml TAE 0,5X, 0,8 g agarose e 0,4 µl SYBR Safe). Para as soluções aplicadas no gel, utilizaram-se 5 µl da amostra amplificada, 6 µl de ddH₂O e 1 µl de tampão de amostra (*Loading Buffer*). Para o padrão molecular aplicado (*Ladder*) utilizaram-se 2 µl, adicionando 9 µl de ddH₂O e 1 µl de tampão de amostra. A purificação foi realizada utilizando o Kit Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean – Up System, e aplicada em gel de agarose 1% contendo 80 ml TAE 1X, 0,8 g agarose e 4 µl SYBR Safe.

Os produtos de PCR foram enviados para a empresa Macrogen (<http://www.macrogen.com/kor/>), onde foi realizado o sequenciamento do gene citocromo *b* pelo método de Sanger. As sequências geradas foram editadas no programa BioEdit ver 7.0.5 (Hall 2005) e alinhadas no programa MEGA ver 5.2 (Tamura *et al.* 2011).

Análise dos dados

Diversos métodos estimam a demografia histórica utilizando dados de sequências de DNA. Alguns destes métodos necessitam de um modelo demográfico paramétrico que explique como o tamanho populacional varia ao longo do tempo. O tamanho populacional pode permanecer constante ao longo do tempo (modelo demográfico com um único parâmetro), ou pode variar com uma taxa de crescimento constante (modelo de crescimento exponencial, dois parâmetros), com uma taxa de crescimento decrescente (modelo de crescimento logístico, três parâmetros) ou com uma taxa de crescimento crescente (modelo de crescimento expansivo, três parâmetros) (Pybus & Rambaut 2002; Ho & Shapiro 2011). A dificuldade de reconhecer um modelo demográfico que melhor explique a história das populações torna tais abordagens problemáticas.

Métodos não paramétricos e semi-paramétricos foram desenvolvidos com o objetivo de estimar histórias demográficas de populações, que em geral são mais complexas que o descrito por modelos paramétricos simples. Entre estes métodos encontram-se os métodos *Skyline-Plot*, introduzidos por Pybus *et al.* (2000). Os métodos *Skyline-Plot* são baseados na teoria da coalescência, teoria que descreve como os processos genéticos atuantes nas populações influenciam na forma da genealogia das sequências amostradas (Drummond *et al.* 2005). O método envolve

dois passos principais: (1) a estimação de uma genealogia a partir de sequências de DNA e (2) a estimação da história demográfica da população, que será baseada na genealogia estimada na etapa (1) (Ho & Shapiro 2011). Ao estimar a genealogia (etapa 1), recuperamos a relação de ancestralidade e descendência entre os indivíduos e o tempo em que as linhagens divergiram. A relação entre os indivíduos é representada pelo padrão de ramificação da árvore genealógica, e o tempo de divergência é representado pelas arestas da genealogia. A estimação da genealogia pode conter erros associados à topologia propriamente dita (erros nas relações entre os indivíduos), e erros associados ao comprimento das arestas (erros no tempo de divergência). A incerteza inerente a estimação genealógica é denominada por Ho & Shapiro (2011) como ‘erro filogenético’.

Ao olharmos para duas sequências contemporâneas contidas na genealogia e as acompanharmos de forma retrospectiva vemos que as linhagens das duas sequências coalesceram, ou seja, encontraram sua linhagem ancestral (Figura 7). O tempo até ocorrer um evento de coalescência é representado pelas arestas da genealogia e é denominado de intervalo de coalescência (Figura 7). Para estimar a história demográfica de uma população a partir da genealogia (etapa 2), o método relaciona o tamanho populacional efetivo e o comprimento dos intervalos de coalescência. Portanto, o tamanho populacional efetivo médio em cada intervalo de coalescência é encontrado multiplicando-se o tamanho do intervalo de

coalescência pelo número de linhagens genealógicas contidas neste intervalo (Ho & Shapiro 2001; Hudson 1983; Kingman 1982; Tajima 1983). Deste modo, estimamos o tamanho populacional efetivo médio para cada intervalo de coalescência da genealogia, reconstruindo a história demográfica da população. A incerteza inerente a estimação da história demográfica a partir da genealogia é denominado por Ho & Shapiro (2011) como 'erro coalescente'. Dentre os métodos da família *Skyline-Plot*, o método *Skyline-Plot* Bayesiano (Drummond *et al.* 2005) se destaca por coestimar a genealogia e a demografia histórica em uma única análise e por considerar os erros filogenético e coalescente.

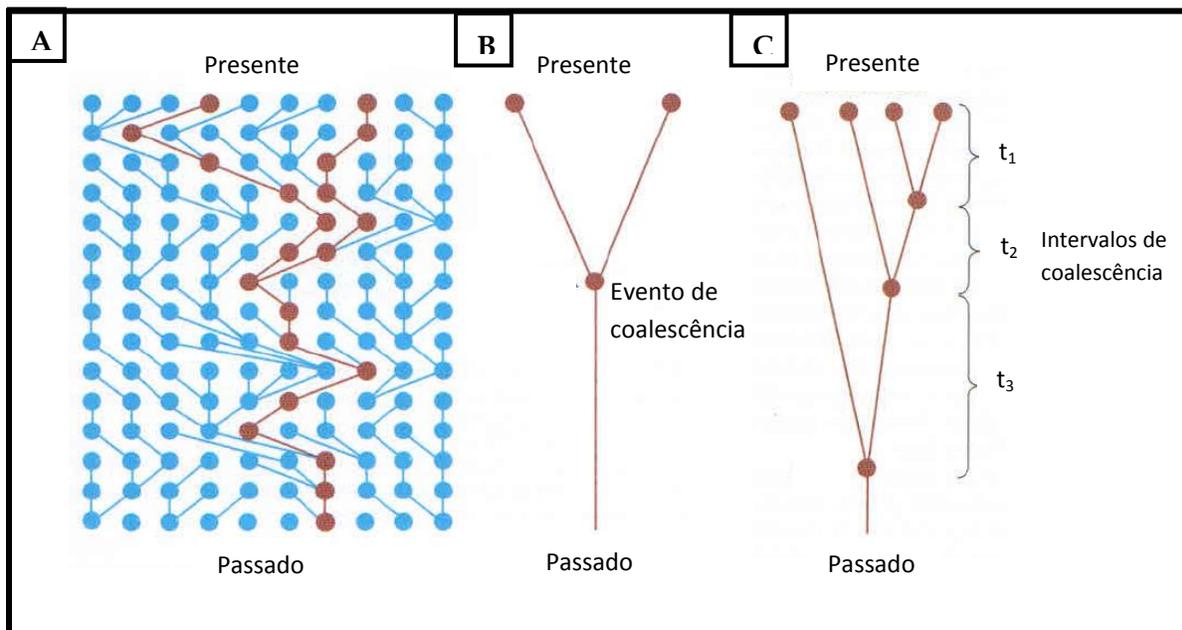


Figura 7. Representação esquemática da Teoria da Coalescência. A) Diagrama representando dez gerações populacionais. A primeira linha corresponde à geração contemporânea, sendo os círculos vermelhos os indivíduos (ou sequências) amostrados e os círculos azuis os indivíduos da população que não foram amostrados. Os círculos vermelhos nas linhas subsequentes representam os ancestrais dos indivíduos amostrados no presente. B) Representação gráfica de um evento de coalescência. Nós representam os indivíduos/sequências e arestas representam as linhagens das amostras contemporâneas. C) Genealogia da amostra, representando relações entre indivíduos/sequências contemporâneas. Os tempos t_1 , t_2 e t_3 representam os intervalos de coalescência. Adaptado de Nielsen & Slatkin (2013).

