

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências - Botucatu

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ESTRUTURA POPULACIONAL E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES EM
CHARACIDIUM PTEROSTICTUM: UMA ABORDAGEM DE TAXONOMIA
INTEGRATIVA**

RELATÓRIO FINAL DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO

João Tiago de Santiago
Claudio de Oliveira e Leonardo Oliveira Silva

Dezembro 2024
Botucatu

JOÃO TIAGO DE SANTIAGO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ESTRUTURA POPULACIONAL E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES EM *CHARACIDIUM PTEROSTICTUM*: UMA ABORDAGEM DE TAXONOMIA INTEGRATIVA

RELATÓRIO FINAL DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO

Trabalho de conclusão de curso apresentado no curso de graduação de ciências biológicas bacharelado, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Campus de Botucatu.

Orientador: Claudio Oliveira

Co-orientador: Leonardo Oliveira Silva

Dezembro 2024

Botucatu

S235t	<p>Santiago, João Tiago</p> <p>Trabalho de conclusão de curso estrutura populacional e delimitação de espécies em characidium pterostictum: uma abordagem de taxonomia integrativa : relatório final de estágio obrigatório / João Tiago Santiago. -- Botucatu, 2024</p> <p>24 p.</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu</p> <p>Orientador: Claudio Oliveira</p> <p>Coorientador: Leonardo Oliveira Silva</p> <p>1. Characidium. 2. pterostictum. 3. molecular. 4. COI. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

JOÃO TIAGO DE SANTIAGO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO


**ESTRUTURA POPULACIONAL E DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES EM
CHARACIDIUM PTEROSTICTUM: UMA ABORDAGEM DE TAXONOMIA
INTEGRATIVA**

RELATÓRIO FINAL DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO


Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel, do curso de Graduação em Ciências Biológicas.

Botucatu, 13 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **CLAUDIO DE OLIVEIRA**
Data: 13/12/2024 11:18:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Claudio de Oliveira IB/UNESP

Documento assinado digitalmente
 **VANESSA PAES DA CRUZ**
Data: 16/12/2024 07:22:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Vanessa Paes da Cruz IB/UNESP

Agradecimentos:

Agradeço primeiramente aos meus pais, João R. Santiago e Ivete C. Santiago, por sempre me apoiar, incentivar, e ajudar em todos os momentos, especialmente nos momentos mais difíceis, ajuda essa que nunca serei capaz de retribuir, mas sou eternamente grato. Esse trabalho mostra que todo o esforço e dedicação ao longo destes quatro anos, e que valeu a pena. Essa vitória e este trabalho também é de vocês.

Aos meus irmãos, Rodrigo, Silvia e Silviane, agradeço o apoio e por fazer do meu sonho um pouquinho do de vocês também. Sem vocês teria sido bem mais difícil. Aos meus sobrinhos, Bruna, Ingrid e João Rodrigo, obrigado por estarem comigo, é ótimo voltar e estar com vocês, compartilhar esse sonho que tanto conversamos quando crianças é sem igual, de sempre e para sempre nós. Aos outros sobrinhos, Rafael, Gabriel e Bento, não é fácil estudar fora, mas poder comemorar o fim deste ciclo é sem descrição, saber que teremos um futuro diferente, e trabalhando com o que queremos é libertador. Que de algum modo eu possa inspirar vocês, estarei sempre aqui com e para vocês meus corações.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que financiou o meu projeto de Iniciação Científica e me proporcionou uma bolsa de auxílio pesquisa pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

Aos meus orientadores, professor Claudio de Oliveira por me proporcionar a vivência no laboratório, Leonardo Oliveira por me ensinar e passar um pouquinho do seu conhecimento para mim, e a Vanessa Paes por me apresentar o laboratório, acolher e ensinar, me fazer ter gosto pela biologia molecular, saibam que o amor de vocês pela área chegou até mim. E as integrantes do laboratório, Aisni Mayumi, Giovana Ribeiro, Beatriz Boza, Pamela Nadai e Mariana Kuranaka por sempre estarem à disposição em me ajudar, a atenção e carinho que recebi de vocês ao longo do meu estágio no laboratório foi muito importante.

