

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA LUIZA COMELLI

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES ENTRE ESPÉCIES DE *Cambeva* EM AFLUENTES DO RIO
IGUAÇU**

DOIS VIZINHOS

2022

CAMILA LUIZA COMELLI

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES ENTRE ESPÉCIES DE *Cambeva* EM AFLUENTES DO RIO
IGUAÇU**

**ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY THROUGH MOLECULAR MARKERS
BETWEEN *Cambeva* SPECIES IN IGUAÇU RIVER AFLUENTS**

Trabalho de conclusão de curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Nédia de Castilhos Ghisi
Coorientador(a): Thaís Fernandes Mendonça Mota

DOIS VIZINHOS

2022



[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.

CAMILA LUIZA COMELLI

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POR MEIO DE MARCADORES
MOLECULARES ENTRE ESPÉCIES DE *Cambeva* EM AFLUENTES DO RIO
IGUAÇU**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 12/dezembro /2022

Thiago Cintra Maniglia
Doutor
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Ana Paula da Silva
Mestra
Universidade Federal do Paraná

Naiana Cristine Gabiatti
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

DOIS VIZINHOS

2022

Dedico este trabalho à minha família, amigos e a todas as pessoas que eu amo e estiveram comigo nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Ao longo desses cinco anos de curso, vivi muitos momentos especiais ao lado de pessoas que hoje tenho um imenso orgulho em dizer que apesar de tudo, ainda permanecem ao meu lado em meio as adversidades. Agradeço a Deus por me permitir chegar até aqui e em especial a algumas pessoas que foram essenciais nessa conquista tão importante.

Agradeço a minha família, nas pessoas da minha mãe Suzana Casanova Comelli, meu pai Marcio Comelli e a ao meu irmão Vitor Emanuel Comelli, por sempre me apoiarem e incentivarem a correr atrás dos meus sonhos, obrigada por todo carinho e amor que só uma família pode proporcionar. Agradeço ao meu namorado Douglas Fernando Zimmer por ser meu melhor amigo e meu apoio em todos os momentos difíceis, sempre esteve ao meu lado acreditando em mim. Saibam que sem vocês, nada disso seria possível.

Ao longo do curso fiz amizades que quero levar para a vida, obrigada Jean Felipe Bortot, Jaine Sguissardi e Maíra Eduarda Barc de Moura. Passamos muitos momentos bons juntos, muitos eventos, semanas acadêmicas, provas, trabalhos, jantinhas no RU e muitos outros momentos que levarei para sempre no coração, vocês foram muito importantes ao longo desses anos. Agradeço também aos meus colegas de laboratório e grupo de pesquisa por toda ajuda e apoio.

Agradeço em especial as minhas orientadoras, a professora Dr. Nédia de Castilhos Ghisi e a professora Dr. Thaís Fernandes Mendonça Mota, obrigada por toda ajuda e pelas imensas contribuições, sem vocês eu não teria chegado até aqui. Uma vez Henry Brooks Adams disse: “um professor afeta a eternidade; é impossível dizer até onde vai sua influência”. Realmente, é impossível mensurar o poder que um professor tem.

Por fim, agradeço a CNPq e a Fundação Araucária por financiar a realização desse estudo, bem como pela bolsa concedida pelo Edital Nº 05/2020 da PROREC para APOIO A PROJETOS DESTAQUE DA UTFPR para que eu pudesse ter dedicação total aos estudos. Gostariam de agradecer também ao Laboratório de Análises Biológicas e Biologia Molecular (BioMol) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Dois Vizinhos pelas análises realizadas.

Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.
(Carl Sagan)

RESUMO

Os peixes possuem o maior e mais diverso grupo entre os vertebrados, sendo que a região neotropical possui a maior diversidade de peixes de água doce do mundo. Contudo, a compreensão e estudos da diversidade na ictiofauna da América do Sul são afetadas de forma negativa pela falta de pesquisas. Nesse contexto, está inserido o rio Iguaçu, que apresenta uma taxa elevada de espécies endêmicas em sua ictiofauna, aproximadamente 70% não são encontrados em outra região do mundo. Nesse sentido, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a diversidade molecular de espécies de *Cambeva* em afluentes do rio Iguaçu por meio da região ITS1. Foram coletados 113 indivíduos, as coletas foram realizadas em duas cidades: Dois Vizinhos e Cascavel. A partir disso, foi realizada a extração do DNA proveniente de um fragmento de músculo do peixe. Em seguida, a região ITS1 foi amplificada por PCR. Foram obtidas 68 sequências viáveis para análise. As sequências foram editadas e alinhadas manualmente através do programa BioEdit, comparadas por meio do programa MEGA X onde foi obtida a matriz de máxima verossimilhança, a distância entre os indivíduos e a árvore filogenética. O programa Popart foi utilizado para construção da rede de haplótipos e para a identificação de sequências idênticas. Com isso, foi possível observar através dos dados obtidos que as variações genéticas nos exemplares de *Cambeva* associaram-se ao seu local de origem, não havendo variações intraespecíficas entre si, corroborando a hipótese de 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. Foi constatado também que o ITS1 não é um marcador eficiente para separar as espécies, faz-se necessário a utilização de outros marcadores, especialmente marcadores mitocondriais.

Palavras-chave: ictiofauna; endemismo; biodiversidade; região ITS1.

ABSTRACT

Fish are the largest and most diverse group among vertebrates, and the Neotropical region has the greatest diversity of freshwater fishes in the world. However, understanding and studies of the diversity of fish fauna in South America are negatively affected by the lack of research. In this context, the Iguaçu River has a high rate of endemic species in its ichthyofauna, approximately 70% of which are found nowhere else in the world. In this sense, the present work aimed to evaluate the molecular diversity of *Cambeva* species in tributaries of the Iguaçu River using the ITS1 region. A total of 113 individuals were collected in two cities: Dois Vizinhos and Cascavel. After that, DNA was extracted from a fragment of fish muscle. Then, the ITS1 region was amplified by PCR. Sixty-eight viable sequences were obtained for analysis. The sequences were manually edited and aligned using the BioEdit program, compared using the MEGA X program where the maximum likelihood matrix, the distance between individuals and the phylogenetic tree were obtained. The Popart program was used to build the haplotype network and to identify identical sequences. Thus, it was possible to observe through the data obtained that the genetic variations in *Cambeva* specimens were associated with their place of origin, with no intraspecific variations between them, corroborating the hypothesis that the geomorphology of the Iguaçu River imposes a geographical barrier to gene exchange, contributing to the process of speciation of the genus and increasing endemism. It was also found that ITS1 is not an efficient marker to separate the species, making it necessary to use other markers, especially mitochondrial markers.

Keywords: ichthyofauna; endemism; biodiversity; ITS1 region.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização da Bacia Hidrográfica do Rio Iguaçu	17
Figura 2 – Bacia Hidrográfica	18
Figura 3 - Exemplar do gênero <i>Cambeva</i>	21
Figura 4 -Localização da região ITS	23
Figura 5 - Localização das cidades onde foi realizada a coleta	24
Figura 6 - Esquema da extração do DNA Genômico	26
Figura 7- Árvore filogenética	32
Figura 8- Distância genética entre os indivíduos	33
Figura 9- Rede de haplótipos	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa de máxima verossimilhança da matriz de substituição	30
---------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TBE	Tris/Borato/EDTA
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	Microlitro
mL	Mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	A bacia do Rio Iguaçu	16
3.2	Ordem siluriforme	19
3.3	Características gerais dos <i>Cambeva</i>	20
3.4	Diversidade genética	21
3.5	Características do gene ITS	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	Área de estudo	24
4.2	Coleta	25
4.3	Extração de DNA	25
4.4	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	27
4.5	Purificação das amostras para o sequenciamento	28
4.6	Sequenciamento	28
4.7	Análises moleculares	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Os peixes possuem o maior e mais diverso grupo entre os vertebrados, com aproximadamente 34.200 espécies de peixes descritas (SEMA-CE, 2021), porém, toda diversidade na ictiofauna, principalmente neotropical, está longe de ser conhecida. Aliado a essa diversidade de peixes, está a diversidade de habitats onde vivem, proporcionando uma infinidade de variações na história natural desses animais (FREY-DARGAS et al., 2014).