Para utilizar o método *Skyline-Plot* Bayesiano, as suposições do modelo subjacente ao método precisam ser satisfeitas. O método *Skyline-Plot* Bayesiano tem como base o Modelo Coalescente Padrão Neutro. O Modelo Coalescente Padrão Neutro possui algumas suposições sobre as populações amostradas (Nielsen & Slatkin 2013). Para satisfazer tais suposições, dois aspectos importantes sobre as populações amostradas devem ser preservados: (1) forças deterministas, como seleção natural, não atuam na região analisada, ou seja, as sequências evoluem de forma de forma neutra, e (2) população é panmítica, ou seja, não há estrutura genética na região do genoma analisada. Além destes aspectos, é importante que as sequências escolhidas sejam ortólogas e não recombinantes, e que a amostragem seja abrangente, de modo a incluir um número de indivíduos representativo da população. Como observado na figura 6, o delineamento amostral é abrangente, garantindo a representatividade da população. Para avaliar se nossa amostra satisfaz as suposições (1) e (2), escolhemos como métodos de análise, respectivamente, o Teste de Neutralidade Seletiva (Estatística D de Tajima) (Tajima 1989) e a Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA) (Dupanloup *et al.* 2002).

1. *Teste de Neutralidade Seletiva (Teste D de Tajima)*

A Teoria Neutra de evolução molecular foi proposta por M. Kimura em 1968. Kimura propôs que a variação molecular observada nas populações pode ser consequência apenas de forças estocásticas, como deriva genética e mutação, sem a atuação de forças deterministas, como seleção natural. O Teste *D* de Tajima detecta desvios na distribuição das frequências alélicas das proporções esperadas quando o alelo está evoluindo de forma neutra, ou seja, sob o modelo neutro padrão. O teste relaciona dois estimadores de θ , o estimador de Tajima e o estimador de Watterson, sendo que θ representa o número esperado de mutações separando duas sequências ($\theta = 4N_e\mu$) e $\hat{V}(\hat{\theta}_T - \hat{\theta}_W)$ representa a variância em $(\hat{\theta}_T - \hat{\theta}_W)$ (Nielsen & Slatkin 2013):

$$D \text{ de Tajima} = \frac{\hat{\theta}_T - \hat{\theta}_W}{\sqrt{\hat{V}(\hat{\theta}_T - \hat{\theta}_W)}}$$

O estimador de Tajima calcula o número esperado de mutações θ a partir de diferenças entre pares de sequências (k), enquanto que o estimador de Watterson calcula o θ a partir do número de sítios segregantes de todas as sequências alinhadas (S/a_n). Sob o modelo neutro padrão, o valor esperado para os dois estimadores é θ :

$$E[k] = \theta$$

$$E[S]/a_n = \theta$$

Portanto, quando a sequência evolui de forma neutra espera-se que a estatística D de Tajima seja zero. Valores diferentes de zero representam a atuação de forças deterministas, como seleção natural, sob a sequência analisada. O Teste D de Tajima foi realizado no programa DnaSP v5 (Librado & Rozas 2009).

2. *Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA)*

Para avaliar a existência de estrutura genética no sistema estudado, foi realizada uma Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA). Esta análise define grupos de populações maximamente diferenciados sob o aspecto genético e geograficamente homogêneos (Dupanloup *et al.* 2002). Diferente dos testes clássicos de estrutura genética, não é necessário definir a composição dos grupos *a priori* neste método, sendo os grupos definidos com base apenas nos dados genéticos.

O método SAMOVA utiliza um procedimento computacional exaustivo (*simulated annealing procedure*) para (1) definir a composição de K grupos a partir da sua amostra, sendo K uma partição inicial aleatória das n populações amostradas, e (2) maximizar o índice F_{CT} , que representa a proporção da variância genética total devido a diferenças entre grupos de populações (Dupanloup *et al.* 2002). O método requer uma definição *a priori* do número de partições K , porém, o usuário pode testar vários valores de K , com o objetivo de encontrar o número de partições

da amostra com o maior F_{CT} . O valor de K com maior índice F_{CT} representa o número de partições no qual as populações amostradas são maximamente diferenciadas. Nós testamos todos os valores de K possíveis para a nossa amostra, com o objetivo de obter o K com maior F_{CT} , ou seja, obter o número de grupos que exibisse maior diferenciação genética, revelando uma possível estrutura genética. Quando não há um número de grupos K com F_{CT} que se destaque em relação aos outros e a variação observada é mais frequente dentro das populações que entre os grupos de populações definidos pelo método, podemos concluir que não há estrutura genética nas populações amostradas (Blanco-Pastor *et al.* 2013). O programa utilizado para realizar a Análise Espacial de Variância Molecular foi o SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002).

3. *Skyline-Plot* Bayesiano (BSP)

Como dito previamente, o método *Skyline-Plot* Bayesiano (BSP) (Drummond *et al.* 2005) se destaca por coestimar a genealogia e a demografia histórica em uma única análise, diferente dos métodos *Skyline-Plot* anteriores. Como no método *Skyline-Plot* Generalizado (Strimmer & Pybus 2001), o BSP tem como suposição que o tamanho populacional efetivo médio em cada intervalo de coalescência é constante (Drummond *et al.* 2005). Entre um intervalo de coalescência e outro, porém, o tamanho populacional muda instantaneamente

(Drummond *et al.* 2005; Ho & Shapiro 2011). A possibilidade de agrupar intervalos de coalescência subsequentes torna as mudanças no tamanho populacional graduais, gerando uma curva demográfica suave (Drummond *et al.* 2005; Ho & Shapiro 2011). O gráfico gerado inclui intervalos de credibilidade para os tamanhos populacionais efetivos em cada instante de tempo, representando a incerteza das estimações filogenética e coalescente (Drummond *et al.* 2005; Ho & Shapiro 2011), e mostra a relação entre o tamanho populacional (eixo y) e a quantidade de mudanças em uma escala de tempo (eixo x).

A partir das sequências de DNA amostradas em uma população, a informação recuperada sobre o tamanho populacional está associada primeiramente a uma escala de tempo molecular (substituições/sítio). Em geral, não é interessante inferir apenas o período relativo dos eventos demográficos ancestrais, mas associar tais eventos com uma escala de tempo real (anos), para buscar relações entre eventos demográficos e eventos climáticos. Uma maneira de estimar o tamanho populacional em uma escala de tempo real é conhecer a taxa de substituição da região do genoma analisada. A taxa de substituição do gene citocromo *b* de *P. vivipara* não é conhecida, sendo necessário estimá-la. A taxa de substituição do citocromo *b* foi estimada a partir do número médio de diferenças entre pares de sequências amostradas (π) e de uma estimativa do tempo de divergência entre populações de *P. vivipara*, por meio da relação

$$\text{taxa de substituição} = \frac{\pi}{t} = \frac{\sum_{i < j} d_{ij}}{n(n-1)/2} = \frac{\text{substituições/sítio}}{\text{tempo}}$$

no qual d_{ij} é o número de diferenças de nucleotídeos entre as sequências i e j , n é o número de sequências amostradas e t é o tempo de divergência entre as linhagens das sequências i e j . Dados independentes de sequência e de tempo de divergência entre linhagens de *P. vivipara* foram obtidos em Meredith *et al.* (2011), a partir dos quais foi calculada a taxa de substituição do citocromo *b* da espécie.

