

ANÁLISE MOLECULAR DE ESPÉCIES DE *CNESTERODON* GARMAN, 1895 (CYPRINODONTIFORMES: POECILIIDAE: POECILIINAE) DAS BACIAS DOS RIOS TIBAGI E IVAÍ, PARANÁ, BRASIL

Geovana Jeniffer Ortelã Gonçalves¹, João Paulo de Moraes-Silva², Weferson Júnio da Graça³, Alessandra Valéria de Oliveira⁴

¹ Acadêmica do curso Ciências Biológicas, Campus Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá. PIC. geovanaortela@outlook.com

² Coorientador e Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR, Brasil

³ Departamento de Biologia e Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá/PR, Brasil.

⁴ Orientadora. Docente do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – NUPÉLIA, Programa de pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá/PR, Brasil. avoliveira@uem.br

RESUMO

Cnesterodon tem 10 espécies válidas e possui uma série de caracteres derivados que corroboram o seu monofiletismo. *Cnesterodon hypselurus* ocorre em riachos da bacia do rio Tibagi e rio Itararé (drenagem do rio Paranapanema, alto rio Paraná) e possui como autapomorfias a presença de uma faixa marrom escura longitudinal ao longo de ambos os flancos e modificação no formato ósseo do terceiro raio do gonopódio em machos adultos. *Cnesterodon* sp. coletada em dois riachos na bacia do rio Ivaí possui características morfológicas semelhantes às de *C. hypselurus*. O gene citocromo C oxidase (COI) um marcador molecular mitocondrial funciona como “DNA barcoding” e é utilizado para distinguir espécies. Dessa forma, o presente projeto teve como objetivo caracterizar molecularmente *Cnesterodon hypselurus* e *Cnesterodon* sp., a fim de identificar se pertencem a mesma espécie ou não. Os valores encontrados de 6,86% para a distância genética entre *Cnesterodon hypselurus* e *Cnesterodon* sp. indicam que as espécies são distintas geneticamente, ou seja, a espécie da bacia do rio Ivaí é nova.

PALAVRAS-CHAVE: *Cnesterodon hypselurus*; COI; Identificação molecular.

1 INTRODUÇÃO

Cnesterodon está inserido na ordem Cyprinodontiformes, e contém peixes que habitam a bacia do alto rio Araguaia, no sistema Paraná – Paraguai, bacia do rio Uruguai e em drenagens costeiras que vão desde São Paulo até a Argentina (LUCINDA; REIS, 2005). *Cnesterodon* Garman 1895 possui 10 espécies válidas, com uma série de caracteres derivados que corroboram o monofiletismo do gênero e dos clados infragenéricos (LUCINDA, 2005). *Cnesterodon hypselurus* foi descrito por Lucinda e Garavello em 2001 de riachos da bacia do rio Tibagi e rio Itararé na bacia do rio Paranapanema, tendo como autapomorfias a presença de uma faixa marrom escura longitudinal ao longo de ambos os flancos e pelo formato ósseo do terceiro raio do gonopódio em machos adultos (LUCINDA; GARAVELLO, 2001). *Cnesterodon hypselurus* ocorre em oito localidades, sendo endêmica da bacia do alto rio Paraná (SILVA; JEREP; BENNEMANN, 2015) e está em estado de perigo (BRASIL, 2019).

Frota *et al.* (2016) mencionaram a existência de uma provável nova espécie, *Cnesterodon* sp., em dois riachos da bacia do rio Ivaí. Contudo, possui características morfológicas semelhantes com as de *C. hypselurus* e não se sabe ao certo se ambas constituem ou não a mesma espécie.

Marcadores moleculares podem ser úteis em estudos taxonômicos, discriminando espécies indistinguíveis morfológicamente ou com diferenças sutis. O gene citocromo C oxidase I (COI) é um marcador mitocondrial frequentemente utilizado nos estudos de identificação de espécies de diferentes grupos (AHMAD, *et al.*, 2021), uma vez que as espécies são representadas por um grupo de sequências muito similares deste fragmento gênico, o chamado “DNA barcoding” (HEBERT *et al.*, 2003). Sendo assim, o objetivo desse

trabalho foi caracterizar molecularmente as espécies *Cnesterodon hypselurus* e *Cnesterodon* sp. das bacias dos rios Tibagi e Ivaí, utilizando o marcador mitocondrial COI, visando averiguar se ambas pertencem ou não a mesma espécie.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Exemplares de *Cnesterodon hypselurus* e de *Cnesterodon* sp. foram coletados, via pesca elétrica, nas bacias dos rios Tibagi e do rio Ivaí, respectivamente. Os exemplares foram anestesiados segundo resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Os indivíduos foram fixados em álcool 70% e depositados na coleção ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá. As amostragens foram realizadas com parecer favorável (002/2012 e CEUA N 5680160117) do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM e com licença permanente para coleta e transporte de material zoológico SISBIO (ICMBio), processo n. 14028-1 de 10 de dezembro de 2008, concedidos a Weferson J. da Graça.

