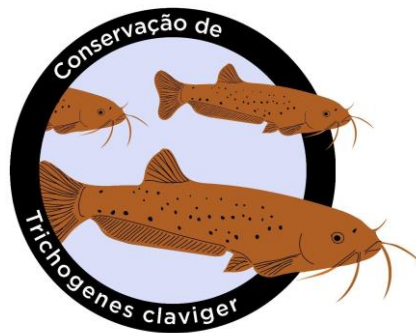


UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Padrões de distribuição e endemismo da espécie  
Criticamente Ameaçada, *Trichogenes claviger*  
(Siluriformes, Trichomycteridae, Trichogeninae)**



**Juliana Paulo da Silva**

**Vitória, ES**

**Agosto, 2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Capítulo I:**

**Padrões de distribuição e endemismo da espécie**  
**Criticamente Ameaçada, *Trichogenes claviger***  
**(Siluriformes, Trichomycteridae, Trichogeninae)**

**Juliana Paulo da Silva**

**Orientadora: Luisa Maria Sarmiento Soares Filho**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Animal) da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

**Vitória, ES**

**Agosto, 2023**

**DATA DE DEFESA:** 27 de setembro de 2023

**BANCA EXAMINADORA**

**TITULARES**

---

Profª Dra. Luisa Maria Sarmiento Soares Filho (Orientadora)

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, ES

---

Prof. Dr. Daniel Cardoso de Carvalho (Coorientador)

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUC Minas, Belo Horizonte, BH

---

Profª Drª. Ana Carolina Loss Rodrigues

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, ES

---

Profª Drª Roberta Paresque

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória, ES

---

Prof. Dr. Heron Oliveira Hilário

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUC Minas, Belo Horizonte, BH

---

Prof. Dr. Andre Teixeira Silva

Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana- BA

## **AVISO**

A presente dissertação é parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Animal), e como tal, não deve ser vista como uma publicação no senso do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (apesar de disponível publicamente sem restrições). Dessa forma, quaisquer informações inéditas, opiniões, hipóteses e conceitos novos apresentados aqui não estão disponíveis na literatura zoológica. Pessoas interessadas devem estar cientes de que referências públicas ao conteúdo deste estudo devem ser feitas contendo a citação de dissertação não publicada.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Maria Marinete da Silva Nascimento** e **Sebastião Paulo da Silva**, ao meu marido e fiel companheiro de campo, **Bruno Felipe Effgen Novelli**, ao meu irmão **Julieder Luís do Nascimento** e meus sobrinhos **Carol** e **Pedro**, pelo amor, compreensão e apoio de sempre. Aos demais membros de minha família, por me apoiar e sempre torcer pelas minhas conquistas.

À minha orientadora **Prof<sup>a</sup> Dra. Luisa Maria Sarmiento Soares Filho** e ao meu coorientador **Prof. Dr. Daniel Cardoso de Carvalho**, pelos ensinamentos e por acreditarem em mim e me apoiarem em todas as etapas.

Ao laboratório de genética da UEFS pelo estágio supervisionado. Ao **Prof. Dr. Eddy José Francisco de Oliveira** e **Ronaldo Martins Pinheiro** pelas muitas contribuições e apoio na concepção e etapas iniciais da proposta.

Ao Instituto Nacional da Mata Atlântica (INMA), pelo suporte com materiais de campo de laboratório. Em especial aos amigos e colegas: **Lorena Tonini**, **Joelcio Freitas**, **Francieli Loss Pugnall**, **Thiago Silva Soares**, **Helio de Queiroz Boudet Fernandes**, **Leandro Biondo**.

Agradeço ao **Joelcio Freitas** pela ajuda com os mapas e pela paciência.

A equipe do Projeto Saíra-apunhalada: **Gustavo Magnago**, **Marcelo Renan**, **Victoria Farias** e **Thieres Fiorotti**, por toda ajuda e suporte nos trabalhos de campo. Ao **Prof. José Luiz Helmer**, pela ajuda em campo.

Aos professores e colegas do PPGBAN-UFES, pelas sugestões e apoio durante o projeto, em especial aos tutores das Disciplinas de Seminário, **Dr<sup>a</sup> Elisandra Chiquito**, **Dr. Mauricio Hostim Silva**, **Dr. Heron Hilário** e **Dra. Rita Rocha**, pela disponibilidade, ensinamentos e pelas contribuições valiosas para o enriquecimento dessa dissertação.

Ao Laboratório de Genética da Conservação da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas) e aos colegas: **Heron Hilário**, **Higor Henrique Alves do Nascimento**, pela ajuda, suporte e paciências nas análises moleculares. A **Lívia Cristina Machado Silva** e **Gabriel Antônio Mendes**, por toda ajuda no laboratório e em campo. E também aos colegas **Júlia Fonseca** e **Guilherme Costa Berger**, pelo apoio no laboratório.

Aos colegas de turma do mestrado, por compartilharem os diversos momentos, em especial a **Letícia Rosário**, que foi uma colega muito prestativa.

A equipe do Parque Estadual de Forno Grande e da Reserva Água Branca, pela hospitalidade durante minha campanha de campo, em especial ao gestor **Rodolpho Torezani Netto**.

A família do **Faccini: Sávio Faccini Júnior, Ana Paula Tomazzini Facini, Rafaela Tomazzini Faccini, Sabrina Tomazzini Faccini e Sávio Faccini Júnior**, por toda ajuda e receptividade durante as campanhas de coleta.

Ao Instituto Chico Mendes (**ICMBio**), pelas autorizações para atividades com finalidade científica nº 79046-1 e 79046-2.

Ao Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos- **IEMA**, pela autorização para atividades com finalidade científica Autorização de Pesquisa NUBIO nº 008-2023 (Processo no 2023-F0STG).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (**FAPES**), pela bolsa concedida (processo 179/2021).

Ao Fundo Brasileiro para a Biodiversidade- **FUNBIO**, através do Programa Bolsas FUNBIO – Conservando o Futuro, em parceria com o Instituto Humanize e o Eurofins Foundation, pelo apoio e financiamento das pesquisas.

Ao **The Mohamed bin Zayed Species Conservation Fund**, pela doação filantrópica significativa, estabelecida para fornecer subsídios a este projeto de pesquisa, em prol da conservação da espécie *Trichogenes claviger*.

# SUMÁRIO

## CAPÍTULO I

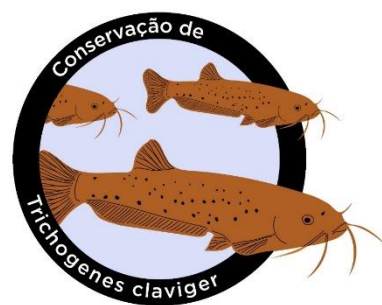
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
2.1. Área de estudo.....	8
2.3. Obtenção das amostras.....	9
2.4. Sequência 12S- <i>T. claviger</i> .....	10
2.5. <i>eDNA</i> - coleta de amostras.....	11
2.6. Protocolo de detecção de <i>eDNA</i> .....	13
2.7. Análises moleculares.....	15
2.8. Análises bioinformática.....	16
2.9. Inventário.....	16
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
3.1. <i>eDNA</i> - Diversidade de espécies de peixes.....	18
3.2. <i>eDNA</i> - espécies não-alvo.....	20
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
2.1. Área de estudo.....	30
2.2. Observações de campo.....	31
2.3. Número de indivíduos visualizados.....	32
2.4. Amostragem.....	33
2.5. Conteúdo estomacal.....	35
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
3.1. Habitat natural.....	35
3.2. Comportamento natureza.....	37
3.3. Comportamento em aquário.....	37

3.4. Interação com outras espécies .....	38
3.5. Distribuição espacial e período de atividade .....	39
3.6. A participação social na conservação .....	40
3.7. Mídias sociais e a popularização da ciência .....	41
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>



"Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade."

(Mari Cure)



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Área de estudo: localizada entre os limites dos municípios de Vargem Alta e Castelo-ES. Ícone com círculo amarelo e peixe azul indicam a localidade tipo da espécie .....8
- Figura 2.** Desenho experimental inicial do projeto. Em verde, as Unidades de Conservação: Parque Estadual do Forno Grande e RPPN Águia Branca. Os pontos com peixes em amarelo representam os registros da série tipo. Os demais pontos, as regiões onde ocorreram delimitadas para a coleta de *eDNA* .....9
- Figura 3.** Coleta de exemplares da espécie *T. claviger*. A e B: RPPN Mata de Kaetés e C: Ribeirão Braço Sul; D: espécie *T. claviger* após a coleta .....11
- Figura 4.** Alinhamento da sequência de DNA mostrando as posições para NeoFish\_3. Primers que vão hibridar com a cadeia de DNA molde Primer F: V05 - 5'-AAACTCGTGCCAGCCACC-3' e primer R: Teleo R - 5'- ACTTCCGGTACACTTACCATG-3'. Tamanho do fragmento 12S de ~700pb ->.....12
- Figura 5.** Pontos da área de estudo: A- Ribeirão do Braço Sul; B, C, D, E, F e G- Mata de Kaetés; H- Ribeirão do Braço Sul; I- Alto Castelinho, São Paulo do Aracê e J- entorno da Reserva Águia Branca.....13
- Figura 6.** Processo de filtração de água em campo. A) coleta da água do córrego com saco stand up, B) Após a coleta da água a seringa a água é filtrada manualmente, com o auxílio de uma seringa Sterivex.....16
- Figura 7.** Gel de agarose 1,5%. Fragmentos gerados para o marcador MiFish após a segunda PCR para inserção dos adaptadores compatíveis à plataforma illumina (P5 e P7) e das sequências index. (L) Marcador de peso molecular 100pb Ladder (Invitrogen) .....19
- Figura 8.** Número de sequências por biblioteca e estágio de limpeza/processamento de dados, por ponto amostral.....19
- Figura 9.** Número de ASVs detectadas por ponto amostral de coleta .....20

## CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Área de estudo: bacia do rio Itapemirim. Os círculos e estrela, indicam os locais que a espécie ocorre. A área está situada entre as RPPNs Mata de Kaetés e Águia Branca .....	31
<b>Figura 2.</b> Ambientes que a espécie <i>Trichogenes claviger</i> vive .....	32
<b>Figura 3.</b> Espécie <i>Trichogenes claviger</i> em filmagens subaquáticas no campo .....	33
<b>Figura 4-</b> A- espécie <i>Trichogenes claviger</i> recém capturada; B e C- ambientes que a espécie ocorre .....	34
<b>Figura 5.</b> Retirada de palmito nas áreas limítrofes de ocorrência da espécie <i>Trichogenes claviger</i> .....	35
<b>Figura 6.</b> Diferenças na coloração da água nos ambientes com ocorrência da espécie <i>Trichogenes claviger</i> . A- água transparente, cor de chá, com substrato arenoso (RPPN Mata de Kaetés) e B- água mais escura, com substrato de lama e matéria orgânica em decomposição (Ribeirão Braço do Sul) .....	36
<b>Figura 7.</b> Indivíduos juvenis de <i>Trichogenes claviger</i> nadando ativamente no aquário .....	37
<b>Figura 8.</b> Indivíduo juvenil de <i>Trichogenes claviger</i> capturando uma minhoca (que foi ofertada como sugestão de alimentação), e engolindo inteira .....	38
<b>Figura 9.</b> Indivíduo de <i>Hypostomus affinis</i> , colocado no aquário juntamente com os indivíduos de <i>Trichogenes claviger</i> e <i>Poecilia vivipara</i> .....	39
<b>Figura 10.</b> Alevino da espécie <i>Trichogenes claviger</i> , recém capturado .....	40
<b>Figura 11.</b> Espécie <i>Trichogenes claviger</i> desenhada em um dos pontos de coleta seletiva na localidade de Alto Castelinho, Castelo- ES .....	41
<b>Figura 12.</b> Perfil no Instagram criado para divulgação do projeto .....	42

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Membranas de filtragem recebidas (‘Réplica’) para a extração de <i>eDNA</i> , construção e sequenciamento de biblioteca de DNA <i>metabarcoding</i> , suas concentrações (ng/ $\mu$ L) e relações de absorvância (A260/280) estimadas em Nanodrop 2000 .....	14
<b>Tabela 2.</b> Relação da detecção das espécies por método de amostragem. Coletas tradicionais (CT): levantamento feito em banco de dados para a região. <i>eDNA</i> : levantamento da ocorrência das espécies com base no DNA detectado na água dos córregos, com acurácia de bancos de dados e taxonomistas e Senso visual (SV): observação direta da presença de peixes nos ambientes .....	17
<b>Tabela 3.</b> Relação das espécies de peixes, aves e mamíferos, identificados nas amostras de <i>eDNA</i> .....	22

## RESUMO

Este estudo apresenta pela primeira vez o uso do DNA ambiental (*eDNA*) para detecção de uma espécie de peixe ameaçada de extinção no Brasil. *Trichogenes claviger* ocorre em riachos florestados de primeira e segunda ordem unicamente nas cabeceiras da bacia do Itapemirim. Até então a espécie era conhecida apenas de duas localidades nos contrafortes serranos, na sub-bacia do córrego Picada Comprida, um formador do rio Caxixe. O estudo teve como objetivo determinar se a abordagem *eDNA metabarcoding* funciona como uma ferramenta adequada para avaliar a presença da espécie. Para esta finalidade foi criado um marcador 12S, específico para a espécie *T. claviger*. Encontramos evidências da presença do bagrinho através de amostras de *eDNA* em três dos dez locais amostrados. Além das espécies alvo deste estudo, foi possível coletar vestígios de espécies não-alvo, detectadas nas amostras de água. Foram identificadas 25 espécies de vertebrados, das quais 15 eram peixes, 5 mamíferos e 5 aves. Dentre esses registros destacamos a presença de espécies exóticas de peixes, como a tilápia *Coptodon rendalli* e *Oreochromis niloticus*, e a espécie de ave, *Scytalopus speluncae*, que se encontra Em Perigo (EN) na lista estadual do Espírito Santo. A comparação entre os métodos para as estimativas da composição de espécies por riacho amostrado, demonstram que a abordagem *eDNA metabarcoding*, identificou mais que o dobro das espécies de riacho detectadas outrora pelos métodos tradicionais de coleta, que utilizaram petrechos de pesca como redes e peneiras. Os resultados alcançados asseguram um melhor entendimento sobre a dinâmica de distribuição espacial de *T. claviger*, seu status de conservação, além de insights sobre a comunidade de vertebrados associados aos ambientes do bagrinho.