O programa utilizado para construir a história demográfica a partir do método BSP foi o *BEAST* (Drummond & Rambaut 2007). Arquivos gerados pelas análises feitas no *BEAST* foram lidos no programa *TRACER* ver 1.5, no qual foi gerado o gráfico do tamanho populacional efetivo das fêmeas (eixo y) pelo tempo em milhares de anos antes do presente (eixo x).

3. Resultados

Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento

A estratégia laboratorial utilizada neste projeto teve como objetivo garantir a qualidade das etapas experimentais no menor tempo possível. Desta forma, os experimentos foram realizados de modo que as amostras escolhidas num dado experimento seguiram as seguintes etapas: (1) extração de DNA, (2) amplificação do gene citocromo *b* por meio da reação de PCR, (3) purificação, (4) sequenciamento do gene amplificado e (5) edição das sequências. Após a verificação do sucesso de cada etapa, novas amostras foram escolhidas e todas as etapas (1 – 5) foram realizadas.

Realizou-se primeiramente a extração das amostras, de acordo com o plano inicial. O DNA foi extraído com sucesso, apresentando bandas únicas no gel de agarose (Figura 8A) que refletem sua integridade. Em seguida, a etapa de amplificação do gene mitocondrial citocromo *b* foi realizada (Figura 8B). O gene foi amplificado com sucesso, gerando bandas específicas que refletem a amplificação apenas do gene de interesse. A partir da reação de PCR, realizou-se a purificação das amostras. As bandas específicas observadas no gel de agarose

(Figura 8C) indicam que o gene citocromo *b* permaneceu íntegro e pronto para o sequenciamento.

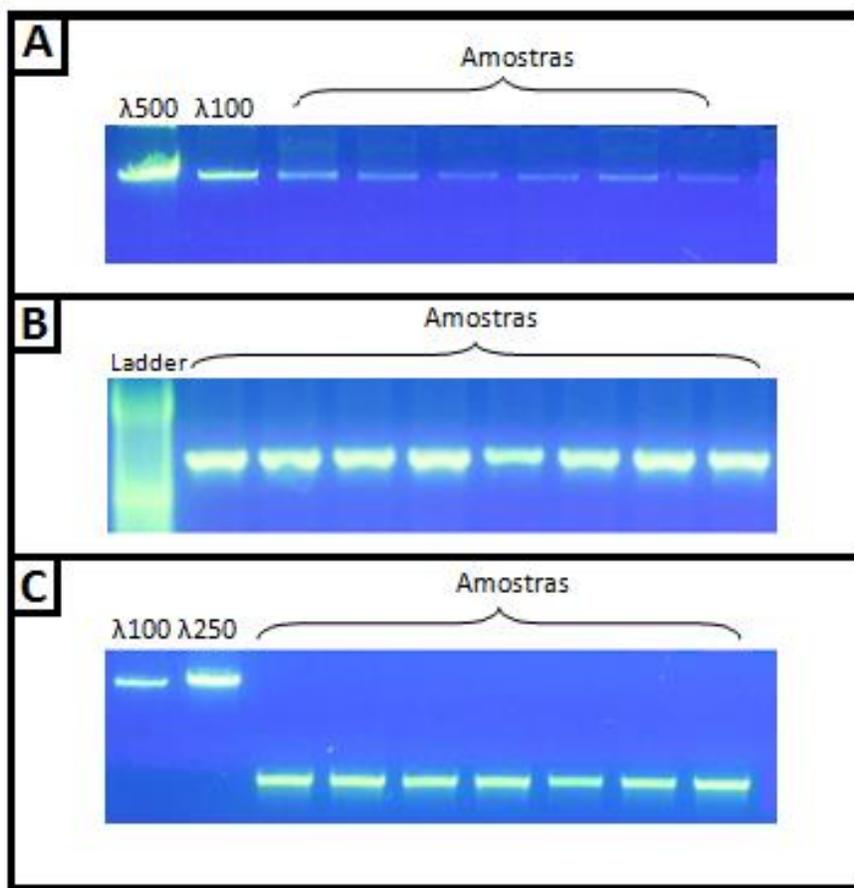


Figura 8. Géis de agarose 1% corados com SYBR Safe. A) DNA extraído de seis indivíduos (amostras). Pesos moleculares: $\lambda 500$ e $\lambda 100$ ng/ μ l. B) DNA amplificado de oito indivíduos. Padrão molecular (*ladder*): 100 bp. C) DNA purificado de sete indivíduos. Pesos moleculares: $\lambda 100$ e $\lambda 250$ ng/ μ l.

A partir das amostras purificadas, foi realizado o sequenciamento do gene mitocondrial citocromo *b*. Duas sequências foram geradas por indivíduo, sendo cada sequência referente a uma das fitas do DNA (denominadas *forward* e *reverse*).

O sequenciamento foi realizado com sucesso (Figura 9), exibindo picos bem definidos e não sobrepostos. A partir das sequências *forward* e *reverse* do gene foi gerada uma sequência consenso para cada indivíduo (Figura 10). Com as sequências consenso, foram realizados o alinhamento entre indivíduos e as análises dos dados.

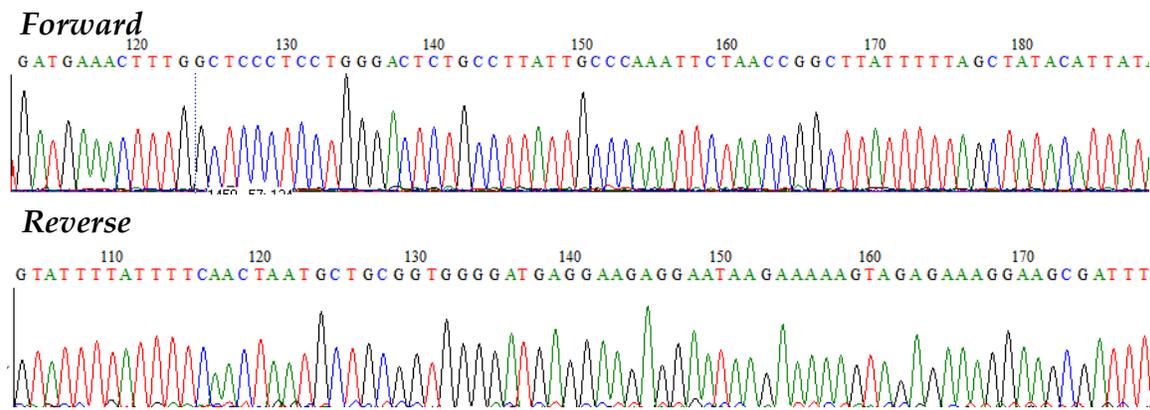


Figura 9. Trecho do sequenciamento do gene citocromo *b* (*forward* e *reverse*) de um indivíduo amostrado.