A minha casa, República Kapim Kanela, obrigado por me acolher, por me deixar fazer morada ao longo desta fase de tantas mudanças e crescimento. Obrigado a “tia Michele”, minha amiga, mãe, e confidente ao longo destes quatro anos, você sempre será mais do que a moça que limpa a casa.

Ao meu veterano Caique, obrigado por me receber, me levar ao primeiro dia de aula e estar comigo e todos os ensinamentos, por tudo! Realmente um irmão mais velho que a vida me deu. Aos meus melhores amigos, meus irmãos de alma Thiago Furlan e Lucas Santana, obrigado por compartilhar esse sonho comigo, obrigado por me ensinarem e por me deixar

ensinar, e além de tudo, obrigado por compartilhar a vida e o axé. Sem vocês teria sido tudo diferente. Aos meus “filhos” Vinicius Guilherme, Gabriel Juhas e Luís Fonseca foi ótimo aprender e crescer com vocês, somos tão diferentes e ao mesmo tempo iguais, mesmo com tudo, nunca trocaria vocês, obrigado por tudo. Ao Caio Camargo, Diego Nunes e Eduardo Seidel, obrigado por me ensinar a dosar mais as decisões, e buscar entender as coisas com mais calma, vocês me ensinaram a rever atitudes e hoje sou melhor que antes, obrigado. Aos meus últimos calouros sendo morador, Lucas Duarte, Rafael Mezzena, Gustavo Zerbinatti, Henrique Cora e João Vitor Lejambre, obrigado por fazer deste ano inesquecível, obrigado por terem o mesmo amor pela casa, e por serem vocês, cada um com suas particularidades, a Kapim será bem cuidada com vocês. Tenho muito orgulho de vocês.

Não poderia deixar de agradecer a três amigas incríveis, que fizeram parte do meu percurso em Botucatu, Ana Beatriz Mello, Victória D’Amario e Melina Sanches. Com vocês ganhei um novo lar na cidade, vocês são luz, aprender com vocês foi incrível, e espero ter ensinado algo a vocês também. Compartilhar com vocês sobre a nossa religiosidade é sem igual, obrigado por isso.

Resumo:

O gênero *Characidium* é composto por pequenos peixes de água doce pertencentes à família Crenuchidae, distribuídos na América do Sul. A espécie *Characidium pterostictum* foi descrita originalmente, por Gomes 1947, dum rio costeiro no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, e sua distribuição estende-se até o rio Ribeira do Iguape, no limite norte. A delimitação de espécies neste gênero é complexa devido à variabilidade morfológica e à ocorrência de populações geograficamente isoladas. Este projeto tem como objetivo principal utilizar uma abordagem de taxonomia integrativa para delimitar a espécie *Characidium pterostictum*. Serão utilizados dados morfológicos e moleculares, com foco no gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade 1 (COI), para avaliar a diversidade e a estrutura populacional ao longo de sua distribuição geográfica. Para tal, serão tomados caracteres morfológicos tradicionais para avaliar variações entre as populações. Será realizado também a extração de DNA, amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial COI e análise filogenética para identificar linhagens genéticas utilizando métodos moleculares de delimitação de espécies, como ASAP e GMYC. Espera-se que os resultados deste estudo forneçam delimitação precisa dos limites taxonômicos de *Characidium pterostictum*, identificando possíveis novas espécies ou linhagens crípticas. Os resultados deste estudo fornecerão uma base sólida para a conservação e manejo das populações de *Characidium pterostictum*, além de contribuir para o conhecimento da biodiversidade e evolução das espécies de peixes de água doce na região Sul e Sudeste do Brasil.

Abstract:

The genus *Characidium* is composed of small freshwater fishes belonging to the family Crenuchidae, distributed in South America. The species *Characidium pterostictum* was originally described by Gomes 1947 from a coastal river in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, and its distribution extends to the Ribeira do Iguape River, in the northern limit. The delimitation of species in this genus is complex due to morphological variability and the occurrence of geographically isolated populations. The main objective of this project is to use an integrative taxonomy approach to delimit the species *Characidium pterostictum*. Morphological and molecular data, focusing on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, will be used to assess diversity and population structure throughout its geographic distribution. For this purpose, traditional morphological characters will be used to evaluate variations among populations. DNA extraction, amplification and sequencing of the mitochondrial COI gene, and phylogenetic analysis will also be performed to identify genetic lineages using molecular species delimitation methods, such as ASAP and GMYC. The results of this study are expected to provide precise delimitation of the taxonomic limits of *Characidium pterostictum*, identifying possible new species or cryptic lineages. The results of this study will provide a solid basis for the conservation and management of *Characidium pterostictum* populations, in addition to contributing to the knowledge of biodiversity and evolution of freshwater fish species in the South and Southeast regions of Brazil.