A região neotropical possui a maior diversidade de peixes de água doce do mundo, as estimativas dessa riqueza chegam a 4.475, a maioria no território brasileiro, onde se encontram aproximadamente 2.587 espécies descritas (SEMA-CE, 2021). Contudo, a compreensão e estudos da diversidade na ictiofauna da América do Sul são afetados de forma negativa pela falta de pesquisas sobre sua ecologia, sistemática e genética (FREY-DARGAS et al., 2014).

Nesse contexto está inserido o rio Iguaçu, que apresenta uma taxa elevada de espécies endêmicas em sua ictiofauna, aproximadamente 70% não são encontrados em outra região do mundo. Isso significa que extinções nesse rio ocasionam uma extinção global. Um fato reconhecido na literatura é que alguns fatores são dominantes na extinção de espécies nas águas continentais, além da modificação do ambiente, a introdução de espécies exóticas aliados a poluição e exploração comercial dos recursos naturais, fatos esses encontrados no rio Iguaçu, o que preocupa ainda mais (BAUMGARTNER et al., 2012).

Um exemplo de espécie endêmica que é classificada como ameaçada de extinção é o *Cambeva mboyca* segundo a portaria de N. 445 do MMA (BRASIL / (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2015). Por esse motivo, é muito importante estudar a diversidade genética desses animais, pois além de compreendermos a relação entre os indivíduos e o processo de evolução, esses estudos auxiliam na conservação de espécies e populações.

Cambeva faz parte da Ordem Siluriformes e são peixes popularmente conhecidos como bagres. Recentemente, houve uma realocação, alguns indivíduos que antes eram alocados como *Trichomycterus* foram destinados a um novo gênero, chamado *Cambeva* (KATZ et al., 2018).

Para conhecermos um pouco mais desse gênero, antes que espécies como o *Cambeva mboyce* sejam extintas, utilizamos técnicas moleculares para estudar sua diversidade genética. Por esta, podemos defini-la segundo Hughes et al. (2008) como qualquer mensuração que quantifica a significância da variabilidade genética dentro de uma população. Esses conhecimentos podem ser adquiridos através da mensuração de alelos, genótipo, diversidade dos nucleotídeos, porcentagem de loci polimórficos entre outros (LOPES, 2018).

Para demarcar a região de interesse do DNA existem vários marcadores moleculares, sendo utilizados para isolar o gene/locus de interesse e posteriormente estudar o nível de relação entre as espécies. Esses marcadores podem ser estabelecidos como qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), ou características de DNA que diferem dois ou mais indivíduos relacionados, sendo herdados geneticamente (MILACH, 1998).

Sob todos os aspectos apresentados acima, o presente trabalho pretendeu analisar a diversidade molecular de espécies de *Cambeva*, distribuídas na bacia do rio Iguaçu, utilizando como marcador molecular ITS1.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a diversidade molecular de espécies de *Cambeva* em afluentes do rio Iguaçu, por meio da região ITS1.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a variabilidade genética presente nas populações de espécies de *Cambeva* por meio da região ITS1 e comparar com outras sequências deste gênero depositadas no banco de dados Genbank.

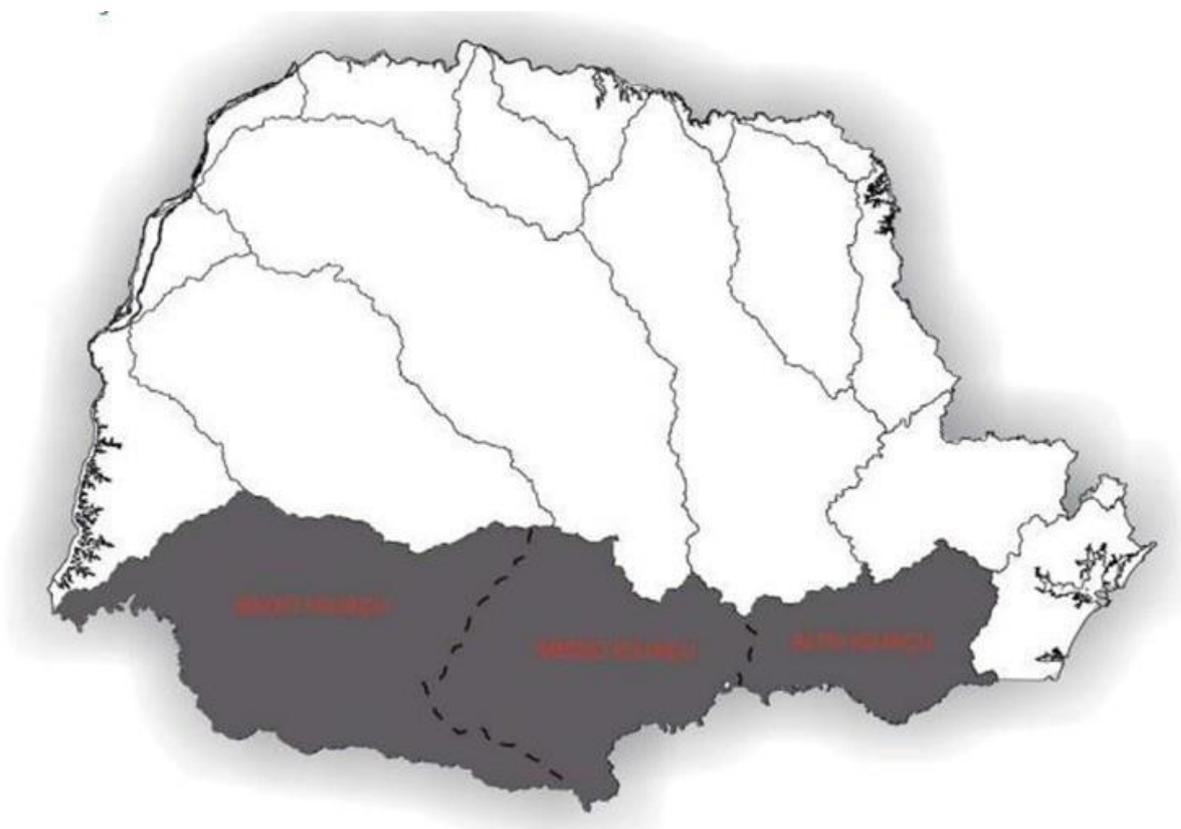
- Depositar as sequências da região ITS1 obtidas dos espécimes de *Cambeva* da bacia do rio Iguaçu no banco de dados Genbank.
- Verificar se os espécimes de diferentes localidades apresentam divergência genética.
- Avaliar diferenças intraespecíficas e interespecíficas nas sequências de DNA do ITS1 em espécies desse gênero.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A bacia do rio Iguaçu

A bacia do rio Iguaçu fica localizada ao Sul do Estado do Paraná, percorrendo 101 municípios (IPARDES, 2007). O rio Iguaçu é um dos principais e mais importantes rios do estado do Paraná. Da nascente à foz ele alimenta todo um ecossistema, além da população ribeirinha que dele depende e tem grande importância econômica e social, abastecendo cidades que margeiam seu percurso. Ele nasce na região leste da capital do estado, Curitiba, e segue na direção oeste do estado até desaguar no rio Paraná (Fig.1). Possui um comprimento de 1.320 km. Sua nascente é o resultado do encontro das águas dos rios Atuba e Iraí e sua foz deságua no rio Paraná, na fronteira entre Brasil, Argentina e Paraguai (SEMA, 2015).

