

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

INDIANARA CARNIEL DA SILVA

DNA BARCODING PARA DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES CONGÊNERAS DE
Cambeva (TELEOSTEI)

DOIS VIZINHOS

2021

INDIANARA CARNIEL DA SILVA

**DNA BARCODING PARA DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES CONGÊNERAS DE
Cambeva (TELEOSTEI)**

DNA barcoding for discrimination of *Cambeva* species (Teleostei)

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias I /Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Elton Celton de Oliveira.

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia.

DOIS VIZINHOS

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



INDIANARA CARNIEL DA SILVA

DNA BARCODING PARA DISCRIMINAÇÃO DE ESPÉCIES CONGÊNERAS DE CAMBEVA (TELEOSTEI)

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra Em Ciências Agrárias da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Agroecossistemas.

Data de aprovação: 22 de Setembro de 2021

Prof Elton Celton De Oliveira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Thais Fernandes Mendonca Mota, Doutorado - Universidade Estadual do Paraná (Unespar)

Prof Thomaz Mansini Carrenho Fabrin, Doutorado - Leibniz Institute For Neurobiology

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 27/09/2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me ajudar em mais uma etapa, pelas orações e pedidos que ouviu e me ajudou.

Agradeço aos meus pais Aldoino Rodrigues e Terezinha Carniel, pelo imenso apoio e incentivo que me deram no decorrer de todos os meus estudos, que acreditaram em mim mesmo nos momentos que eu não acreditava ser possível. Que me ajudaram no que eles puderam, acompanharam e se preocuparam com o andamento do trabalho, com a fiscalização nos covos, com as noites no laboratório, sem eles não teria conseguido.

Agradeço ao meu namorado Taylon Antunes, por todas as vezes que me ouviu reclamando que uma análise não dava certo, ou que não tinha peixes nos covos, mas sempre me consolou dizendo que eu iria conseguir e sempre esteve do meu lado disposto a ajudar.

Agradeço imensamente aos meus orientadores Prof^a Dr^a Nédia de Castilhos Ghisi, Prof^o Dr^o Elton Celton de Oliveira e Prof^o Dr^o Thiago Cintra Maniglia, por toda ajuda que me deram, pelo conhecimento recebido, por se disponibilizarem a conversarmos via meet devido a pandemia, a todo apoio para realização deste trabalho e principalmente por não desistirem de mim.

Agradeço também ao meu melhor amigo Alex Bachi por todos os conselhos, incentivo e apoio, que está sempre me acompanhando desde a graduação.

Agradeço a UTFPR pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo espaço e pelo fomento da bolsa de incentivo a defesa do mestrado, a Fundação Araucária pelo financiamento do projeto contemplado no Edital PROPG 11/2016 - PROGRAMA DE PESQUISA BÁSICA E APLICADA NO ÂMBITO DA UTFPR em conformidade com a Chamada Pública n. 09/2016-Fundação Araucária; Lieb- Laboratório de Ictiologia, Ecologia e Biomonitoramento (UNIOESTE - Paraná) e Laboratório de Análises Biológicas e Biologia Molecular (BioMol) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“É a direção da vela, e não o
sopro da tempestade, que
determina o seu curso na
vida”*

RANDY DAVIS

RESUMO

O rio Iguaçu é um curso d'água com várias quedas de água e sua geomorfologia permitiu um elevado endemismo da ictiofauna. Sua exuberante foz, as Cataratas do Iguaçu, tornam a bacia conhecida mundialmente, com grande apelo ao turismo, sendo extremamente importante ainda para o fornecimento básico de água, produção de energia elétrica, pesca, agricultura, dentre outros. Devido a esta grande utilização dos seus recursos também recebe altas cargas de poluição antrópica, sendo catalogado como o segundo rio mais poluído do Brasil. Dentre as espécies endêmicas de peixes encontradas no rio Iguaçu está o *Cambeva mboyacy*, a qual encontra-se em risco de extinção (categoria em perigo), sem estudos a seu respeito. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi utilizar a técnica de DNA Barcoding para avaliar a diversidade genética e compreender os padrões filogeográficos de espécies de peixes do gênero *Cambeva* e comparar com populações de dois locais geograficamente separados na região do Baixo Iguaçu. Os animais foram obtidos em tributários localizados nas cidades de Dois Vizinhos e Cascavel, nas regiões sudoeste e oeste do estado do Paraná, respectivamente. Foram coletados 113 indivíduos e realizado a extração do DNA a partir de um fragmento de músculo do peixe. Após isso, o DNA individual foi amplificado por PCR, utilizando um fragmento do gene COI. O DNA amplificado foi sequenciado e 45 amostras foram obtidas. As sequências foram editadas e alinhadas manualmente com o programa BioEdit, comparadas por meio do programa MEGA X e a árvore filogenética foi construída utilizando algoritmo neighbor-joining. As sequências de DNA barcoding, juntamente com outras informações, serão disponibilizadas no banco de dados mundial para os peixes; Fish Barcode of Life Initiative (FISH-BOL). Percebeu-se que as variações genéticas observadas nas espécies de *Cambeva* associaram-se às localidades, sendo possível observar através da árvore filogenética, ao invés de espécies, deixando sugestivamente que a geomorfologia do rio Iguaçu impõe uma barreira geográfica para a troca gênica, contribuindo para o processo de especiação do gênero e aumentando o endemismo.

Palavras-chave: dendograma; endemismo; poluição; especiação.

ABSTRACT

The Iguaçu River is a watercourse with several waterfalls and its geomorphology allowed a high endemism of the ichthyofauna. Its exuberant mouth, the Iguaçu Falls, make the basin known worldwide, with great appeal to tourism, being extremely important for the basic supply of water, production of electricity, fishing, agriculture, among others. Due to this great use of its resources, it also receives high loads of anthropogenic pollution, being ranked as the second most polluted river in Brazil. Among the endemic species of fish found in the Iguaçu River is the *Cambeva mboycy*, which is at risk of extinction (endangered category), with no studies about it. In this sense, the aim of the present work was to use the technique of DNA Barcoding to assess the genetic diversity and understand the phylogeographic patterns of fish species of the genus *Cambeva* and compare them with populations from two geographically separated locations in the Baixo Iguaçu region. The animals were obtained from tributaries located in the cities of Dois Vizinhos and Cascavel, in the southwest and west regions of the state of Paraná, respectively. 113 individuals were collected and DNA extraction from a fish muscle fragment was performed. After that, the individual DNA was amplified by PCR, using a fragment of the COI gene. Amplified DNA was sequenced and 45 samples were obtained. The sequences were edited and aligned manually with the BioEdit program, compared using the MEGA X program and the phylogenetic tree was built using the neighbor-joining algorithm. The barcoding DNA sequences, along with other information, will be made available in the world fish database; Fish Barcode of Life Initiative (FISH-BOL). It was noticed that the genetic variations observed in *Cambeva* species were associated with localities, making it possible to observe through the phylogenetic tree, instead of species, suggesting that the geomorphology of the Iguaçu River imposes a geographic barrier to gene exchange, contributing to the speciation process of the genus and increasing endemism

Keywords: dendrogram; endemism; pollution; speciation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Bacia do Rio Iguaçu delimitando as suas porções: baixo, médio e alto	16
Figura 2 - Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Iguaçu	16
Figura 3 - Ponto de coleta no rio Jirau Alto, Dois Vizinhos-PR	22
Fotografia 1 - Indivíduo coletado e alguns procedimentos da identificação	23
Fotografia 2 - Gel de eletroforese com amostras amplificadas com sucesso a partir do gene COI. O número de identificação das amostras segue a tabela 1	29
Quadro 1 - Distância genética entre e dentre os grupos amostrados	32
Figura 4 - Árvore Filogenética. Círculos indicam animais coletados e sua origem: preto= Rio Jirau Alto; vermelho= rio Afluente de Quati; verde= Rio Pedregulho do Iguaçu; azul= Rio São José; roxo = rio Arquimedes; laranja = Rio Bom Retiro. Triângulos representam os indivíduos obtidos em bancos de dados	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação e dados morfométricos dos 45 indivíduos das espécies do gênero *Cambeva* sequenciadas neste estudo. N° = identificação do indivíduo; P(g) = peso em gramas; Ct e Cp(cm) = comprimento total e padrão, em centímetros 28

Tabela 2 - Estimativa de máxima verossimilhança da matriz de substituição..... 30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral.....	14
2.2	Objetivos específicos.....	14
3	REVISÃO DE LITERATURA / REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	Rio Iguaçu.....	15
3.2	Siluriformes: <i>Trichomycterus/Cambeva</i>.....	18
3.3	Diversidade genética e técnicas moleculares (COI)	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1	Área de estudo	21
4.2	Procedimentos de coleta e identificação dos exemplares	22
4.3	Extração do DNA.....	23
4.4	Gel eletroforese e PCR.....	25
4.5	Purificação das amostras com Polietilenoglicol 8000 à 20% (PEG) e preparação para posterior envio para sequenciamento.....	25
4.6	Análises moleculares.....	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

O rio Iguaçu é famoso devido as Cataratas do Iguaçu, considerada sétima maravilha do mundo e a maior queda d'água do planeta. O rio Iguaçu é formado pelos rios Atuba e Iraí e termina no rio Paraná, localizado no município de Foz do Iguaçu, e seu curso está dividido nas regiões: Alto (Curitiba e região metropolitana), Médio (Porto Amazonas à União da Vitória) e Baixo Iguaçu (União da Vitória à Foz do Iguaçu). Possui alta taxa de endemismo devido as barreiras naturais impostas, ou seja, a maioria das espécies de peixes (cerca de 75%) são exclusivas deste rio (BAUMGARTNER *et al.*, 2012).