Sumário

Introdução	10
Objetivo Geral e Específico	12
Material e Métodos	13
Resultados	15
Referência	22

Introdução:

O gênero *Characidium*, pertencente à família Crenuchidae, compreende pequenos peixes de água doce distribuídos amplamente na América do Sul. *Characidium* inclui atualmente 85 espécies válidas e é o gênero de Crenuchidae mais amplamente distribuído, ocorrendo do Panamá até a Argentina (Fricke *et al.*, 2024). Espécies do gênero podem ser encontradas em riachos com fortes corredeiras, cachoeiras e em ambientes relativamente lênticos (Buckup, 1993a; 1998). Apesar de *Characidium* ser o gênero mais amplamente distribuído e rico da família Crenuchidae, com grande representatividade nas coleções e museus, uma série de problemas taxonômicos envolvem espécies ou grupos de espécies do gênero, dificultando a identificação e conseqüentemente impedindo o conhecimento real de sua riqueza.

Muitas espécies do gênero, difíceis de identificar, aparecem na literatura identificadas apenas em nível genérico, ou ainda, acompanhadas de "aff." ou "cf.", revelando incertezas taxonômicas e indicando possível riqueza ainda a ser conhecida (Zanata & Ohara, 2015). Além disso, muito do material depositado em coleções científicas não identificado até a espécie ainda não foi examinado por especialistas. De acordo com Buckup (1993b), a dificuldade de identificar espécies de *Characidium* pode estar relacionada à homogeneidade morfológica de seus representantes. Por outro lado, é comum a presença de morfotipos semelhantes a espécies descritas, mas que não se encaixam totalmente nelas, distribuídos por várias bacias hidrográficas independentes entre si.

Essa dificuldade de delimitação taxonômica é atualmente observada na identificação de populações pertencentes à espécie *Characidium pterostictum*, descrita por Gomes em 1947. Esta espécie apresenta uma distribuição geográfica que se estende desde rios costeiros no estado do Rio Grande do Sul até o rio Ribeira do Iguape, Estado de São Paulo, no limite norte (Fricke *et al.*, 2024). A variabilidade morfológica e a ocorrência de populações geograficamente isoladas tornam a delimitação desta um desafio taxonômico significativo. Essa problemática taxonômica pode esconder uma diversidade ainda não conhecida, como a existência de novas espécies e estruturação populacional.

Mesmo sabendo da importância dos dados morfológicos no reconhecimento e descrição de espécies, existem casos nos quais especiação recente, retenção de polimorfismo ancestral, alto grau de variação intraespecífica e/ou convergências podem atuar como importantes desafios na delimitação das espécies (Flot *et al.*, 2011; Knowles & Carstens, 2007). E é por isso que é recomendado o uso de fontes adicionais de informações, além dos dados morfológicos. Dados moleculares se mostram importantes nesse processo e, em

conjunto com os avanços da bioinformática, essa fonte de dados tem apresentado grande relevância na delimitação de espécies (Hillis, 2019).

Conforme discutido em Ferguson (2002), existe uma distância genética a ser considerada na diferenciação entre espécies. De acordo com o autor, com algumas exceções, o acúmulo de diferenças genéticas em vários *loci* ao longo do tempo acarretaria incompatibilidade genética entre os organismos, levando assim ao isolamento reprodutivo. Partindo dessa ideia, Hebert *et al.* (2003) propuseram, a partir de um marcador molecular mitocondrial único, o desenvolvimento de um sistema de bioidentificação global dos seres vivos, denominado DNA *barcoding*. Com esse método, cada espécie analisada apresentaria um “código de barras” (*barcode*) próprio, o qual seria utilizado como ferramenta auxiliar para sua correta identificação taxonômica, levando ao aumento na descoberta de novas espécies (Hebert *et al.*, 2003). De acordo com estes autores, o gene Citocromo C Oxidase I (COI) foi escolhido porque apresenta características importantes para a proposta do projeto: ausência de *introns*, ocorrência rara de recombinação e ausência de inserções e deleções (*indels*).

