



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

**Programa de Pós-Graduação em
Genética Evolutiva e Biologia Molecular**

Via Washington Luís, Km 235 - Caixa Postal 676

CEP 13565-905 - São Carlos - SP - Brasil

e-mail ppgeev@power.ufscar.br

Fone/Fax: (0XX16) 3351-8306



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

NOVAS PERSPECTIVAS SOBRE A BIOLOGIA EVOLUTIVA DE *Astyanax* aff. *fasciatus*
DO PARQUE ESTADUAL DE VILA VELHA, ACESSADA DUAS DÉCADAS APÓS A
PRIMEIRA ABORDAGEM

Candidato: LUZ ELENA DE LA OSSA GUERRA

Orientador: Prof. Dr. ROBERTO FERREIRA ARTONI

Co orientador: Prof. Dr. DANIEL CARDOSO DE CARVALHO

Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para seleção a admissão ao Doutorado

São Carlos
2019



TÍTULO: Novas perspectivas sobre a biologia evolutiva de *Astyanax* aff. *fasciatus* do parque estadual de Vila Velha, acessada duas décadas após a primeira abordagem

Candidato: LUZ ELENA DE LA OSSA GUERRA

Orientador: Prof. Dr. ROBERTO FERREIRA ARTONI

Co orientador: Prof. Dr. DANIEL CARDOSO DE CARVALHO

RESUMO

A diversidade biológica está diretamente relacionada com as histórias evolutivas das paisagens. Há cerca de 35 milhões de anos se consolidou o que hoje se conhece como o segundo planalto paranaense no Sul do Brasil, mudando mediante estas transições geomorfológicas as condições ecológicas dos grupos biológicos existentes. Neste sentido, algumas formações geológicas adquiriram características exclusivas, permitindo o estabelecimento de populações animais. Este é o caso dos poços de desabamento que atingem o lençol freático, conhecidos como Furnas do Parque Estadual de Vila Velha (PEVV), que abriga uma espécie de peixe. Este cenário suporta o principal objetivo deste projeto que é analisar geneticamente as populações selvagens isoladas (PIs) nas Furnas do PEVV e não isoladas (PnI) na bacia do Alto Rio Tibagi, do peixe Characidae *Astyanax* aff. *fasciatus*. Este modelo oportuniza novas perspectivas sobre especiação através de abordagens que integrem qualitativa e quantitativamente a variação ecológica, genética e fenotípica subjacente ao isolamento reprodutivo. Embora o estudo da especiação tenha recebido crescente atenção nas últimas décadas, ainda se tem lacunas de conhecimento acerca dos mecanismos causais que impulsionam o processo de especiação na natureza. Os cientistas evolucionistas reconhecem cada vez mais que múltiplos mecanismos contribuem para o processo de especiação. No entanto, poucas populações selvagens estão submetidas a um isolamento em uma escala perceptiva de tempo em sistemas naturais. Assim, esta proposta irá explorar um ambiente único que abriga populações naturais da mesma espécie que vivem em condições isoladas (PIs) e não isoladas (PnI) por muitas gerações.

Palavras-chave: Furnas, isolamento, geomorfologia, genética.



1. INTRODUÇÃO

1.1. Formação Furnas de Vila Velha e Lagoa Dourada, Paraná

As Furnas de Vila Velha, (localizadas no Parque Estadual de Vila Velha (PEVV)) estão situadas geologicamente no segundo planalto paranaense, no Arenito de Vila Velha que está sob a forma de platôs sub-horizontais, com sobreposição de ritmitos e diamictitos (França et al., 1996). O segundo planalto ou planalto de Ponta Grossa (Fig 1B) constitui uma paisagem suavemente ondulada, constituída por sedimentos paleozoicos do devoniano, carbonífero e do permiano (Maack, 1969).

A palavra *Furnas* (que significa “cavernas profundas e íngremes”) são dolinas de abatimento formadas pela existência de cavidades com profundidades superiores a 100m, que podem ser geradas pela erosão dos arenitos sob influência do cruzamento de estruturas tectônicas (falhas e fraturas) ou podem constituir carste subjacente (Maack, 1969; Melo et al., 2011). Brevemente, a história geológica das Furnas de Vila Velha começa desde os processos de formação da bacia do Paraná, desde o Ordoviciano superior até o Cretáceo superior (a sine, 1996). Alguns gráficos estratigráficos do Carbonífero Tardio ao Permiano Superior foram analisados por Holz et al., (2010), para contribuir ao conhecimento da formação do Arenito de Vila Velha como resultado do empilhamento de três lobos espalhados em torno de 30 m de espessura cada um e 2 km de largura, depositado provavelmente durante a escavação do vale inciso da Lapa. Por outra parte, processos de intemperismo em Vila Velha responsáveis pelas características pseudo-cársticas começaram há 35Ma, sendo mais intensos entre 17 e 9 Ma (Riffel et al., 2015). Produto destes processos, existem quatro Furnas dentro do PEVV, mas apenas três possuem lagos no interior (Furnas 1, 2 e 4, em sequência, a Furna 3 é seca, Fig. 1C). Seguindo esta ordem, encontra-se a lagoa dourada, reconhecida como uma depressão formada também no arenito das Furnas com cerca de 200 m de diâmetro e lâmina d'água de até 5,4 m, situada na bacia hidrográfica do Rio Guabiroba, um afluente do alto Rio Tibagi no Estado do Paraná (Fig 1A) (de Melo et al., 2000).