Atualmente, o rio Iguaçu e seus recursos são utilizados de forma excessiva, desde o abastecimento básico de água a usos para irrigação de lavouras, despejos de efluentes urbanos e industriais de cidades do entorno, despejos de resíduos químicos e agropecuários, construção de barragens para usinas hidrelétricas e ainda é utilizado como ponto recreativo (BAUMGARTNER *et al.*, 2012; DELARIVA *et al.*, 2018; FREIRE *et al.*, 2015).

Dentre as espécies endêmicas presentes na bacia do rio Iguaçu, os Trichomycterídeos já possuem alguns estudos publicados na literatura científica e algumas das espécies deste grupo demonstram urgência no conhecimento de sua biologia por estarem em grande risco de extinção e com pouquíssimas informações concretas e aprofundadas a seu respeito (DELARIVA *et al.*, 2018; MORAIS-SILVA *et al.*, 2018).

O gênero *Trichomycterus* sofreu uma alteração taxonômica recente, sendo algumas de suas espécies caracterizadas em um novo gênero em 2018, o qual foi denominado de *Cambeva*, com base em novos caracteres morfológicos. Este também possui espécies endêmicas do Rio Iguaçu e inclui 25 espécies outrora pertencentes ao gênero *Trichomycterus*. Devido à proximidade morfológica e genética, torna-se indispensável avaliar a diversidade genética entre e dentro os grupos (COSTA *et al.*, 2020 e KATZ *et al.*, 2018). A partir deste ponto na escrita desta dissertação, haverá a padronização da nomenclatura para *Cambeva* e esta será aplicada, a não ser em casos em que os autores na fonte original citaram como *Trichomycterus*.

Para conhecer melhor a diversidade genética intra e interespecífica é indicada a utilização do DNA barcoding, que têm por objetivo o

sequenciamento de regiões específicas de DNA e o registro genético das espécies em uma plataforma mundial.

A capacidade de analisar a diversidade genética de espécies presentes em um determinado ecossistema, depende do entendimento de suas estruturas funcionais, suas características e as pressões evolutivas infringidas as populações. A arquitetura dos rios possibilita uma alta diversidade de peixes, tornando este um fator de diferenciação genética, ou seja, o ambiente e a sua formação interferem na filogeografia destes animais (MORAIS-SILVA *et al.*, 2018).

Os peixes representam um pouco mais da metade de todas as espécies de animais vertebrados. Diante de toda esta diversidade de peixes, a Iniciativa Fish Barcode of Life (FISH-BOL) busca um esforço colaborativo de pesquisas internacionais com o cunho de oferecer uma biblioteca de referência de códigos de barras de DNA, ou seja, DNA *barcoding*, para todas as espécies. Este sistema FISH-BOL favorece o acesso rápido em identificações a nível molecular da ictiofauna mundial (IVANOVA *et al.*, 2007).

O DNA *barcoding* propõe um sistema de identificação de espécies utilizando um pequeno trecho de DNA padronizado no genoma - em animais, 648 pb do gene mitocondrial citocromo C Oxidase 1 ("COI"). A vantagem de usar o COI é por ser uma porção de DNA curta o suficiente para ser sequenciada de forma rápida, e longa o suficiente para identificar variações entre as espécies (GOMES, 2011). O gene COI é o marcador molecular mais utilizado mundialmente para sequenciamento genético de espécies de animais por possuir baixas taxas de distância genética intraespecíficas. É utilizada atualmente em estudos populacionais e identificação de espécies, o que se pode corroborar com os trabalhos de Costa *et al.* (2020); Ochoa *et al.* (2017); Costa *et al.* (2021); Katz *et al.* (2018).

As sequências do DNA *barcoding* obtidas para cada espécie, juntamente com outras informações, devem ser disponibilizadas em bancos de dados mundial referentes a diversos grupos biológicos (<https://www.ibol.org/phase1/about-us/campaigns/>). Para os peixes, o banco de dados da FISH-BOL cadastrou mais de 5.000 espécies (<http://www.fishbol.org/>). As sequências disponíveis são utilizadas para formação do código de barras e assim, é possível confrontar um espécime desconhecido com as sequências

COI e identificá-lo, ainda comparando entre indivíduos de mesmo gênero, obtendo-se uma relação de diversidade dentro da espécie (WARD *et al.*, 2005).

Diante da importância de se levantar informações a respeito da ictiofauna endêmica, em que há espécies ameaçadas de extinção, e visando a preservação da bacia do Rio Iguaçu, o presente estudo tem por objetivo utilizar a técnica de DNA *barcoding* para avaliar a diversidade genética de espécie de peixes do gênero *Cambeva* de dois locais do Baixo Iguaçu, separados geograficamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Utilizar a técnica de DNA *barcoding* para avaliar a diversidade genética de espécies de peixes do gênero *Cambeva* e comparar com populações de dois locais geograficamente separados na bacia do Baixo Rio Iguaçu.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a variabilidade genética nas populações de *Cambeva* amostradas em comparação com outras espécies do gênero;
- Avaliar a distância genética de espécies de *Cambeva* se diferem intra e interespecíficas;
- Obter sequências deste gênero disponíveis em banco de dados mundiais e incorporá-los as análises;
- Depositar estas sequências no banco de dados genético global e comparar com espécies do mesmo gênero, obtendo assim um índice de diversidade genética para as espécies de *Cambeva*;
- Avaliar se a geomorfologia das localidades amostradas influencia nos padrões filogeográficos das espécies estudadas;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Rio Iguaçu

A bacia hidrográfica do rio Iguaçu está totalmente inserida no Bioma “Mata Atlântica”, um dos dois *hot spots* brasileiros de biodiversidade, e atravessa de leste a oeste o estado do Paraná. Esse bioma possui elevadas taxas de endemismos, um histórico de uso excessivo dos recursos naturais e de intensa mudança no uso do solo, restando atualmente apenas 7% de áreas primárias (WARD *et al.*, 2005). Este contexto, associado à geomorfologia do rio Iguaçu, torna a região especialmente importante para estudos científicos sobre taxonomia, diversidade genética e conservação da ictiofauna, visto que 75% das espécies são endêmicas desta bacia (BAUMGARTNER *et al.*, 2012).

A bacia do Rio Iguaçu faz parte do sistema hidrográfico do Rio Paraná e possui extensão de 72.000 km², localizado no sul do Brasil, mais especificamente entre os estados do Paraná e Santa Catarina e nordeste da Argentina. O Rio Iguaçu percorre 101 municípios (IPARDES, 2007), ao longo de uma extensão de cerca de 1.300 km, que utilizam as suas águas para a agricultura, captação de água e também para o lançamento de efluentes, muitas vezes não tratados, os quais são responsáveis por fontes pontuais ou difusas de poluição.

As navegações pelo Rio Iguaçu, iniciaram-se no século XIX, facilitando a ocupação do Sul do Paraná, formando cidades, e possibilitando o comércio, nos ciclos econômicos da madeira e da erva-mate. Após o fim das navegações iniciou a implementação de usinas hidrelétricas no decorrer de seu curso, a citar as usinas do Salto Caxias, Salto Osório, Salto Santiago, Foz de Areia e Salto Segredo. Assim, o Estado tornou-se um polo Hidrelétrico responsável por cerca de 41% da energia produzida no Paraná (MERENDA, 2004).

O rio Iguaçu é formado pelos rios Atuba e Iraí e termina no rio Paraná, localizado no município de Foz do Iguaçu (BAUMGARTNER *et al.*, 2012). O rio Iguaçu, é dividido em: baixo, médio e alto, como mostra a figura 1. O alto rio Iguaçu compreende as suas nascentes, que inicia-se em Curitiba até o município de Porto Amazonas; logo em seguida se inicia o médio Iguaçu até