À medida que o objetivo da taxonomia é chegar a estimativas robustas da identidade das espécies, então a repetibilidade na delimitação é essencial, tanto quanto compreender que as espécies são hipóteses sujeitas a mudanças com novos dados e descobertas (de Queiroz, 2007). Nesse sentido, o DNA *barcoding* precisa ser avaliado junto a outras fontes de dados para não ser apenas um identificador de unidades moleculares (Galimberti *et al.*, 2012). Muitos autores passaram a defender esse tipo de abordagem complementar entre diferentes fontes de dados na delimitação de espécies como Taxonomia Integrativa (Dayrat, 2005). Nesse sentido, uma abordagem integrativa/iterativa assume a relevância de agregar diferentes fontes de dados (*e.g.*, comportamentais, ecológicos, moleculares, morfológicos), no processo de delimitação de espécies (Yeates *et al.*, 2011).

Considerando, portanto, a problemática taxonômica envolvendo populações de *Characidium pterostictum* este projeto visa utilizar uma abordagem de taxonomia integrativa, combinando dados morfológicos e moleculares, para delimitar com precisão a espécie. A delimitação precisa das espécies é essencial para a conservação e manejo eficaz das populações naturais. Este estudo fornecerá informações cruciais sobre a diversidade genética e a estrutura populacional de *Characidium pterostictum*, contribuindo para o conhecimento da biodiversidade e evolução das espécies de peixes de água doce no Sul e Sudeste do Brasil. Além disso, a identificação de novas espécies ou linhagens crípticas pode ter implicações importantes para a biogeografia e ecologia da região.

Objetivo Geral:

Utilizar uma abordagem de taxonomia integrativa para delimitar a espécie *Characidium pterostictum*, avaliando a diversidade e a estrutura populacional ao longo de sua distribuição geográfica.

Objetivos Específicos:

1. Coletar e analisar dados morfológicos tradicionais para avaliar variações entre as populações de *Characidium pterostictum*;
2. Realizar a extração de DNA, amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial citocromo oxidase I.
3. Analisar a diversidade genética e a estrutura populacional utilizando métodos moleculares de delimitação de espécies (ASAP e GMYC).
4. Identificar possíveis novas espécies ou linhagens crípticas dentro do grupo estudado.

Material e métodos:

Amostragem taxonômica e análise morfológica dos espécimes

O material a ser utilizado nas análises morfológicas e moleculares está depositado na Coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu.

Para as análises moleculares, serão utilizadas amostras de tecido preservadas em etanol a 96%, coletadas durante expedições de campo sob licenças de coleta emitidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

Sempre que possível, a identificação morfológica será realizada da seguinte maneira: as amostras serão agrupadas por ecorregião e, dentro desta, por bacia hidrográfica, sendo identificadas em nível específico a partir de comparações com material tipo e descrições originais. Na busca por caracteres informativos para a delimitação morfológica, dados tradicionalmente utilizados na taxonomia do gênero *Characidium* serão obtidos e analisados, incluindo: medidas e contagens realizadas de acordo com Melo & Oyakawa (2015), utilizando paquímetro digital com precisão de 0,1 mm e expressas como porcentagem do comprimento padrão (CP), exceto subunidades da cabeça, dadas como porcentagens do comprimento da cabeça (CC); observação do padrão de *circuli* e *radii* em escamas situadas entre a base da nadadeira dorsal e a série da linha lateral.

Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

Amostras de tecido muscular, brânquias e nadadeiras, preservadas em etanol 96% e mantidas em -80°C ou -20°C, serão utilizadas como fonte de material genético. Para as análises moleculares, serão selecionados, sempre que possível, pelo menos dois espécimes de cada população de *Characidium pterostictum* de cada localidade. O DNA genômico total será extraído usando o kit de purificação de DNA Wizard Genomic (Promega; www.promega.com). Fragmentos da subunidade I do marcador citocromo oxidase serão amplificados através da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) usando os *primers* descritos em Ward *et al.* (2005).