1.1.1. Bacia hidrográfica do rio Guabiroba

A rede de drenagem fluvial do PEVV é formada pelos rios Barrozinho e Quebra Perna que se unem originando o rio Guabiroba (Michels-Souza et al., 2011). A bacia hidrográfica do Rio Guabiroba, à qual pertence a Lagoa Dourada, tem forma aproximadamente triangular, com cerca de 360 km² de superfície. O Rio Guabiroba corresponde à base do triângulo. Apresenta direção WNW-ESE, com sentido da drenagem para WNW. Esta direção geral é subparalela a

importantes estruturas rúpteis da área, notando-se, nas cabeceiras do Rio Guabiroba, trechos com nítido controle por estas estruturas. Os topos das elevações na bacia do Rio Guabiroba variam de 1.117m.s.n.m. a nordeste até 865 m s.n.m. a sudoeste, configurando aproximadamente a mesma tendência geral de caimento dos topos para oeste (de Melo et al., 2000).

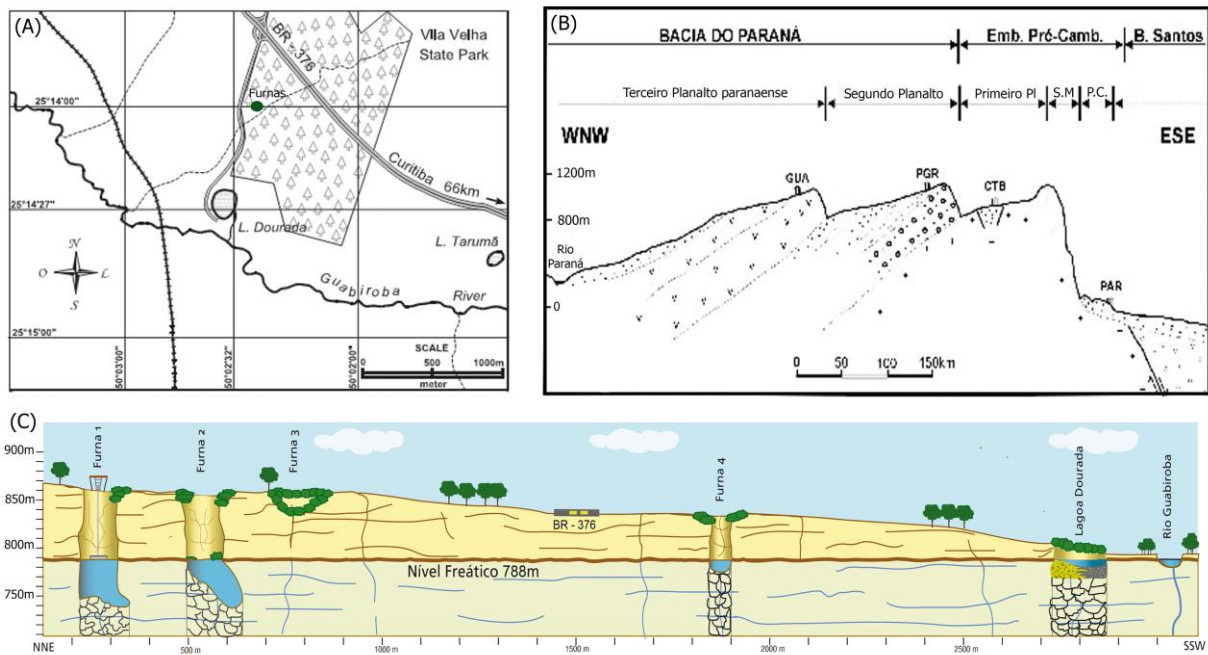


Fig.1. (A) Mapa apresentando Ubicação da Lagoa Dourada e sua conexão com o rio Guabiroba (Moro et al., 2004). (B) Esquema do Estado do Paraná mostrando a estrutura geológica do relevo (de Melo et al., 2000) (C) Perfil das Furnas do Parque Estadual Vila Velha (Mineropar).

1.2. Ocorrência de populações de *Astyanax* aff. *fasciatus* no PEVV

A família Characidae é uma das mais diversas e abundantes no Neotrópico. O gênero *Astyanax* é um dos mais especiosos da ordem Characiformes, com 86 espécies descritas e distribuídas em praticamente todos os cursos de água da região Neotropical (Lima et al., 2003). Todas as espécies são conhecidas popularmente como lambaris. Na bacia do rio Tibagi, onde se localiza o Parque Estadual de Vila Velha (PEVV), são reconhecidas quatro espécies (Shibatta et al., 2003). Populações de *Astyanax* aff. *fasciatus* habitam no interior de algumas Furnas (especialmente Furna 2) (fig. 2) e na lagoa dourada. Existe registro de uma população extinta na Furna 1, devido a eutrofização por deposição de fezes de andorinhas que constroem ninhos nas paredes das Furnas durante o período reprodutivo, resultando em depleção de oxigênio dissolvido na coluna de água (Matoso et al, 2010). Um evento histórico

que foi potencializado pelo efeito antrópico de visitação da Furna 1 com acesso de turistas facilitado por elevador panorâmico (Artoni, *informação pessoal*).