**Palavras-chave:** Endemismo; Mata Atlântica; Trichogeninae; *eDNA*; biodiversidade.

## ABSTRACT

This study presents for the first time the use of environmental DNA (eDNA) for detection of an endangered fish species in Brazil. *Trichogenes claviger* occurs in first and second order forested streams only in the headwaters of the Itapemirim basin. Until then, the species was known only from two locations mountain regions, in the sub-basin of the Picada Comprida stream, a source of the Caxixe river. The study aimed to determine whether the eDNA metabarcoding approach works as an adequate tool to assess the presence of the species. Though, a 12S marker was created, specific for the *T. claviger* species. We found evidence of the catfish presence through eDNA samples in three of the ten sites sampled. In addition to the target species of this study, it was possible to collect traces of non-target species detected in the water samples. 25 species of vertebrates were identified, of which 15 were fish, 5 mammals and 5 birds. Among these records, we highlight the presence of exotic fish species, such as the tilapia *Coptodon rendalli* and *Oreochromis niloticus*, and the species of bird, *Scytalopus speluncae*, which is in Danger (EN) on the state list of Espírito Santo. Comparison between the methods for estimating species composition per sampled stream demonstrates that the eDNA metabarcoding approach identified more than twice as many stream species previously detected by traditional collection methods, which used fishing gear such as nets and sieves. The results achieved ensure a better understanding of the spatial distribution dynamics of *T. claviger*, its conservation status, as well as insights into the vertebrate community associated with catfish environments.

**Key words:** Endemism; Atlantic forest; Trichogeninae; eDNA; biodiversity.

## 1. INTRODUÇÃO

A família Trichomycteridae abriga mais de 360 espécies válidas (Ferraris, 2007; Do Nascimento, 2015; Rizzato & Bichuette, 2014; Fricke et al., 2023), sendo o grupo mais diverso dentre os bagres neotropicais. Os Trichomycteridae se distinguem dos demais Siluriformes por possuírem um aparelho opercular único, envolvendo os ossos do opérculo e interopérculo, munidos de uma placa de odontoides (de Pinna & Wosiacki, 2003).

Dentro da família Trichomycteridae, a monotípica subfamília Trichogeninae, compreende três espécies válidas. A primeira a ser descoberta foi *Trichogenes longipinnis* Britski & Ortega, 1983; vinte e sete anos após, foi descrita a segunda espécie, *Trichogenes claviger* de Pinna, Helmer, Britski & Nunes 2010 e, mais recentemente, *Trichogenes beagle* de Pinna, Reis & Britski, 2020, que foi descrita com base em um lote com três espécimes preservados, porém sem informações associadas sobre sua localização.

A espécie *Trichogenes claviger*, é endêmica da sub-bacia do rio Caxixe, formador do rio Castelo, um contribuinte da bacia do rio Itapemirim, ao sul do estado do Espírito Santo. A espécie despertou grande interesse da comunidade científica, por sua importância filogenética, representando uma contribuição relevante por se tratar de grupo relictual de peixes, guardando caracteres basais dentro da família, e possuindo distribuição geográfica restrita (Stiassny & de Pinna, 1994).

Várias expedições de campo foram realizadas em busca de novas populações dessa espécie, porém, até o presente estudo, a espécie só havia sido encontrada somente em duas localidades. A primeira é a própria localidade tipo, hoje Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Mata de Kaetés, e a segunda localidade fica na Fazenda Santa Clara, ambos locais na sub-bacia do rio Caxixe, município de Castelo-ES (de Pinna et. al, 2020).

Por estar isolada geograficamente e categorizada como Criticamente em Perigo (CR-*Critically Endangered*), nas listas nacional e global (MMA, 2014; IUCN, 2022), *T. claviger* foi incluída no Plano de Ação Nacional para Conservação dos Peixes e Eglas da Mata Atlântica Ameaçados de Extinção (PAN Peixes e Eglas da Mata Atlântica), pela necessidade máxima de proteção desta espécie (MMA, ICMBio, 2019).

Entretanto, quando trabalhamos com espécies ameaçadas, que por definição suas populações enfrentam um alto risco de extinção na natureza, torna-se desafiador detectar seus remanescentes e determinar sua distribuição (Bonfil et al., 2021).

Os métodos tradicionais de pesquisa de campo com peixes, como pesca e censos visuais, nem sempre são efetivos na localização de espécies, principalmente as ameaçadas, que possuem uma baixa abundância de indivíduos na natureza. (Bonfil et al., 2021, Thomsen & Willerslev, 2015; Le Port et al., 2018). Nesse sentido, novas abordagens, que não envolvam métodos que necessitem sacrificar os indivíduos, se mostram uma alternativa.

O *environmental DNA- eDNA* (DNA ambiental), surgiu como uma ferramenta importante para avaliar a biodiversidade e para detectar espécies raras e ameaçadas no ambiente natural (Goldberg et al., 2015; Thomsen & Willerslev, 2015; Cristescu & Hebert, 2018). A técnica *eDNA metabarcoding*, surgiu no final da década de 1980, para detecção de microrganismos em amostras de solo, sendo hoje um potencial aliado para os métodos de coletas tradicionais, podendo ser utilizado para a abordagem de comunidades inteiras e identificação de espécies exóticas e ameaçadas, através das células liberadas na água ou no solo dos córregos, pelos organismos que ali vivem, que deixam seus rastros genéticos, como uma escama, a liberação de muco, fezes entre outros vestígios. A partir dessas células é possível extrair o DNA e comparar com os bancos de dados genéticos para saber quais são as espécies que ali habitam, sem que haja a coleta dos espécimes (Rees et al., 2014).

Apesar das espécies peixes serem o foco na maioria dos estudos envolvendo *eDNA metabarcoding*, os dados de monitoramento de *eDNA* também podem fornecer informações importante e confiáveis sobre outros táxons que vivem ou frequentam os rios e riachos, como os mamíferos (Andruszkiewicz et al., 2017; Closek et al., 2019), anfíbios (Bálint et al., 2018; Lacoursière-Roussel et al., 2016; Harper et al., 2018) e aves (Ushio, Murata et al., 2018; Schütz et al., 2020).

Nesse sentido, apresentamos os resultados do primeiro estudo usando *eDNA* para detecção de uma espécie de peixe Criticamente em Perigo no Brasil. O presente estudo tem por objetivo geral avaliar o potencial do *eDNA metabarcoding* para detecção da espécie *Trichogenes claviger*, através do marcador molecular 12S. Com os objetivos específicos, apresentamos as informações sobre a dinâmica de distribuição espacial de *T. claviger*, seu status de conservação e insights sobre a comunidade de vertebrados (aves e mamíferos) associados aos ambientes do bagrinho.

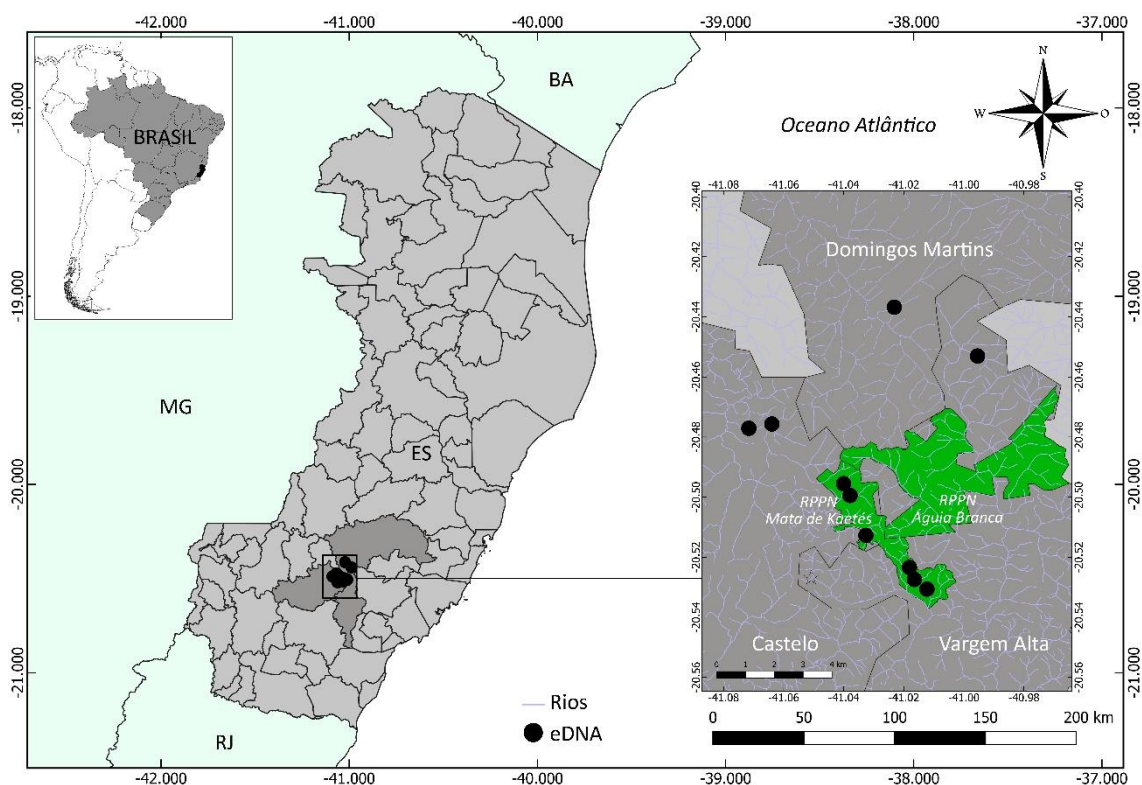


## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Área de estudo

A área de estudo está localizada nos municípios de Castelo e Vargem Alta, estado do Espírito Santo (Figura 1). Com aproximadamente 85 Km<sup>2</sup> de superfície e 45 km de perímetro, que envolve as cabeceiras de tributários da bacia do rio Itapemirim, situada entre o Parque Estadual de Forno Grande e a RPPN Águia Branca.

Sua rede hidrográfica é formada principalmente pelo córrego Picada Comprida e o Ribeirão Braço Sul, ambos da sub-bacia do rio Caxixe (um dos tributários do rio Castelo) e os ribeirões Bateia e Caetés e o córrego do Ouro, estes da sub-bacia do rio Fruteiras. Com uma altitude média de 1.100 metros, as elevações na área de estudo variam entre 1150 e 1.300 metros.