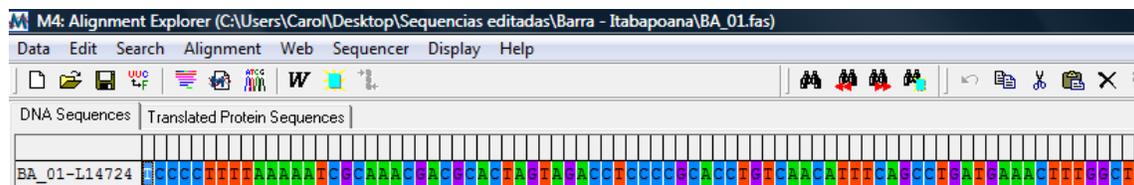


Figura 10. Sequência editada do gene mitocondrial citocromo *b* a partir das sequências *forward* e *reverse* de um indivíduo amostrado.

Análise dos dados

1. Teste de neutralidade seletiva (Teste D de Tajima)

O teste *D* de Tajima teve como resultado um valor negativo ($-0,15229$), porém sem significância estatística ($P > 0,10$). Tal resultado indica que o gene citocromo *b* não está sob ação da seleção natural. Portanto, a suposição do modelo de que não há forças deterministas atuando foi satisfeita, permitindo, sob esse aspecto, o uso do marcador molecular escolhido na análise de demografia histórica.

2. Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA)

A análise SAMOVA indicou ausência de estrutura genética, pois os valores de F_{CT} foram muito próximos uns dos outros, e a porcentagem de variação explicada pela variação intrapopulacional foi sempre maior que a explicada pela variação entre grupos de populações (Tabela 1, Figura 11). A ausência de estrutura genética satisfaz a suposição do modelo de que a população é panmítica, permitindo a inferência da demografia histórica a partir da amostra tomada.

Tabela 1. Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA) do gene citocromo *b* de *Poecilia vivipara*. Valores de F_{CT} e porcentagem de variação entre grupos, entre populações dentro de grupos e dentro das populações, para todos os possíveis valores de *K*.

K	F_{CT}	Porcentagem da variação		
		Entre grupos	Entre populações dentro de grupos	Dentro de populações
2	0.406*	40.56	5.72	53.72
3	0.399*	39.85	3.54	56.61
4	0.385*	38.47	3.92	57.61
5	0.370*	36.98	4.54	58.48
6	0.345*	34.55	3.77	61.68
7	0.333*	33.33	2.64	64.03
8	0.321*	32.05	1.80	66.14
9	0.302*	30.23	1.62	68.15
10	0.305*	30.52	-3.75	73.23
11	0.303*	30.27	-3.64	73.37
12	0.299*	29.89	-4.43	74.54
13	0.299*	29.93	-4.75	74.82
14	0.303*	30.34	-5.62	75.27
15	0.301*	30.13	-5.52	75.39
16	0.301*	30.12	-5.99	75.87
17	0.302*	30.15	-6.15	76.00

* $P < 0.01$

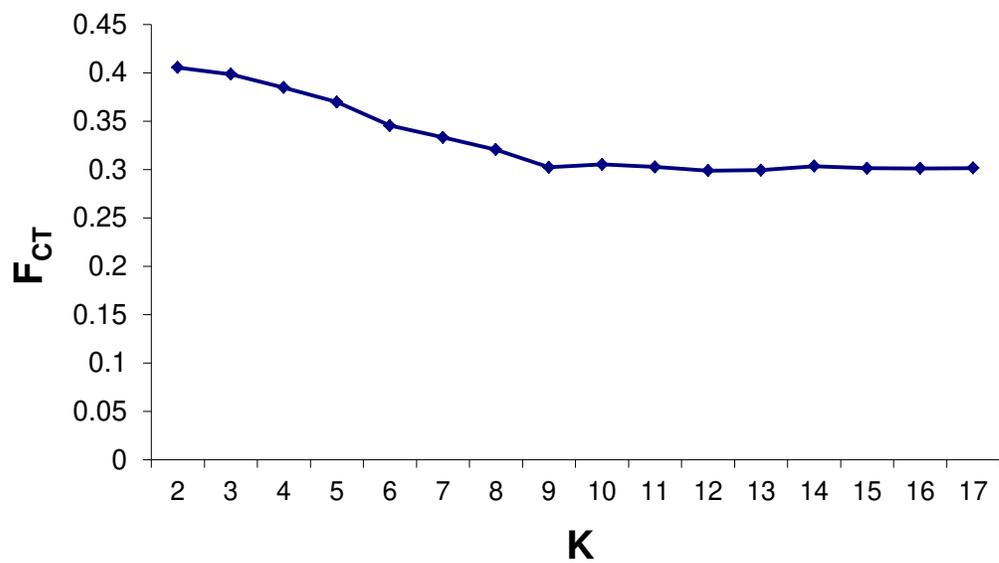


Figura 11. Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA) do gene citocromo *b* de *P. vivipara*. Gráfico dos valores de F_{CT} representando variação entre grupos para cada valor de K .

3. Skyline-Plot Bayesiano (BSP)

A taxa de substituição do citocromo *b* foi estimada em $0,9 \times 10^{-8}$ substituições/sítio x ano, ou 0,9% substituições/sítio por milhões de anos:

$$\text{taxa de substituição} = \frac{\pi}{t} = \frac{\frac{\sum_{i < j} d_{ij}}{n(n-1)/2}}{t} = \frac{1,9 \times 10^{-2}}{2,11 \times 10^6} = \frac{0,9 \times 10^{-8} \text{ substituições/sítio}}{\text{ano}}$$

A análise coalescente do gene mitocondrial citocromo *b* realizada pelo método *BSP* estimou a história demográfica das populações de *Poecilia vivipara* dos últimos 300 mil anos (Figura 12).