Fig. 2. *Astyanax* aff. *fasciatus*. Exemplar coletado na furna 2 do PEVV.

A origem destas populações ainda é incerta, e ainda não tem sido realizado estudos que a confirmem. Tem sido relatadas diferenças morfométricas entre as populações da Furna 1 (hoje extinta) e Furna 2, demonstrando que essas populações foram submetidas a pressões seletivas distintas e ressaltando a singularidade desses ambientes, além disso, reforça a necessidade de preservá-los (Gross et al., 2004; Shibatta and Artoni, 2005). Populações de *A. aff. fasciatus* na Furna 2 tem mostrado uma forte preocupação em termos de conservação e variabilidade genética (Artoni and Almeida Matiello, 2003), estudos prévios relatam uma distinção haplotípica (Matoso et al., 2010; Artoni and Almeida Matiello, 2003) e diferenças cromossômicas (Gross et al., 2004) devido ao isolamento genético próprio das características do habitat. Isto, reafirmando mais uma vez questões que podem ser resolvidas usando análises integrativas e empregando marcadores massivos. Essa configuração torna as populações desses peixes únicas confinadas em ambientes isolados sob condições abióticas muito semelhantes e primitivas. Segundo informação pessoal do pesquisador Dr. Anders Nilsson da Lund Universit, Suécia, nosso parceiro neste projeto, nem mesmo as espécies de peixes que habitam os *Blues Holes* das Bahamas representam um modelo de isolamento populacional como o verificado para as Furnas do PEVV.

Por outro lado, a Lagoa Dourada, mostra-se como um ambiente interessante para o refúgio de espécies de peixes do Alto Rio Tibagi, embora seja conectada a este sistema de drenagem pelo Rio Gabiroba. Além, da espécie *Astyanax* aff. *fasciatus*, espécies de caracídeos como *A. altiparanae* e *Bryconamericus iheringii* (Michels-Souza et al., 2011) podem ser encontrados na Lagoa Dourada. Esta fauna de peixes é formada por espécies residentes que realizam pequenas migrações, entre a lagoa e o rio Guabirola, na procura de alimento e de locais para a reprodução. Com isto, é possível levantar a hipótese de que estas populações tenham maior variação genética quando comparadas com populações de *A. aff. fasciatus* das Furnas.



1.3. Contribuições ao entendimento da dinâmica das Furnas de PEVV

A integração de informações fósseis com filogenias moleculares oferece esforços potenciais junto com métodos de datação molecular para reconstruir tempos de diversificação dos seres vivos (Near et al., 2005; Ho and Duchêne, 2014), e eventos evolutivos históricos (Hipsley and Müller, 2014). Estes dados fornecem algumas informações em torno da dinâmica de manutenção de populações naturais de *Astyanax* aff. *fasciatus* nas furnas e sua escala de tempo. Usando ferramentas como o relógio molecular, como um método probabilístico, é possível por meio da distribuição de *Poisson* indicar padrões de substituição de muitos genes para fornecer *insights* sobre a história de todo o organismo (Bromham and Penny, 2003). As calibrações geralmente são baseadas em evidências fósseis ou geológicas, e sua escolha pode ter um enorme impacto nas estimativas moleculares de escalas de tempo evolutivas (Ho and Duchêne, 2014).

A genômica revolucionou a forma como entendemos a evolução, a ecologia e a fisiologia, mas mesmo com os recentes avanços, o estudo do comportamento animal demorou em adotar tecnologias genômicas (Bengston et al., 2018). Algumas dessas tecnologias podem ajudar a responder desde perguntas mais simples até abordagens mais complexas. Ferramentas genômicas incluem sequências conhecidas (sequenciamento completo do exoma, enriquecimento direcionado) ou o direcionamento de sítios de restrição distribuídos aleatoriamente em todo o genoma (sequenciamento de DNA associado ao sítio de restrição (RAD-Seq) e genotipagem por sequenciamento (GBS)).

Como a manutenção da população de *Astyanax* aff. *fasciatus* nas furnas de Vila Velha é reconhecida como uma pergunta sem uma resposta abrangente, os marcadores genéticos gerados via GBS ou RAD-Seq podem ser usados, neste sentido, para realizar estudos de associação genômica ampla (GWAS) ou para identificar QTLs (*Quantitative trait loci*) que podem estar associado a um tipo de comportamento específico, identificando regiões genéticas em desequilíbrio de ligação com alelos envolvidos na restrição da plasticidade (Bengston et al., 2018). Nesse caso, também, a baixa diversidade genética pode aumentar o risco de extinção de pequenas populações, elevando a endogamia e a depressão por endogamia, reduzindo o potencial adaptativo (Coleman et al., 2018). Todas essas situações poderiam conduzir a informações relevantes para desvendar o comportamento genético intrínseco das populações de *A. aff. fasciatus* do PEVV.