Dos povos Guarani e Kaingangue, primeiros ocupantes da bacia hidrográfica, originou-se o nome. Iguaçu significa “água grande” ou “muita água” (SEMA, 2015). O rio Iguaçu é demarcado em Baixo, Alto e Médio Iguaçu (fig.2), sendo que é considerado o maior rio do estado do Paraná com uma área de 70.800 km², compreendendo as áreas do Brasil, Argentina e bacia do rio Iguaçu (SEMA, 2015).

Figura 2 - Bacia do rio Iguaçu.

Fonte: SEMA (2010).

As Cataratas do Iguaçu, famosas no mundo todo e conhecida como uma das sete maravilhas da natureza, fazem parte da bacia do rio Iguaçu. Elas funcionam como uma barreira natural, ou seja, ela barra os peixes para que não subam a montante, e isso colabora com a alta taxa de peixes endêmicos em sua ictiofauna. Tem-se conhecimento que 70% das espécies de peixes nativas do rio Iguaçu são exclusivas a ele (BAUMGARTNER et al., 2012), ou seja, não são encontradas em nenhum outro rio do planeta.

Devido a sua grande extensão, várias cidades desenvolveram-se ao redor do Rio Iguaçu, o que gera um aumento nas atividades humanas e por consequência poluição. Segundo estudos, esse rio é o segundo mais poluído do Brasil (FREIRE et al., 2015). A poluição desse rio é muito preocupante, pois como supracitado é o lar de diversas espécies endêmicas.

Outro fato a ser considerado sobre o endemismo é que muitas espécies são pouco ou nada conhecidas, podendo ser extintas sem que se tenha conhecimento sobre suas características biológicas, como se desenvolvem, como se reproduzem, seu comportamento, evolução e ancestralidade.

A poluição ambiental está diretamente relacionada com o aumento da população humana mundial. Em virtude disso, as atividades antrópicas tais como os rejeitos que produz que são despejados, resíduos agrícolas, industriais e domésticos, também estão aumentando em volume a cada ano. As atividades humanas estão entre os fatores que mais poluem os ambientes aquáticos, devido ao fato de os corpos d'água serem utilizados como destinatário desses efluentes. Juntamente com esses resíduos estão elementos muito prejudiciais à diversidade aquática causando danos a biota (BRANDIMARTE; SANTO, 2012). A diversidade de organismos presente tem uma função muito importante nesses ambientes, pois existem relações ecossistêmicas onde cada espécie desempenha uma função no nicho que ocupa, sendo muito importante para o ambiente (DINIZ, 2017).

3.2 Ordem Siluriforme

Os peixes são conhecidos como o grupo mais diverso entre os Craniata. Existem aproximadamente 25.000 espécies conhecidas. A ictiofauna brasileira contém 2.300 espécies de água doce e 1.298 espécies marinhas. Porém, o conhecimento sobre a ictiofauna brasileira ainda é muito incompleto, o que nos leva a entender que ainda existem muitas espécies desconhecidas, um exemplo disso é que todos os anos milhares de espécies são descritas (ROSA; LIMA, 2008).

As espécies da ordem Siluriformes geralmente possuem o corpo nu (sem escamas) ou revestido por placas dérmicas. Grande parte dos peixes desta ordem são encontrados em água doce mais próximo ao substrato (BAUMGARTNER et al., 2014). Os peixes siluriformes são conhecidos como peixe-gato ou bagre. (SCHUINGUES et al., 2013). São conhecidos por esse nome devido às características morfológicas que apresentam. Essa ordem contém 4.100 espécies, sendo 12% dos peixes e 6,3% de todos os vertebrados (JIN et al., 2016).

Os bagres são muito conhecidos por seus bigodes, também chamados de barbilhões. Essa estrutura no corpo do animal é de extrema importância pois funciona

como um “sensor” ou “radar” que ajuda o peixe a localizar suas presas (ALVES, Victor 2017).

Devido ao fato desses peixes terem bastante importância econômica devido ao seu valor nutricional, são muito utilizados na alimentação, sendo assim, são muito conhecidos e aproveitados pela população. Vários estudos tem sido feito na área de genética populacional de peixes neotropicais e as ordens Characiformes e Siluriformes são os principais alvos desses estudos, com o objetivo de identificar a estrutura populacional de espécies dessas ordens (OLIVEIRA; FORESTI; HILSDORF, 2009).

3.3 Características gerais dos *Cambeva*

A família Trichomycteridae é composta por 41 gêneros, porém, apenas os *Cambeva* (Fig. 3) são encontrados na bacia do rio Iguaçu (BAUMGARTNER et al., 2014). No geral, esse grupo de peixes são de pequeno porte, caracterizam-se por apresentar odontódeos no opérculo e interopérculo, possuem também dois pares de barbilhões na boca e um nasal, mas esse último ocorre apenas em algumas subfamílias (DE PINNA; WOSIACKI, 2003, Apud BAUMGARTNER et al., 2014).

Recentemente, alguns indivíduos do gênero *Trichomycterus* foram realocados para *Cambeva*. Datovo e Bockmann (2010) examinaram caracteres de vários *Trichomycterus* entre os quais estavam duas espécies de *Cambeva*: *C. davisii* e o *C. stawiarski*. Esses autores citam uma condição apomórfica única que consiste nos tentáculos extensores originarem-se exclusivamente da região etmoidal do neurocrânio. Essa condição foi pesquisada em várias espécies de *Cambeva*, porém, só foi encontrada em espécies endêmicas de alguns rios do sul do Brasil como a bacia do rio Iguaçu, Ribeira do Iguape e Paranapanema (*C. castroi*, *C. cubataonis*, *C. davisii*, *C. naipi* e *C. zonata*), o que sugere, que esta condição derivada é sinapomórfica para um subclado de *Cambeva* (KATZ et al., 2018).

Grande parte dos *Cambeva* têm hábitos noturnos ou crepusculares, porém, algumas espécies possuem hábitos diurnos. No geral, os *Cambeva* vivem enterrados nos substratos dos rios (areia, restos de vegetação ou cascalhos), sendo encontrados em rios com águas claras e transparentes (VIANNA, 2004).

Sendo popularmente conhecidos como “candirus”. As espécies descritas que conhecemos são: *Cambeva castroi* de Pinna, 1992; *Cambeva crassicaudatus* Wosiacki & de Pinna, 2008; *Cambeva davisii* (Haseman, 1911); *Cambeva igobi* Wosiacki & de Pinna, 2008, *Cambeva taroba* Wosiacki & Garavello, 2004 e *Cambeva* sp. 2, possuem cor amarelada com manchas castanhas no tronco, corpo alongado e rebaixado na região da cabeça (BAUMGARTNER et al., 2014).