Amplificações serão realizadas com 200 µM de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP; Invitrogen; www.invitrogen.com), 1× *buffer* (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0.2 µM de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 50 a 100 ng de amostra de DNA e água ultra pura, perfazendo volume total de 15 µl. O programa no termociclador consistirá de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 4 min; seguida por 40 ciclos de: cadeia de desnaturação 30 s a 92°C, pareamento 30 s a 52°C-56°C, extensão nucleotídica de 1 min e 30 s a 72°C e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 min. Os segmentos de DNA

amplificados serão visualizados em gel de agarose 1%. Os produtos da PCR serão purificados com polietilenoglicol (PEG) 20% (Sambrook *et al.*, 1989) e, em seguida, sequenciados em ambas as direções, utilizando os mesmos *primers* da PCR, com o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (Applied Biosystems; www.appliedbiosystems.com).

Análises moleculares

As sequências *forward* e *reverse* obtidas no presente estudo serão montadas e editadas usando o Geneious v9.1.3 (<https://www.geneious.com>). As sequências serão alinhadas usando o Muscle v3.8.4 (Edgar, 2004) no programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018), com parâmetros do *default*.

Uma análise filogenética será obtida por Inferência Bayesiana (BI) no programa MrBayes 3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012) através do portal CIPRES *Science Gateway* (Miller *et al.*, 2010). A sequência de *Crenuchus spilurus* será usada para enraizar a análise filogenética. A análise será realizada sob o modelo de substituição estimado no jModeltest 2.2 (Nylander, 2004) em conjunto com PAUP *, sob critério de informação de Akaike (AIC). Serão realizadas duas corridas com 10 milhões de gerações e quatro cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) cada, com 10% de *burn-in* e parâmetros amostrados a cada 1000 gerações. A convergência das corridas será verificada no Tracer v1.7.1 (Suchard *et al.*, 2018; <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>), certificando-se de que todos os valores do Tamanho Efetivo da Amostra (ESS) fossem maiores que 200. A topologia com valores de probabilidade posterior (PP) atribuídos aos nós será então visualizada e editada no FigTree 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Para investigar o número unidades taxonômicas operacionais moleculares (*i.e.* MOTUs; Floyd *et al.*, 2002), serão empregados dois de delimitação molecular de espécies: (a) *Generalized Mixed Yule-Coalescent Model* (GMYC) (Fujisawa & Barraclough, 2013), (b) *Assemble Species by Automatic Partitioning* (ASAP; Puillandre *et al.*, 2020).

Resultados:

Amostragem taxonômica e análise morfológica dos espécimes

As análises tiveram início com a parte de morfologia, na qual foram examinados caracteres anatômicos e estruturais detalhados de *Characidium pterostictum*. Essa etapa foi essencial para a identificação de características diagnósticas da espécie, fornecendo a base para as investigações subsequentes de biologia molecular.

As análises morfológicas foram feitas com os lotes da coleção do LBGP, visto que consistiam em confirmar caracteres diagnósticos da espécie *C. pterostictum*, sendo eles:

- Presença ou não de linha lateral completa;
- Formato das nadadeiras peitoral e dorsal (Fig. 3) (Fig. 5),
- Presença ou não de escamas no istmo (Fig. 1),
- Número de escamas no entorno do pedúnculo caudal,
- Comprimento do peixe, do focinho à base da nadadeira caudal (Fig. 4),
- Presença ou não de padrão de coloração na nadadeira caudal (Fig. 2),



Figura 1: Imagens de espécime de *Characidium pterostictum*, destacando padrão de escamação ventral. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 2: Imagem de espécime de *Characidium pterostictum*, destacando o padrão de coloração da nadadeira caudal. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 3: Imagem de espécime de *Characidium pterostictum*, destacando nadadeira dorsal e caudal. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 4: Arquivo pessoal: Imagem de espécime de *Characidium pterostictum*, destacando comprimento e nadadeira peitoral. Fonte: arquivo pessoal.

Após a identificação e confirmação das populações pertencentes a espécie alvo do estudo, foram realizadas as atividades de bancada. A priori, foi elaborado um mapa da distribuição das amostras, e a partir de então foi selecionada ao menos uma população por bacia hidrográfica ao longo de toda a possível distribuição da espécie.

Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

Para a extração foi usado o protocolo do kit de extração da PROMEGA seguindo instruções do fabricante com o seguintes reagentes:

- **EDTA 0,5M PH 8:** 60 ul
- **Nuclei Lysis Solution (kit):** 250 ul
- **Proteinase K:** 10 ul
- **RNAse Solution (kit):** 3 ul
- **Protein Precipitation Solution (kit):** 100 ul
- **Isopropanol gelado:** 300 ul
- **Etanol 70%:** 300 ul
- **DNA Rehydration Solution:** 30 ul
- *valor por amostra

Para preservação, as amostras extraídas foram armazenadas em freezer, em torno de 2°C e -8°C, e depois foram retiradas para visualização da qualidade do DNA extraído através de um gel de agarose (Fig. 5).

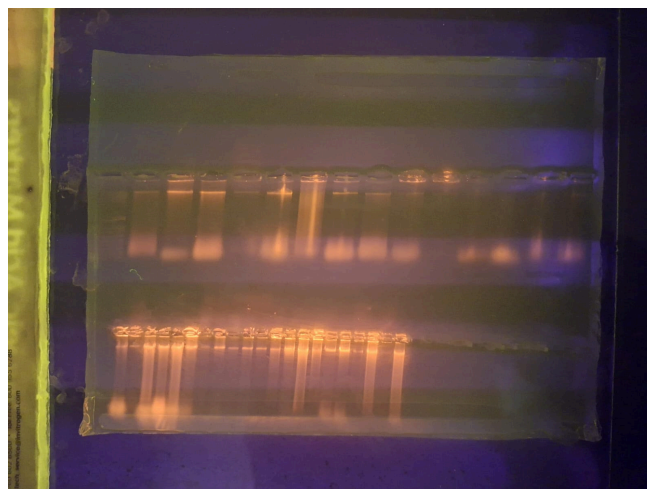


Figura 5: Gel de agarose 1X, com o resultado das amostras de extração de DNA.

Com a confirmação de qualidade das extrações, foi realizado a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do marcador de interesse, que nesse caso foi o gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI), amplamente utilizado em estudos moleculares de delimitação de espécies. Para reação de PCR (Fig. 6), foram usados os seguintes reagentes:

- **H2O:** 8,55 ul
- **Buffer:** 1,25 ul
- **MgCl:** 0,50 ul
- **Primer F1.:** 0,25 ul
- **Primer R1.:** 0,25 ul
- **Dntp:** 0,50 ul
- **Taq:** 0,20 ul
- **DNA:** 1 ul
- *valor por amostra



Figura 6: Processo de PCR. Fonte: arquivo pessoal.

Ao final, o mix de PCR teve o volume final de 12,5 ul por tubo, em exceção o tubo controle, que foi para a reação com 11,50 ul. O termociclador foi programado a uma temperatura de anelamento do primer a 54°C, com um total de 40 ciclos. Após o processo da

PCR, foi feito o gel de agarose (Fig. 7 e 8) a fim de conferir os resultados, para dar continuidade no processo de sequenciamento.

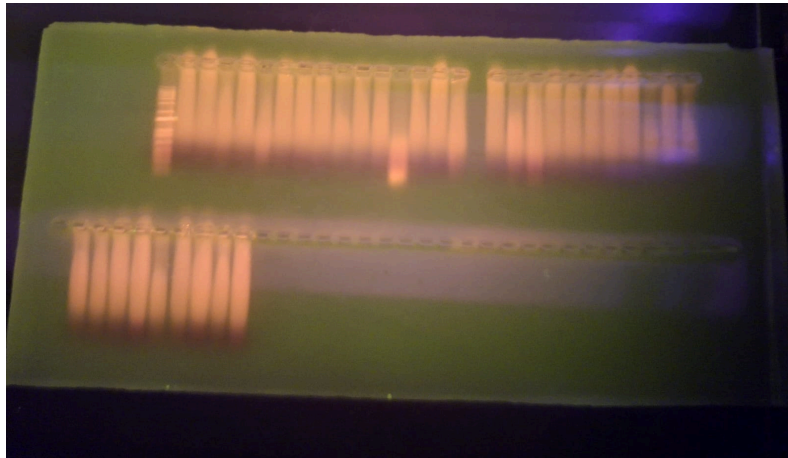


Figura 7: Gel de agarose 1X, com o resultado das amostras da PCR de DNA-COI.