Os papéis relativos da deriva genética, da seleção divergente e da seleção de reforço são questões básicas para orientar esta pesquisa. Aqui é crucial estabelecer marcadores moleculares a serem ligados a fenótipos de interesse e submetê-los a análise de similaridade, agrupamentos e relações de herança. A partir da integração de dados moleculares com morfometria e marcadores cariotípicos, elucidamos vários caminhos evolutivos, incluindo a especiação em outros grupos de *Astyanax* (Castro et al., 2014b, 2014a).

1.4. *Conservação das populações de peixes no PEVV*

Os dados genômicos têm tido uma importância crescente na biologia da conservação, principalmente na designação de unidades de conservação, unidades evolutivamente significativas (ESUs), áreas protegidas e espécies ameaçadas (Crandall et al., 2000). Da mesma forma, Moritz (1994) enfatiza no passado evolutivo de populações isoladas um potencial distinto e adaptado para existir unicamente em tais condições ambientais. Devemos considerar que a fisiografia do PEVV, como uma unidade, é uma área importante em termos de eventos históricos evolutivos, e as populações de peixes significam unidades de conservação e subunidades que compõem um antigo evento geológico. Alguns autores (Funk et al., 2012) descrevem a necessidade de incluir abordagens moleculares para entender, definir e proteger áreas naturais. Frankham (2010) também afirma que a falta de manejo genético em algumas populações não se deve à falta de diretrizes científicas, mas devido à falha em não considerar questões genéticas no manejo silvestre. Isto é refletido, por exemplo, nas populações extintas na Furna 1 do PEVV, o qual significou uma perda da diversidade genética e as características únicas de uma espécie capaz de sobreviver neste ambiente, que se configura *per se* como de especial interesse e de um alto valor histórico.

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS

As populações isoladas tendem a reduzir a variabilidade genética e conseqüentemente sua habilidade em se adaptar às mudanças ambientais. As populações do lambari *Astyanax aff fasciatus* estão submetidas a eventos seletivos ocasionados por sua restrição de deslocamento devido às características do seu habitat. Dadas às condições ecológicas sob as quais se encontram estas populações, é necessário inferir sobre as estratégias e padrões genéticos e evolutivos que experimentam estes peixes. Entre as hipóteses a serem testadas, podemos destacar: *i. A dinâmica populacional destes peixes isolados nas Furnas evidencia efeitos de*



*deriva genética causada pela endogamia, resultando em alterações fenotípicas; ii. A variabilidade genética das populações no ambiente isolado apresenta uma tendência a diminuir quando comparado com populações sem restrição ao deslocamento e ao fluxo gênico; iii. A idade das populações de *A. aff. fasciatus* junto com a idade geológica das Furnas de Vila Velha possibilitariam o entendimento da evolução e dinâmica de populações isoladas permitindo a criação de um modelo natural como foco de estudo e conservação biológica.*

OBJETIVO GERAL

Estimar o tempo de colonização da Furna 2 pelos *Astyanax aff. fasciatus* no contexto evolutivo e evidenciar possíveis efeitos de endogamia nesta população, confrontando a variabilidade genética desta população isolada com outras populações váveis da mesma espécie.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Datar geneticamente as populações de *Astyanax aff. fasciatus* no ambiente isolado e não isolado e contrastar com sua datação geológica.
- Quantificar a variação genômica intra- e entre populações isoladas e não isoladas no PEVV.
- Explorar o ambiente isolado (Furnas) e não isolado (Lagoa Dourada) usando *metabarcoding*.
- Confrontar os dados com outros modelos de peixes isolados (Blue Holes e de cavernas).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto conta com autorização do Instituto Ambiental de Paraná (IAP) N° 15.18, protocolo N° 15.190.528-5 e licença permanente para coleta de material zoológico do IBAMA-CMBio N° 15115-1. Os ensaios experimentais estão resguardados por parecer da Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA N° 0388001).



Capítulo 1. Datação molecular e geomorfológica desvendam o enigma da ocorrência do peixe *Astyanax aff. fasciatus* isolado em poços de desabamento naturais no Sul do Brasil.

Potencial de divulgação na BMC Evolutionary Biology (1471-2148) – Qualis CBI:B1; Fator de Impacto: 3.559

Coleta e extração de DNA

Os indivíduos utilizados para análises morfológicas, comportamentais e moleculares serão amostrados a partir de populações selvagens isoladas e não isoladas da espécie *Astyanax fasciatus*. A extração do DNA genômico será realizada com tampão salino (Aljanabi and Martinez, 1997), a partir de tecido muscular. Cada amostra de aproximadamente 100 mg será homogeneizada em 800 µL de tampão salino (0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH = 8,0 e 2 mM EDTA pH = 8,0) usando pistilo adaptado a um agitador mecânico por 10-15s. Se adicionará 80 µL de 20% SDS (Cf = 2%) e 16 µL Proteinase K 20 mg/mL (Cf = 400 mg/mL) misturando tudo o conteúdo. Incubar as amostras a 55-65 °C durante pelo menos 1h ou *overnight*. Se adicionará 300 µL de NaCl 6M. Agitação das amostras em vortex por 30s na velocidade máxima e centrifugar por 20 minutos a 13.000g. Se transfere o sobrenadante para outro tubo. Adição de um volume igual de isopropanol. Se incubará a -20°C por 1h. Logo, se realizará uma centrifugação durante 10 minutos a 4 °C a 13.000 g. Se lavará o pellet com 300 µL de etanol a 70%, centrifugação por 5 minutos a 13.000 g. Secado e ressuspensão 300-500 µL H₂O estéril (100 µL = 98 µL TE + 2 µL RNase 10 mg/µL).