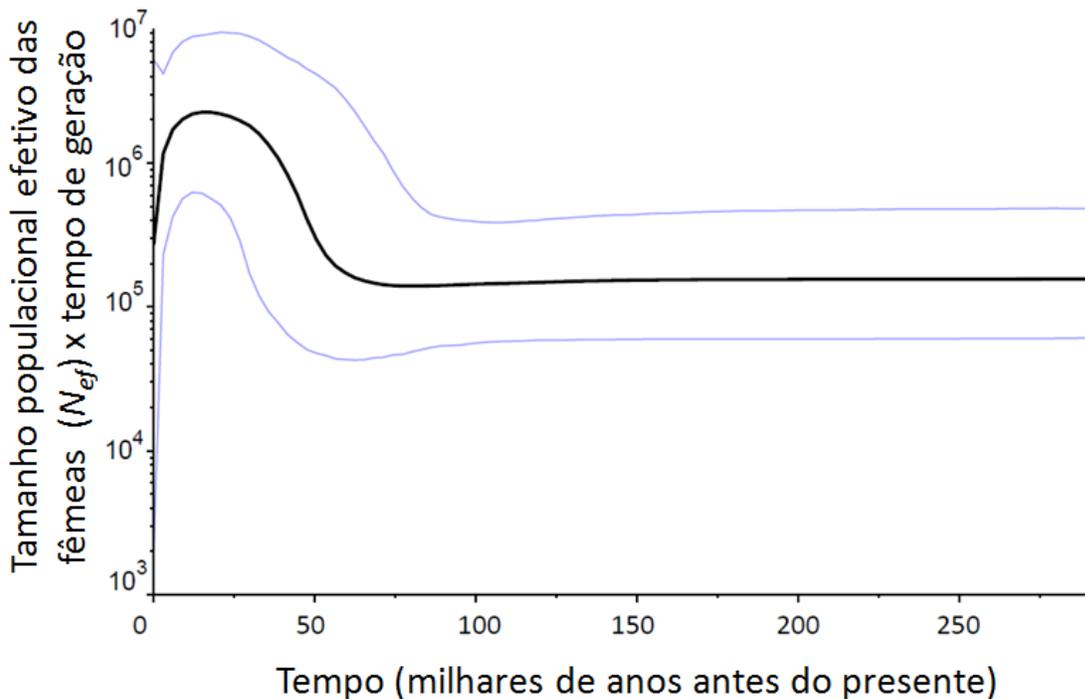


Figura 12. Gráfico BSP exibindo mudanças temporais no tamanho populacional efetivo de *P. vivipara*. O eixo x representa o tempo em milhares de anos antes do presente. Note que zero (0) representa o presente, e os valores subsequentes (50 a 250) representam o tempo no passado. O eixo y representa o tamanho populacional efetivo das fêmeas, multiplicado pelo tempo de geração da espécie. Linhas azuis são os intervalos de credibilidade para os tamanhos populacionais efetivos em cada instante de tempo, representando a incerteza das estimações filogenética e coalescente.

Com a dinâmica populacional ancestral estimada, a próxima etapa foi buscar associações entre as flutuações no tamanho populacional e eventos climáticos da época. Para buscar tal relação, mudanças na temperatura foram mapeadas na região do gráfico *BSP* onde houve mudança de regime, com base em dados globais sobre as variações da temperatura na escala de tempo analisada (Figura 13). O Último Glacial Máximo (LGM) foi incorporado ao gráfico da dinâmica, e as duas últimas transgressões marinhas também foram incluídas. As transgressões marinhas representam avanços no nível do mar sobre as regiões costeiras dos continentes. A Última Transgressão Marinha (LMT) ocorreu em torno de 5 mil anos atrás, e a Penúltima Transgressão Marinha (SLMT) ocorreu há 123 mil anos.

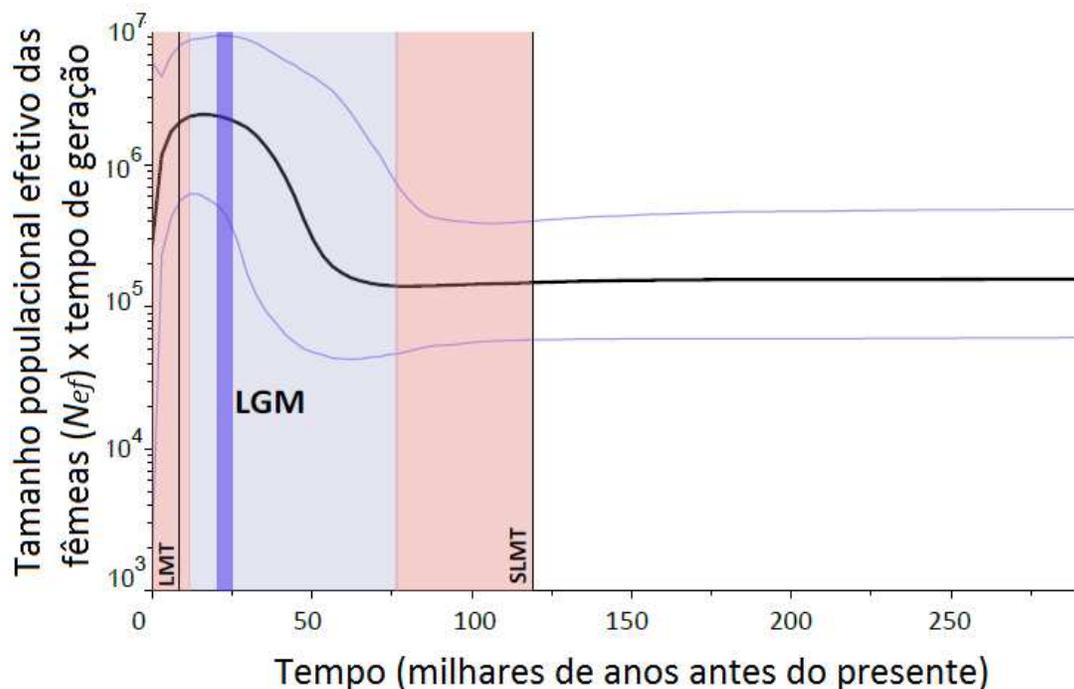


Figura 13. Gráfico BSP exibindo mapeamento das mudanças climáticas nas mudanças temporais no tamanho populacional efetivo de *P. vivipara*. Faixas vermelhas representam períodos de clima quente e faixas azuis representam períodos de clima frio. LGM: Último Glacial Máximo, delimitado pela faixa azul escura; LMT – Última Transgressão Marinha; SLMT – Penúltima Transgressão Marinha.

4. Discussão

A dinâmica ancestral das populações de *P. vivipara* da planície Quaternária do norte do Rio de Janeiro revelou uma mudança de regime nos últimos 75 mil anos, caracterizada por um crescimento populacional seguido por um rápido declínio (Figura 12). Ao mapear o clima na dinâmica populacional ancestral, observou-se uma potencial associação entre variações na temperatura e flutuações no tamanho populacional (Figura 13). A relação observada é de aumento populacional quando a temperatura diminui (período de clima frio), atingindo um ponto de máximo após o período mais frio da época (LGM). A partir desse ponto a temperatura se eleva (período de clima quente) e ocorre diminuição do tamanho populacional até o presente (Figura 13). Parece existir, portanto, uma relação inversa entre o tamanho populacional e a temperatura.

Os efeitos do clima sobre a demografia histórica das populações de *P. vivipara* podem ter se estabelecido de diversas maneiras, com influências diretas e indiretas da temperatura sobre a dinâmica das populações. Uma hipótese é que mudanças no nível do mar, ocasionadas por variações na temperatura, foram responsáveis por contrações e expansões do hábitat das populações de *P. vivipara* na planície costeira do norte do Rio de Janeiro (Figura 14). Como observado em regiões da Patagônia que sofreram influências das variações climáticas (Ruzzante

et al. 2008, Zemplak *et al.* 2010, Pardiñas *et al.* 2011, Sérsic *et al.* 2011, Ruzzante *et al.* 2011), em períodos frios ocorreram quedas no nível do mar na região costeira do Brasil, aumentando o território continental disponível para a formação de lagoas a partir do Rio Paraíba do Sul (Ledru *et al.* 2005). A expansão do hábitat nos períodos frios ocasionaria, portanto, um aumento no tamanho populacional de *P. vivipara*, por sua capacidade de colonizar rapidamente novos ambientes (Kotler *et al.* 2013). Em contrapartida, em períodos quentes, como no início do Holoceno (Figura 1), o nível do mar se elevou, diminuindo o território disponível para as populações de *P. vivipara*. Nesta situação, a contração do hábitat em períodos quentes ocasionaria na diminuição do tamanho populacional da espécie. Avanços do nível do mar em relação à planície costeira do norte do Rio de Janeiro foram registrados por Martin *et al.* (1997), e estão representados na Figura 13 como Última e Penúltima Transgressões Marinhas (LMT e SLMT, respectivamente) e na Figura 14, onde se observa variações no nível do mar em diversas regiões do planeta. Durante as Transgressões Marinhas, o território continental diminuiu, ao passo que após estas transgressões ocorreram regressões do nível do mar, quando o continente aumentou em sua extensão. Portanto, as variações no nível do mar ocasionadas por mudanças climáticas podem ter sido responsáveis pela dinâmica geográfica da planície costeira do norte do Rio de Janeiro que, por sua vez, foi responsável pelas flutuações do tamanho populacional de *P. vivipara*.