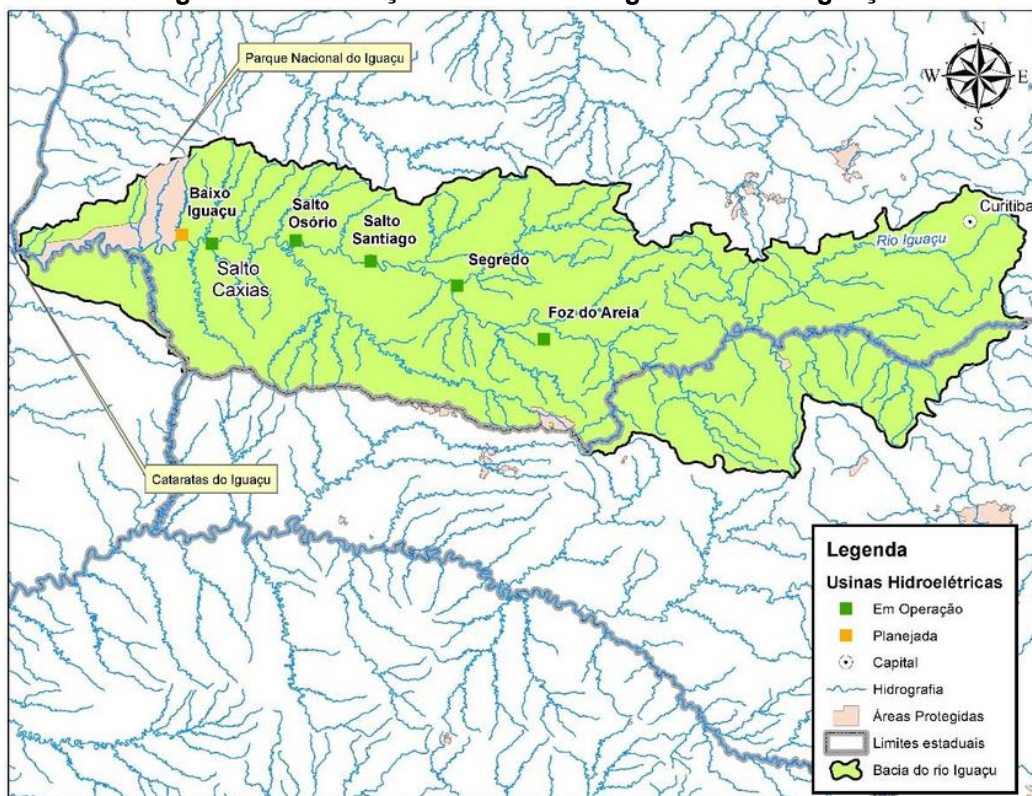
União da Vitória, local em que se inicia o baixo rio Iguazu até sua foz próximo do rio Paraná, como mostra a figura. 2.

Figura 1 - Bacia do Rio Iguazu delimitando as suas porções: baixo, médio e alto.



Fonte: Secretaria Estadual do Meio Ambiente-SEMA (2010).

Figura 2 - Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Iguazu.



Fonte: Guimarães e Guimarães (2013)

O Baixo Iguaçu fica localizado na unidade geomorfológica do Brasil Meridional denominada de Terceiro Planalto, no qual é possível identificar diversas fraturas provocadas pelo derramamento de lava ocorrido há cerca de 130 milhões de anos atrás, no período Cretáceo. A subida do magma foi a responsável pela formação das fissuras, formando camadas de rochas basálticas, processo chamado de Serra Geral, estas camadas formaram as diversas cachoeiras e quedas (PAROLIN; RIBEIRO; LEANDRINI, 2010) registradas para essa região da bacia, conferindo-lhe alta energia e isolamento de diversos locais por barreiras geográficas.

Situada a sul do Arco de Ponta Grossa, a área estudada foi palco da influência daquela estrutura mediante a formação de um corredor de denso fraturamento SE-NW a E-W, o qual passou a controlar o curso inferior do Rio Iguaçu e de seus tributários (BRITO *et al.*, 2006). O fluxo nos canais do rio Iguaçu nesta região é controlado pelo declive do planalto para oeste, e os seus tributários pelo suave declive dos derrames de basalto locais. O Baixo rio Iguaçu tem vales estreitos e encaixados, com encostas abruptas, a maioria está claramente controlada por falhas e fraturas. Estas falhas e fraturas nesta região, favorecem a formação de saltos e corredeiras, algumas atualmente aproveitadas para a instalação de hidroelétricas locais, como as dos Saltos Caxias e Santiago (BRITO *et al.*, 2006). Estes saltos e corredeiras impuseram barreiras geográfica ao fluxo gênico dentro do rio Iguaçu e seus afluentes.

O Rio Iguaçu é conhecido pelas Cataratas do Iguaçu, maior queda d'água do planeta, catalogada como uma das sete maravilhas do mundo, responsável pela formação de 272 quedas com 72 metros de desvio médio. Em consequência da formação das Cataratas, o rio Iguaçu possui uma história biogeográfica de peixes que evoluíram separadamente do rio Paraná. Essa separação permitiu a formação da ictiofauna endêmica de peixes (DELARIVA *et al.*, 2018). No entanto, tal biodiversidade está ameaçada devido a ações antrópicas. Como consequência, segundo Freire *et al.* (2015) o rio Iguaçu já foi considerado o segundo rio mais poluído do Brasil. Isto resulta da grande quantidade de poluição despejada nesta região, de origem agrícola, urbana e industrial, podendo assim influenciar e acelerar a extinção de espécies que ainda não foram totalmente estudadas.

De acordo com Yamamoto *et al.* (2018), o Rio Iguaçu possui diversos

usos, como abastecimento de água para consumo humano, populações endêmicas, potencial para geração de energia e outras como recreação e descarte de efluentes tratados (ou não), ressaltando-se a importância socioeconômica e ambiental do Rio Iguaçu. Justifica-se deste modo a intensa preocupação com a conservação deste ambiente aquático.

Brandimarte; Santo (2012) ainda trazem que o principal responsável pela poluição aquática são as atividades humanas que utilizam os corpos aquáticos como receptor final desses efluentes, sendo em parte letais para a biota. Diz ainda que a diversidade de organismos presentes é de suma importância para o ambiente, sendo responsável pelo vínculo estreito entre eles e crucial para o equilíbrio ambiental.

3.2 Siluriformes: *Trichomycterus/Cambeva*

A ordem Siluriformes é constituída de espécies de peixes de couro e placas ósseas, recorrentes em ambientes neotropicais e apresentam cerca de 2.800 espécies (BAUMGARTNER *et al.*, 2012). Na Bacia do Rio Iguaçu é representada por bagres, mandis e cascudos, representando grande diversidade neste local (BRITTO; SIROL; VIANNA, 2003; COSTA *et al.*, 2020; KATZ *et al.*, 2018; OCHOA *et al.*, 2017).

Trichomycteridae é a segunda família mais rica em espécies de bagres com cerca de 300 espécies válidas. Os Trichomycterídeos são organismos ecologicamente adaptados, que costumam habitar rios de corredeira e possuem alta taxa de endemismo (OCHOA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2020; KATZ *et al.*, 2018). Esta família apresenta espécies caracterizadas por possuir sistema opercular modificado, envolvendo a presença de odontodos no osso interopercular e opercular. Em estudos recentemente, *Trichomycterus* teve sua monofilia contestada e devido as características morfológicas e genéticas serem muito semelhantes, 25 espécies foram realocadas em um novo gênero, chamado de *Cambeva* em 2018, inclusive espécies do Rio Iguaçu (KATZ *et al.*, 2018). Desta maneira, ao longo deste trabalho será adotada esta nova nomenclatura para o gênero (COSTA *et al.*, 2020, 2021; OCHOA *et al.*, 2017, 2020; PARRA *et al.*, 2021).

Cambeva é composto por espécies que estavam previamente agrupadas

como *Trichomycterus* e compartilham uma condição apomórfica única que consiste nos tentáculos extensores originando-se exclusivamente da região etmoidal do neurocrânio (KATZ *et al.*, 2018). Na bacia do rio Iguaçu são encontradas 10 espécies, nove ocorrendo no Baixo Iguaçu e duas delas ainda sem definição para epíteto específico. Em comparação com outros gêneros de ocorrência em bacias similares, algumas espécies de *Cambeva* apresentam um formato peculiar do corpo, com o pedúnculo caudal muito alto, ultrapassando a cabeça e um tamanho maior que o comum (BAUMGARTNER *et al.*, 2012).

Dentre as várias espécies, *Cambeva mboyacy*, endêmico da bacia do rio Iguaçu se localiza no trecho baixo do Rio Iguaçu, descrita dentro da categoria 'EN': em perigo, na Lista Nacional de Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Portaria MMA nº 445/2014, nesta nominada de *Trichomycterus mboyacy*) (BRASIL, 2014). *Cambeva mboyacy*, segundo Wosiacki & Garavello (2004) é diferente de todas as outras espécies do gênero pela combinação de caracteres não exclusivos como: comprimentos da cabeça e pré-dorsal, 6 raios peitorais, primeiro raio peitoral não prolongado como filamento e nadadeira caudal arredondada.

3.3 Diversidade genética e técnicas moleculares (COI)

A capacidade de analisar a diversidade genética de um determinado ecossistema depende do entendimento de suas estruturas funcionais e das suas características geomorfológicas. A arquitetura dos rios possibilita uma alta diversidade de peixes, tornando este um fator de diferenciação genética, ou seja, o ambiente e a sua formação, bem como as pressões evolutivas infringidas as populações ao longo das gerações interferem na filogenia destes animais (MORAIS-SILVA *et al.*, 2018).

Diante da grande diversidade de peixes a Iniciativa Fish Barcode of Life (FISH-BOL) busca um esforço colaborativo de pesquisas internacionais com o cunho de oferecer uma biblioteca de referência de códigos de barras de DNA, ou seja, DNA *barcoding*, para todas as espécies. Este sistema FISH-BOL favorece o acesso rápido em identificações a nível molecular da ictiofauna mundial (IVANOVA *et al.*, 2007).

O DNA *barcoding* consiste na utilização de uma porção do DNA mitocondrial padronizado no genoma – em animais, 648 pb do gene citocromo C Oxidase 1 (COI).

Hebert *et al.* (2003) também afirmaram, em seu trabalho, que o princípio básico do COI é que a partir da seleção de apenas um gene se permite a identificação de espécies descritas e ajuda na busca por novas espécies. No entanto, o código de barras necessita que as sequências analisadas sejam mais próximas dentro da espécie estudada, do que as espécies diferentes, Ward *et al.* (2005) em seus estudos utilizando o gene COI, identificou diferentes espécies comerciais de peixes australianos e obteve resultados satisfatórios.