As espécies *Cambeva mboycei* Wosiacki & Garavello, 2004 e *Cambeva stawiarski* (Miranda Ribeiro, 1968) possuem cor marrom amarelado com pintas castanhas espalhadas pelo corpo. Já as espécies *Cambeva papilliferus* Wosiacki & Garavello, 2004 e *Cambeva plumbeus* Wosiacki & Garavello, 2004, possuem cor castanha sem pintas (BAUMGARTNER et al., 2014).

E por último, temos a espécie *Cambeva* sp. 1, possuem cor cinza amarelado com manchas cinzas espalhadas pelo corpo, o que produz faixas claras em indivíduos maiores (BAUMGARTNER et al., 2014).

Figura 3- Exemplo do gênero *Cambeva*



Fonte: autoria própria (2022).

3.4 Diversidade genética

Por genes, entendemos que é uma região do DNA (ácido desoxirribonucleico) transcrita que contém informações sobre uma característica hereditária particular. (CECCATTO, 2015). Toda evolução biológica que se tem conhecimento atualmente é

um resultado do acúmulo de variações hereditárias que deu origem a biodiversidade como a conhecemos. Sendo assim, todas as formas de vida do nosso planeta são definidas por variações genéticas (SANTOS et al. 2009).

Durante o processo evolutivo, toda variação biológica acumulada ocorreu por mutações na sequência dos nucleotídeos no processo de replicação do DNA. Quando ocorre variação nos indivíduos de uma mesma espécie, chamamos de diversidade intraespecífica ou polimorfismos. Estudamos essa variação genética quando queremos saber o parentesco entre indivíduos, se existe ou não fluxo gênico entre essas populações (SANTOS et al.2009).

Analisar a diversidade genética é muito importante, pois é através dela que sabemos se uma espécie está em extinção genética ou não, e a partir disso, fazer o manejo correto. O estudo e manejo dessa diversidade pode evitar o desequilíbrio ecológico, uma vez que cada espécie possui sua importância no ecossistema.

A genética molecular tem avançado sobremaneira nos últimos anos, e uma das técnicas utilizadas são os marcadores moleculares que permitem calcular a distância genética entre espécies e populações e a heterozigosidade (ARTONI; MARTIELLO., 2003).

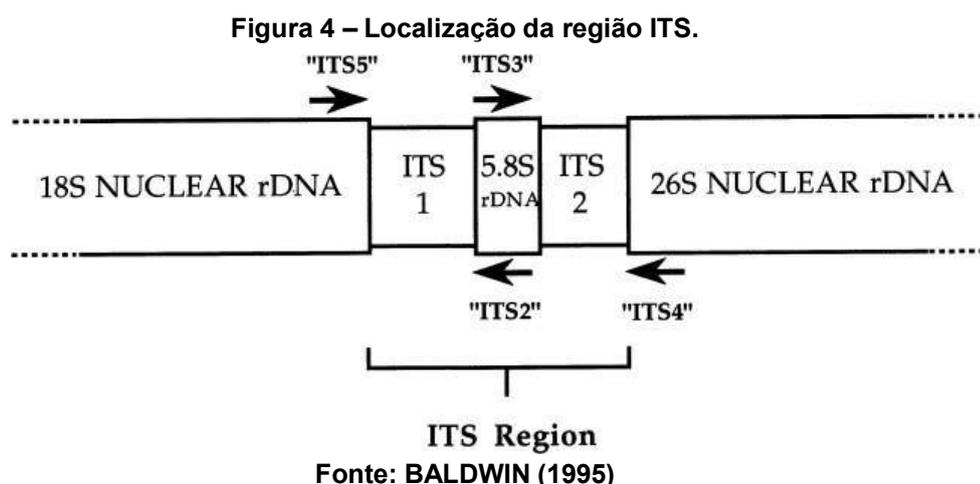
A sistemática filogenética se preocupa com os estudos de toda diversidade biológica existente na Terra e sua história evolutiva, ou seja, todos os eventos evolutivos que ocorreram fizeram com que populações gerassem linhagens independentes (PERDENEIRAS, 2011). A filogenia nos ajuda a entender a ancestralidade das espécies de interesse, podendo contribuir também com os estudos na área de conservação.

Com a aprimoração das técnicas de biologia molecular, o DNA passou a ser o foco do desenvolvimento de marcadores moleculares, uma vez que estes permitem a verificação de mudanças na variação natural na sequência dos indivíduos, permitindo assim o estudo da filogenia, diversidade genética, doenças, estudo populacional, mapeamento e análises de similaridade (EMBRAPA, 2012).

3.5 Características da região ITS

Dentre os principais marcadores moleculares está da região nuclear ITS (*Internal Transcribed Spacer*). O espaçador interno transcrito, são regiões conservadas do DNAr (DNA Ribossomal) que codifica o RNAr (RNA Ribossomal). Diante disso, essa região é utilizada para identificar espécies e investigar relações filogenéticas (FOLIARES et al., 2013).

Existem dois ITS (ITS1 e ITS2), que estão presentes no DNAr de organismos eucariotos (fig.4). A região ITS1 está localizado entre os genes 18S e 5.8S e a região ITS2 está localizado entre 5.8S e 28S. Antes da região 18S está o espaçador externo transcrito (ETS) e cada cópia da repetição do DNA ribossomal está separada pelo espaçador não transcrito (NTS) ou espaçador intergênico (HILLIS; DIXON, 1991).



A região ITS1 possui aproximadamente 269pb e da região ITS2 possui aproximadamente 218pb, o que se torna uma vantagem na hora do sequenciamento por se tratar de uma região mais curta (ZHANG et al., 2015).

O DNA Ribossomal nuclear é encontrado em todos os seres vivos e possuem várias cópias no genoma, sendo conhecido por ser bastante conservado e exercer função na célula na tradução de RNA em proteínas (SCHERER, 1999). Com avanço da bioinformática, o ITS tornou-se muito utilizado, pois muitas sequências já foram depositadas em bancos em dados, o que facilita o estudo.

Nos estudos de análises filogenéticas é extremamente importante escolher da região adequada para o objetivo do estudo, pois se forem escolhidas sequências

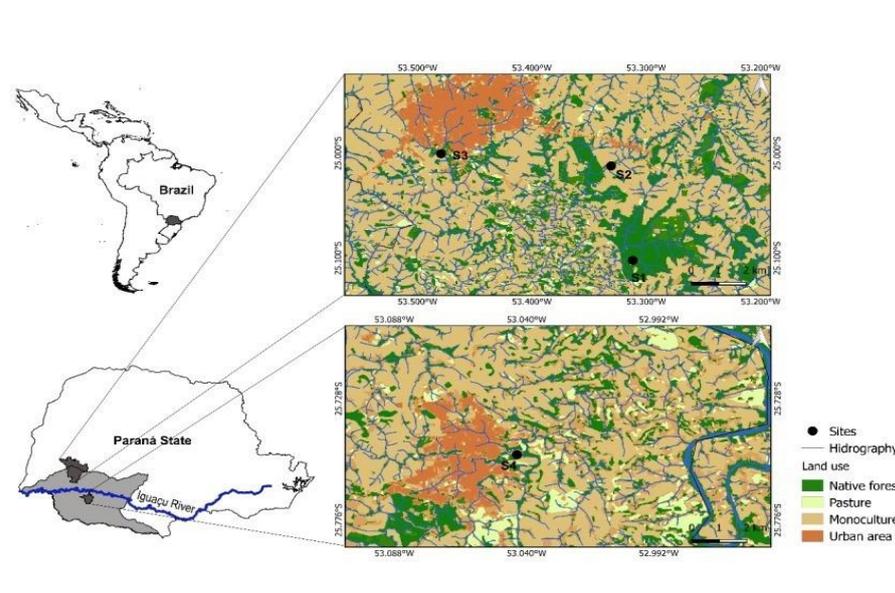
muito parecidas entre si as diferenças para serem analisadas não poderão ser suficientes para uma análise adequada e confiável (PREZOTTO, 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