Amplificação de DNA: Método de código de barras

O gene mitocondrial citocromo oxidase 1 (COI) será amplificado de acordo com a metodologia de Hebert et al., (2003). A reação de PCR será realizada em um volume final de 25 µL: 18.65 µL de água ultrapura, 2.5 µL de 10X DNA Taq buffer, 0.5 µL de MgCl₂ (10 mM), 0.4 µL de dNTP (8 mM), 0.5 µL de *primers* L6252-Asn (5'-AAGCGGGGGAAAGCCCCGGCAG-3'), 0.5 µL H7271-COXI (5'TCCTATGTAGCCGAATGGTTCTTTT-3') (Melo et al., 2011) 0.2 µL de Taq polymerase (1U), e 1.0 µL de DNA genômico (50 ng). A condição da PCR consistirá de uma desnaturação inicial de 94°C (5 min), seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, alinhamento a 56.7°C por 30 s e extensão a 72°C por 2 min. A extensão final a 72°C por 20 min. Depois da amplificação, os produtos de PCR serão corados com GelRed™ e visualizados em gel de agarose a 1% para determinar a qualidade e o tamanho dos fragmentos



amplificados. Os produtos de PCR que serão utilizados para sequenciamento serão purificados com o Kit de purificação de ADN para PCR GE Healthcare Life Sciences™ *illustra™* *GFX™*. As sequências serão alinhadas usando o algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) implementado no software Geneious v4.8. (Kearse et al., 2012), e os pontos mutacionais serão verificados manualmente, para evitar uma má interpretação do software. A identificação molecular das espécies seguirá a análise de similaridade das sequências parciais do gene COI com o arquivo do banco de dados do projeto BOLD (*Barcode of life data systems*), acessível em (<http://v3.boldsystems.org/>).

Estimação de tempos de divergência

A fim de estimar o tempo de divergência das populações de peixes nas Furnas, faremos uma pesquisa sobre registros fósseis, se existir, e assim realizaremos a calibração a partir dele. Além disso, o marcador molecular será usado para medir as taxas de divergência. Regiões potenciais do genoma mitocondrial: COI (citocromo oxidase 1), 16S, NAD4, Cytb, etc., podem fornecer uma boa taxa de mutação para analisar os tempos de divergência. Os comprimentos médios dos ramos de todas as árvores pós-*burnin* resultantes da análise bayesiana serão utilizados na estimativa do tempo de divergência, estes serão gerados no software BEAST v1.8 (Bouckaert et al., 2014). A probabilidade penalizada parece ser o método mais apropriado para avaliar a veracidade de pontos de calibração individuais (Near et al., 2005), usando o programa de r8s v.1.7 (Sanderson, 2003).

Datação a partir de estratigrafia e ¹⁴C

Três amostras serão retiradas dos testemunhos (conchas juvenis e adultas, fragmentos de conchas, detritos vegetais, restos de madeira e lama orgânica) das localidades de estudo. Estas amostras serão datadas pelo radiocarbono convencional (CENA-USP) e por AMS (Acelerador de Espectrômetro de Massa) no Geochron Laboratories da Krueger Enterprises Inc., Cambridge MA, EUA. parceiros do Laboratório de Estudos Costeiros (LECost) do Departamento de Geologia da Universidade Federal do Paraná. Os resultados serão calibrados usando o programa Calib Radiocarbon Calibration 5.0 (Stuiver e Reimer, 1986) e corrigidas para um ΔR de 8 ± 17 anos, conforme definido em Angulo et al. (2005) para o sul do Brasil. As idades acima dos 30.000 anos BP não serão calibradas, porque esses valores ficam ao alcance do programa de calibração.



Capítulo 2. Convivendo com a endogamia: Análises da estrutura genética populacional de *Astyanax aff. fasciatus* isolados no Sul do Brasil.

Potencial de divulgação na Heredity (0018-067X) – Qualis CBI:A2; Fator de Impacto: 3.801

Restriction site-associated DNA sequencing (RADseq)

Pretende-se testar se as IsP (populações isoladas) experimentam efeitos mais fortes de deriva (N_e) e exibem maiores níveis de isolamento reprodutivo em comparação com NiP (populações não isoladas). Para estimar o parentesco genético e o fluxo gênico, criaremos matrizes de distâncias genômicas entre as populações a partir das frequências alélicas de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e estimaremos o fluxo gênico usando uma análise multivariada de SNPs neutros identificados no sequenciamento RAD. O protocolo será realizado de acordo com o RADseq de dupla digestão (ddRADseq) de (Peterson et al., 2012) e os testes ecológicos. As análises de bioinformática e estatísticas serão realizadas seguindo a *pipeline* de *Stacks* (Catchen et al., 2013) para análises de dados genômicas. O sequenciamento do RADseq será realizado em uma plataforma Illumina HiSeq X.