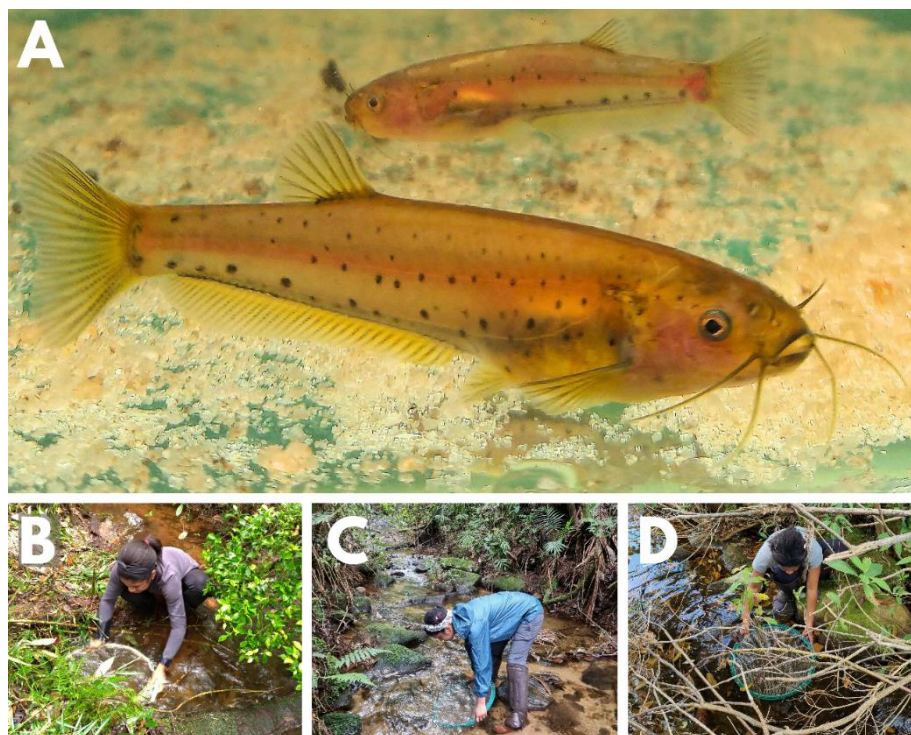


**Figura 1.** Área de estudo: localizada entre os limites dos municípios de Domingos Martins, Vargem Alta e Castelo-ES. Ícones com círculo preto correspondem aos pontos de amostragem de *eDNA*. As áreas destacadas em verde correspondem às RPPNs Mata de Kaetés e Águia Branca.

### 2.3. Obtenção das amostras

Foram coletados 10 exemplares de *Trichogenes claviger*, com o objetivo de criarmos sequências genéticas da espécie para comparação com as amostras de água que

foram coletadas (Figura 2). Tais sequências se faziam necessárias para compreensão das análises de *eDNA metabarcoding*, uma vez que não existiam sequências genéticas disponíveis para a espécie até o presente estudo. Os resultados obtidos contribuem para interpretar a Extensão de Ocorrência da espécie (EOO), que até então era desconhecida e a atualizar a Área de Ocupação (AOO), que atualmente é de 8km<sup>2</sup> na lista vermelha nacional e na lista da *International Union for Conservation of Nature* – IUCN (MMA, 2022; IUCN, 2022).



**Figura 2.** Coleta de exemplares da espécie *T. claviger*. A: espécie *T. claviger*, após a coleta B e C: RPPN Mata de Kaetés e D: Ribeirão Braço Sul.

Os exemplares de *T. claviger* foram coletados com peneira em dois pontos de amostragem. As autorizações para captura dos exemplares foram concedidas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade- ICMBio, sob número da autorização do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO: 79046/1 e 79046/2).

Os peixes foram transportados vivos até o laboratório, onde foram mantidos em aquário para análises de comportamento. Todos os exemplares foram anestesiados e fixados. As primeiras amostras (coletadas em dezembro de 2021), foram fixadas em etanol 95% e armazenadas no freezer a -15°C, na coleção MBML-PEIXES (MBML14089 e MBML 14091), do Instituto Nacional da Mata Atlântica. Já na segunda

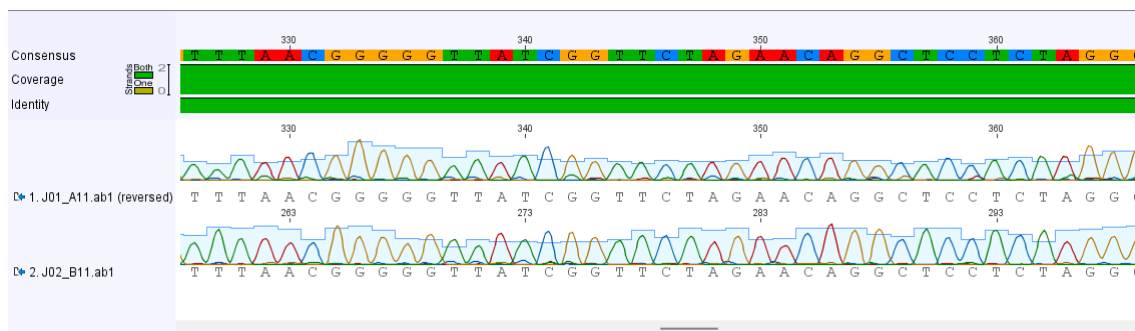
coleta, os exemplares foram fixados em etanol 100% absoluto, mantidos sob refrigeração e levados para o Laboratório de Genética da Conservação (LGC) da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais- PUC/Minas. O material testemunho, foi depositado na coleção ictiológica MBML-Peixes (MBML 14206 e MBML 14207), bem como as amostras genéticas no LGC da PUC Minas (LGC: 8125; 8126; 8127; 8128; 8129).

#### **2.4. Sequência 12S- *T. claviger***

Para uma determinação mais precisa dentro das sequências geradas pelo *eDNA*, obtivemos uma sequência de DNA do gene 12S para a espécie *Trichogenes claviger*, a fim de garantir a confiabilidade em sua detecção nas amostras.

A extração de DNA foi realizada por Salting Out seguindo um protocolo adaptado de Aljanabi & Martinez (1997). O programa da PCR consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 97 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C, anelamento dos primers a 57 °C e extensão a 72 °C. O sucesso da amplificação foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura). As amostras que apresentaram uma banda nítida com tamanho (pb) correspondente ao esperado foram selecionadas para sequenciamento bidirecional pelo método de Sanger, em ambas orientações do fragmento: forward (FWD) e reverse (REV). Ao final das etapas de sequenciamento, as sequências obtidas referentes aos amplicons FWD e REV tiveram sua qualidade avaliada e foram concatenadas por sobreposição para obtenção da sequência consenso correspondente ao amplicon completo (Figura 3).

Para a construção do banco de sequências referência, utilizamos os marcadores V05F (5'-AAACTCGTGCCAGCCACC-3') e TeleoR (5'-ACTTCCGGTACTTACCATG-3'), específicos para a região 12S de aproximadamente 700 pb. Esse amplicon compreende as regiões de amplificação dos principais marcadores para *eDNA*, como o MiFish (Miya et al., 2015) e Teleo (Valentini et al., 2016).



**Figura 3.** Alinhamento da sequência de DNA mostrando as posições para NeoFish\_3. Primers que vão hibridar com a cadeia de DNA molde. Primer F: V05 - 5'-AAACTCGTGCCAGCCACC-3' e primer R: Teleo R - 5'- ACTTCCGGTACACTTACCATG-3'. Tamanho do fragmento 12S de ~ 700pb ->.

## 2.5. eDNA- coleta de amostras

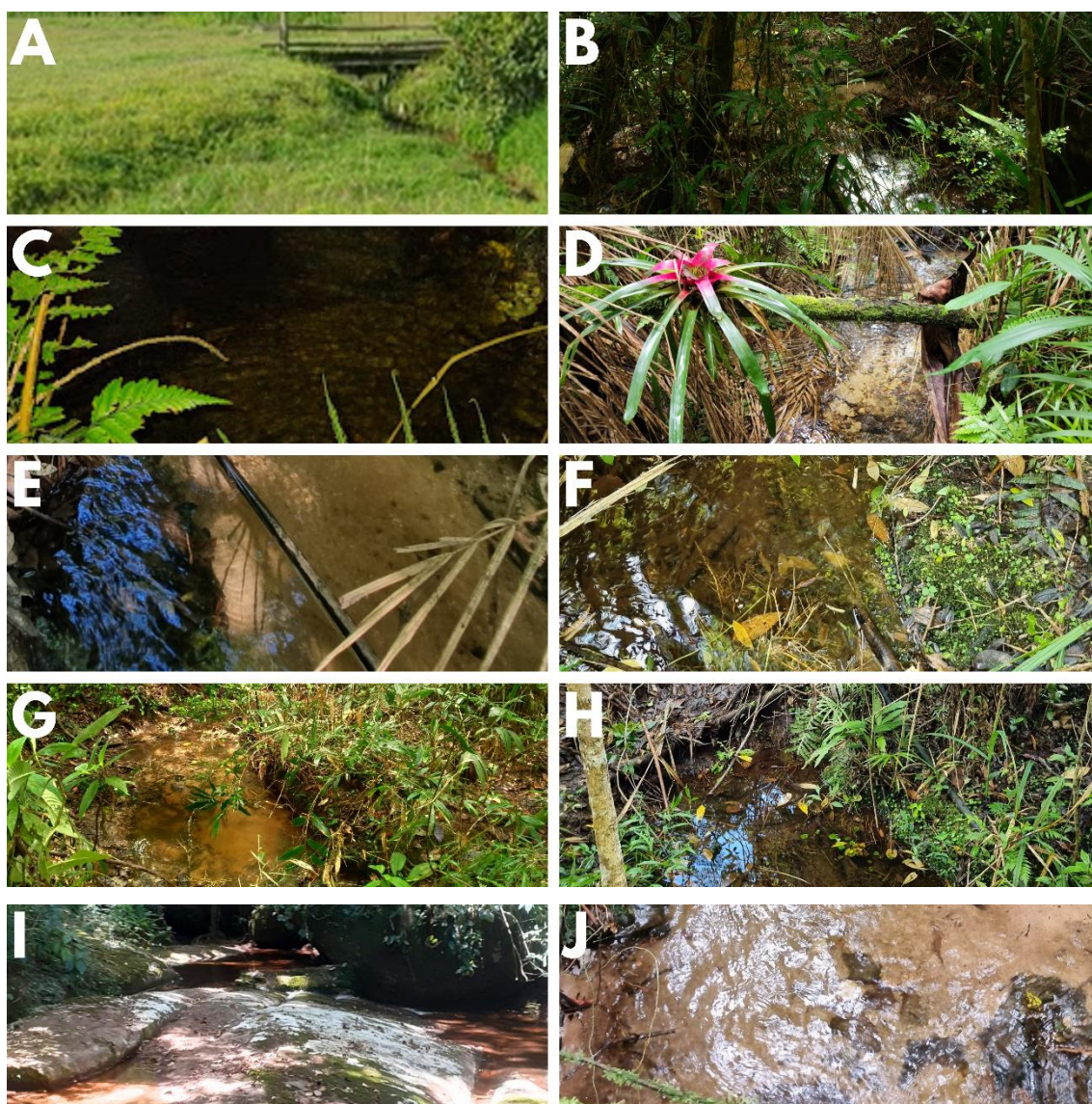
Uma campanha de amostragem foi realizada entre os dias 02 e 04 de março de 2023. As amostras foram coletadas em 10 pontos lóticos dos formadores dos rios Caxixe e Fruteiras contribuintes da bacia do Itapemirim e rio Jucu Braço Norte, contribuinte da bacia do rio Jucu.

Os locais amostrados, foram: Ribeirão Braço Sul, pontos RBS1 e RBS8; RPPN Mata de Kaetés, pontos MK2, MK3, MK4, MK5, MK6 e MK7, ambos os pontos pertencentes a bacia do Itapemirim; São Paulo do Aracê, contribuinte do rio Jucu Braço Norte, bacia do Jucu, ponto SPA9 e Alto Castelinho, entorno do Parque Estadual Pedra Azul e RPPN Águia Branca, contribuintes do rio Fruteiras, bacia do Itapemirim, ponto PPA1 (Figura 4). Estes pontos foram escolhidos a partir da dúvida se a espécie *Trichogenes claviger* ocorria em outras sub-bacias circunvizinhas ao Córrego Picada Comprida, localidade tipo da espécie. Assim, foram escolhidos pontos de amostragem onde sabidamente a espécie ocorria e pontos onde não havia sido reportada.

Para a análise do eDNA de peixes, amostras de água foram coletadas em todos os dez pontos. As coletas foram realizadas com o auxílio de um saco *stand up pouch* com *ziplock* transparente, com capacidade de aproximadamente 1 litro (1000ml). Após a coleta da água, foi realizado o processo de filtragem, onde uma seringa era acoplada ao Sterivex da Merck Millipore e ajustada manualmente. As seringas possuíam uma trava tipo “*Leuer Lock*”, onde eram acoplados os tubos com filtros de 0,45 µm Sterivex, com o mesmo tipo de trava. O pacote do filtro era aberto no topo e guardado, sendo utilizado para cada ponto um novo kit (Figura 5).