O estudo ocorreu em um rio localizado na área urbana o rio Jirau Alto ($25^{\circ} 45'1.436''\text{S}$ - $53^{\circ}2'40.06''\text{O}$) e outro em um ponto rural, rio Dois Vizinhos ($25^{\circ} 48' 17.359''\text{S}$ - $53^{\circ}6'18.868''\text{O}$) da cidade de Dois Vizinhos, que possui uma área de aproximadamente 418 km^2 e uma população estimada de 40.234 habitantes (IBGE, 2018). Outros pontos de coleta foram dois riachos localizados na cidade de Cascavel-PR, são eles com suas respectivas coordenadas: rio Afluente de Quati ($25^{\circ} 0'1.33''\text{S}$ - $53^{\circ}28'45.86''\text{O}$) e rio Bom Retiro ($25^{\circ} 4'48.38''\text{S}$ - $53^{\circ}24'2.86''\text{O}$).

Figura 5- Localização das cidades onde foi realizada a coleta



Fonte: Rosilene Delariva (2022)

4.2 Coleta

A autorização para a coleta dos indivíduos utilizados neste estudo foi concedida pelo 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.

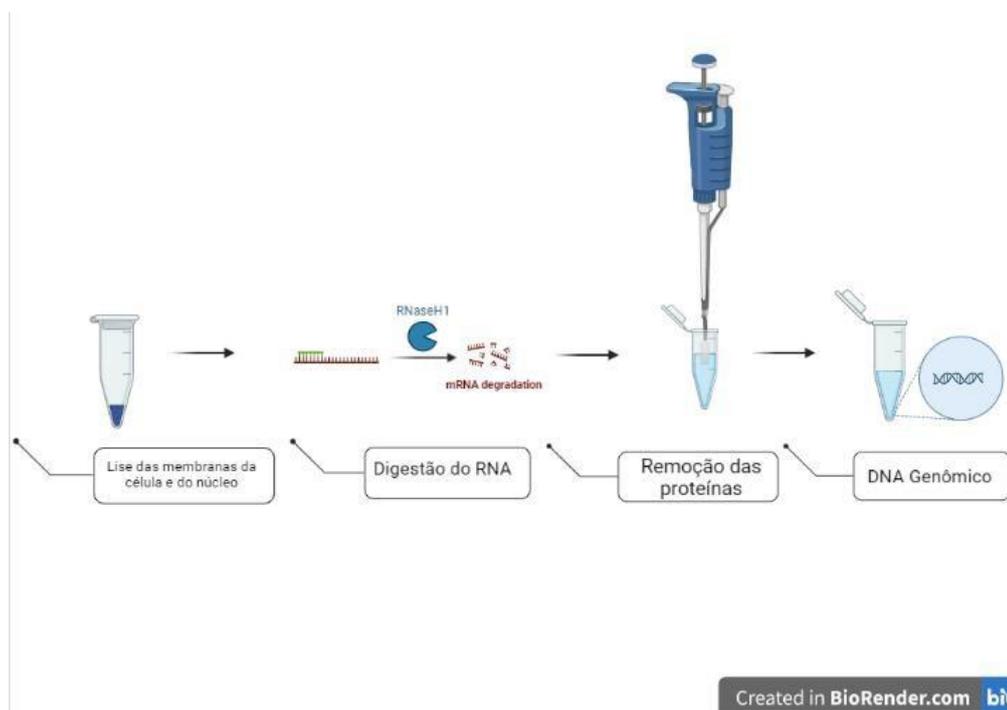
Esse projeto passou pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA), descrita na Lei 11.794/2008, visando o comprometimento da universidade em seguir os procedimentos para pesquisas envolvendo animais (2018-013/CEUA).

Os indivíduos de Dois Vizinhos e Cascavel-PR foram coletados em agosto de 2022, com o auxílio da pesca elétrica através de uma parceria estabelecida com o Lieb- Laboratório de Ictiologia, Ecologia e Biomonitoramento da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Foram coletados indivíduos de 3 espécies diferentes: *C. cubataonis*, *Cambeva* sp e *Cambeva* sp 1. A identificação foi realizada utilizando a chave de identificação proposta por Baumgartner *et al.* (2012). Após a coleta, os animais foram eutanasiados por resfriamento em uma caixa térmica com gelo e em seguida foram armazenados em tubos Falcon com álcool 70%.

4.3 Extração de DNA

O kit Promega® foi utilizado para a extração do DNA. Esse kit de extração do DNA genômico Wizard é dividido em quatro etapas. A primeira etapa consiste na lise das membranas de células e núcleos, a segunda etapa ocorre digestão do RNA, na terceira etapa remoção das proteínas e por último concentração do DNA genômico (PROMEGA, 2009). O DNA genômico foi obtido do tecido muscular dos peixes, utilizando o protocolo descrito por (PROMEGA, 2009), ajustado para tecido fixado em etanol.

Figura 6- Esquema da extração do DNA Genômico



Fonte: autoria própria (2022)

4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A região do DNA nuclear onde a região ITS está presente foi amplificada por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Para PCR com um volume final de 25 μ l foi utilizado 12,5 de 2X PCR Taq MasterMix with dye, 1 μ l de *primer* específico para cada região, 5 μ l de DNA extraído e 5,5 de μ l de água miliQ para completar a reação. Os primers para a região ITS1 foram F18S 5' GAT TAC GTC CCT GCC CTT TG 3' e R5.8S 5' CGA TGA TCA AGT GTC CTG CA 3' (Wilson et al.,2010).

A mistura foi colocada nos tubos de 0,2 mL no termociclador e à amplificação do DNA foi feita através de desnaturação, anelamento e extensão do DNA, as quais ocorrem ao longo do ciclo. O termociclador foi programado para os seguintes ciclos: 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos, o qual ocorre durante 36 ciclos e ao final para ser conservado 4°C por 5 minutos. Os produtos de

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

4.5 Purificação das amostras para o sequenciamento

As amostras com produto de PCR 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 2 mL, sendo transferido e misturado todo o produto de PCR com auxílio de micropipeta. Foi incubado em banho-maria por 15 minutos a temperatura de 37°C . Em seguida, centrifugou-se por 15 minutos a 12.000 rpm, retirou-se o sobrenadante com cuidado para não tocar nas paredes do tubo. 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. Essa última etapa foi repetida mais de uma vez.

Por último, foi deixado secar totalmente e então ressuspendido em 13 μl de água MiliQ. A amostra foi acondicionada em microtubos de 0,2 mL. Antes do envio para o sequenciamento as amostras foram quantificadas através do quantificador fluorométrico Qubit, seco na estufa a 60°C para então serem enviadas para a empresa ACTGene Análises Moleculares especializada no sequenciamento de DNA.

4.6 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *AB 3500 Genetic Analyzer* equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems).

Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5 pmol de *primer* específico e 0,5 μL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied

Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *LGC XP Cycler* com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida *Hi-Di™* (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático.

Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection 3* (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set "Z"*; *Mobility File "KB_3500_POP7_BDTv3.mob"*; *BioLIMS Project "3500_Project1"*; *Run Module 1 "FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100"*; e *Analysis Module 1 "BC-3500SR_Seq_FASTA.saz"*. Os arquivos resultantes do *Data Collection* (.ab1; eletroferogramas) foram convertidos em arquivos FASTA (.seq; texto) pelo *Sequence Analysis Software v. 6* (Applied Biosystems) sob parâmetros padrões.

4.7 Análises moleculares

As sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas manualmente e alinhadas utilizando 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 intraespecíficas 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).

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.

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. Além disso, foi usado o programa Popart para a construção da rede de haplótipos e identificação de sequências idênticas.

Para as análises foram adicionadas sequências do gene ITS de espécies de *Cambeva* que estavam disponíveis no Genbank: *Cambeva alternatus*, *Cambeva* sp, *Cambeva* sp 1 e *Cambeva cubataonis*. Uma sequência disponível de *Oreochromis niloticus* foi utilizada como grupo externo. No Genbank, um banco de dados mundial para depósito de sequências de diversas espécies, estavam disponíveis poucas sequências deste gênero, o que evidencia a importância deste trabalho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 113 indivíduos coletados de três espécies de *Cambeva* (*Cambeva cubataonis*, *Cambeva* sp e *Cambeva* sp1), 68 tiveram sequências viáveis para análise. Desses, 22 são de rios da região de Dois Vizinhos e 46 da região de Cascavel, cujas amostras sequenciadas atingiram cerca de 578pb e após a edição obteve-se um total de 500pb para todas as amostras padrão.

Dentre as sequências analisadas no programa MEGA X, foi possível estimar a quantidade de cada base nitrogenada, sendo 19,31% de Adenina, 15,50% de Timina, 32,86% de Citosina e 32,33% de Guanina. Verificou-se que a Citosina teve a maior frequência e a Timina a menor. As taxas de transições (tab.1) são apresentadas em negrito e as substituições transversais em itálico presentes em todas as sequências analisadas.

Tabela 1- Estimativa de máxima verossimilhança da matriz de substituição

	A	T	C	G
A	-	3.22	6.83	25.62
T	4.01	-	11.89	6.72
C	4.01	5.61	-	6.72
G	15.31	3.22	6.83	-

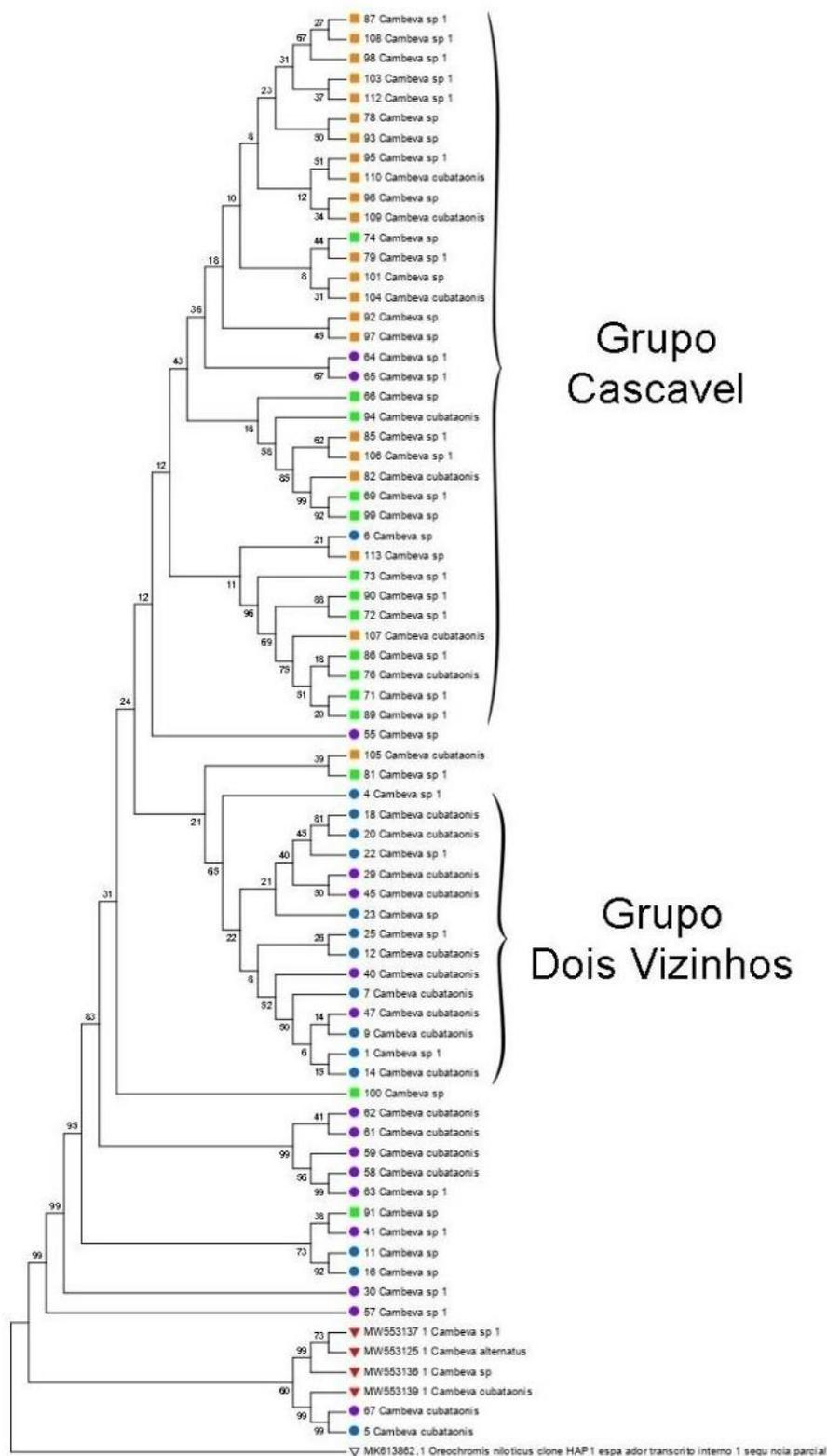
Fonte: autoria própria (2022)

As análises filogenéticas (Fig. 7) evidenciaram que a região ITS1 não foi eficiente para separar os espécimes das três espécies coletadas. O grupo externo foi formado pelo indivíduo pertencente a *Oreochromis niloticus*. Os indivíduos pertencentes a mesma localidade (Dois Vizinhos ou Cascavel) apresentaram uma maior proximidade genética. Os espécimes de diferentes espécies ficaram muito próximos, não houve uma diferenciação clara entre as espécies. Por exemplo, um clado foi formado por indivíduos pertencentes a *Cambeva sp*, *Cambeva sp1* e *Cambeva cubataonis*. Na verdade, espécimes identificados como pertencentes a diferentes espécies compartilharam haplótipos, por exemplo, o indivíduo 47 *Cambeva cubataonis* e o indivíduo 1 *Cambeva sp1* compartilham o mesmo haplótipo, assim como o indivíduo 96 *Cambeva sp* e o indivíduo 109 *Cambeva cubataonis*.