A vantagem de utilizar o gene COI no sequenciamento genético é seu tamanho, pequeno o suficiente para ser utilizado de forma rápida, e longo suficiente para identificar variações entre as espécies (GOMES, 2011). A utilização do COI permitiu a comparação de um código de barras e a comparação entre espécies de uma sequência particular ou então por uma sequência muito parecida, facilitando a identificação (WARD *et al.*, 2005).

De acordo com Morais-Silva *et al.* (2018), o gene COI é o marcador molecular mais utilizado mundialmente para sequenciamento genético de espécies de animais por possuir baixas taxas de distância genética intraespecíficas. O autor relata ainda que esta ferramenta é utilizada atualmente em estudos populacionais e identificação de espécies.

Além disso, temos visto que o DNA *barcoding* pode ser usado para outros fins além da identificação de indivíduos da mesma espécie e de novas espécies, ele também pode ser utilizado para identificação de larvas e juvenis, identificação de matéria prima de peixes, identificação de espécies exóticas invasoras e para delimitações de espécies (BARMAN *et al.*, 2018).

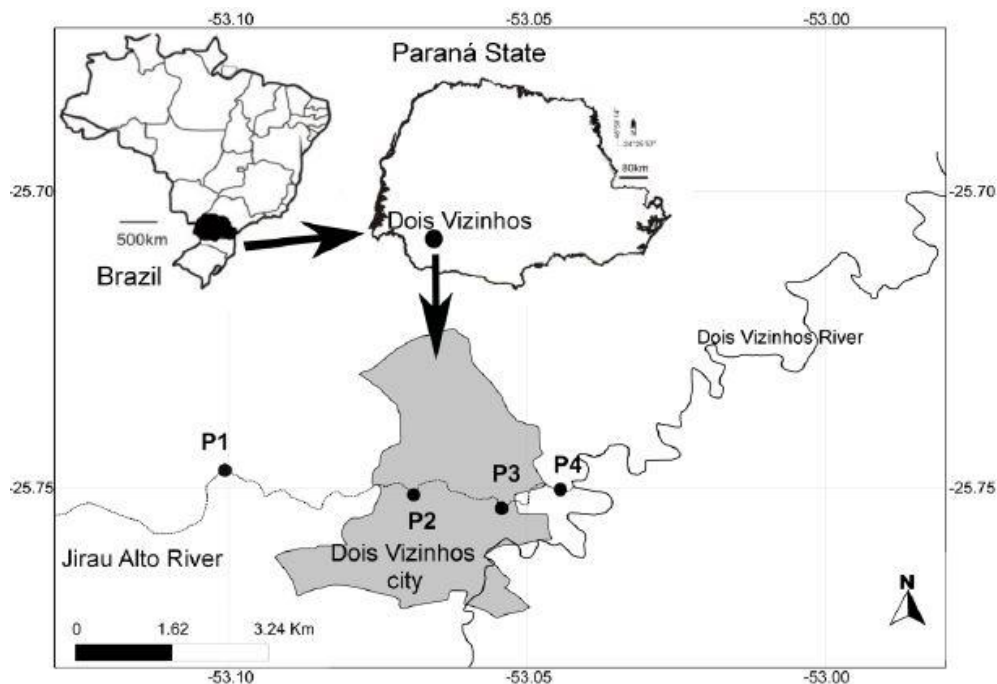
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Os locais determinados para captura dos animais foram selecionados por possuírem registros de ocorrência de espécies de *Cambeva*. Todos os animais foram coletados na bacia do Baixo Iguaçu, em duas cidades: 1) na cidade de Dois Vizinhos-PR, no rio Jirau Alto, ponto representado na Figura 3, pertencente a Unidade Hidrográfica dos Afluentes do Iguaçu; 2) na cidade de Cascavel-PR em outros cinco riachos, sendo eles: rio Afluente de Quati coordenadas latitude 25° 0'1.33"S e longitude 53°28'45.86"O; rio Pedregulho do Iguaçu latitude 25° 6'7.17"S e longitude 53°18'42.25"O; rio São José latitude 25° 0'43.32"S e longitude 53°19'50.53"O; rio Arquimedes latitude 25° 9'10.25"S e longitude 53°16'41.86"O e rio Bom Retiro latitude 25° 4'48.38"S e longitude 53°24'2.86"O.

A cidade de Dois Vizinhos fica localizada na região sudoeste do estado do Paraná, apresenta aproximadamente 418km² e cerca de 40.234 habitantes. O rio Jirau Alto nasce em zona rural e percorre todo o município, sendo também utilizado para captação da Companhia de Saneamento do Paraná - SANEPAR para abastecimento básico de água para toda a cidade. Alguns trechos do rio percorrem o perímetro urbano, recebendo grandes cargas de poluição antrópica oriunda da degradação das margens, descarte de efluentes industriais, resíduos de agroquímicos e esgoto (PIGOSSO *et al.*, 2009).

Figura 3 – Ponto de coleta no rio Jirau Alto, Dois Vizinhos-PR



Fonte: Oliveira et al. (2019)

4.2 Procedimentos de coleta e identificação dos exemplares

Os indivíduos de Dois Vizinhos foram coletados entre maio de 2018 e março de 2020, com auxílio de covos. Antes disso, o projeto foi submetido e aprovado junto a Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo nº 2018-13 CEUA/UTFPR). Ainda, para a realização deste estudo, obteve-se licença do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – (ICMBio, SISBIO) (nº 62556-1) e autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (nº 25039-1) para a coleta específica desse grupo de vertebrados, incluindo a espécie ameaçada.

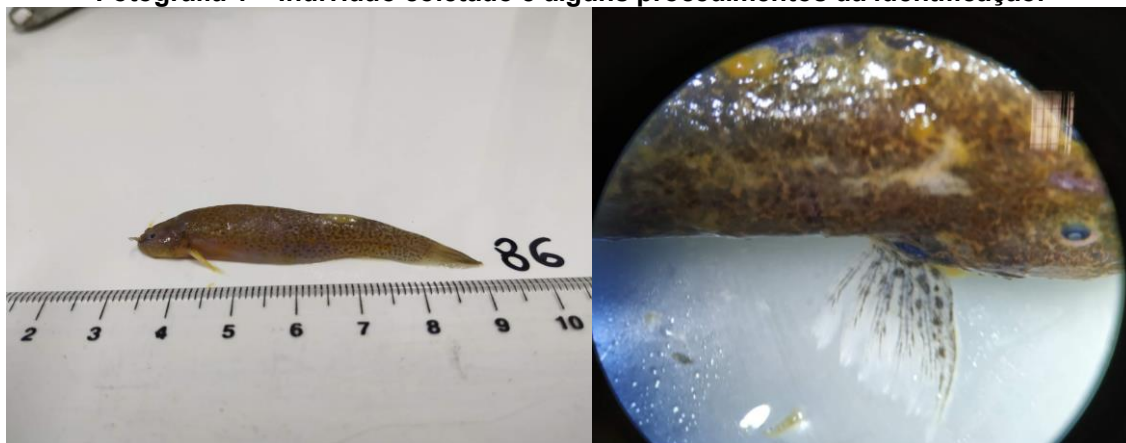
Foram realizadas coletas mensais, durante dias de lua cheia, no período uma semana a cada mês. Os covos foram expostos e revistados diariamente, sendo utilizado iscas para atrair os animais. Os covos foram escolhidos como ferramenta de captura diante do perfil do animal alvo, que são de tamanho bem reduzido e com hábitos demersais. Além disso, para atender a critérios éticos de bem-estar animal, os covos proporcionam aos animais capturados redução de sofrimentos desnecessários, não ficando machucados quando comparados com o método de captura como redes de espera. Nestas armadilhas, eles permanecem vivos, nadando livres dentro do espaço do covo, não estando

susceptíveis a predação. Nos casos em que outras espécies não alvo foram capturadas, estas estavam vivas e foram devolvidas ao seu local de origem.

Os indivíduos da cidade de Cascavel-PR foram obtidos a partir de uma parceria estabelecida com o Lieb- Laboratório de Ictiologia, Ecologia e Biomonitoramento da Universidade do Oeste do Estado do Paraná (UNIOESTE – Cascavel-PR). Esses animais foram coletados nos dias 23 e 29 de agosto de 2018 (Inverno de 2018) por meio de pesca elétrica e com a licença ambiental (IBAMA nº 25039-1). Após a coleta, os animais foram eutanasiados por resfriamento. De cada exemplar foram obtidos dados sobre: comprimento total (Lt), comprimento padrão (Ls) e peso total (Wt).

Os espécimes coletados foram identificados com base nas chaves propostas por Baumgartner *et al.* (2012) e devido ao seu tamanho não puderam ser depositados.

Fotografia 1 – Indivíduo coletado e alguns procedimentos da identificação.



Fonte: Autoria própria (2021)

4.3 Extração do DNA

Uma amostra do tecido muscular foi retirada no momento da identificação dos exemplares, fixada em álcool comercial puro e armazenadas sob refrigeração a -20°C até o momento da extração. O DNA foi extraído com Kit universal Wizard Promega®. Para a extração, a amostra foi fragmentada em pedaços pequenos dentro de um microtubo de 1,5ml, adicionou-se 400µl de solução de lise nuclear, com posterior maceração do músculo com o auxílio de um pestle até obter uma massa homogênea.