Três filtros em cada local foram utilizados para filtrar 60 ml de água ou até o filtro obstruir (aproximadamente 180 ml de água por ponto). Também foram utilizados controles negativos com água mineral filtrada em campo. e a cada filtro deve ser dado um número identificador único. Para cada ponto os filtros eram coletados em triplicata (A, B e C), onde a seringa era desacoplada e o processo repetido.

Após a filtração, as amostras de água foram armazenadas em uma caixa de resfriamento e para cada amostra foi adicionado solução tampão de preservação com uma concentração final de 0,01%, para suprimir a degradação do DNA por microrganismos (Yamanaka et al., 2017).



**Figura 4.** Pontos da área de estudo: A e H- Ribeirão do Braço Sul; B, C, D, E, F e G- Mata de Kaetés; I- Alto Castelinho, São Paulo do Aracê e J- entorno da Reserva Água Branca.

Cada filtro foi etiquetado com um código por amostra, exemplo MK2B, amostra do segundo filtro do ponto 2, na localidade da RPPN Mata de Kaetés. Seguido o processo de filtragem, o filtro era colocado em sacos individuais (identificados), após ser desacoplado para evitar contaminação. O processo era repetido para cada amostra. Todo o procedimento de filtragem foi conduzido com luva nitrílica descartável e, caso a luva tocasse uma superfície contaminada, elas também eram descartadas e substituídas.



**Figura 5.** Processo de filtração de água em campo. A- coleta da água do córrego com saco stand up; B- após a coleta da água a seringa a água é filtrada manualmente, com o auxílio de uma seringa Sterivex.

## 2.6. Protocolo de detecção de *eDNA*

Foram enviadas para análise, um total de 32 membranas de filtro Sterivex (fabricante) com poros de 0.45  $\mu\text{m}$ , para a empresa Ecomol Consultoria realizar três réplicas referentes a 10 pontos de coleta e duas amostras “controle” de coleta, que são os controles negativos, para a construção e sequenciamento de biblioteca de DNA *metabarcoding* (Tabela 1). Para realizar a extração do *eDNA* das membranas de filtragem foi seguido o protocolo de extração utilizado pelo Laboratório de Genética da Conservação, PUC Minas, coordenado pelo Prof. Daniel Carvalho.

Nesse protocolo, a extração do *eDNA* é realizada com base no kit comercial DNEasy PowerWater (Qiagen), precedida de uma etapa inicial de digestão do DNA com Proteinase K.

A etapa de extração de DNA foi realizada em sala de dedicação exclusiva, luz ultravioleta (UV), material estéril e equipe com Equipamento de Proteção Individual - EPI, específicos para se evitar a contaminação das e entre as amostras. A concentração e a pureza do DNA extraído foram avaliadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher).

**Tabela 1.** Membranas de filtragem recebidas ('Réplica') para a extração de *eDNA*, construção e sequenciamento de biblioteca de DNA *metabarcoding*, suas concentrações (ng/ $\mu$ L) e relações de absorvância (A260/280) estimadas em Nanodrop 2000.

N	PONTO	RÉPLICA	[ng/ $\mu$ L]	A260/280
1		MK2A	4,5	1,66
2	<b>MK2</b>	MK2B	8,8	1,33
3		MK2C	9,3	1,81
4		MK3A	6,7	1,6
5	<b>MK3</b>	MK3B	3	1,61
6		MK3C	10,4	1,65
7		MK4A	3,5	1,93
8	<b>MK4</b>	MK4B	3,1	1,84
9		MK4C	4,7	1,54
10		<b>MK5</b>	MK5A	10,3
11	MK5B		7,5	1,45
12	MK5C		4,8	1,7
13	<b>MK6</b>	MK6A	3,7	1,66
14		MK6B	3,5	1,51
15		MK6C	3,8	1,14
16	<b>MK7</b>	MK7A	3,8	1,68
17		MK7B	4,6	1,55
18		MK7C	8,1	1,36
19	<b>RBS1</b>	RBS1A	24,8	1,46
20		RBS1B	3,4	1,73
21		RBS1C	15,8	1,37
22	<b>RBS8</b>	RBS8A	21,1	1,42
23		RBS8B	3	1,68
24		RBS8C	2,8	1,06

25	<b>SPA9</b>	SPA9A	3,3	1,17
26		SPA9B	3	0,92
27		SPA9C	2,6	1,18
28	<b>PPA1</b>	PPA1A	3,1	1,32
29		PPA1B	5	1,61
30		PPA1C	4,1	1,35
31	<b>Controle 1</b>		2,9	1,41
32	<b>Controle 2</b>		2,7	1,54

## 2.7. Análises moleculares

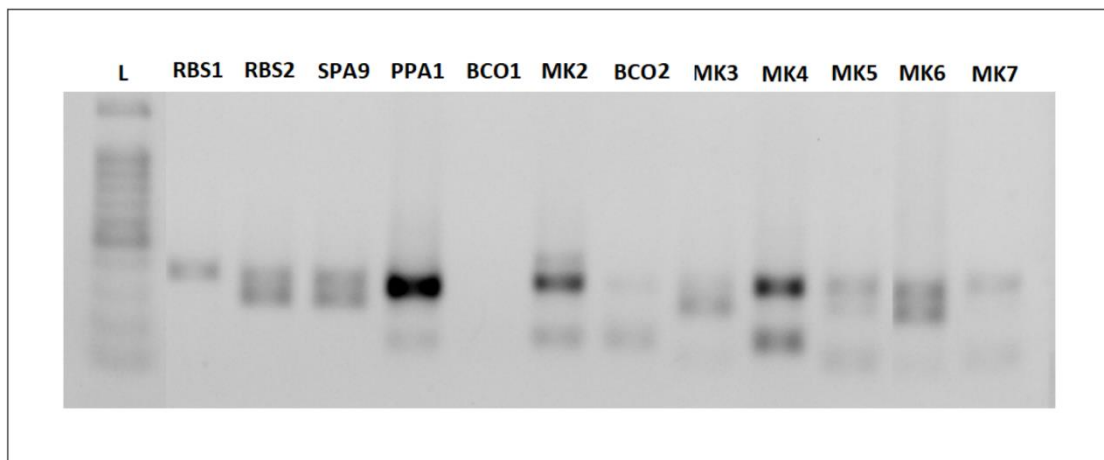
Um fragmento de 200pb da região mitocondrial 12S foi amplificado via reação em cadeia da polimerase- PCR, utilizando os primers Mifish (Miya et al., 2020). Três amplificações independentes foram realizadas para cada amostra (filtro) obtido. Os produtos de PCR foram misturados em um único tubo para posteriormente receberem uma cauda (pré-adaptador Illumina) complementar ao adaptador utilizado em uma segunda PCR subsequente. Em seguida, os produtos da PCR foram purificados com esferas magnéticas (Agencourt AMPure XP® – Beckman Coulter).

Após a purificação, foi realizada uma segunda PCR com os adaptadores do Nextera Index kit® (Illumina) para a amplificação do conjunto de amplicons do passo anterior. Nessa reação, os adaptadores compatíveis com o sistema Illumina de sequenciamento de nova geração (P5 e P7) foram utilizados como primers. Uma combinação de index único (sequências específicas associadas ao adaptador Illumina) foi utilizada para posterior identificação de cada amostra, uma vez que todos os pontos formarão um único conjunto de sequenciamento. O produto da amplificação avaliado em gel de agarose 1,5 % (Figura 6).

Todas as amostras foram então unidas em um único pool e este purificado com o kit ZymoClean™ Large Fragment DNA Recovery (Zymo Research) para a retirada de fragmentos espúrios ao fragmento de tamanho desejado (700pb 12S + 60pb adaptador + 64pb index = 824pb). Por meio de uma PCR em tempo real, realizada com o reagente KAPA Biosystems Quantification Kit (illumina), o pool foi quantificado, diluído a uma concentração de 2nM e novamente quantificado para confirmação da concentração final. A solução final foi desnaturada e carregada no equipamento MiSeq® (Illumina),



utilizando o kit de sequenciamento MiSeq® 300 ciclos (2x150pb) com uma concentração final de 16 pM.



**Figura 6.** Gel de agarose 1,5%. Fragmentos gerados para o marcador MiFish após a segunda PCR para inserção dos adaptadores compatíveis à plataforma illumina (P5 e P7) e das sequências index. (L) Marcador de peso molecular 100pb Ladder (Invitrogen).

## 2.8. Análise bioinformática

O processamento dos dados foi realizado utilizando um script customizado em R, por meio dos pacotes DADA2 (Callahan et al., 2016) e Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013), bem como o programa cutadapt (Martin, 2011). As reads obtidas no sequenciamento foram automaticamente demultiplexadas pela plataforma Basespace (Illumina). Inicialmente é realizada a remoção de bases indeterminadas (Ns), e a detecção e remoção das sequências correspondentes aos primers. Em seguida realizamos a remoção de reads com qualidade inferior a PHRED 20 (1 erro a cada 100 bp). As sequências de DNA (reads) foram submetidas à busca por similaridade contra o banco de dados NCBI nr, utilizando a ferramenta BLASTn (Altschul et al., 1990), com limiares de cobertura de sequência > 85% e de identidade de sequência > 80%. A curadoria das identificações foi realizada individualmente para cada amostra. Apenas sequências de DNA (reads) com abundância relativa superior a 1% foram mantidas.

## 2.9. Inventário

Realizamos um levantamento, para a região da área de estudo, dos registros de coletas tradicionais (artefatos de pesca: rede de arrasto, peneira e picaré), existentes na coleção ictiológica do INMA (MBML-Peixes), coleção de referência para a ictiofauna capixaba. Também procuramos por registros a partir de consulta ao Centro de Referência

em Informação Ambiental (CRIA, 2023), onde as identificações das espécies foram conferidas pela taxonomista Dra. Luisa Maria Sarmiento Soares. Esse levantamento teve por objetivo, saber quais espécies já haviam sido registradas para os córregos da região, através dos métodos tradicionais de coleta e comparar com os resultados obtidos pelo *eDNA metabarcoding* e senso visual (durante o campo *de eDNA*) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Relação da detecção das espécies por método de amostragem. Coletas tradicionais (CT): levantamento feito em banco de dados para a região. *eDNA*: levantamento da ocorrência das espécies com base no DNA detectado na água dos córregos, com acurácia de bancos de dados e taxonomistas e Senso visual (SV): observação direta da presença de peixes nos ambientes.

ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO	ESPÉCIE	CT	eDNA	SV
Characiformes	Characidae	<i>Astyanax</i>	<i>Astyanax microschemos</i> Bertaco & Lucena, 2006			
Characiformes	Characidae	<i>Deuterodon</i>	<i>Deuterodon giton</i> (Eigenmann, 1908)			
Characiformes	Characidae	<i>Deuterodon</i>	<i>Deuterodon janeiroensis</i> (Eigenmann, 1908)			
Characiformes	Characidae	<i>Deuterodon</i>	<i>Deuterodon parahybae</i> Eigenmann, 1908			
Characiformes	Crenuchidae	<i>Characidium</i>	<i>Characidium vidali</i> Travassos, 1967			
Characiformes	Erythrinidae	<i>Hoplias</i>	<i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794)			
Cyprinodontiformes	Poeciliidae	<i>Phalloceros</i>	<i>Phalloceros harpagos</i> Lucinda, 2008			
Cyprinodontiformes	Poeciliidae	<i>Poecilia</i>	<i>Poecilia reticulata</i> Peters 1859			
Gymnotiformes	Gymnotidae	<i>Gymnotus</i>	<i>Gymnotus carapo</i> Linnaeus, 1758			
Perciformes	Cichlidae	<i>Coptodon</i>	<i>Coptodon rendalli</i> (Boulenger 1897)			
Perciformes	Cichlidae	<i>Geophagus</i>	<i>Geophagus brasiliensis</i> (Quoy & Gaimard 1824)			
Perciformes	Cichlidae	<i>Oreochromis</i>	<i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758)			
Perciformes	Sciaenidae	<i>Plagioscion</i>	<i>Plagioscion</i> sp.			
Pleuronectiformes	Achiridae	<i>Hypoclinemus</i>	<i>Hypoclinemus mentalis</i> (Günther, 1862)			
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus</i>	<i>Hypostomus affinis</i> (Steindachner, 1877)			
Siluriformes	Loricariidae	<i>Neoplecostomus</i>	<i>Neoplecostomus microps</i> (Steindachner, 1877)			

Siluriformes	Heptapteridae	<i>Pimelodus</i>	<i>Pimelodus</i> sp.			
Siluriformes	Heptapteridae	<i>Rhamdia</i>	<i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard 1824)			
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Trichogenes</i>	<i>Trichogenes claviger</i> de Pinna, Helmer, Britski & Nunes, 2010			
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Trichomycterus</i>	<i>Trichomycterus</i> <i>caudofasciatus</i> Alencar & Costa, 2004			