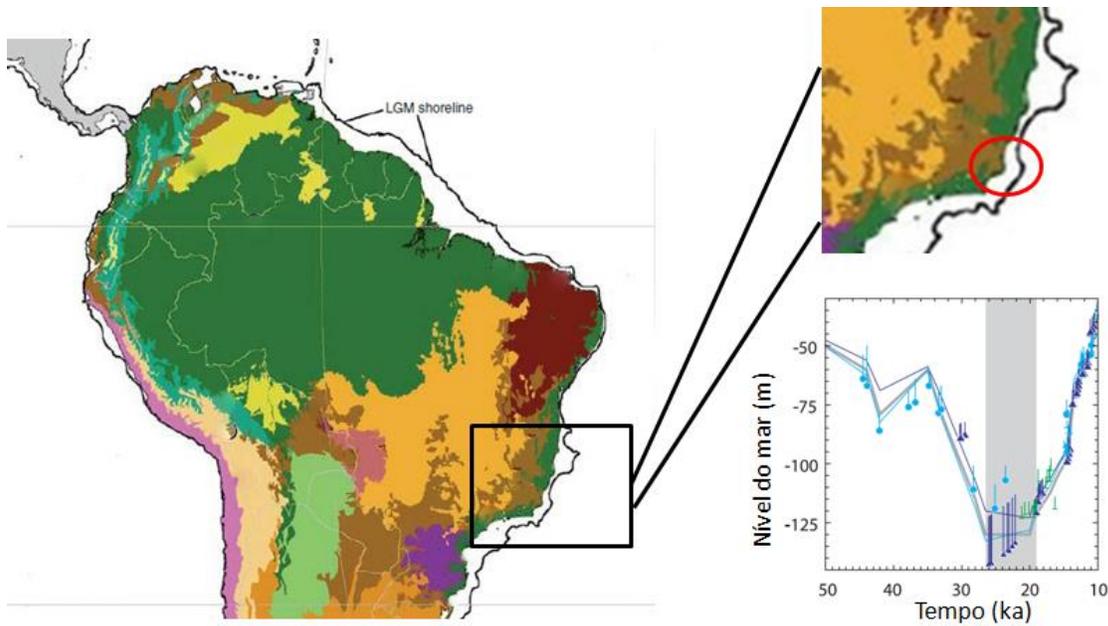


Figura 14. Variações no nível do mar durante o Quaternário Tardio. À esquerda, mapa do continente Sul Americano, no qual linha preta delineando o continente representa a linha da costa no período do Último Glacial Máximo. À esquerda (imagem superior), destaque em vermelho da região da planície costeira do norte do Rio de Janeiro, mostrando que a área exposta do continente era maior no período do UGM. A imagem inferior representa o nível do mar nos últimos 50 mil anos para diversas regiões do planeta. A faixa cinza do gráfico corresponde ao período do UGM, sendo este o momento em que o nível do mar foi mais baixo em todas as regiões, cerca de 120 metros abaixo do nível do mar atual. Mapa modificado de Mayle *et al.* 2009 e gráfico modificado de Clark *et al.* 2009.

Em trabalhos anteriores observou-se que um padrão emergente entre diferentes populações ancestrais foi a tendência à perda de diversidade genética e à extinção durante tempos de mudanças climáticas rápidas (Hofreiter & Stewart 2009). De fato, as populações de *P. vivipara* exibiram uma perda de diversidade genética durante a transição dos períodos frios para os quentes. Entretanto, em populações estudadas no hemisfério Norte a relação estabelecida entre o clima e a demografia histórica foi oposta à observada em *P. vivipara*, ocorrendo uma diminuição do tamanho populacional, e, portanto, na diversidade genética, em

períodos de clima frio, devido à diminuição de habitats disponíveis, o que ficou conhecido como Teoria do Refúgio (Hofreiter & Stewart 2009, Hewitt 2000). A diferença entre a relação clima-demografia encontrada nas populações de *P. vivipara* e nas populações de outras regiões pode ser decorrente de diferenças dos habitats das populações, sendo a maioria das espécies estudadas de hábito terrestre, havendo poucos estudos sobre espécies de água doce que habitam regiões costeiras (Hofreiter & Stewart 2009). Outro fator possivelmente responsável pelas diferenças observadas nas populações de *P. vivipara* com relação a estudos anteriores é a diferença na intensidade dos efeitos das mudanças climáticas do Quaternário sobre as regiões estudadas. O sudeste brasileiro não sofreu tão intensamente os efeitos das glaciações pleistocênicas, não havendo registros sobre formação de geleiras nesta região (Ledru *et al.* 2005). Diferentemente, as glaciações pleistocênicas impactaram fortemente a América do Norte e a Europa, explicando a diminuição de habitats disponíveis e a formação de refúgios em períodos frios (Hofreiter & Stewart 2009, Hewitt 2000), ocasionando diminuição do tamanho populacional das espécies destas regiões (por exemplo, Barnes *et al.* 2002, Shapiro *et al.* 2004, Stuart *et al.* 2004, Stiller *et al.* 2010, Debruyne *et al.* 2008).

A dinâmica populacional ancestral de *P. vivipara* foi estimada a partir de padrões de variabilidade genética de populações contemporâneas habitantes da

planície costeira do norte do Rio de Janeiro. Um único *locus* foi utilizado para estimar a demografia histórica, o gene mitocondrial citocromo *b*. A escala de tempo (Quaternário) da dinâmica populacional ancestral de *P. vivipara* está dentro do limite de informação recuperada a partir de marcadores moleculares mitocondriais (Avice 1994, Blair *et al.* 2014). Estudos que avaliam um único *locus* são relevantes como um primeiro enfoque para compreender dinâmicas populacionais ancestrais (Zemlak *et al.* 2011). Entretanto, diferentes *loci* do genoma podem contar diferentes histórias demográficas, havendo o risco na utilização de um único *locus* de desvios significativos na estimação da dinâmica populacional ancestral (Zemlak *et al.* 2011). Aumentar o número de *loci* analisados pode ser uma maneira eficiente de melhorar a acurácia e reduzir o erro da estimação de histórias populacionais (Ho & Shapiro 2011). A estimação da história demográfica das populações de *P. vivipara* da planície costeira do norte do Rio de Janeiro foi um primeiro passo para compreender possíveis mecanismos e processos responsáveis por influenciar dinâmicas de populações de sistemas costeiros. A ampliação do número de *loci* analisados, acrescentando regiões do genoma nuclear, é crucial para aumentar a confiabilidade da história populacional estimada e para aumentar a escala de tempo da dinâmica ancestral.