Dentro de cada IsP e NiP, examinaremos a diversidade de nucleotídeos, heterozigosidade e F_{IS} , testando a hipótese de que as populações das Furnas estejam estruturadas. Avaliaremos o histórico demográfico das populações (por exemplo, evidências de um gargalo recente) usando o espectro de frequências alélicas. A perda global de diversidade genética dentro de cada população fornecerá uma estimativa da força da deriva genética e do tamanho efetivo da população a longo prazo (N_e).

Capítulo 3. Contraste da diversidade taxonômica em poços de desabamento e corpos de água abertos (Lagoa Dourada) a traves da análise de *eDNA metabarcoding*

Potencial de divulgação na Molecular Ecology (1365-294X) – Qualis CBI:A1; Fator de Impacto: 5.855

Coleta de amostras

Amostras de sedimento e água serão coletadas em vários pontos da Furna 2 do PEVV para obter uma amostragem significativa de *eDNA* para detecção de espécies de peixes e organismos invertebrados. Três amostras de água de 1L serão coletadas no local, separadas por 3-5 m, em frascos estéreis de 10 a 30 cm abaixo da superfície da água e imediatamente colocadas em gelo (Hobbs et al., 2017; Shaw et al., 2016). A filtragem das amostras (água e



sedimento) será realizada segundo o protocolo Ambiental de DNA para Ecossistemas Aquáticos de Água Doce (Hobbs et al., 2017).

Amplificação e sequenciamento

A amplificação será realizada segundo Sales et al., (2019), isto é, a amplificação de *eDNA metabarcoding* será feita usando os primers específicos 12S descritos por Miya et al., (2015). Amplicons de ~ 172pb de uma região variável do gene 12S rRNA mitocondrial serão obtidos com os primers (MiFish-U-F, 5'-GCCGGTAAACTCGTGCCAGC-3'; MiFish-U-R, 5'-CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'). O sequenciamento será realizado na plataforma Multiplex Illumina Miseq usando 2 conjuntos de 96 primers com oligo-tags de conjuntos de bases específicas da amostra e um número variável (2-4) de Ns (posições totalmente degeneradas) para aumentar a variabilidade nas sequências amplificadas. O protocolo de amplificação por PCR será realizado segundo Sales et al., (2019).

Preparação da biblioteca

Os produtos de PCR serão agrupados em dois conjuntos diferentes e purificados usando colunas MinElute (Qiagen), e bibliotecas Illumina serão construídas a partir de cada conjunto, usando um kit de preparação de bibliotecas sem o NextFlex PCR (Bioo Scientific) com tags de biblioteca de 6 pb. Uma seleção de tamanho do lado esquerdo será realizada usando 1.1x Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). As bibliotecas serão então quantificadas por qPCR usando um kit de quantificação de NEPCext qPCR (New England Biolabs) e reunidas em concentrações equimolares juntamente com PhiX a 1% (v3, Illumina). As bibliotecas serão executadas em uma molaridade final de 10 pM na plataforma Illumina MiSeq em uma única célula de fluxo MiSeq usando a química 2x 150bp v2.

Análises bioinformáticas

Para as análises bioinformáticas será usado o pacote OBITools *metabarcoding* (Boyer et al., 2016). A ferramenta FastQC será usada para avaliar a qualidade das leituras, e a remoção do iniciador serão conduzidas usando o comando *ngs filter*. A delimitação da Unidade Taxonômica Operacional Molecular (MOTU) será realizada utilizando o algoritmo SWARM 2.0 (Mahé et al., 2015) e *ecotag* (Boyer et al., 2016) será utilizado para a subsequente atribuição taxonômica.

Análises estatísticas

Será realizado uma análise não paramétrica PERMANOVA (*Permutational multivariate analysis of variance*) no software R v3.5.1 (<https://www.R-project.org/>). Gráficos



multidimensionais não-métricos serão obtidos usando a dissimilaridade de Bray-Curtis, através do software PAST 3.14 (Hammer et al., 2001).

4. COLABORAÇÕES NACIONAIS E INTERNACIONAL

- i. Laboratório de Estudos Costeiros (LECost), Departamento de Geologia da Universidade Federal de Paraná (UFPR). Colaboração para a datação geomorfológica das Furnas.
- ii. Laboratório de Genética da Conservação, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais -PUC-Minas. Colaboração para a análise de metabarcoding (eDNA).
- iii. Laboratório de Genética em Aquicultura e Conservação do Centro de Aquicultura da UNESP – Jaboticabal. Colaboração para a análise ddRadSeq.
- iv. Laboratório de Ecologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Colaboração nos desenhos experimentais e em análises de comportamento.
- v. Aquatic Ecology Laboratory, Lund University, Suécia. Colaboração para a análises ecológicas e no estabelecimento do modelo de estudo.