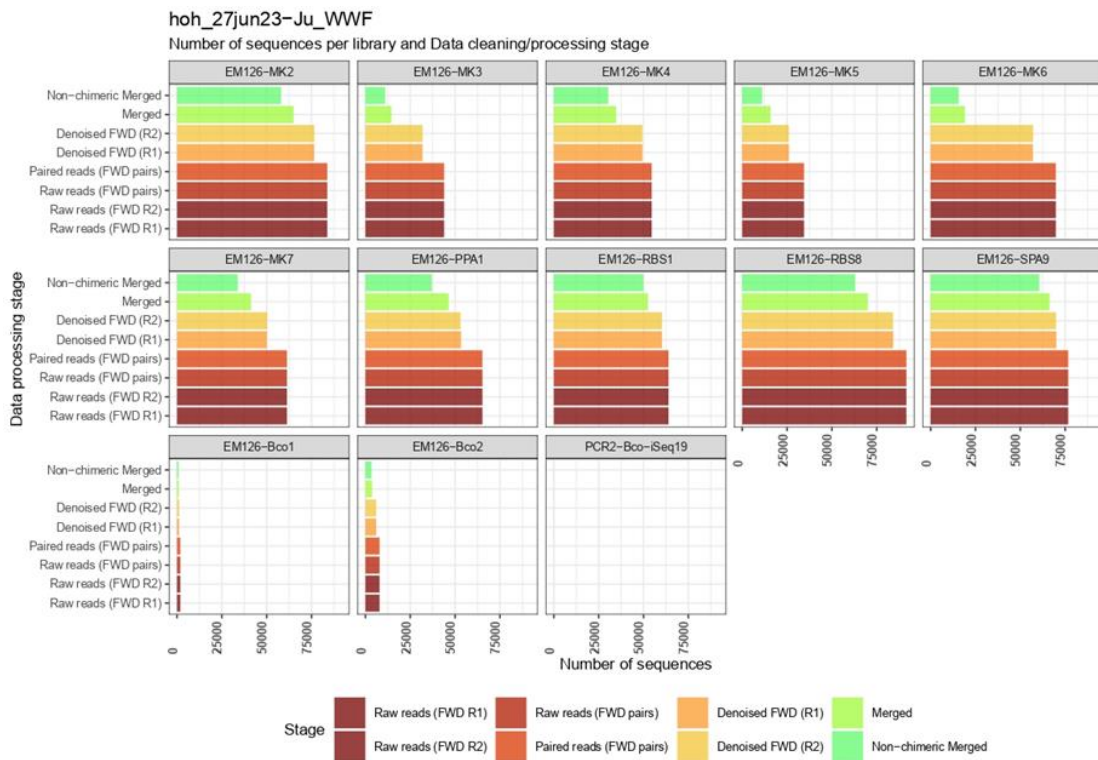
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. *eDNA*- Diversidade de espécies de peixes

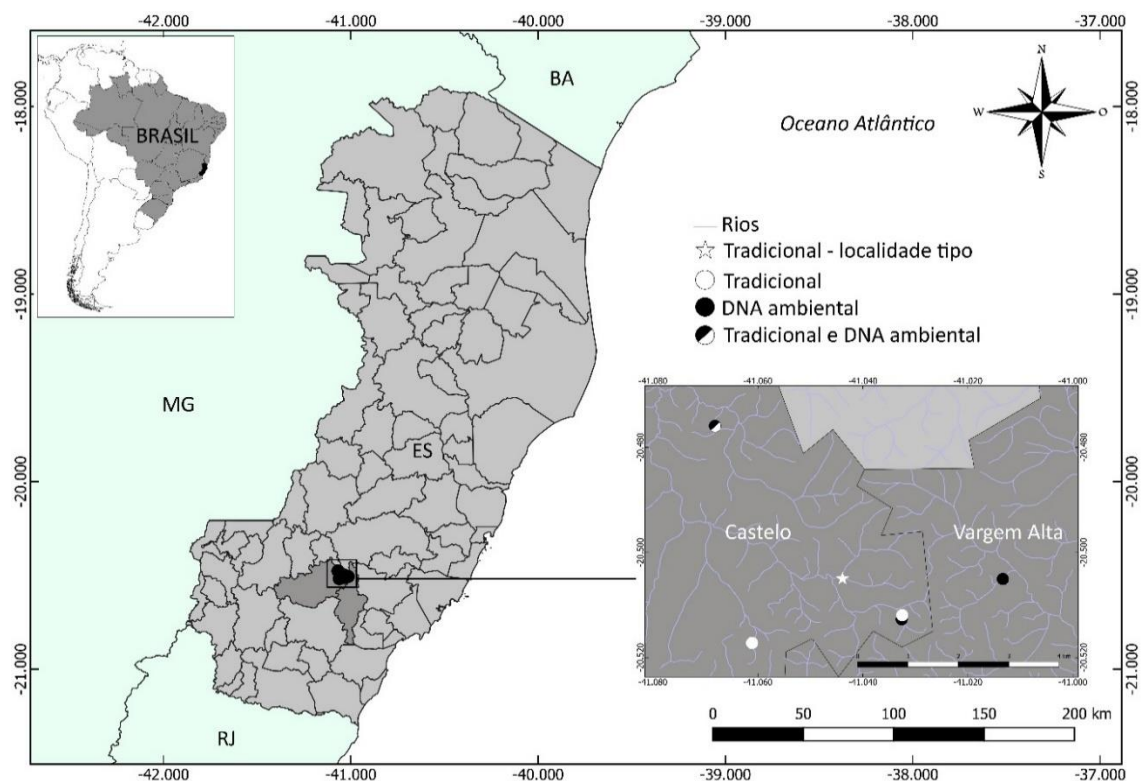
O marcador criado para detecção da espécie *T. claviger* amplificou e a identificação da espécie pode ser confirmada por sequenciamento nas amostras analisadas.

Além da espécie *T. claviger*, foram identificadas 14 espécies de peixes, conforme índice de confiabilidade do BLASTn e DADA2, juntamente com a acurácia de taxonomistas. As espécies detectadas, pertencem a 6 ordens, 10 famílias e 14 gêneros. A ordem Siluriformes foi a mais representativa, compreendendo 5 espécies; seguido por 4 espécies de Perciformes; 2 de Characiformes e 1 espécie de Cyprinodontiformes, Gymnotiformes e Pleuronectiformes.

Os pontos SPA9, RBS8 e MK2, foram os locais que tiveram o maior número de sequências (reads) por amostra após o processamento por bioinformática, respectivamente (Figura 7). Com as novas detecções para a espécie *T. claviger* (Pontos: MK4 e RBS8), sua distribuição geográfica foi ampliada. Com destaque para o ponto RBS8, que além de detectar a presença do bagrinho, foi possível visualizar vários indivíduos nadando, entre adultos, juvenis e alevinos (Figura 8).



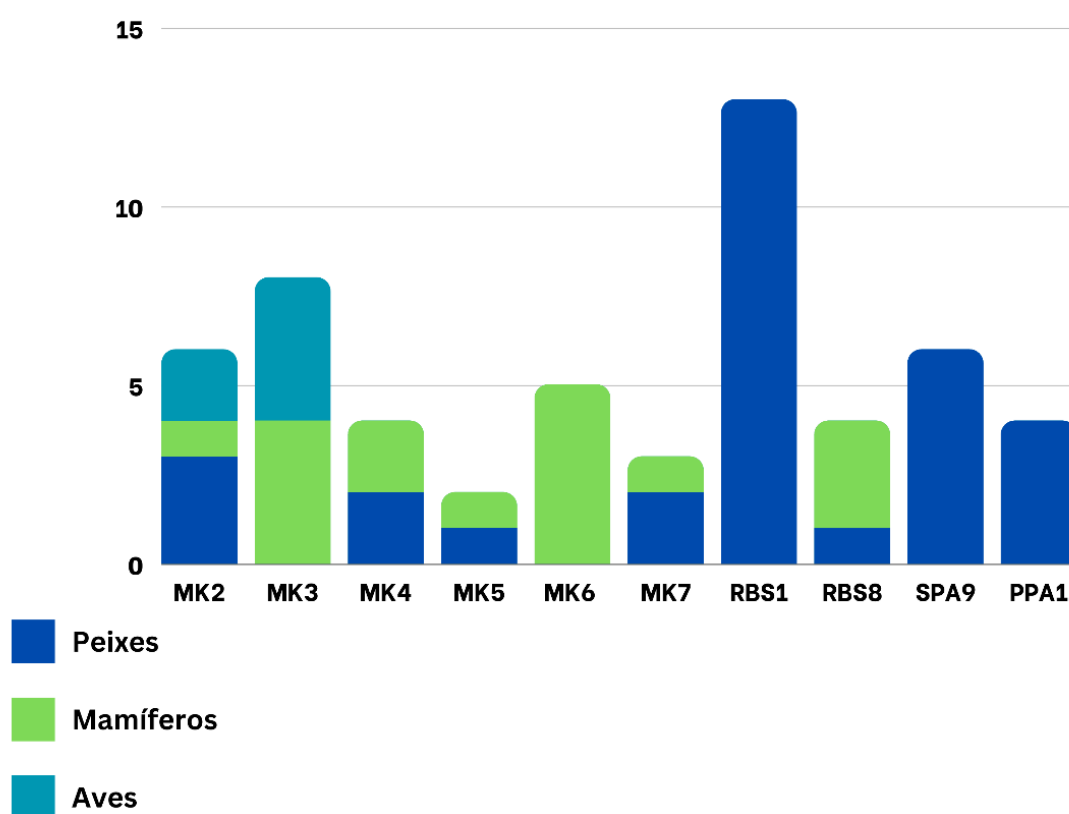
**Figura 7.** Número de seqüências por biblioteca e estágio de limpeza/processamento de dados, por ponto amostral.



**Figura 8.** Mapa com todos os registros conhecidos para a espécie *T. claviger*. Ponto com o símbolo “estrela”, corresponde a localidade tipo e o ponto com o círculo todo branco, corresponde a localidade na Fazenda Santa Clara. Os demais pontos, são os novos registros adquiridos através deste trabalho.

### 3.2. eDNA- espécies não-alvo

Após removermos os ASVs (*Amplicon Sequence Variant*) com proporção > 0,1% das amostras e atribuirmos as identificações dos mesmos, mantivemos 24 espécies de vertebrados, com pelo menos 98% de similaridade de uma espécie em nosso banco de dados de referência DADA e/ou BLASTn (Altschul et al., 1990). Como esperado, a maioria dos ASVs (33 ASVs em um total de 19291 reads) pertencem a peixes, seguidos por mamíferos (3553 reads pertencentes a 21 ASVs) e 6 ASVs (1.085 reads) atribuídos a aves (Figura 9).



**Figura 9.** Número de ASVs detectadas por ponto amostral de coleta.

Todas as ASVs de mamíferos foram identificadas a nível de espécie, sendo as espécies domésticas, como cachorro, boi e porco, além do DNA humano, as que mais foram detectadas nas amostras, devido às áreas de estudo serem rodeadas por propriedades rurais. O único mamífero silvestre detectado, foi a espécie *Philander frenatus*, popularmente conhecida como cuíca-de-quatro-olhos. Das seis ASVs designadas como aves, todas foram identificadas em nível específico, sendo todas as

espécies de hábitos florestais. Já para o grupo dos peixes, das 33 ASVs, 14 foram identificadas em nível de espécie e uma a nível de gênero (*Pimelodus* sp.).

Quando analisamos os métodos de amostragem, mesmo não pertencendo aos mesmos trechos, podemos observar que as estimativas da composição de espécies por riacho amostrado, demonstram que o método tradicional de coleta e o *eDNA*, se complementam, tendo em vista que das 20 espécies levantadas com ocorrência para a região, sete foram detectadas em ambas as amostragens (35%) e 8 espécies (40%) foram detectadas somente pelo *eDNA*.

Apesar do foco deste estudo ser uma única espécie, com a utilização dos protocolos em abordagem *metabarcoding*, várias sequências de espécies não-alvo são inevitavelmente geradas e em muitos casos acabam sendo descartadas nas análises de bioinformática (Macher et al., 2021). Porém, quando precisamos compreender a dinâmica de uma espécie, levar em consideração as informações biológicas sobre a presença de outros organismos nos ambientes estudados, nos permite ter um panorama maior e mais preciso para os estudos ecológicos, além de possibilitar a compreensão da dinâmica de espécies que convivem nos mesmos ambientes que o bagrinho *T. claviger*.

Neste contexto, analisamos também a presença de outros vertebrados presentes nas amostras ambientais aquáticas, que foram amplificadas inicialmente visando a presença de espécies de peixes.