Vale ressaltar que no trabalho publicado por Morais-Silva et al. (2018), os autores ressaltam a dificuldade nas identificações morfológicas em indivíduos desse gênero, o que indica a possibilidade de espécies crípticas. No trabalho de Costa et al. (2020) os autores relatam que além da dificuldade na identificação morfológica, os mesmos precisaram direcionar suas comparações morfológicas em estruturas ósseas para inferir relações filogenéticas e definir táxons, além disso, utilizaram dados osteológicos para criar grupos filogenéticos e possíveis relações entre as espécies de Trichomycterídeos.

Estudos realizados por Ochoa, L. E. et al. (2020) através da hipótese filogenômica suporta o monofiletismo de Trichomycteridae. O resultado é conveniente com todos os estudos morfológicos realizados, que mostram um elevado número de sinapomorfias inequívocas para a família Trichomycteridae.

Figura 7- Árvore filogenética. Círculos e os quadrados indicam animais coletados e sua origem: Círculo azul: Rio Jirau Alto; Círculo roxo= Rio Dois Vizinhos; Quadrado laranja= Rio Afluente do Quati; Quadrado verde= Rio Bom Retiro. E os triângulos representam os indivíduos obtidos no Genbank. *Oreochromis niloticus* como grupo externo.

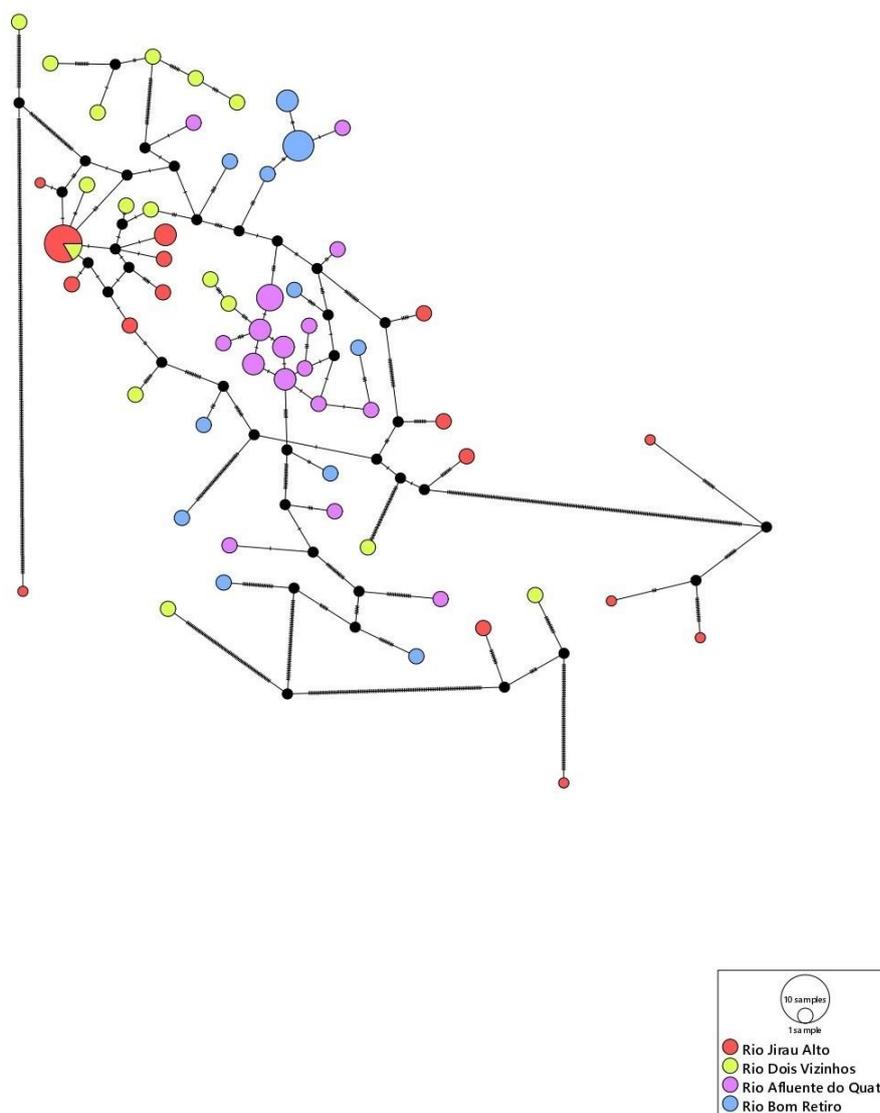


Fonte: autoria própria (2022)

insuficiente quando utilizado sozinho, ou seja, faz-se necessário a utilização de outros marcadores, especialmente marcadores mitocondriais.

Pela árvore filogenética foi possível perceber uma maior proximidade genética entre os indivíduos pertencentes a mesma localidade, com poucas exceções, ou seja, os indivíduos de Cascavel ficaram em um agrupamento e os indivíduos de Dois Vizinhos em outro agrupamento. A rede de haplótipos (Fig. 9) mostra que não houve uma distribuição dos haplótipos em relação a localidade, os haplótipos de diferentes localidades não formaram um grupo exclusivo de cada localidade.

Figura 9- Rede de Haplótipos



A região do baixo rio Iguaçu está situada na unidade geomorfológica do Brasil Meridional denominada de Terceiro Planalto, que tem como características a presença de várias cachoeiras e saltos que são formados por derrames basálticos provenientes do magnetismo da Serra Geral que foram formados devido a movimentos epirogênicos e alternâncias no clima durante o Neógeno. O baixo rio Iguaçu contém várias fendas e fraturas que permitem a formação de corredeiras e saltos, sendo que a partir disso são instaladas usinas hidroelétricas como as de Salto Santiago, Salto Osório e Salto Caxias. Esses saltos e corredeiras infundiram barreiras geográficas ao fluxo gênico de diversas espécies do rio Iguaçu e de seus afluentes, isolando os indivíduos e proporcionando o endemismo. A usina de Salto Caxias, por exemplo, separa os dois pontos de coleta do presente estudo (BAUMGARTNER et al., 2014) (BRITO *et al.*, 2006).

Com isso, percebe-se uma maior separação dos indivíduos quanto ao seu local de origem devido a geomorfologia dessa região do estado, o que acaba provocando uma separação e por consequência a formação de um agrupamento de peixes coletados no rio Jirau Alto e no rio Dois Vizinhos em contraposição ao agrupamento de indivíduos coletados mais a jusante, na região de Cascavel, que também se mostrou mais vinculado a região geomorfológica, sugerindo uma separação alopátrica para esse gênero. Isso corrobora a hipótese de que clima, local, e a geomorfologia da área interferem no fluxo gênico desses indivíduos, levando a adaptações sofridas pelo ambiente.

Nesse contexto, vale ressaltar que há dois importantes fatos que ocasionam o isolamento entre os indivíduos dos diferentes locais de estudo, o primeiro é que ambos estão em afluentes do rio Iguaçu, porém, encontram-se em margens opostas da calha principal, os indivíduos 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). O rio Iguaçu é um rio caudaloso e provavelmente atua como uma barreira geográfica o que impede a migração entre afluentes de margens diferentes, principalmente de peixes pequenos e não migradores ou migradores de pequenas distâncias; O segundo fato é que a influência geomorfológica aliado a construção de usinas hidrelétricas como a de Salto Caxias, leva ao isolamento geográfico.