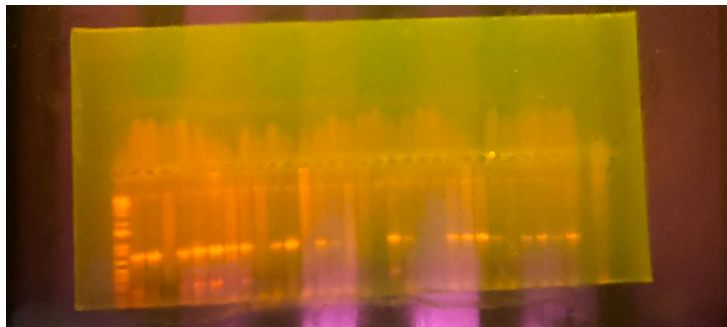


Figura 8: Gel de agarose 1X. Com o resultado das amostras da PCR de DNA-COI.

Com as amostras que tiveram o DNA amplificado com sucesso, foi realizado o processo de purificação utilizando o protocolo EXOSAP. Esse método consiste na utilização das enzimas Exonuclease I (Exo) e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), que atuam na degradação dos primers e na inativação dos nucleotídeos livres, respectivamente. Essa etapa é fundamental para garantir a qualidade do DNA amplificado, eliminando resíduos que possam interferir nas análises subsequentes, como o sequenciamento genético. O protocolo seguiu às seguintes proporções:

- **EXO:** 0,05 ul
- **SAP:** 0,05 ul
- **H2O:** 1,90 ul

O volume final da reação foi de 2,00 ul por amostra.

Após a finalização do processo de purificação com EXOSAP, as amostras foram submetidas ao sequenciamento utilizando o reagente BigDye Terminator, seguindo as proporções estabelecidas para cada componente. O protocolo utilizado foi otimizado para um volume total de 10 µL por amostra, com os seguintes componentes e quantidades:

- **Água ultrapura (H₂O):** 4,5 µL
- **Buffer de sequenciamento:** 1,5 µL
- **BigDye Terminator:** 1,0 µL
- **Primer (F1 ou R1):** 1,0 µL
- **Produto de PCR:** 2,0 µL

Essas proporções garantem uma reação eficiente e de alta qualidade para o sequenciamento capilar. Cada amostra foi preparada separadamente com os primers direcionais, F1 e R1, de modo a obter leituras nos dois sentidos, assegurando maior confiabilidade na análise final das sequências de DNA.

Para o sequenciamento, foram preparados dois mix distintos. O primeiro continha o primer forward (F), responsável pela leitura no sentido 5'-3', enquanto o segundo mix continha o primer reverse (R), que realiza a leitura no sentido 3'-5'. Essa separação foi feita para evitar qualquer interferência entre os primers durante a reação de sequenciamento. Após a finalização do processo, as amostras foram armazenadas em geladeira, envoltas em papel alumínio para proteger a fluorescência contra exposição à luz, garantindo a preservação da qualidade dos reagentes e dos sinais fluorescentes.

A última etapa realizada na bancada foi o protocolo de precipitação da reação de sequenciamento, utilizando glicogênio como agente carreadores para melhorar a recuperação do DNA. Essa etapa é essencial para purificar os produtos da reação de sequenciamento, removendo reagentes residuais e garantindo a qualidade do material para a leitura das sequências.

Para cada amostra, foi preparado o seguinte mix:

- **Etanol 100%,**
- **Acetato de sódio 3M (pH 5,2),**
- **Glicogênio (1 mg/mL),**

O volume total do mix foi ajustado para 20 μ L. Após a adição do mix, cada amostra foi submetida a uma etapa de centrifugação para formar o pellet de DNA, seguida pela lavagem com 50 μ L de etanol 70%, que remove sais e outras impurezas. Após a lavagem, o pellet foi seco em temperatura ambiente ou em estufa a baixa temperatura antes de ser ressuspendido para análise subsequente.

Posteriormente, as amostras foram enviadas ao IBTEC- UNESP para a realização da leitura dos sequenciamentos em equipamentos de capilaridade. Foram enviadas um total de 40 amostras sequenciadas.

Análises moleculares

Não foi possível receber e analisar os resultados a tempo da entrega do presente estudo. Contudo, é esperado que as análises deste projeto de pesquisa tragam resultados que contribuam para o avanço do conhecimento científico, tal como diversidade e evolução dos peixes de água doce na América do Sul. Como também, fornecer uma base sólida para futuras pesquisas e iniciativas de conservação envolvendo a espécie *Characidium pterostictum* e possíveis novas espécies que venham a ser descobertas. O trabalho continuará no próximo ano, e assim será possível desenvolver e analisar, e trazer resultados.