Os ASVs designados como mamíferos, pertencem a cinco espécies, *Bos taurus* (boi); *Canis lupus familiaris* (cachorro doméstico); *Homo sapiens* (homem); *Philander frenatus* (cuíca-quatro-olhos) e *Sus scrofa* (porco). Já para as aves, foram determinadas cinco espécies, *Campylorhamphus falcularius* (arapaçu-de-bico-torto), *Scytalopus speluncae* (tapaculo-preto), *Crypturellus obsoletus* (inhambuguaçu), *Contopus cinereus* (papa-moscas-cinzento) e *Turdus flavipes* (sabiá-una) (Tabela 3). As ASVs para as aves, foram registradas para os pontos MK2, MK3. Já as ASVs para mamíferos, foram registradas para os pontos MK2, MK3, MK4, MK5, MK6, MK7 e RBS8. Os pontos MK3 e MK6, foram os únicos pontos que não houve detecção de espécies de peixes.

**Tabela 3.** Relação das espécies de peixes, aves e mamíferos, identificados nas amostras de *eDNA*.

CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO	ESPÉCIE
Peixes	Characiformes	Characidae	<i>Deuterodon</i>	<i>Deuterodon giton</i> (Eigenmann, 1908)
Peixes	Characiformes	Erythrinidae	<i>Hoplias</i>	<i>Hoplias malabaricus</i> (Bloch, 1794)
Peixes	Cyprinodontiformes	Poeciliidae	<i>Phalloceros</i>	<i>Phalloceros harpagos</i> Lucinda, 2008
Peixes	Gymnotiformes	Gymnotidae	<i>Gymnotus</i>	<i>Gymnotus carapo</i> Linnaeus, 1758
Peixes	Perciformes	Cichlidae	<i>Coptodon</i>	<i>Coptodon rendalli</i> (Boulenger, 1897)
Peixes	Perciformes	Cichlidae	<i>Geophagus</i>	<i>Geophagus brasiliensis</i> (Quoy & Gaimard, 1824)
Peixes	Perciformes	Cichlidae	<i>Oreochromis</i>	<i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758)
Peixes	Perciformes	Sciaenidae	<i>Micropogonias</i>	<i>Plagioscion</i> sp.
Peixes	Pleuronectiformes	Achiridae	<i>Hypoclinemus</i>	<i>Hypoclinemus mentalis</i> (Günther, 1862)
Peixes	Siluriformes	Loricariidae	<i>Neoplecostomus</i>	<i>Neoplecostomus microps</i> (Steindachner 1877)
Peixes	Siluriformes	Heptapteridae	<i>Pimelodus</i>	<i>Pimelodus</i> sp.
Peixes	Siluriformes	Heptapteridae	<i>Rhamdia</i>	<i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard 1824)
Peixes	Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Trichogenes</i>	<i>Trichogenes claviger</i> de Pinna, Helmer, Britski & Nunes 2010
Peixes	Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Trichomycterus</i>	<i>Trichomycterus caudofasciatus</i> Alencar & Costa 2004
Aves	Passeriformes	Dendrocolaptidae	<i>Campylorhamphus</i>	<i>Campylorhamphus falcularius</i> (Vieillot, 1822)
Aves	Passeriformes	Rhinocryptidae	<i>Scytalopus</i>	<i>Scytalopus speluncae</i> (Ménétries, 1835)
Aves	Passeriformes	Tinamidae	<i>Crypturellus</i>	<i>Crypturellus obsoletus</i> (Temminck, 1815)
Aves	Passeriformes	Tyrannidae	<i>Contopus</i>	<i>Contopus cinereus</i> (Spix, 1825)
Aves	Tinamiformes	Turdidae	<i>Turdus</i>	<i>Turdus flavipes</i> Vieillot, 1818
Mammalia	Artiodactyla	Suidae	<i>Sus</i>	<i>Sus scrofa</i> Linnaeus, 1758
Mammalia	Artiodactyla	Bovidae	<i>Bos</i>	<i>Bos taurus</i> Linnaeus, 1758
Mammalia	Carnivora	Canidae	<i>Canis</i>	<i>Canis lupus familiaris</i> Linnaeus, 1758
Mammalia	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Philander</i>	<i>Philander frenatus</i> (Olfers, 1818)
Mammalia	Primates	Hominidae	<i>Homo</i>	<i>Homo sapiens</i>

#### 4. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que a abordagem *eDNA metabarcoding* é uma alternativa viável de informações genéticas para espécies ameaçadas e espécies não-alvo. Também demonstrou que a utilização do marcador 12S, desenvolvido para a detecção de *T. claviger*, se mostrou eficiente, tornando essa abordagem uma ferramenta poderosa e promissora para monitorar a ocorrência de espécies ameaçadas e que vivem em ambientes sensíveis.

A abordagem *eDNA metabarcoding*, foi uma ferramenta auxiliar na percepção holística da biodiversidade, detectando uma diversidade de táxons com igual certeza. Nas cabeceiras do rio Itapemirim o *eDNA* auxiliou na detecção de espécies invasoras, exóticas e ameaçadas, mas também detectou a presença de outras espécies de vertebrados não-alvo, que vivem próximos dos ambientes aquáticos, tornando essa técnica abrangente e reduzindo custos adicionais e impactos sobre os frágeis ambientes de cabeceira de riachos florestados.

O potencial de detecção de espécies bioindicadoras se confirmou com o uso da técnica e se mostrou um método bastante sensível para rastrear as espécies presentes em um determinado ambiente.

O ponto RBS8, localizado no Ribeirão Braço Sul, além de ser uma ampliação da distribuição da espécie, que até então era conhecida somente para os contribuintes do rio Caxixe, demonstrou ser um berçário para a espécie, onde foi possível visualizar dezenas de indivíduos juvenis e alevinos nadando.

Os resultados demonstraram que *T. claviger* ainda está presente na região delimitada para este estudo e sua detecção nas amostras ampliou a distribuição da espécie, que antes do estudo era conhecida somente da localidade tipo, com uma área de Extensão de Ocorrência (EOO) que era desconhecida e agora passa a ter 8.883 km<sup>2</sup> e uma Área de Ocupação (AOO) revisada agora com 16.000 km<sup>2</sup>.

O rápido avanço das tecnologias em genômica é promissor. Esperamos em um futuro próximo que a aplicabilidade do *eDNA* possa fazer a diferença como uma ferramenta de apoio aos estudos em conservação da biodiversidade.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 25(22), 4692-4693.
- Altschul, S. F., et al. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403–410 (1990) doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Andruszkiewicz, E. A., Starks, H. A., Chavez, F. P., Sassoubre, L. M., Block, B. A., & Boehm, A. B. (2017). Biomonitoring of marine vertebrates in Monterey Bay using eDNA metabarcoding. *PLoS One*, 12(4), e0176343.
- Bálint, M., Nowak, C., Márton, O., Pauls, S. U., Wittwer, C., Aramayo, J. L., ... & Jansen, M. (2018). Accuracy, limitations and cost efficiency of eDNA-based community survey in tropical frogs. *Molecular Ecology Resources*, 18(6), 1415-1426.
- Bonfil, R., Palacios-Barreto, P., Vargas, O. U. M., Ricaño-Soriano, M., & Díaz-Jaimes, P. (2021). Detection of critically endangered marine species with dwindling populations in the wild using eDNA gives hope for sawfishes. *Marine Biology*, 168(5), 60.
- Britski, H.A. & H. Ortega (1983). *Trichogenes longipinnis*, novo gênero e espécie de Trychomycterinae do sudeste do Brasil (Pisces, Siluriformes). *Revta bras. Zool.* 1 (3):211-216.
- Castro RMC, Polaz CNM. (2020). Small-sized fish: the largest and most threatened portion of the megadiverse neotropical freshwater fish fauna. *Biota Neotrop.* 20(1):e20180683. doi:10.1590/1676-0611-bn-2018-0683
- Closek, C. J., Santora, J. A., Starks, H. A., Schroeder, I. D., Andruszkiewicz, E. A., Sakuma, K. M., ... & Boehm, A. B. (2019). Marine vertebrate biodiversity and distribution within the central California Current using environmental DNA (eDNA) metabarcoding and ecosystem surveys. *Frontiers in Marine Science*, 6, 732.
- Cristescu, M. E., & Hebert, P. D. (2018). Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49, 209-230.
- de Pinna M. C. C. (1998) Phylogenetic relationships of neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical overview and synthesis of hypotheses. In: Malabarba LR, Reis, RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS (Eds) *Phylogeny and classification of Neotropical Fishes. Edipucrs*, Porto Alegre, 279–330.

de Pinna, M. C., Helmer, J. L., Britski, H. A., & Nunes, L. R. (2010). A new species of *Trichogenes* from the rio Itapemirim drainage, southeastern Brazil, with comments on the monophyly of the genus (Siluriformes: Trichomycteridae). *Neotropical Ichthyology*, 8, 707-717.

de Pinna, M., Reis, V., & Britski, H. (2020). A new species of *Trichogenes* (Siluriformes, Trichomycteridae), with a discussion on the homologies of the anterior orbital bones in trichomycterids and other loricarioids. *American Museum Novitates*, 2020 (3951), 1-27.

Do Nascimento, C. (2015). Morphological Evidence for the Monophyly of the Subfamily of Parasitic Catfishes Stegophilinae (Siluriformes, Trichomycteridae) and Phylogenetic Diagnoses of Its Genera. *Copeia* 103, No. 4, 2015, 933–960.

Ferraris, C. J., Jr. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418:1–628.

Fricke, R. (2019). Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references. 2021. Electronic version. Available online: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> (accessed on 05 Juny 2023).

Goldberg, C. S., Strickler, K. M., & Pilliod, D. S. (2015). Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 183, 1-3.

Harper, L. R., Lawson Handley, L., Hahn, C., Boonham, N., Rees, H. C., Gough, K. C., ... & Hänfling, B. (2018). Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Ecology and evolution*, 8(12), 6330-6341.

IUCN, (2022). The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acesso em 15.jul.2023. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org/>. Disponível em: <https://www.iucn.org>.

Lacoursière-Roussel, A., Rosabal, M., & Bernatchez, L. (2016). Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular ecology resources*, 16(6), 1401-1414.

Le Port, A., Bakker, J., Cooper, M.K., Huerlimann, R. & Mariani, S. (2018). Environmental DNA (eDNA): A valuable tool for ecological inference and management of sharks and their relatives. In: J.C. Carrier, M.R. Heithaus, C.A. Simpfendorfer (Eds.) *Shark research: Emerging technologies and applications for the field and laboratory*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 271-300.

Macher, T. H., Schütz, R., Arle, J., Beermann, A. J., Koschorreck, J., & Leese, F. (2021). Beyond fish eDNA metabarcoding: Field replicates disproportionately improve the detection of stream associated vertebrate species. *BioRxiv*, 2021-03.

Ministério do Meio Ambiente – MMA. Lista Nacional Oficial das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Portaria n. 444, de 17 de dezembro de 2014. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Seção 1, 245, p. 121-126, 2014.

MMA- Ministério do Meio Ambiente, ICMBio- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Portaria no- 370, de 1 de agosto de 2019 de aprovação do Plano de Ação Nacional para a Conservação de Espécies de Peixes e Eglas Ameaçados de Extinção da Mata Atlântica - PAN Peixes e Eglas da Mata Atlântica. Ministério do Meio Ambiente, Brasília; 2019. Disponível em: <http://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-n-370-de-1-de-agosto-de-2019-209274364> acesso 10 abr 2021.

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... & Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088.

Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Beja, P., Boggero, A., ... & Kahlert, M. (2018). The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e) DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 637, 1295-1310.

Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R., & Gough, K. C. (2014). The detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of applied ecology*, 51(5), 1450-1459.

Rizzato, P. P., & Bichuette, M. E. (2014). Ituglanis boticario, a new troglomorphic catfish (Teleostei: Siluriformes: Trichomycteridae) from Mambai karst area, central Brazil. *Zoologia (Curitiba)*, 31, 577-598.

Sarmento Soares, L.M., R.F.M. Martins-Pinheiro, L.S.F. Martins, S. Nunes, & J.L. Helmer. (2018). *Trichogenes claviger* um peixinho capixaba criticamente ameaçado de extinção: “Caetés” uma Unidade de Conservação que pode protegê-lo. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia* 127: 13–19.

Schenekar, T. (2023). The current state of eDNA research in freshwater ecosystems: are we shifting from the developmental phase to standard application in biomonitoring?. *Hydrobiologia*, 850(6), 1263-1282.

Schütz, R., Tollrian, R., & Schweinsberg, M. (2020). A novel environmental DNA detection approach for the wading birds *Platalea leucorodia*, *Recurvirostra avosetta* and *Tringa totanus*. *Conservation Genetics Resources*, 12, 529-531.