Após a obtenção da mistura, adicionou-se ao microtubo mais 200µl da solução de lise nuclear e 12,5 µl de Proteinase K, estes componentes realizam a primeira etapa de desintegração do tecido. O microtubo foi incubado em banho-maria a 55°C até todo o músculo ter sido completamente desintegrado, ou seja, aproximadamente 1 hora. Durante o período de incubação realizou-se inversões nos tubos a cada 15 minutos para homogeneizar. Centrifugou-se o tubo por 1 minuto a 8.000 rpm, para que os resíduos da reação de desintegração fossem precipitados e o material genético almejado permanecesse no sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5ml, e neste foi adicionado 1,5 µl solução de RNase e seguido de inversão gentil do tubo 3 vezes.

O material foi incubado novamente em banho-maria a 37°C por 30 minutos e, após a retirada as amostras, foram mantidas em temperatura ambiente por 5 minutos. Adicionou-se 200µl de solução de precipitação de proteína seguida de agitação com vórtex por 20 segundos em velocidade máxima. Posteriormente, acondicionou-se no gelo por 5 minutos e centrifugou-se o material por 4 minutos a 14000rpm. Neste processo, as proteínas são precipitadas no fundo do tubo e o sobrenadante, contendo o DNA, é transferido para um novo microtubo. Foram adicionados na amostra 300µl de Isopropanol a temperatura ambiente, invertendo-se gentilmente o tubo até observar uma massa gelatinosa visível - o DNA extraído.

Centrifugou-se então o tubo a 14.000rpm por 1 min, e assim o DNA livre de resíduos se depositou no fundo do tubo. Por fim, adicionou-se 600µl de etanol 70% (MERCK) em temperatura ambiente e se inverteu gentilmente o tubo com o DNA, com nova centrifugação a 14.000rpm por 2 minutos. Retirou-se o sobrenadante com cuidado utilizando uma micropipeta. Inverteu-se o tubo em um papel absorvente até secar totalmente.

Por fim, adicionou-se 70µl da solução para reidratação do DNA, responsável por conservar o DNA, e homogeneizou-se a amostra com auxílio de uma pipeta, cuidadosamente para não criar bolhas de ar, sendo estocadas as amostras em freezer para mantê-las congeladas.

4.4 Gel eletroforese e PCR

Com as amostras de DNA extraídas, realizou-se eletroforese com todas as amostras para evidenciar o sucesso nas extrações. Para este processo utilizou-se gel de agarose a 1%. Para o padrão Ladder adicionou-se 3 µl de corante de DNA Gel Red (Biotium®) e 5 µl de Ladder 100 pb (Cellco®). Para as amostras foi adicionado 3 µl de Loading Buffer 1 x, 3 µl Gel red (Biotium®) e 5 µl da amostra de DNA extraído. As amostras correram no gel por 40 minutos e depois foram fotografadas utilizando Transiluminador e Fotodocumentador Locus, e o programa LPix-STi. Para as amostras em que não foram obtidas bandas de DNA, realizamos o processo de extração novamente.

O DNA genômico extraído foi utilizado para amplificação de fragmentos do gene COI com os primers descritos por Ward *et al.* (2005). As condições para a reação de PCR foram as descritas por Prioli *et al.* (2002). A mistura de reação para PCR foi constituída de Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8,4 com 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 mM de cada primer (FishF1-5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' e FishR1-5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3'), 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U Taq DNA polimerase, 15 ng de DNA e água milliQ para completar o volume para 25 µL. Para cada exemplar foram realizadas duas reações independentes e um controle negativo em cada experimento, consistindo em reação de PCR sem DNA. A programação do termociclador foi 94°C por 2 minutos, seguidos de 34 ciclos a 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR também foram quantificados em gel de agarose (2%) e a estimativa dos comprimentos se deram por comparação com o padrão Ladder 100 pb.

4.5 Purificação das amostras e preparação para sequenciamento

As amostras de DNA amplificadas com sucesso foram purificadas usando-se polietilenoglicol (PEG) para eliminação do excesso de primers e resíduos de nucleotídeos e armazenadas a -20°C até o envio para sequenciamento. Para a purificação com PEG foram adicionados 50 µl de PEG

em um microtubo de 1,5 ml, sendo transferido e misturado todo o produto de PCR com auxílio de micropipeta. Foi incubado em banho-maria por 15 minutos com temperatura de 37°C. Após isso, centrifugou-se por 15 minutos a 12000 rpm, retirou-se o sobrenadante com cuidado para não tocar nas paredes do tubo, sendo utilizado uma pipeta para esta etapa. Por fim, o sobrenadante foi descartado e, no tubo, adicionou-se 62,5 µl de Etanol 80% gelado. Em seguida, centrifugou-se novamente por 2 minutos a 12.000 rpm e retirou-se novamente o sobrenadante, que foi descartado. Este procedimento foi repetido mais uma vez.

Por último, foi deixado secar totalmente e então ressuspendido em 13 µl de água MiliQ Autoclavada. A amostra foi acondicionada em microtubo, que foi seco em estufa a 60°C. Antes do envio para sequenciamento as amostras foram quantificadas através de comparações com as bandas de ladder nas imagens do gel de agarose, para então ser enviado para empresa ACTGene Análises Moleculares especializada em sequenciamento de DNA.

4.6 Análises moleculares

As sequências nucleotídicas obtidas foram editadas manualmente e alinhadas utilizando-se o alinhamento de sequências múltiplas Clustal Ômega, com o programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.1. Para as análises de diversidade molecular foi utilizado o programa MEGA-X. As diversidades intra-específicas foram obtidas pela média dentre todos os indivíduos da espécie estudada. As diversidades inter-específicas calculadas foram comparadas com as diversidades de outras espécies de *Cambeva* ou *Trichomycterus* disponíveis em bancos de dados genéticos no NCBI (National Center for Biotechnology Information). O grupo externo utilizado para compor as análises foi a espécie *Parastegophilus paulensis*, mesma espécie utilizada por (MORAIS-SILVA *et al.*, 2018) em seus estudos.

A árvore filogenética foi construída pelo algoritmo neighbor-joining (NJ) com suporte de 10.000 repetições bootstrap e utilizando o modelo de correção Kimura-2-parâmetros. Os parâmetros utilizados foram os propostos por Hebert *et al.* (2003) como metodologia padrão para as análises do DNA barcoding, baseando-se nos pressupostos de que o modelo evolutivo é eficaz quando

distâncias genéticas são baixas e o algoritmo é eficiente e rápido em análises de espécies em larga escala (NEI; KUMAR, 2000). Para a realização das análises estatísticas como Matriz de substituição; Distância genética entre os grupos e dentro do mesmo grupo e construção da árvore filogenética, foram selecionadas através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sequências que auxiliaram na confecção dos resultados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 113 indivíduos, dos quais 45 tiveram sequências viáveis para análise. Desses, 16 foram coletados em rios na região da cidade de Cascavel e 29 em Dois Vizinhos. A tabela 1 sumariza os dados de identificação taxonômica, comprimento padrão, comprimento total, peso total e local de coleta para cada um dos indivíduos amostrados. A espécie *C. stawiarski* predominou nas amostras sequenciadas no rio Jirau Alto, onde apresentou em média $8,8 \pm 4,8$ cm de comprimento padrão, e também nos rios de Cascavel, nos quais apresentou em média um comprimento total de $9,1 \pm 3,0$ cm. Verificou-se que a espécie *C. mboycei* foi sequenciada somente no rio Jirau Alto e as espécies *C. davisii* e *C. sp.2* apenas nos rios de Cascavel.

Tabela 1 – Identificação e dados morfométricos dos 45 indivíduos das espécies do gênero *Cambeva* sequenciadas neste estudo. N° = identificação do indivíduo; P(g) = peso em gramas; Ct e Cp(cm) = comprimento total e padrão, em centímetros.
(continua)

N°/espécie	P(g)	Ct (cm)	Cp (cm)	Rio
2- <i>C. stawiarski</i>	4.46	8.1	6.9	Jirau Alto
3- <i>C. stawiarski</i>	6.44	9.7	8.6	Jirau Alto
6- <i>C. stawiarski</i>	5.09	8.6	8.1	Jirau Alto
14- <i>C. stawiarski</i>	5.16	8.7	7.2	Jirau Alto
20- <i>C. stawiarski</i>	3.10	8.0	7.0	Jirau Alto
23- <i>C. stawiarski</i>	5.76	8.2	7.4	Jirau Alto
25- <i>C. stawiarski</i>	4.12	7.5	6.4	Jirau Alto
27- <i>C. stawiarski</i>	2.10	5.6	5.2	Jirau Alto
28- <i>C. stawiarski</i>	1.57	5.5	4.8	Jirau Alto
29- <i>C. stawiarski</i>	6.14	9.1	8.2	Jirau Alto
36- <i>C. stawiarski</i>	4.66	8.8	7.5	Jirau Alto
37- <i>C. stawiarski</i>	4.84	8.2	7.3	Jirau Alto
43- <i>C. stawiarski</i>	4.70	9.7	8.6	Jirau Alto
52- <i>C. stawiarski</i>	5.86	10.0	8.8	Jirau Alto
59- <i>C. stawiarski</i>	6.94	9.3	7.7	Afluente do Quati
63- <i>C. stawiarski</i>	9.03	10	9.1	Afluente do Quati
65- <i>C. stawiarski</i>	3.18	6.8	7.6	Pedregulho do Iguaçu
66- <i>C. stawiarski</i>	3.10	7.4	6.4	Pedregulho do Iguaçu
78- <i>C. stawiarski</i>	3.80	8.6	7.7	Rio Arquimedes
81- <i>C. stawiarski</i>	0.51	4.2	3.6	Rio Bom Retiro
82- <i>C. stawiarski</i>	0.57	4.3	4	Rio Bom Retiro
84- <i>C. stawiarski</i>	0.30	3.6	3.0	Rio Bom Retiro
92- <i>C. stawiarski</i>	0.3	3.6	3.2	Rio Bom Retiro
96- <i>C. stawiarski</i>	0.54	4.2	3.6	Rio Bom Retiro
98- <i>C. stawiarski</i>	0.72	4.8	4.3	Rio Bom Retiro
99- <i>C. stawiarski</i>	6.61	8.9	7.6	Pedregulho do Iguaçu
103- <i>C. stawiarski</i>	5.69	8.9	7.6	Jirau Alto
107- <i>C. stawiarski</i>	5.72	9.3	8.2	Jirau Alto
8- <i>C. sp1</i>	5.83	7.6	6.5	Jirau Alto
9- <i>C. sp1</i>	6.39	9.8	8.6	Jirau Alto
10- <i>C. sp1</i>	5.49	9.1	7.7	Jirau Alto