5. Conclusão

A demografia histórica de populações de *P. vivipara* da planície costeira do norte do Rio de Janeiro demonstrou que dinâmicas de populações ancestrais deixaram uma assinatura no genoma de seus representantes modernos. A história populacional da espécie revelou mudanças de regime no final do Quaternário que podem estar associadas a variações climáticas atuantes nessa escala de tempo. A hipótese de que flutuações no nível do mar geradas pelas mudanças climáticas do Quaternário influenciaram na demografia das populações mostrou-se plausível. Entretanto, estudos incluindo outras regiões do genoma e estudos sobre variações climáticas locais podem contribuir consideravelmente para estimativas mais confiáveis da história populacional de *P. vivipara* e sua potencial relação com eventos climáticos. A demografia histórica de *P. vivipara* exibiu um regime diferente do comumente observado em estudos sobre a dinâmica ancestral de espécies durante o Quaternário, revelando que populações de sistemas costeiros podem ter respondido de forma distinta as variações climáticas atuantes nessa escala de tempo.

Referências

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692-4693.
- Araújo, L. G., & Monteiro, L. R. (2013). Growth pattern and survival in populations of *Poecilia vivipara* (Teleostei; Poeciliidae) inhabiting an environmental gradient: a common garden study. *Environmental Biology of Fishes*, 96(8), 941-951.
- Auer, S. K., Arendt, J. D., Chandramouli, R., & Reznick, D. N. (2010). Juvenile compensatory growth has negative consequences for reproduction in Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecology Letters*, 13(8), 998-1007.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular markers: natural history and evolution*. Springer.
- Barnes, I., Matheus, P., Shapiro, B., Jensen, D., & Cooper, A. (2002). Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears. *Science*, 295(5563), 2267-2270.
- Bassar, R. D., Marshall, M. C., López-Sepulcre, A., Zandonà, E., Auer, S. K., Travis, J., Pringle, C. M., Flecker, A. S., Thomas, S. A., Fraser, D. F., & Reznick, D. N. (2010). Local adaptation in Trinidadian guppies alters ecosystem processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3616-3621.
- Bizerril, C. R. S. F., & Primo, P. B. S. (2001). Peixes de águas interiores do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. *PLANAGUA-FEMAR/SEMADS*, 417p.
- Blair, D., McMahon, A., McDonald, B., Tikel, D., Waycott, M., & Marsh, H. (2014). Pleistocene sea level fluctuations and the phylogeography of the dugong in Australian waters. *Marine Mammal Science*, 30(1), 104-121.
- Blanco-Pastor, J. L., Fernández-Mazuecos, M., & Vargas, P. (2013). Past and future demographic dynamics of alpine species: limited genetic consequences despite dramatic range contraction in a plant from the Spanish Sierra Nevada. *Molecular Ecology*, 22(16), 4177-4195.
- Breden, F., Ptacek, M. B., Rashed, M., Taphorn, D., & Figueiredo, C. A. (1999). Molecular Phylogeny of the Live-Bearing Fish Genus *Poecilia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12(2), 95-104.

- Burns, J. G., Di Nardo, P., & Rodd, F. H. (2009). The role of predation in variation in body shape in guppies *Poecilia reticulata*: a comparison of field and common garden phenotypes. *Journal of Fish Biology*, 75(6), 1144-1157.
- Clapperton, C. M., & Clapperton, C. (1993). *Quaternary geology and geomorphology of South America* (Vol. 25). Amsterdam etc.: Elsevier.
- Clark, P. U., Dyke, A. S., Shakun, J. D., Carlson, A. E., Clark, J., Wohlfarth, B., Mitrovica, J. X., Hostetler, S. W., & McCabe, A. M. (2009). The last glacial maximum. *Science*, 325(5941), 710-714.
- Debruyne, R., Chu, G., King, C. E., Bos, K., Kuch, M., Schwarz, C., Szpak, P., Gröcke, D. R., Matheus, P., Zazula, G., Guthrie, D., Froese, D., Buigues, B., Marliave, C., Flemming, C., Poinar, D., Fisher, D., Southon, J., Tikhonov, N., MacPhee, R. D. E., & Poinar, H. N. (2008). Out of America: ancient DNA evidence for a new world origin of late quaternary woolly mammoths. *Current Biology*, 18(17), 1320-1326.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B., & Pybus, O. G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5), 1185-1192.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 214.
- Dupanloup, I., Schneider, S., & Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11(12), 2571-2581.
- Gattepaille, L. M., Jakobsson, M., & Blum, M. G. (2013). Inferring population size changes with sequence and SNP data: lessons from human bottlenecks. *Heredity*, 110(5), 409-419.
- Gomes-Jr, J. L., & Monteiro, L. R. (2007). Size and fecundity variation in populations of *Poecilia vivipara* Block & Schneider (Teleostei; Poeciliidae) inhabiting an environmental gradient. *Journal of Fish Biology*, 71(6), 1799-1809.
- Hall, T. (2005). BioEdit. Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP. URL <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.

- Hendry, A. P., Kelly, M. L., Kinnison, M. T., & Reznick, D. N. (2006). Parallel evolution of the sexes? Effects of predation and habitat features on the size and shape of wild guppies. *Journal of Evolutionary Biology*, 19(3), 741-754.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913.
- Ho, S. Y., & Shapiro, B. (2011). Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 423-434.
- Hofreiter, M., & Stewart, J. (2009). Ecological change, range fluctuations and population dynamics during the Pleistocene. *Current Biology*, 19(14), R584-R594.
- Hollatz, C., Vilaca, S. T., Redondo, R. A., Marmontel, M., Baker, C. S., & Santos, F. R. (2011). The Amazon River system as an ecological barrier driving genetic differentiation of the pink dolphin (*Inia geoffrensis*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 102(4), 812-827.
- Houde, A. E. (1997). Sex, color, and mate choice in guppies. *Princeton University Press*.
- Hudson, R. R. (1983). Testing the constant-rate neutral allele model with protein sequence data. *Evolution*, 37(1), 203-217.
- Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217, 624-626.
- Kingman, J. F. (1982). On the genealogy of large populations. *Journal of Applied Probability*, 19, 27-43.
- Kottler, V. A., Fadeev, A., Weigel, D., & Dreyer, C. (2013). Pigment pattern formation in the guppy, *Poecilia reticulata*, involves the Kita and Csf1ra receptor tyrosine kinases. *Genetics*, 194(3), 631-646.
- Langerhans, R. B. (2010). Predicting evolution with generalized models of divergent selection: a case study with poeciliid fish. *Integrative and Comparative Biology*, 50(6), 1167-1184.
- Ledru, M. P., Rousseau, D. D., Cruz Jr, F. W., Riccomini, C., Karmann, I., & Martin, L. (2005). Paleoclimate changes during the last 100,000 yr from a record in the Brazilian Atlantic rainforest region and interhemispheric comparison. *Quaternary Research*, 64(3), 444-450.

- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Lucinda, P. H. F. (2003). Family Poeciliidae. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs*, 729p., 555-581.
- Lucinda, P. H. F., & Reis, R. E. (2005). Systematics of the subfamily Poeciliinae Bonaparte (Cyprinodontiformes: Poeciliidae), with an emphasis on the tribe Cnesterodontini Hubbs. *Neotropical Ichthyology*, 3(1), 1-60.
- Martin, L., Suguio, K., Flexor, J. M., & Dominguez, J. M. L. (1997). Geologia do quaternário costeiro do litoral norte do estado do Rio de Janeiro e Espírito Santos. *Coedição CPRM e FAPESP. Belo Horizonte, MG*.
- Mayle, F. E., Burn, M. J., Power, M., & Urrego, D. H. (2009). Vegetation and fire at the Last Glacial Maximum in tropical South America. In *Past Climate Variability in South America and Surrounding Regions* (pp. 89-112). Springer Netherlands.
- Mazzoni, R., & Iglesias-Rios, R. (2002). Distribution pattern of two fish species in a coastal stream in southeast Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 62(1), 171-178.
- Meredith, R. W., Pires, M. N., Reznick, D. N., & Springer, M. S. (2010). Molecular phylogenetic relationships and the evolution of the placenta in *Poecilia* (*Micropoecilia*) (Poeciliidae: Cyprinodontiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(2), 631-639.
- Monteiro, L. R., & Gomes-Jr, J. L. (2005). Morphological divergence rate tests for natural selection: uncertainty of parameter estimation and robustness of results. *Genetics and Molecular Biology*, 28(2), 345-355.
- Neves, F. M., & Monteiro, L. R. (2003). Body shape and size divergence among populations of *Poecilia vivipara* in coastal lagoons of south-eastern Brazil. *Journal of Fish Biology*, 63(4), 928-941.
- Nielsen, E. & Slatkin, M. (2013). An introduction to population genetics: theory and applications. *Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, MA, USA*.
- Palkovacs, E. P., Marshall, M. C., Lamphere, B. A., Lynch, B. R., Weese, D. J., Fraser, D. F., Reznick, D. N., Pringle, C. M., & Kinnison, M. T. (2009). Experimental evaluation of evolution and coevolution as agents of ecosystem change in Trinidadian

streams. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1523), 1617-1628.

Pardiñas, U. F., Teta, P., D'elía, G., & Lessa, E. P. (2011). The evolutionary history of sigmodontine rodents in Patagonia and Tierra del Fuego. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(2), 495-513.

Parenti, L. R. & Rauchenberger, M. (1989). Systematic overview of the Poeciliines. In *The Ecology and Evolution of Poeciliid Fishes (Poeciliidae)* (Meffe, A. & Snelson, F. F., eds), 3-12. New Jersey: Prentice Hall.

Pybus, O. G., & Rambaut, A. (2002). GENIE: estimating demographic history from molecular phylogenies. *Bioinformatics*, 18(10), 1404-1405.

Pybus, O. G., Rambaut, A., & Harvey, P. H. (2000). An integrated framework for the inference of viral population history from reconstructed genealogies. *Genetics*, 155(3), 1429-1437.

Rosen, D. E., & Bailey, R. M. (1963). The poeciliid fishes (Cyprinodontiformes): their structure, zoogeography, and systematics. *Bulletin of the AMNH; v. 126, article 1*.

Ruzzante, D. E., Walde, S. J., Gosse, J. C., Cussac, V. E., Habit, E., Zemplak, T. S., & Adams, E. D. (2008). Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology*, 17(9), 2234-2244.

Ruzzante, D. E., Walde, S. J., Macchi, P. J., Alonso, M., & Barriga, J. P. (2011). Phylogeography and phenotypic diversification in the Patagonian fish *Percichthys trucha*: the roles of Quaternary glacial cycles and natural selection. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(2), 514-529.

Schories, S., Meyer, M. K., & Schartl, M. A. N. F. R. E. D. (2009). Description of *Poecilia (Acanthophaeus) obscura* (Teleostei: Poeciliidae), a new guppy species from western Trinidad, with remarks on *P. wingei* and the status of the "Endler's guppy". *Zootaxa*, 2266, 35-50.

Sérsic, A. N., Cosacov, A., Cocucci, A. A., Johnson, L. A., Pozner, R., Avila, L. J., Sites Jr., J. W., & Morando, M. (2011). Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(2), 475-494.

Shapiro, B., Drummond, A. J., Rambaut, A., Wilson, M. C., Matheus, P. E., Sher, A. V., Pybus, O. G., Gilbert, M. T. P., Barnes, I., Binladen, J., Willerslev, E., Hansen, A. J., Baryshnikov, G. F., Burns, J. A., Davydov, S., Driver, J. C., Froese, D. G., Harington, C. R., Keddie, G., Kosintsev, P., Kunz, M. L., Martin, L. D., Stephenson, R. O., Storer, J., Tedford, R., Zimov, S., & Cooper, A. (2004). Rise and fall of the Beringian steppe bison. *Science*, 306(5701), 1561-1565.

Silva, L. H. D. S., Alves, S. A. P. M. D. N., Magina, F. C., & Gomes, S. B. V. C. (2013). Composição cianobacteriana e química dos estromatólitos da lagoa Salgada, Neógeno do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Geologia USP. Série Científica*, 13(1), 95-106.

Stiller, M., Baryshnikov, G., Bocherens, H., d'Anglade, A. G., Hilpert, B., Münzel, S. C., Pinhasi, R., Rabeder, G., Rosendahl, W., Trinkaus, E., Hofreiter, M., & Knapp, M. (2010). Withering away—25,000 years of genetic decline preceded cave bear extinction. *Molecular Biology and Evolution*, 27(5), 975-978.

Strimmer, K., & Pybus, O. G. (2001). Exploring the demographic history of DNA sequences using the generalized skyline plot. *Molecular Biology and Evolution*, 18(12), 2298-2305.

Stuart, A. J., Kosintsev, P. A., Higham, T. F. G., & Lister, A. M. (2004). Pleistocene to Holocene extinction dynamics in giant deer and woolly mammoth. *Nature*, 431(7009), 684-689.

Suzuki, M. S., Ovalle, A. R. C., & Pereira, E. A. (1998). Effects of sand bar openings on some limnological variables in a hypertrophic tropical coastal lagoon of Brazil. *Hydrobiologia*, 368(1-3), 111-122.

Suzuki, M. S., Figueiredo, R. O., Castro, S. C., Silva, C. F., Pereira, E. A., Silva, J. A., & Aragon, G. T. (2002). Sand bar opening in a coastal lagoon (Iquipari) in the northern region of Rio de Janeiro State: hydrological and hydrochemical changes. *Brazilian Journal of Biology*, 62(1), 51-62.

Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2), 437-460.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.

Tobler, M. (2008). Divergence in trophic ecology characterizes colonization of extreme habitats. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95(3), 517-528.

Turner, K. J., Fogwill, C. J., McCulloch, R. D., & Sugden, D. E. (2005). Deglaciation of the eastern flank of the north patagonian icefield and associated continental-scale lake diversions. *Geografiska Annaler: Series A, Physical Geography*, 87(2), 363-374.

Zemlak, T. S., Habit, E. M., Walde, S. J., Carrea, C., & Ruzzante, D. E. (2010). Surviving historical Patagonian landscapes and climate: molecular insights from *Galaxias maculatus*. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 67-84.

Zemlak, T. S., Walde, S. J., Habit, E. M., & Ruzzante, D. E. (2011). Climate-induced changes to the ancestral population size of two Patagonian galaxiids: the influence of glacial cycling. *Molecular Ecology*, 20(24), 5280-5294.