Silva, J. P., Sarmiento-Soares, L., Tonini, L., Freitas, J. (2023). How does local people contribute to species conservation? The case study of *Trichogenes claviger* at neotropical Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Oryx*. No prelo.

Stiassny, M. L. J., & Pinna, M. D. (1994). Basal taxa and the role of cladistic patterns in the evaluation of conservation priorities: a view from freshwater. *Systematics and conservation evaluation*.

Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological conservation*, 183, 4-18.

Ushio, M., Murata, K., Sado, T., Nishiumi, I., Takeshita, M., Iwasaki, W., & Miya, M. (2018). Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific reports*, 8(1), 4493.

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., ... Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929–942. 10.1111/mec.13428

Yamanaka, H., Minamoto, T., Matsuura, J., Sakurai, S., Tsuji, S., Motozawa, H., ... & Kondo, A. (2017). A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology*, 18, 233-241.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Capítulo II:**

**História Natural de *Trichogenes claviger***  
**(Siluriformes, Trichomycteridae, Trichogeninae), bagrinho**  
**ameaçado de extinção, endêmico da bacia do rio Itapemirim,**  
**Espírito Santo**

**Juliana Paulo da Silva**

**Orientadora: Luisa Maria Sarmiento Soares Filho**

## 1. INTRODUÇÃO

Os estudos de história natural auxiliam na compreensão da dinâmica dos organismos e buscam saber onde eles vivem e o que eles fazem em seu ambiente, incluindo interações com outros indivíduos. As pesquisas são baseadas em estudos voltados para ecologia, comportamento descritivo, além de experimentos para observação da interação entre espécies (Greene, 1994). Pesquisas dessa natureza são importantes para compreensão da biodiversidade, pois permitem traçar estratégias de conservação para o grupo que se estuda (Greene & Losos, 1988).

Para os peixes Trichomycteridae, os estudos se concentram mais para as espécies de caverna como Trichomycterinae (Bichuette & Trajano, 2004; Rizzato et al., 2011) e de hábitos parasíticos, como os Vandeliinae e Stegophilinae (Winemiller & Yan, 1989; de Pinna & Britski, 1981; Spotte et al., 2001). Para as espécies epígeas se destacam os estudos de Zuanon & Sazima (2004) e Zanata & Primitivo (2014).

Os peculiares cambévas do gênero *Trichogenes* (nome popular dado as espécies pertencentes a família Trichomycteridae), estão alocados em uma subfamília própria, Trichogeninae. Essa subfamília apresenta a morfologia e o comportamento muito distintos do que se vê outros grupos dentro da família Trichomycteridae na Mata Atlântica.

Quando comparados o gênero *Trichogenes* como os gêneros *Trichomycterus*, *Microcambeva* e *Ituglanis*, as diferenças estão, respectivamente: corpo parcialmente comprimido (vs. deprimido), olhos proporcionalmente grandes (vs. pequenos), hábitos de vida não tão crípticos (vs. crípticos), nadadores ativos a meia água (vs. demersais), e na maioria das vezes a única espécie de peixe naquele trecho do riacho (vs. ambiente co-habitado por outras espécies).

A subfamília Trichogeninae, conta com três espécies descritas: *Trichogenes longipinnis* Britski & Ortega, 1983, *Trichogenes claviger* de Pinna, Helmer, Britski & Nunes, 2010 e *Trichogenes beagle* de Pinna, Reis & Britski 2020.

A espécie *Trichogenes longipinnis*, a primeira a ser descoberta, ocorre em rios costeiros entre os estados de São Paulo e Rio de Janeiro, habitando riachos de cabeceiras na região nomeada Costa Verde, entre litoral norte de São Paulo e o sul do Rio de Janeiro. A espécie *Trichogenes claviger*, descrita quase três décadas após seu congênere *T. longipinnis*, também vive em ambientes restritos e de altitude da Mata Atlântica, porém habita as cabeceiras do rio Itapemirim, ao sul do estado do Espírito Santo.

Uma terceira espécie, *Trichogenes beagle*, foi descrita a partir de material colecionado sem a informação de localidade, carecendo inclusive de conhecimento acerca de qual bacia hidrográfica pertence. Sua descrição foi uma tentativa de colocar a público mais uma população desses enigmáticos peixes de riacho, que inclusive não possui nem informações sobre os coletores, o que seria uma esperança de resgatar mais informações sobre a espécie (M. de Pinna, com. Pessoal).

Para a espécie *T. claviger*, foco deste estudo, as informações disponíveis até o momento, limitam-se a sua descrição original, a notas publicadas em anais de congressos (Silva et. al, 2017; Silva et. al, 2022), e a publicações focadas em conservação e comportamento (Sarmiento-Soares et. al, 2018 e Silva et. al, 2022).

Com o trabalho voltado para o *eDNA* da espécie, questões como sua distribuição de ocorrência, os ambientes que a espécie vive, puderam ser compreendidos, como consta no Capítulo 1 dessa dissertação.

Porém, compreender somente sua distribuição não é o suficiente para proteger de fato essa espécie, saber quais são as ameaças que ela enfrenta são fundamentais, tendo em vista as pressões constantes que os ambientes aquáticos sofrem. Este cenário se torna mais preocupante, quando as espécies que ali vivem, são extremamente sensíveis a mudanças ambientais e dependentes de vegetação ciliar para sobreviver (Buckup, 1999; Langeani et al., 2005). Por este motivo, o presente estudo, tem por objetivo principal caracterizar os ambientes de vida, a ocupação do habitat e aspectos do comportamento de *T. claviger* em seu ambiente natural e em aquário, para subsidiar informações necessárias à sua conservação.

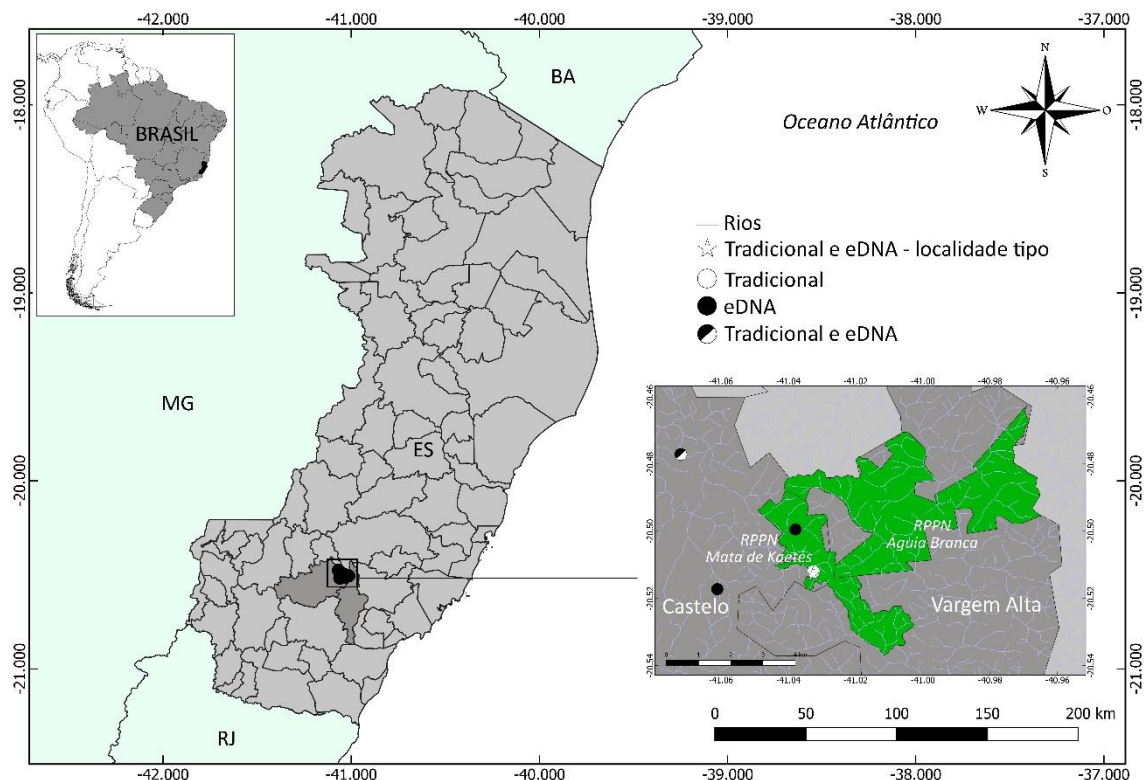
## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Área de estudo**

O presente estudo foi realizado nos municípios de Castelo e Vargem Alta – ES, situado entre o Parque Estadual de Forno Grande e a RPPN Águia Branca (Figura 1).

A sub-bacia do rio Caxixe, tributário do rio Castelo no Alto rio Itapemirim, é formada principalmente pelo córrego Picada Comprida e o Ribeirão Braço Sul.

Segundo o INCAPER (2022), a vegetação predominante dessa região é originária da Mata Atlântica ombrófila densa sub-montana, com maior concentração nas áreas de maior altitude, com características de mata secundária e em regeneração, e com poucas áreas de matas originais. As florestas cultivadas predominantes nessa região são de espécies de eucalipto e pinus. De acordo com a Classificação Climática de Köppen & Geiger (1928) feita por Alvares et al. (2013), as cidades de Vargem Alta e Castelo, estão classificadas com o clima temperado quente, sem estação seca no inverno (clima do tipo “Cfb”).



**Figura 1.** Área de estudo: bacia do rio Itapemirim. Os círculos e estrela, indicam os locais que a espécie ocorre. A área está situada entre as RPPNs Mata de Kaetés e Águia Branca.

## 2.2. Observações de campo

As observações de campo foram realizadas em trechos lânticos ou semi lânticos dos córregos na área de estudo, em ambientes arenosos, com águas cor de chá e vegetação marginal (Figura 2). A profundidade média desses locais não ultrapassava os 40cm, formando em algumas localidades poças maiores, sem correnteza.





**Figura 2.** Ambientes que a espécie *Trichogenes claviger* vive.

Observações subaquáticas e captura de peixes foram realizadas em quatro localidades diferentes, sendo três na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Mata de Kaetés e uma no Ribeirão Braço Sul, em uma propriedade particular.

O comportamento foi observado diretamente, a luz do dia. Observações noturnas foram feitas em aquário de campo. Para evitar perturbações, os animais em aquário foram observados usando iluminação indireta, com o auxílio de uma luminária revestida com papel celofane vermelho. O registro do comportamento em sessões diurnas no ambiente natural somou 10 horas de observação direta. As observações em aquário de campo, incluindo fotografia e gravações de comportamento, somaram 32 horas de observação.

### **2.3. Número de indivíduos visualizados**

Com o objetivo de estimar o número de indivíduos ativos em cada visita, foram realizadas observações subaquáticas, sendo anotados o número de exemplares observados e seu comportamento (Figura 3). Os registros do número de indivíduos visualizados são apresentados na forma de médias por ponto.



**Figura 3.** Espécie *Trichogenes claviger* em filmagens subaquáticas no campo.

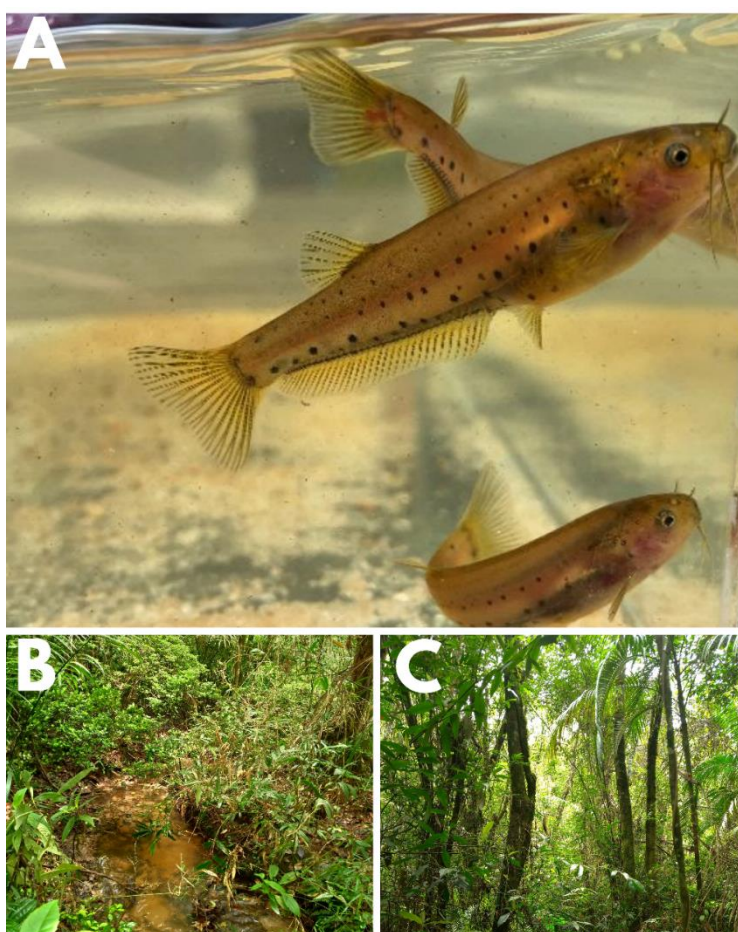
#### **2.4. Amostragem**

Para este estudo de comportamento, foi realizada uma expedição de campo na localidade de Caetés, Córrego Picada Comprida, município de Castelo. Para a expedição obtivemos autorização de licença do SISBIO (Número: 79046-1/2).