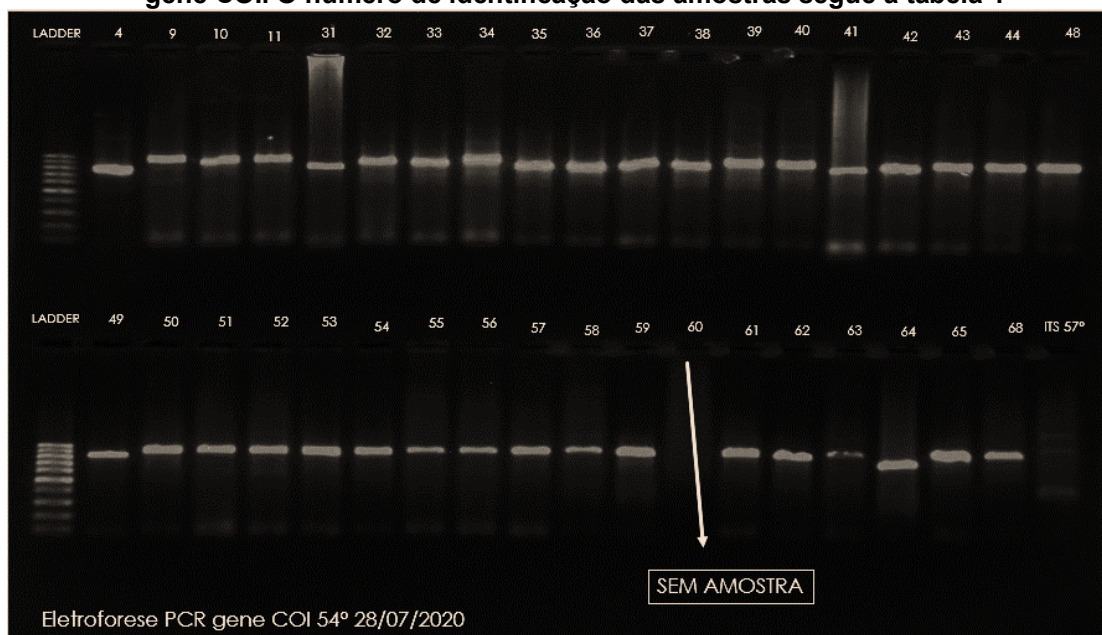
Tabela 1 – Identificação e dados morfométricos dos 45 indivíduos das espécies do gênero *Cambeva* sequenciadas neste estudo. N° = identificação do indivíduo; P(g) = peso em gramas; Ct e Cp(cm) = comprimento total e padrão, em centímetros.

(conclusão)				
13- <i>C. sp1</i>	3.20	7.3	6.2	Jirau Alto
17- <i>C. sp1</i>	4.49	8.4	7.3	Jirau Alto
21- <i>C. sp1</i>	3.88	8.3	7.2	Jirau Alto
46- <i>C. sp1</i>	1.70	6.7	5.6	Jirau Alto
48- <i>C. sp1</i>	4.03	8.6	7.3	Jirau Alto
57- <i>C. sp1</i>	2.19	7.5	6.5	Jirau Alto
68- <i>C. sp1</i>	1.94	5.9	4.9	São José do Iguaçú
71- <i>C. sp1</i>	1.45	5.5	4.7	São José do Iguaçú
24- <i>C. mboyacy</i>	4.08	7.3	6.4	Jirau Alto
33- <i>C. mboyacy</i>	3.07	6.8	5.9	Jirau Alto
34- <i>C. mboyacy</i>	2.55	6.7	5.8	Jirau Alto
53- <i>C. mboyacy</i>	2.89	8.2	7.3	Jirau Alto
61- <i>C. sp2</i>	1.89	5.8	5.1	Afluente do Quati
73- <i>C. davisii</i>	1.74	6.8	5.9	Rio Arquimedes

Fonte: Autoria própria (2021)

Foi realizado a extração do DNA de 113 indivíduos, e submetido a eletroforese em gel de agarose a 1%, para confirmar o sucesso na extração. Logo em seguida realizado as PCRs utilizando o gene COI. Com intuito de melhorar as amostras antes do envio para sequenciamento, todas foram purificadas com PEG (Figura 5). As amostras enviadas para sequenciamento com 30 a 60ng de DNA e com primer Forward.

Fotografia 2 - Gel de eletroforese com amostras amplificadas com sucesso a partir do gene COI. O número de identificação das amostras segue a tabela 1



Fonte: Autoria própria (2021)

Após o envio para sequenciamento foram obtidas 45 sequências viáveis, cujas amostras sequenciadas atingiram cerca de 650pb e após a edição obteve-se um total de 568 pb final para todas as amostras padrão.

Dentre as sequências analisadas foi possível estimar a quantidade de cada base nitrogenada presente nas amostras, sendo 25,40% de Adenina 28,89% de Timina, 27,37% de Citosina e 18,34% de Guanina. Verificou-se que a Timina teve a maior frequência e Citosina a menor. A tabela 2 apresenta as taxas de transições em negrito e as substituições transversais em itálico presentes em todas as sequências analisadas.

Tabela 2 - Estimativa de máxima verossimilhança da matriz de substituição

	A	T/U	C	G
A	-	<i>4.85</i>	<i>4.59</i>	15.31
T/U	<i>4.26</i>	-	14.55	<i>3.08</i>
C	<i>21.21</i>	15.36	-	<i>3.08</i>
G	21.21	<i>4.85</i>	<i>4.59</i>	-

Fonte: Autoria própria (2021)

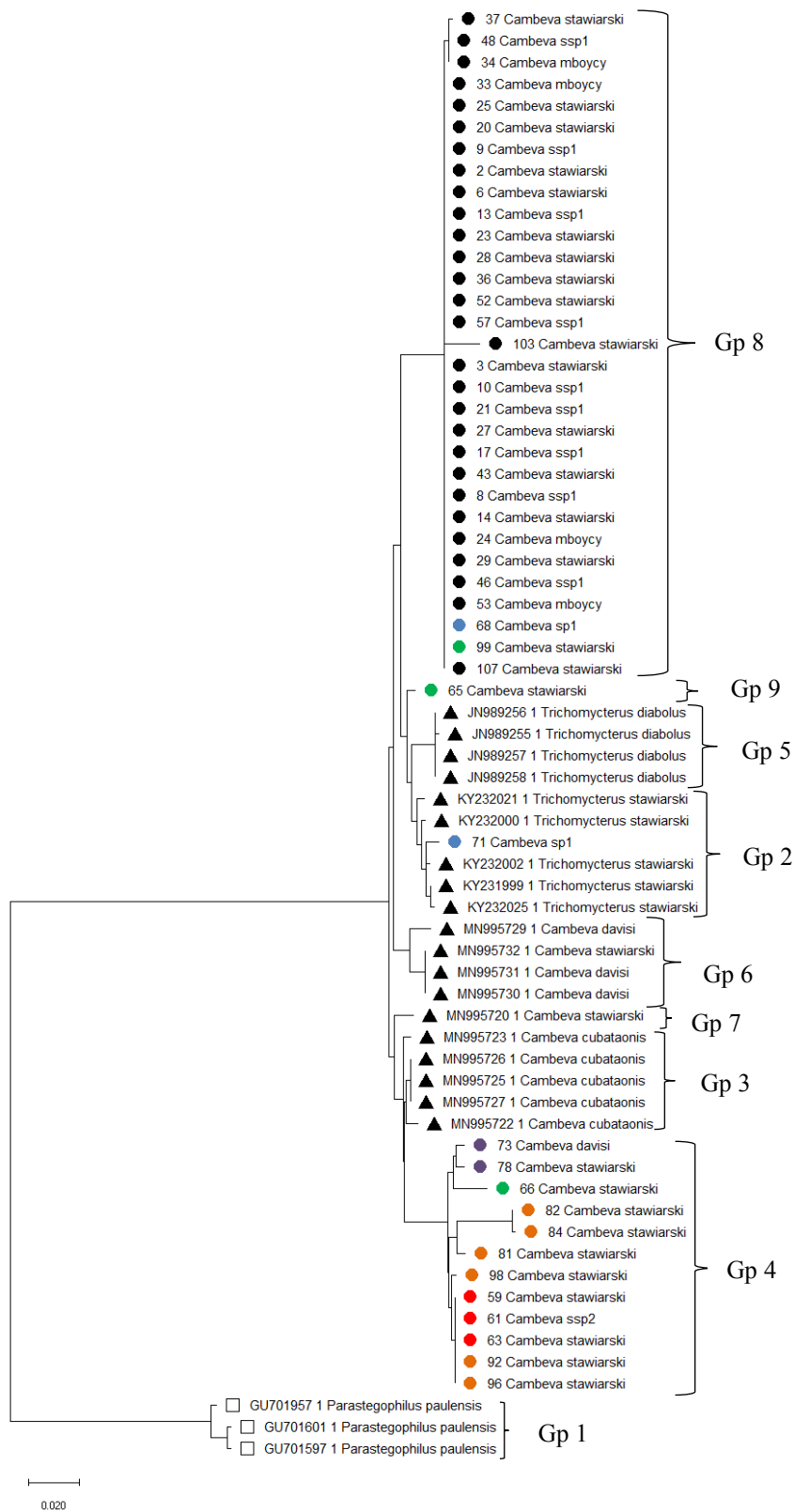
As análises filogenéticas baseadas na árvore filogenética (Figura 4) permitiu agrupar os indivíduos de acordo com as proximidades genéticas e os grupos formados foram: Grupo 1 representando o grupo externo formado pela espécie *Parastegophilus paulensis*, os grupos de 2 a 7 foram formados apenas por sequências de exemplares obtidos em bancos de DNA. O grupo 2 representado por exemplares das espécies *T. stawiarski* e *C. sp.1*, o grupo 3 pela espécie *C. cubataonis*, grupo 5 por *T. diabolus*, grupo 6 por *C. stawiarski* e *C. davisii* e grupo 7 por *C. stawiarski*. O grupo 4 foi formado por indivíduos de Cascavel representado por exemplares das espécies de *C. stawiarski* e *C. sp.2* e o grupo 8 por indivíduos de Dois Vizinhos, representado por exemplares das espécies de *C. stawiarski*, *C. mboycei* e *C. sp.1*.