5. VIABILIDADE TÉCNICA E FINANCEIRA DA PROPOSTA

A referida proposta de projeto conta com a estrutura do Laboratório de Genética Evolutiva (LabGEV). O LabGEV possui a estrutura necessária para o desenvolvimento das análises moleculares. Além disto, os proponentes da referida proposta possuem parceria com o Laboratório de Estudos Costeiros (LECost) do Departamento de Geologia da Universidade Federal do Paraná que contribuirá na datação e análises geológicas necessárias, assim como parcerias do Laboratório de Ecologia da UTFPR, e o laboratório de Genética e conservação da PUC-Minas. O suporte financeiro desta proposta conta com apoio de diversos projetos aprovados no LabGEV.

6. RESULTADOS ESPERADOS

A partir da implementação do presente projeto pretende-se atingir vários impactos, entres os mais destacados:

Obtenção de dados genômicas que respondam aos aspectos evolutivos mais importantes que levaram à preservação das populações Isoladas (PIs) nas Furnas do PEVV;

O grupo de pesquisa envolvido neste projeto consolidará parcerias nacionais e internacionais com um amplo e rico conhecimento acerca dos temas relacionados a evolução, ecologia, e



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angulo, R.J., Souza, M.C., Reimer, P., Sasaoka, S.K., 2005. Reservoir effect of the southern and southeastern Brazilian coast. *Radiocarbon* 47, 67–73.
- Aljanabi, S. M., and Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25, 4692–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9358185> [Accessed June 25, 2018].
- Artoni, R. F., and Matiello, M. C. a (2003). Genética De Peixes Neotropicais. I. Conservação Genética Dos Peixes No Parque Estadual De Vila Velha , Paraná, Brasil. *Publ. UEPG Ciências Biol. e da Saude* 9, 7–15.
- Bengston, S. E., Dahan, R. A., Donaldson, Z., Phelps, S. M., Van Oers, K., Sih, A., et al. (2018). Genomic tools for behavioural ecologists to understand repeatable individual differences in behaviour. *Nat. Ecol. Evol.* 2, 944–955. doi:10.1038/s41559-017-0411-4.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., et al. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput. Biol.* 10. doi:10.1371/journal.pcbi.1003537.
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P., and Coissac, E. (2016). obitools : a unix -inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Resour.* 16, 176–182. doi:10.1111/1755-0998.12428.
- Bromham, L., and Penny, D. (2003). The modern molecular clock. *Nat. Rev. Genet.* 4, 216–224. doi:10.1038/nrg1020.
- Castro, J. P., Moura, M. O., Moreira-Filho, O., Shibatta, O. A., Santos, M. H., Nogaroto, V., et al. (2014a). Diversity of the *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae) in the Atlantic Forest, Brazil: species limits and evolutionary inferences. *Rev. Fish Biol. Fish.* 25. doi:10.1007/s11160-014-9377-3.
- Castro, J. P., Moura, M. O., Moreira-Filho, O., Shibatta, O. A., Santos, M. H., Nogaroto, V., et al. (2014b). Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). *Neotrop. Ichthyol.* 12, 429–438. doi:10.1590/1982-0224-20130222.
- Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., and Cresko, W. A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol. Ecol.* 22, 3124–3140. doi:10.1111/mec.12354.
- Coleman, R. A., Gauffre, B., Pavlova, A., Beheregaray, L. B., Kearns, J., Lyon, J., et al. (2018). Artificial barriers prevent genetic recovery of small isolated populations of a low-mobility freshwater fish. *Heredity (Edinb).* 120, 515–532. doi:10.1038/s41437-017-0008-3.
- Crandall, K. a, Bininda-emonds, O. R. P., Mace, G. M., and Wayne, R. K. (2000). Considering evolutionary processes in Conservation Biology. *TREE* 15, 290–295.
- de Melo, M. S., Fonseca Giannini, P. C., and Ruiz Pessenda, L. C. (2000). Gênese e evolução da lagoa Dourada, Ponta Grossa, PR. *Rev. do Inst. Geológico, São Paulo* 21, 17–31.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–7. doi:10.1093/nar/gkh340.
- França, A. B., Winter, Wi. R., and Assine, M. L. (1996). Arenitos Lapa-Vila Velha: Um Modelo De Trato De Sistemas Subaquosos Canal-Lobos Sob Influência Glacial, Grupo Itararé (C-P), Bacia Do Paraná. *Rev. Bras. Geociências* 26, 43–56. doi:10.25249/0375-7536.19964356.
- Frankham, R. (2010). Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biol. Conserv.* 143, 1919–1927. doi:10.1016/j.biocon.2010.05.011.
- Funk, W. C., McKay, J. K., Hohenlohe, P. A., and Allendorf, F. W. (2012). Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends Ecol. Evol.* 27, 489–496. doi:10.1016/j.tree.2012.05.012.