Referências:

- Buckup P. A. (1998). Relationships of the Characidiinae and phylogeny of Characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edited by: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M.; Lucena, C. A. Porto Alegre: Edipucrs, 123-144.
- Buckup, P. A. (1993a). The monophyly of the Characidiinae, a Neotropical group of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 108(3), 225–245. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-3642.1993.tb00297.x>
- Buckup, P. A. (1993b). Phylogenetic interrelationships and reductive evolution in neotropical Characidiin fishes (Characiformes, ostariophysi). *Cladistics*, 9(3), 305–341. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1096-0031.1993.tb00227>
- Dayrat, B. (2005), Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 407-415. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x>
- de Queiroz, K. (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879–886. <http://dx.doi.org/10.1080/10635150701701083>
- Ferguson, J. W. H. (2002). On the use of genetic divergence for identifying species. *Biological journal of the Linnean Society*, 75(4), 509-516
- Flot, J.-F., Blanchot, J., Charpy, L., Cruaud, C., Licuanan, W. Y., Nakano, Y., Payri, C., Tillier, S. (2011). Incongruence between morphotypes and genetically delimited species in the coral genus *Stylophora*: phenotypic plasticity, morphological convergence, morphological stasis or interspecific hybridization? *BMC Ecology*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-11-22>
- Floyd R, Abebe E, Papert A, Blaxter M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology* 11: 839–850.
- Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & Fong, J. D. (2024). ESCHMEYER'S CATALOG OF FISHES: GENERA/SPECIES BY FAMILY/SUBFAMILY. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>).
- Versão eletrônica acessada em 12 Jun 2024.
- Fujisawa T & Barraclough TG. (2013). Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology* 62(5): 707–724.
- Galimberti, A., Spada, M., Russo, D., Mucedda, M., Agnelli, P., Crottini, A., Ferri, E., Martinoli, A., Casiraghi, M. (2012). Integrated Operational Taxonomic Units (IOTUs) in

Echolocating Bats: A Bridge between Molecular and Traditional Taxonomy. *PLoS ONE*, 7(6), e40122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040122>

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>

Hillis, D.M. 2019. Species Delimitation in Herpetology. *Journal of Herpetology*, 53: 3-12

Knowles, L. L., & Carstens, B. C. (2007). Delimiting Species without Monophyletic Gene Trees. *Systematic Biology*, 56(6), 887–895. <https://doi.org/10.1080/10635150701701091>

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6): 1547–1549.

Melo, M. R. S., & Oyakawa, O. T. (2015). A New Species of *Characidium* Reinhardt (Characiformes, Crenuchidae) with a Distinctively Dimorphic Male. *Copeia*, 103(2), 281–289. <http://dx.doi.org/10.1643/ci-14-073>.

Nylander JAA. 2004. MrModeltest 2.2 – Program distributed by the author. *Evolutionary Biology Centre, Uppsala University*.

Puillandre N, Brouillet S & Achaz G. (2020). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources* 21(2): 609-620.

Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard M A, Huelsenbeck J.P. (2012). Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3): 539–542.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual (No. Ed. 2)*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.

Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ & Rambaut A. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution* 4: vey016.

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

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN. (2005). DNA barcoding Australia’s fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1462): 1847–1857.

Yeates, D. K., Seago, A., Nelson, L., Cameron, S. L., Joseph, L. & Trueman, J. W. H. (2011). Integrative taxonomy or iterative taxonomy? *Systematic Entomology*, 36, 209–217

Zanata, A. M., & Camelier, P. (2015). Two new species of *Characidium* Reinhardt (Characiformes: Crenuchidae) from northeastern Brazilian coastal drainages. *Neotropical Ichthyology*, 13, 487-498. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140106>.

Zanata, A. M., & Ohara, W. M. (2015). A new species of *Characidium* Reinhardt (Ostariophysi: Characiformes: Crenuchidae) from headwaters of rio Pacaás Novos, rio Madeira basin, Rondônia, Brazil. *Zootaxa*, 4021(2), 368-376. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4021.2.7>