A região do Baixo Iguaçu se situa na unidade geomorfológica do Brasil Meridional denominada de Terceiro Planalto (BRITO *et al.*, 2006), caracterizado pela presença de inúmeras cachoeiras e saltos (BAUMGARTNER *et al.*, 2012) formados por derrames basálticos do magmatismo da Serra Geral, que se formaram devido a movimentos epirogenéticos e alternâncias climáticas durante o Neógeno. Esta área situa-se no sul do Arco de Ponta Grossa, sendo

o fluxo do rio controlado pelo declive do planalto para oeste. O baixo rio Iguaçu apresenta diversas fraturas e fendas que possibilitam a formação de saltos e corredeiras, algum destes aproveitados para instalação de usinas hidroelétricas como a do Salto Caxias, Salto Osório e Salto Santiago (BRITO *et al.*, 2006). Estes saltos e corredeiras impuseram barreiras geográficas ao fluxo gênico dentro do rio Iguaçu e seus afluentes, separando os indivíduos e possibilitando o endemismo nas espécies de peixes; o Salto Caixas, por exemplo, separa os dois pontos de coleta deste trabalho.

Sendo assim, percebeu-se uma maior separação dos indivíduos quanto ao seu local de origem, devido a geomorfologia da região provocando a clara formação de um agrupamento de peixes coletados no Rio Jirau Alto (Gp8) (afluente do rio Chopim) em contraposição a outro agrupamento de indivíduos coletados mais a jusante, na região de Cascavel (Gp4) que também se mostrou mais vinculado a região geográfica do que as espécies, sugerindo uma separação alopátrica para o gênero. Isto nos mostra que os efeitos externos, como o local, clima e a geografia da área interferem geneticamente nestes indivíduos, sendo assim estes, devem ter sofrido adaptações genéticas devido ao ambiente. Morais-Silva *et al.* (2018) também concluíram que a estrutura genética no complexo de espécies de *T. davisii* é explicada por eventos tectônicos intrínsecos às áreas de influência de onde os animais foram coletados, corroborando nossa hipótese.

Figura 4 – Árvore Filogenética. Círculos indicam animais coletados e sua origem: preto= Rio Jirau Alto; vermelho= rio Afluente de Quati; verde= Rio Pedregulho do Iguaçu; azul= Rio São José; roxo = rio Arquimedes; laranja = Rio Bom Retiro. Triângulos representam os indivíduos obtidos em bancos de dados



Fonte: Autoria própria (2021)

Os grupos formados na construção da árvore obtiveram valores de distância genética entre si que variou de 0.009 a 0.052, excetuando-se da comparação o grupo externo (Gp1), como pode ser visto no Quadro 1.

É possível observar uma baixa distância genética entre os grupos 9 e 2 (0.00987), de modo a demonstrar que seus indivíduos são muito semelhantes, sendo os dois grupos mais próximos geneticamente. Os dois grupos mais distantes entre si foram os grupos 4 e 8, 4 e 5 e 4 e 6, que atingiram respectivamente 0,05832, 0,4237 e 0.04234 de diferenciação, não levando em conta o grupo externo (Gp 1).

A maior distância genética dentro do mesmo grupo foi de 0,0148 (Gp 4) e a menor 0,0009 (Gp 5). No entanto, podemos observar uma baixa diversidade genética de apenas 0.0014 dentro do grupo 8, sendo este o maior grupo em número de indivíduos, isto caracteriza um alto nível de endemismo, ou seja, os animais são muito semelhantes. Desta maneira, os animais do rio Jirau Alto correm risco de extinção e problemas de população, visto que o rio Jirau Alto sofre com despejo de grandes cargas de poluição, como foi visto no trabalho de (WACHTEL *et al.*, 2019). O Grupo 4 por outro lado, apresenta elevada distância entre seus indivíduos, mas os indivíduos de Cascavel foram coletados de 5 rios diferentes, em contraposição que os animais de Dois Vizinhos (Gp 8) apenas do rio Jirau Alto. Isto denota novamente que as barreiras naturais interferem na diversidade genética deste grupo.

Quadro 1 – Distância genética entre e dentro os grupos amostrados.

	Gp8	Gp4	Gp9	Gp2	Gp3	Gp5	Gp7	Gp6	Gp1
Gp8	<i>0,0014</i>								
Gp4	0.05832	<i>0,0148</i>							
Gp9	0.02458	0.03640	n/c						
Gp2	0.03073	0.04223	0.00987	<i>0,0071</i>					
Gp3	0.03309	0.02977	0.01186	0.01921	<i>0,0046</i>				
Gp5	0.03280	0.04237	0.01678	0.01803	0.02280	<i>0,0009</i>			
Gp7	0.03429	0.03567	0.01260	0.01758	0.01674	0.02050	n/c		
Gp6	0.03497	0.04234	0.02491	0.02946	0.02540	0.03516	0.02291	<i>0,0072</i>	
Gp1	0.31143	0.31192	0.30435	0.29532	0.30289	0.30853	0.28931	0.29790	<i>0,0084</i>

Nota: valores em *itálico* representam a distância dentro de cada grupo. N/C = grupos com apenas 1 indivíduo. **Negrito** representa maior distância genética entre grupos.

Fonte: Autoria própria (2021)

Os resultados apontam haver uma barreira geográfica, ou seja, um certo

distanciamento geográfico separando os indivíduos do grupo 4 e grupo 8, podendo impedir que os mesmos compartilhem material genético, deixando mais claro a especiação destes indivíduos e o alto endemismo. O caráter monofilético do grupo vem sendo contestado há algum tempo, desde 1973 e seu status filogenético é classicamente reconhecido como obscuro. Katz *et al.* (2018) propuseram a nova nomenclatura para o gênero a partir de análises multigênicas e neste artigo de 2018 realizou a descrição de um novo gênero *Cambeva*.

No trabalho de Morais-Silva *et al.* (2018), também foram avaliados diversas espécies de *Cambeva*, incluindo *C. stawiarski* e *C. davisii*. Neste artigo foram relatadas dificuldades nas identificações morfológicas dos indivíduos, indicando a possibilidade de espécies crípticas. Outro trabalho que aponta dificuldade na identificação das espécies é o estudo de Costa *et al.* (2020) que precisaram direcionar suas comparações morfológicas em estruturas ósseas para inferir relações filogenéticas e definir táxons. Costa *et al.* (2020) em seu estudo com *Cambeva* também utilizaram dados osteológicos para criar grupos filogenéticos e possíveis relações entre as espécies de Trichomictéridos. Com isso, verifica-se uma lacuna de informações moleculares a respeito dos *Cambeva*, pois as análises genética contribuem para a formação de táxons e também permite agrupar os indivíduos mais semelhantes geneticamente, mesmo que estes tenham sido separados pelas barreiras naturais.