Para fim da extração do material genético foi utilizado o kit comercial da Promega e seguido seus protocolos. A quantificação de DNA ocorreu através de eletroforese em gel de agarose 1%. Na PCR, para amplificação da região COI, foi utilizado o par de primers para peixes e temperaturas propostos por Ivanova *et al.* (2007). O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 1% e o tamanho do fragmento estimado por comparação com DNA ladder 100pb. Na purificação do DNA amplificado utilizou-se Polietilenoglicol-NaCl (PEG-NaCl) e posteriormente o mesmo foi sequenciado utilizando o kit Big Dye Terminator, sendo que a determinação da sequência nucleotídica se deu pelo sequenciador automático ABI 3500.

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas nos programas BioEdit e MEGA 10, respectivamente, e a identificação molecular foi realizada por comparação com sequências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando a ferramenta "Blastn". A distância genética (p) foi calculada entre os indivíduos e o dendrograma neighbor-joining foi construído utilizando o modelo Kimura 2 Parâmetros, no programa Mega 10, com a utilização de sequências de *Cnesterodon* disponíveis no BoldSystems e Genbank.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram obtidas sequências nucleotídicas parciais do gene COI de um total de cinco espécimes, sendo três de *C. hypselurus* e dois de *Cnesterodon* sp. As sequências após alinhamento e edição, apresentaram 514 pares de bases. Foram obtidos três haplótipos, sendo um de *Cnesterodon* sp. e dois para *C. hypselurus*.

A distância genética (Quadro 1) obtida por meio da proporção de diferenças nucleotídicas entre os pares de sequências (distância p), entre *C. hypselurus* e *Cnesterodon* sp. foi alta, sendo aproximadamente de 6%. Levando em consideração o limiar de divergência de 2% como valor de corte na delimitação de espécies (HEBERT *et al.*, 2003; AHMAD, 2021), tais espécies podem ser consideradas distintas. Ademais, os valores de distância entre *Cnesterodon* sp. e *C. decemmaculatus* e *C. cf. raddai*, espécies morfologicamente diferentes, gira em torno de 4%, valor menor do que encontrado para as espécies estudadas neste trabalho. Ainda, os valores de distância intraespecíficos para *C. hypselurus* foi de 0,19%, 34 vezes menor do que o valor interespecífico. Comparando tal dado com os obtidos por Bingpeng *et al.* (2018), no qual a distância média interespecífica foi 31 vezes maior do que a distância média intraespecífica, se pode inferir que *Cnesterodon* sp. e *C. hypselurus* são espécies distintas.

Na árvore Neighbor-Joining (Figura 1) os exemplares de *Cnesterodon* sp. e *C. hypselurus* se posicionaram em grupos distintos.

Quadro 1: Médias das distâncias genéticas (distância p), com base no gene COI, entre diferentes espécies de *Cnesterodon* e *Fundulus heteroclitus*, utilizados neste estudo

	<i>Fundulus heteroclitus</i>	<i>Cnesterodon</i> sp.	<i>C. hypselurus</i>	<i>C. decemmaculatus</i>	<i>C. cf raddai</i>	<i>Cnesterodon</i>
<i>Fundulus heteroclitus</i>						
<i>Cnesterodon</i> sp.	0,1712					
<i>C. hypselurus</i>	0,1815	0,0686				
<i>C. decemmaculatus</i>	0,1777	0,0412	0,0695			
<i>C. cf raddai</i>	0,1858	0,0455	0,0723	0,0355		
<i>Cnesterodon</i>	0,1765	0,0394	0,0645	0,0361	0,0448	