- Gross, M. C., Schneider, C. H., Matiello, M. C. de A., Leite, M. de L., Bertollo, L. A. C., and Artoni, R. F. (2004). Population structure, fluctuating asymmetry and genetic variability in an endemic and highly isolated *Astyanax* fish population (Characidae). *Genet. Mol. Biol.* 27, 529–535. doi:10.1590/S1415-47572004000400011.
- Hammer, D. A. T., Ryan, P. D., Hammer, Ø., and Harper, D. A. T. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Available at: <http://palaeo-electronica.org>http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm. [Accessed June 22, 2019].
- Hebert, P. D. N., Cywinska, a., Ball, S. L., and deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270, 313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218.
- Hipsley, C. A., and Müller, J. (2014). Beyond fossil calibrations: Realities of molecular clock practices in evolutionary biology. *Front. Genet.* 5, 1–11. doi:10.3389/fgene.2014.00138.
- Ho, S. Y. W., and Duchêne, S. (2014). Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. *Mol. Ecol.* 23, 5947–5965. doi:10.1111/mec.12953.
- Hobbs, J., Goldberg, C. S., Helbing, C. C., and Veldhoen, N. (2017). Environmental DNA Protocol for Freshwater Aquatic Ecosystems, Version 2.1.
- Holz, M., França, A. B., Souza, P. A., Iannuzzi, R., and Rohn, R. (2010). A stratigraphic chart of the Late Carboniferous/Permian succession of the eastern border of the Paraná Basin, Brazil, South America. *J. South Am. Earth Sci.* 29, 381–399. doi:10.1016/j.jsames.2009.04.004.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., et al. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199.
- Lima, F. C. T., Malabarba, L. R., Buckup, P. A., Silva, J. F. P., Vari, R. P., Harold, A., et al. (2003). “Família Characidae: Gêneros incertae sedis,” in *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*, ed. EDIPUCRS (Porto Alegre), 106–169.
- Maack, R. (1969). *Geografia física do Estado de Paraná*. 4th ed. Ponta Grossa: Editora UEPG.
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., and Dunthorn, M. (2015). Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ* 3, e1420. doi:10.7717/peerj.1420.
- Melo, B. F., Benine, R. C., Mariguela, T. C., and Oliveira, C. (2011). A new species of *Tetragonopterus* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae: Tetragonopterinae) from the rio Jari, Amapá, northern Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 9, 49–56. doi:10.1590/S1679-62252011000100002.
- Melo, M. S. de, Guimarães, G. B., Pontes, H. S., Massuqueto, L. L., Pigurim, I., Bagatim, H. Q., et al. (2011b). Carste em rochas não-carbonáticas: o exemplo dos arenitos da formação furnas, campos gerais do Paraná/Brasil e as implicações para a região. *Espeleo-Tema* 221, 81–97.
- Michels-Souza, M. A., Hackradt, C. W., Artoni, R. F., and Sene-Silva, G. (2011). A ictiofauna das lagoas adjacentes a lagoa dourada e Tarumã no Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Paraná. *Inst. Ambient. do Paraná, Curitiba* 1, 1–374.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., et al. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.* 2. doi:10.1098/rsos.150088.
- Moritz, C. (1994). Defining ‘Evolutionarily Significant Units’ for conservation. *Trends Ecol. Evol.* 9, 373–375. doi:10.1016/0169-5347(94)90057-4.
- Moro, R. S., de Mattos Bicudo, C. E., de Melo, M. S., and Schmitt, J. (2004). Paleoclimate of the late Pleistocene and Holocene at Lagoa Dourada, Paraná State, southern Brazil. *Quat. Int.*



114, 87–99. doi:10.1016/S1040-6182(03)00044-2.

- Near, T. J., Bolnick, D. I., and Wainwright, P. C. (2005). Fossil calibrations and molecular divergence time estimates in Centrarchid fishes (Teleostei: Centrarchidae). *Evolution (N. Y.)* 59, 1768–1782. doi:10.1111/j.0014-3820.2005.tb01825.x.
- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., and Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0037135.
- Riffel, S. B., Vasconcelos, P. M., Carmo, I. O., and Farley, K. A. (2015). Combined ⁴⁰Ar/³⁹Ar and (U-Th)/He geochronological constraints on long-term landscape evolution of the Second Paraná Plateau and its ruiniform surface features, Paraná, Brazil. *Geomorphology* 233, 52–63. doi:10.1016/j.geomorph.2014.10.041.
- Sales, N. G., Wangensteen, O. S., Carvalho, D. C., and Mariani, S. (2019). Influence of preservation methods, sample medium and sampling time on eDNA recovery in a neotropical river. *Environ. DNA*, edn3.14. doi:10.1002/edn3.14.
- Sanderson, M. J. (2003). r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics* 19, 301–302. doi:10.1093/bioinformatics/19.2.301.
- Shaw, J. L. A., Clarke, L. J., Wedderburn, S. D., Barnes, T. C., Weyrich, L. S., and Cooper, A. (2016). Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biol. Conserv.* 197, 131–138. doi:10.1016/j.biocon.2016.03.010.
- Shibatta, A. O., and Artoni, R. F. (2005). Sobre a Identidade Das Populações Alopátricas De *Astyanax* (Characiformes, Characidae) Das Formações Furna 1 Ponta Grossa, Paraná, Brasil. *Publ. UEPG* 11, 7–12.
- Shibatta, O. A., Orsi, M. L., Bennemann, S. T., and Silva-Souza, Â. T. (2003). “Diversidade de peixes da bacia do rio Tibagi.” in *A bacia do rio Tibagi*, 403-423.
- Stuiver, M., Reimer, P.J., 1986. A computer program for radiocarbon age calibration. *Radiocarbon* 28, 1022–1030.