6. CONCLUSÃO

Levando-se em consideração esses aspectos analisados, concluímos que a geomorfologia da bacia do rio Iguaçu favorece a especiação e a alta taxa de endemismo, sendo de extrema importância a preservação e conservação desse rio e de seus afluentes. Foi possível verificar também que da região ITS1 não é suficiente para discriminar espécies, o que sugere a utilização de mais marcadores, principalmente mitocondriais. As sequências obtidas neste trabalho serão depositadas no Genbank, favorecendo futuros estudos neste grupo. Mais trabalhos envolvendo esse gênero e outras espécies endêmicas do rio Iguaçu deveriam ser realizados, uma vez que esse rio é de suma importância, bem como todas as espécies e ecossistemas que nele habitam.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Victor. **Características do peixe Bagre**. Portal dos animais, 2017. Disponível:<https://www.portaldosanimais.com.br/informacoes/caracteristicas-do-peixe-bagre/>. Acesso em: 11 nov. 2022.
- BALDWIN, B. G. et al. **The its Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny Source : Annals of the Missouri Botanical Garden** , Vol . 82, No. 2 (1995), pp. 247-277 Published by: Missouri Botanical Garden Press Stable URL: <http://.> Annals of the Missouri Botanical Garden, v. 82, n. 2, p. 247–277, 1995.
- BAUMGARTNER, G. et al. **Peixes do baixo rio Iguaçu**, 2012.
- BAUMGARTNER, G. et al. **Peixes do baixo rio Iguaçu**. 22. ed. Maringá: Eduem, 2014.
- BRANDIMARTE, A. L.; SANTO, D. Y. A. C. DOS. A água como recurso cada vez mais limitante. In: **O Ser Humano e o Meio Ambiente**. São Paulo: USP/Univesp, 2012. p. 34–49.
- BRASIL / (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). Portaria MMA nº 445, de 17 de dezembro de 2015. . 2015, p. 445.
- 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: 20 out. 2020.
- BOTERO, J. B.; LOURENÇO, R. C. G., RODRIGUES-FILHO, C. A. S.; RAMOS, T. P. A.; PINTO, L. M. E GARCEZ, D. S. 2021. **Lista de Peixes Continentais do Ceará**. Fortaleza: Secretaria do Meio Ambiente do Ceará. Disponível em: <https://www.sema.ce.gov.br/fauna-do-ceara/peixes/>. Acessado em: 03 de out. 2022.
- CECCATTO, V. M. **Ciências Biológicas- Biologia Molecular**. 2ª edição Fortaleza – Ceará, 2015.

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

DAMASIO, D. **BIOINDICADORES NA AVALIAÇÃO AMBIENTAL EM UM RIO DE ABASTECIMENTO PÚBLICO**. p. 1–46, 2017.

DINIZ, M. H. **Defaunação: a atual crise da biodiversidade**. [s.l: s.n.]. v. 12

EMBRAPA. **I Ciclo de Palestras sobre o Uso de Marcadores Moleculares na Pesquisa Agropecuária**. 1. ed. Brasília: 2012.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília DF: EmbrapaCenargen, p. 220, 1998.

FOLIARES, E. *et al.* **Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia Identificação Molecular baseada no Sequenciamento de rDNA de Fungos Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**. III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia, p. 134–137, 2013.

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**, 2015.

FREITAS, C. E. C.; SIQUEIRA-SOUZA, F. K. **O uso de peixes como bioindicador ambiental em áreas de várzea da bacia amazônica**. *Revista Agrogeoambiental*, v. 1, n. 2, p. 39–45, 2009.

FREY-DARGAS, J. H. *et al.* **Composição e Distribuição de Comunidades de Peixes na Planície de Inundação do Rio Taquari, Pantanal, MS**. Embrapa Pantanal, p. 1–22, 2014.

HEBERT, P. D. N. et al. biological identifications through DNA barcodes.

Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. **Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic**. Inference Author (s): David M . Hillis and Michael T. Dixon Published by: The University of Chicago Press Stable URL: <https://www.jstor.org/stable/2831326> REFERENCES Linked references are available. v. 66, n. 4, p. 411– 453, 1991.

HUGHES, A. R.; INOUE, B. D.; JOHNSON, M. T.; UNDERWOOD, N. VELLEND, M. **Ecological consequences of genetic diversity**. Ecology Letters, v. 11, n. 6, p. 609- 623. 2008.

IBGE. Dois Vizinhos, 2018.

IPARDES. **INDICADORES AMBIENTAIS por bacias hidrográficas do estado do paraná**. Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econ mico e Social, p. 98, 2007.

JIN, Y. et al. **Catfish genomic studies: Progress and perspectives**. [s.l: s.n.].

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. BAUMGARTNER, G. et al. **Peixes do baixo rio Iguaçu**. 22. ed. Maringá: Eduem, 2014.

LOPES, W. S. Tendências da literatura científica sobre uso de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética de peixes. p. 52, 2018.

MILACH, S. C. K. Mapeamento molecular de características de importância agron mica. In: S. C. K. Milach (ed) Marcadores Moleculares em Plantas. Porto Alegre, UFRGS, p. 67-73, 1998.

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, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. **Genetics of neotropical fish: From chromosomes to populations**. Fish Physiology and Biochemistry, v. 35, n. 1, p. 81–100, 2009.

PAULO, S. **Análise do ITS1 do DNA riboss mico em espécies do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera : Tephritidae)**. Disserta o, p. 1–74, 2008.

PERDENEIRAS, L. C. **CONCEITOS BÁSICOS DE FILOGENIA** Leandro Cardoso Pederneiras. p. 12, 2011.

PEREIRA, R. S. Régis da Silva Pereira. Instituto Federal Sul-Rio-Grandense (IFSUL) - Campus Pelotas. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**, v. 1, n. 1, p. 20–36, 2004.

PROMEGA. Wizard® Genomic DNA Purification Kit. p. 21, 2009.

R. F., A.; M. C. A., M. **Genética De Peixes Neotropicais. I. Aspectos Da Conservação Genética Dos Peixes No Parque Estadual De Vila Velha, Paraná, Brasil**. Publicatio UEPG: Ciencias Biologicas e da Saude, v. 9, n. 2, p. 7–15, 2003.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. (Pitchard, 1967). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**, p. 9–278, 2008.

SANTOS-DANIELA, F. R. et al. **Diversidade Genética**. 2009.

SEMA. Bacias Hidrográficas do Paraná - Série Histórica. **Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos - SEMA**, p. 30, 2015.

SCHERER, N. M. **Aplicação das Sequencias dos Espaçadores Internos Transcritos do DNA Ribossomal Nuclear para Estudos Filogenéticos com o Gênero Passiflora (Passifloraceae)**. 1999.

SCHUINGUES, C. D. O. et al. **Anatomia da cavidade bucofaringeana de sorubim trigonocephalus (Siluriformes, Osteichthyes)**. Pesquisa Veterinaria Brasileira, v. 33, n. 10, p. 1256–1262, 2013.

VIANNA, M. A. B. S. **Revisão Sistemática do gênero Trichomycterus Valenciennes do Sudeste do Brasil (Siluriformes: Loricarioidea: Trichomycteridae)**. p. 127, 2004.

WANG, X. C. et al. ITS1: A DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes? **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 3, p. 573–586, 2015.

Wilson, J. S., Willians, K. A., Gunnell, C. F., & Pitts, J. P. (2010). **Phylogeographic investigations of the widespread, arid-adapted antlion Brachynemurus sackeni Hagen (Neuroptera: Myrmeleontidae)**. Psyche, 2010, 1–7.

ZHANG, W. et al. **ITS2 secondary structure improves discrimination between medicinal “Mu tong” species when using DNA barcoding.** PLoS ONE, v. 10, n. 7, p. 1–1.2015.