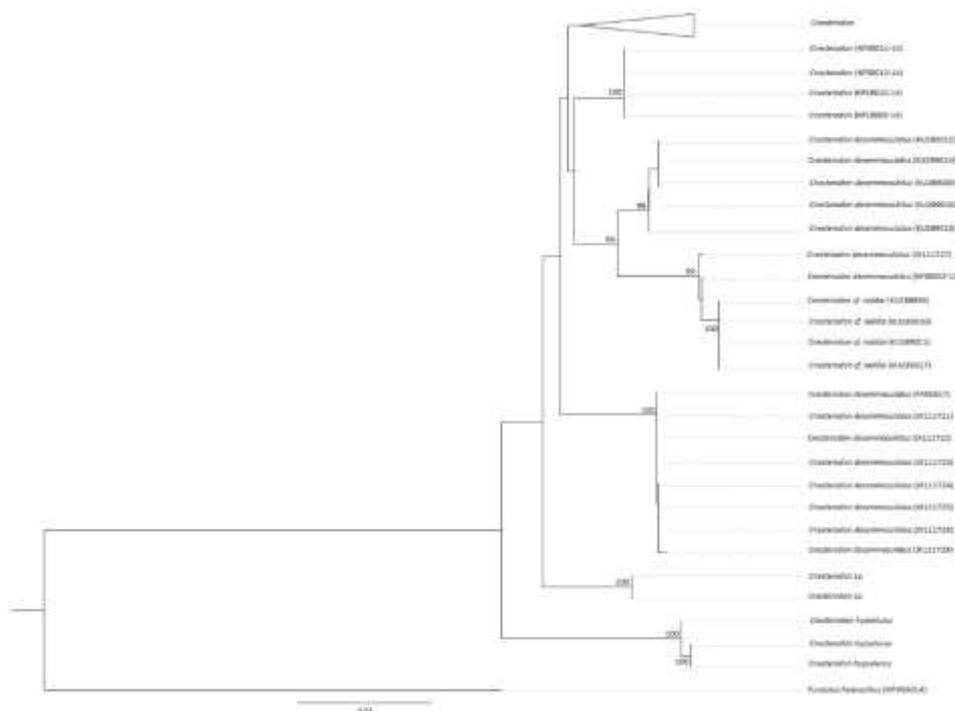


Figura 1: Árvore gênica obtida a partir de sequências do gene COI de *Cnesterodon*, pelo método de Neighbor-joining

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os valores de distância genética obtidos entre *Cnesterodon hypselurus* e *Cnesterodon* sp. sobressaem aos valores mínimos utilizados para delimitação de espécies utilizando o marcador molecular COI, sendo condizentes com valores apresentados por espécies distintas geneticamente, ou seja, a espécie da bacia do rio Ivaí é nova.

REFERÊNCIAS

AHMAD, Z. *et al.* Classificação molecular e estudo filogeográfico comparativo de espécies de morcegos insetívoros (*Pipistrellus coromandra*) de Punjab, Paquistão. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/RZWRyYbyHFXCkSYZzj6M5xK/abstract/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 15 abr. 2021.

BINGPENG, Xing *et al.* DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, jun., 2018. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0198109>. Acesso em: 10 jun. 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 370 de 1 de agosto de 2019. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 7 ago. 2019. Seção 1, p.64. Disponível em: <https://mapas.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-pan/pan-peixes-e-eglas-da-MA/1-ciclo/pan-peixes-e-eglas-da-ma-portaria-aprovacao-e-gat.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2021.

FROTA, Augusto *et al.* Inventory of the fish fauna Ivaí River basin, Paraná State, Brazil. **SciELO**, v. 16, n.3, jul., 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bn/a/CXydBZ4wVwh5DvVWG9bGhXn/?lang=en&format=html>. Acesso em: 20 jun. 2021.

HEBERT, Paul D. N. *et al.* Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **The Royal Society**, v. 270, n. 1, p. 596-599, ago, 2003. Disponível em: https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rsbl.2003.0025?casa_token=gAxpdk8kYMAAAA:PhEnAMUKO8qmBwyRsUxu5f5-b8w0pioTSpLCX1I3rBiG-f7RmXw2Dk-aDLFvlywmiAuSKlu-Ooz9S_hV. Acesso em: 10 abr. 2021.

IVANOVA, N. *et al.* Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 4, p. 544-548, 2007. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x?casa_token=VpuGvbpoJ9AAAAA%3AOr5kK5bld7T87bcD-eXUCL0MN0SCUhnXDUU8sUewZFO5zy9sK0BVAObRCgefHVeQDOsSliRmEj1F3Ba2. Acesso em: 10 abr. 2021.

LUCINDA, Paulo H. F. Systematics of the genus *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae). **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n.2, p. 259-270, jun., 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ni/a/97jsH5fhhbkWW7jd77fQFGGG/?lang=en>. Acesso em: 24 jun. 2021.

LUCINDA, Paulo H. F.; GARAVELLO, J.C. Two new species of *Cnesterodon* Garman, 1895 (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) from the upper Rio Paraná drainage. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS**, Série Zoologia, v. 13, n. 2, p. 119-138, 2001. Disponível em: <https://editora.pucrs.br/edipucrs/acessolivre/periodicos/comunicacoes-mct/download/2000.v13.n2.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2021.

LUCINDA, Paulo H. F.; REIS, Roberto E. Systematics of the subfamily Poeciliinae Bonaparte (Cyprinodontiformes: Poeciliidae), with an emphasis on the tribe Cnesterodontini Hubbs. **Neotropical Ichthyology**, v. 3, n. 1, p.1-60, jan./mar., 2005.

SILVA, Fernando M. da S.; JEREP, Fernando C.; BENNEMANN, Sirlei Terezinha. New record and distribution extension of the endangered freshwater fish *Cnesterodon hypselurus* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) in the upper Paraná River basin, Brazil. **Check List**, v. 11, n. 6, art.6 dez, 2015. Disponível em: <https://www.biotaxa.org/cl/article/view/11.6.1811>. Acesso em: 10 jun. 2021.