É importante ressaltar que há dois fatores de isolamento entre os animais dos diferentes locais estudados: 1) ambos estão em afluentes do Rio Iguaçu, mas encontram-se em margens opostas da calha principal - os animais de Dois Vizinhos são da margem esquerda (Sub Bacia do Rio Chopim), e os animais de Cascavel são da margem direita (desembocando no Rio São Salvador), e o rio Iguaçu é um rio caudaloso e provavelmente funciona como uma barreira geográfica impedindo a migração entre afluentes de margens diferentes, principalmente para peixes pequenos e não migradores, ou migradores de pequenas distância; 2) Isolamento geográfico por barreiras naturais e a influência geomorfológica (PAROLIN; RIBEIRO; LEANDRINI, 2010).

Com relação a este segundo tópico, é importante destacar que o Baixo Iguaçu era caracterizado pela presença de inúmeras cachoeiras, e que o Salto

Caxias separava fisicamente os indivíduos dos dois pontos de coleta do presente trabalho. Atualmente esta separação geográfica foi intensificada com a construção da barragem de Salto Caxias, a qual foi construída entre 1995 e 1999. A arquitetura dos rios possibilita uma alta diversidade de peixes, tornando este um fator de diferenciação genética, ou seja, o ambiente e a sua formação interferem na filogeografia destes animais (MORAIS-SILVA *et al.*, 2018) corroborando nossa hipótese.

Foi possível verificar que as análises da morfologia externa não corroboram os resultados das análises moleculares realizadas. Sendo assim, a análise morfológica externa se torna insuficiente para identificação e reflete a necessidade de análises morfológicas mais específicas e minuciosas, tendo como exemplo análises osteológicas dos peixes. Da mesma forma, a análise molecular apenas do COI pode não ser suficiente para identificação das diferentes espécies de *Cambeva*, sendo necessário a análise de outros genes, especialmente associando genes mitocondriais e nucleares.

E também a utilização de mais que um primer para as análises genéticas, já que as análises genéticas utilizando o gene COI foi capaz de realizar apenas uma caracterização das localidades mais do que por espécies. Costa *et al.* (2020) realizaram análises de espécies de peixes das subfamílias Tridentinae, Stegophilinae, Vandelliinae, Sarcoglanidinae e Glanapteryginae com sequências parciais de 2 genes nucleares e sequências parciais de três genes mitocondriais, e conseguiu comprovar a monofilia e as relações destas subfamílias com árvores filogenéticas. Ochoa *et al.* (2017) também utilizaram outros dois genes nucleares e três genes mitocondriais além das análises osteológicas realizadas em Trichomycteridae.

6 CONCLUSÕES

Concluimos que a geomorfologia do rio Iguaçu favoreceu a especiação desses animais e o surgimento da alta taxa de endemismo, sendo de extrema importância a conservação do rio Iguaçu e das suas sub bacias na preservação dessas espécies. Foi possível também, identificar a presença do novo gênero *Cambeva* entre as populações de peixes do rio Iguaçu, utilizando o gene COI.

O COI se mostrou ineficiente na identificação destes animais por espécies e, por isso, recomenda-se a utilização de mais genes nas análises genéticas e análises morfológicas mais minuciosas como análise osteológica. Percebemos ainda que, a estrutura geomorfológica dos ambientes em que estes peixes estão inseridos contribuíram para a diferenciação genética evidenciada neste estudo.

REFERÊNCIAS

- BARMAN, A. S. *et al.* DNA barcoding of freshwater fishes of Indo-Myanmar biodiversity hotspot. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1–12, jan. 2018.
- BAUMGARTNER, G. *et al.* **Peixes do baixo rio Iguaçu**. Maringá: Eduem, 2012.
- BRANDIMARTE, A. L.; SANTOS, D. Y. A. C. **O ser humano e o meio ambiente**. São Paulo: USP/Univesp, 2012.
- BRASIL. **Portaria MMA Nº 445, de 17 de Dezembro de 2014**. Reconhece como espécies de peixes e invertebrados aquáticos da fauna brasileira ameaçadas de extinção. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2014. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/aquicultura-e-pesca/legislacao/legislacao-geral-da-pesca/portaria-mma-no-445-de-17-12-2014.pdf/view>. Acesso em: 18 abr. 2021.
- BRITO, R.S.C.; WILDNER, W.; LICHT, O.A.B.; ARIOLI, E.E. Geologia e Recursos Minerais do Sudoeste do Estado do Paraná. **Relatório Técnico**. Brasília: CPRM, 2006. Disponível em: <https://rigeo.cprm.gov.br/handle/doc/10439>. Acesso em: 12 mai. 2020.
- BRITTO, S.; SIROL, R.; VIANNA, N. **Peixes do rio Paranapanema**. São Paulo: Duke Energy, 2003.
- COSTA, W. J. E. M. *et al.* Relationships of a new species support multiple origin of melanism in *Trichomycterus* from the Atlantic Forest of south-eastern Brazil (Siluriformes: Trichomycteridae). **Zoologischer Anzeiger**, v. 288, p. 74–83, 2020.
- COSTA, W. J. E. M.; HENSCHER, E.; KATZ, A. M. Multigene phylogeny reveals convergent evolution in small interstitial catfishes from the Amazon and Atlantic forests (Siluriformes: Trichomycteridae). **Zoologica Scripta**, v. 49, n. 2, p. 159–173, 2020.
- COSTA, W. J. E. M.; FELTRIN, C. R. M.; KATZ, A. M. Filling distribution gaps: Two new species of the catfish genus *Cambeva* from southern Brazilian Atlantic Forest (Siluriformes, Trichomycteridae). **Zoosystematics and Evolution**, v. 97, n. 1, p. 147–159, 2021.
- DELARIVA, R. L. *et al.* Fish fauna in forested and rural streams from an ecoregion of high endemism, lower Iguaçu River basin, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 18, n. 3, e20170459, 2018.
- FREIRE, C. A. *et al.* A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 17, p.

13263–13277, 2015.

GOMES, V. N. **Avaliação da sequência nucleotídica do gene mitocondrial citocromo oxidase I na identificação de espécies de peixes neotropicais.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

GUIMARÃES, J.; GUIMARÃES, A.T.B. Proposta de implantação de vazões ambientais no rio Iguazu (Paraná, Brasil) à jusante da barragem de Salto Caxias. *In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS*, 20, 2013, Bento Gonçalves. **Anais [...]** Bento Gonçalves: ABRH, 2013.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L.; WAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society**, v. 270, p. 313–321, 2003.

IPARDES (Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social). **Indicadores ambientais por bacias hidrográficas do estado do Paraná.** Curitiba: IPARDES, 2007.

IVANOVA, N. V. *et al.* Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 4, p. 544–548, 2007.

KATZ, A. M. *et al.* Multigene analysis of the catfish genus *Trichomycterus* and description of a new South American trichomycterine genus (Siluriformes, Trichomycteridae). **Zoosystematics and Evolution**, v. 94, n. 2, p. 557–566, 2018.

ŁUCZYŃSKA, J.; PASZCZYK, B.; ŁUCZYŃSKI, M. J. Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk assessment for consumer's health. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 153, p. 60–67, nov. 2018.

MERENDA, E. A. **Reservatório de Segredo e área de entorno: aspectos legais e modificações no uso do solo.** 2004, Dissertação (Mestrado em Geografia) - Programa de Pós Graduação em Geografia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

MORAIS-SILVA, J. P. *et al.* Geomorphology influencing the diversification of fish in small-order rivers of neighboring basins. **Zebrafish**, v. 15, n. 4, p. 389–397, 2018.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics.** New York: Oxford, 2000.

OCHOA, L. E. *et al.* Multilocus analysis of the catfish family Trichomycteridae (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes) supporting a monophyletic Trichomycterinae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 115, p. 71–81, 2017.

- OCHOA, L. E. *et al.* Phylogenomic analysis of trichomycterid catfishes (Teleostei: Siluriformes) inferred from ultraconserved elements. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020.
- OLIVEIRA, E. C. *et al.* Reproductive indicators of the endemic species *Astyanax bifasciatus* (Teleostei: Characidae) in a tributary of the Lower Iguaçú River Basin, Brazil. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 41, n. 1, p. 1–12, 2019.
- PARRA, A. B. *et al.* Parasites of *Cambeva davisii* (Siluriformes: Trichomycteridae) from the Cascavel stream, Neotropical area. **Biologia**, v. 76, n. 2, p. 599–612, 2021.
- PAROLIN, M; RIBEIRO, C. V.; LEANDRINI, J. A. Abordagem ambiental interdisciplinar em bacias hidrográficas no estado do Paraná. **Terra Plural**, v. 4, n. 2, p. 285-288, 2010.
- PIGOSSO, M. *et al.* Diagnóstico Ambiental da Bacia do Rio Jirau Alto - Dois Vizinhos - Paraná. **Revista Eletrônica do Curso de Geografia - Campusa Jataí (UFG)**, v. 13, p. 175–193, 2009.
- PRIOLI, S. M. A. P. *et al.* Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.
- SEMA (Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos). **Bacias Hidrográficas do Paraná** - Série Histórica. Curitiba: SEMA, 2010.
- WACHTEL, C. C. *et al.* Waterborn Genotoxicity in Southern Brazil Using *Astyanax bifasciatus* (Pisces: Teleostei). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 102, n. 1, p. 59–65, 2019.
- WARD, R. D. *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1847–1857, 2005.
- YAMAMOTO, F. Y. *et al.* Alterations of cytochrome P450 and the occurrence of persistent organic pollutants in tilapia caged in the reservoirs of the Iguaçú River. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 670–682, 2018.