Por se tratar de uma espécie Criticamente em Perigo (CR), os peixes foram observados e coletados com peneira, e após a captura os espécimes foram mantidos em aquário. Os 05 indivíduos de *Trichogenes claviger*, foram trazidos para o laboratório e foram utilizados em um experimento comportamental. Nesse experimento de 15 dias, os espécimes foram mantidos em aquário pequeno (15cm de altura x 30 cm de largura x 20 cm de profundidade), com água proveniente do riacho amostrado (Rio Caxixe). Os peixes foram

mantidos em fotoperíodos de 12 horas claro: 12 horas escuro, em um ambiente provido de iluminação natural indireta.

Foram tomados dados bióticos referentes a vegetação e abióticos quanto a água e substrato das localidades amostradas. Alguns exemplares foram fotografados em vida, assim como seus respectivos biótopos (Figura 4). Em laboratório, os exemplares foram medidos com paquímetro digital Mitutoyo 500-196-30B (precisão de 0,01mm) para obtenção do comprimento padrão.



**Figura 4.** A- espécie *Trichogenes claviger* recém capturada; B e C- ambientes que a espécie ocorre.

Os pontos de amostragem foram georreferenciados por GPS (*Global Positioning System*), fotografados e caracterizados quanto às condições ambientais. Do material coletado, antes da fixação, foram extraídas amostras de tecido, para usos posteriores em análises genéticas, que foram acondicionados em microtubos com álcool absoluto, mantidos em freezers da coleção MBML-PEIXES.

## 2.5. Conteúdo estomacal

Como os exemplares foram mantidos em observação no aquário, não foi possível realizar a análise do conteúdo estomacal, devido a interferência na alimentação. Nos baseamos no trabalho anterior realizado por Sarmiento-Soares (2018), com a espécie.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Habitat natural

A cobertura vegetal predominante é a floresta ombrófila densa submontana, com uma vegetação arbórea entre 7 a 15 metros de altura (Ambientais, 2000). Na mata ripária destaque para a canela (*Nectandria* spp.), e a palmeira juçara (*Euterpe edulis* Mart.), sendo essa última espécie altamente visada por caçadores que a extraem nesses remanescentes florestais (Figura 5). Na margem fluvial, também havia ocorrência de samambaias. Além disso, existe uma grande diversidade de epífitas, principalmente as Bromeliáceas (*Guzmania lingulata* (L.) Mez), Gesneriáceas e Aráceas, com destaque para a espécie *Philodendron spiritus-sancti* G.S.Bunting, endêmica do Estado do Espírito Santo e ameaçada de extinção (Fraga et al., 2019).



**Figura 5.** Retirada de palmito nas áreas limítrofes de ocorrência da espécie *Trichogenes claviger*.

Os pontos onde a espécie foi avistada, conforme resultados da pesquisa com *eDNA*, estão situados entre Vargem Alta e Castelo, no complexo Mata de Kaetés e Ribeirão Braço Sul. Registros incluem riachos de primeira e segunda ordem nas cabeceiras do rio Caxixe, entre as coordenadas 20°30'40.0"S 41°02'00.0"W e 20°28'37"S 41°04'17"W.

Os riachos são rasos, entre 20 e 70 cm de profundidade, de correnteza fraca ou parada. Possuem leitos arenosos, revestidos por densa camada de folhiço, galhos e restos de vegetação. Não haviam macrófitas flutuantes ou plantas emergentes, mas em alguns trechos estavam presentes raízes submersas da vegetação ripária. A água é transparente, de tonalidade translúcida e sem turbidez, nas localidades da RPPN Mata de Kaetés e com matéria orgânica em decomposição e água mais escura em Ribeirão Braço Sul (Figura 6).



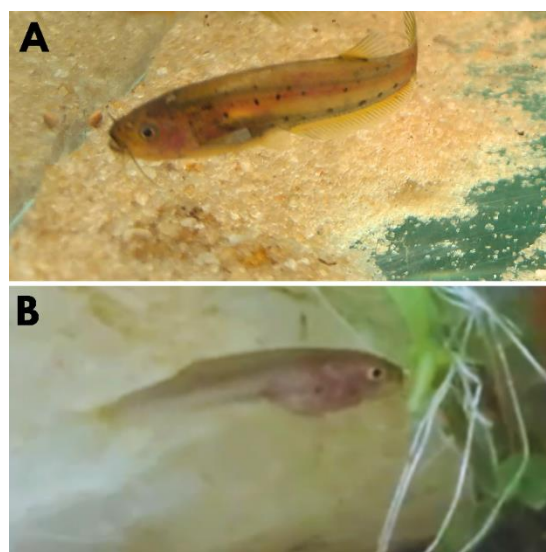
**Figura 6.** Diferenças na coloração da água nos ambientes com ocorrência da espécie *Trichogenes claviger*. A- água transparente, cor de chá, com substrato arenoso (RPPN Mata de Kaetés) e B- água mais escura, com substrato de lama e matéria orgânica em decomposição (Ribeirão Braço do Sul).

### 3.2. Comportamento na natureza

Em ambiente natural *Trichogenes claviger* demonstrou comportamento de agregação, onde juvenis e adultos convivem juntos, sendo que os juvenis ficam mais expostos, enquanto indivíduos adultos têm comportamento críptico durante o dia, e a noite forrageiam, corroborando as observações já realizadas (Silva et al., 2022). Os riachos possuem leitos arenosos, com uma camada densa de folhiço sobre a areia, e ainda galhos e restos de vegetação, onde a espécie usa como esconderijo. Os bagrinhos foram observados em águas claras, translúcidas e também em águas mais escuras, ambos com correnteza fraca e em área mais empoçadas. Nos trechos onde havia correnteza forte a espécie não foi encontrada.

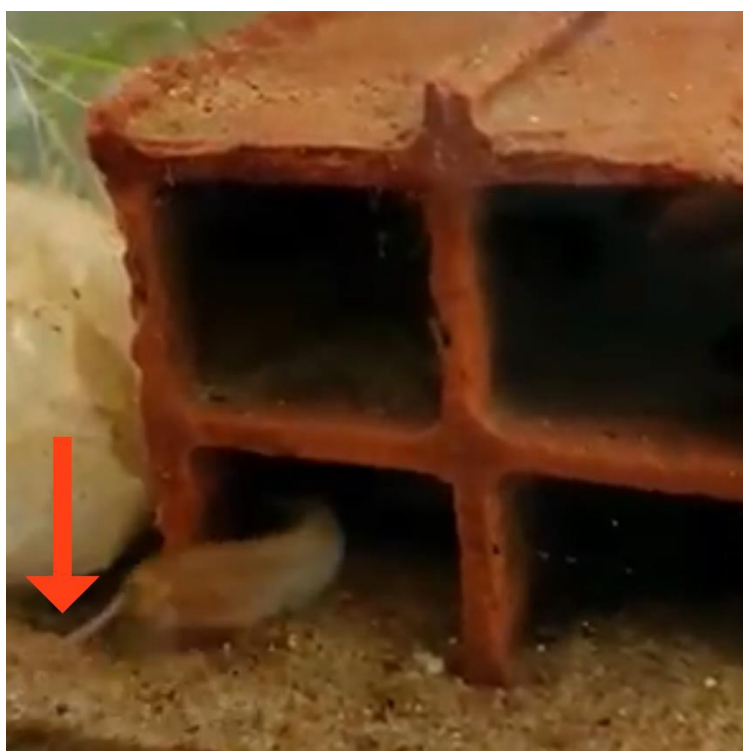
### 3.3. Comportamento em aquário

O comportamento da espécie foi registrado durante o dia (período da manhã) e à noite (no crepúsculo). Indivíduos juvenis de *T. claviger* nadam ativamente sobre o substrato e não exibem um comportamento críptico, ou seja, não se enterram na areia quando perturbados (Figura 7). Observamos que a ocupação na coluna d'água varia conforme o tamanho. Os adultos são principalmente demersais, e demonstram comportamento críptico. Estes adultos se mostram territorialistas durante o dia, ocupando o abrigo e impedindo a entrada dos demais, enquanto que os sub-adultos e jovens nadam na meia água. Durante o dia os indivíduos se mantêm ocultos sob a vegetação, e saem para forragear no horário do crepúsculo. Indivíduos maiores se camuflam no fundo de areia e pedras, permanecendo estacionários por minutos, quando percebem perturbações.



**Figura 7.** Indivíduos juvenis de *Trichogenes claviger* nadando ativamente no aquário.

A oferta alimentar consistiu em insetos imaturos e invertebrados terrestres. Os indivíduos são ágeis principalmente ao anoitecer, no momento da oferta alimentar, tendo preferência por animais relativamente pequenos, contudo, em uma situação observada, um juvenil conseguiu ingerir uma minhoca inteira, o que pode sugerir plasticidade na ingestão de alimentos que caem na água (Figura 8). As observações corroboram que *T. claviger* é bastante resistente a ambientes controlados, sem aeração artificial. E o comportamento em aquário possivelmente se relaciona com as peculiaridades do ambiente habitado, que são matas preservadas de águas claras extremamente limpas, com pouca oferta de nutrientes de origem autóctone.



**Figura 8.** Indivíduo juvenil de *Trichogenes claviger* capturando uma minhoca (que foi ofertada como sugestão de alimentação), e engolindo inteira.

### 3.4. Interação com outras espécies

Em seu habitat natural *Trichogenes claviger*, foi a única espécie observada em seu biótopo. Mas mesmo assim foram realizados experimentos colocando outras espécies “invasoras”, para documentar o comportamento da espécie em ambiente controlado.

A primeira a ser introduzida no aquário foi um barrigudinho da espécie *Poecilia vivipara*, coletado em um riacho do contribuinte do rio São Lourenço, em Santa Teresa-ES (residência da pesquisadora Juliana Silva). A espécie se adaptou muito bem ao aquário e

sua presença não incomodou os indivíduos de *T. claviger*, tampouco serviu de alimentação. Foram observados em alguns momentos, quando eram ofertados alimentos, que os juvenis de *T. claviger* espantavam a *P. vivipara*, quando a mesma se aproximava do alimento.

A outra espécie introduzida foi um cascudo *Hypostomus affinis* (Figura 9). Diferentemente do comportamento com o barrigudinho, com a presença do cascudo todos os indivíduos se sentiram ameaçados, levando os adultos a atacarem o cascudo (ainda que este fosse maior), que ficou o tempo todo aderido a lajota (local que era abrigo dos indivíduos de *T. claviger*). Após alguns dias da introdução do cascudinho, os indivíduos de *T. claviger* começaram a morrer, provavelmente devido ao estresse.



**Figura 9.** Indivíduo de *Hypostomus affinis*, colocado no aquário juntamente com os indivíduos de *Trichogenes claviger* e *Poecilia vivipara*.

### **3.5. Distribuição espacial e período de atividade**

Tanto na RPPN Mata de Kaetés, quanto no Ribeirão Braço do Sul, foram avistados vários indivíduos, inclusive no último ponto foram avistados alevinos de *T. claviger*, mostrando que a espécie está reproduzindo. Em ambos os pontos o número de indivíduos nadando era superior a 100 (estimativa visual).

Os alevinos, juvenis e indivíduos adultos, têm preferências distintas de habitat e período de atividade. Alevinos: foram observados muitos indivíduos (50 a 100) nadando



ativamente durante o dia em áreas maiores mais a jusante, onde os indivíduos adultos e juvenis costumam ficar, com profundidade mais rasa (25cm). Esses indivíduos possuem a cabeça maior, quando comparada ao tamanho do corpo (Figura 10).



**Figura 10.** Alevino da espécie *Trichogenes claviger*, recém capturado.

Já os indivíduos juvenis compartilham do mesmo ambiente que os indivíduos adultos, porém estes ficam mais expostos, nadando ativamente no período do dia, podendo ser facilmente avistados, possuindo também comportamento de agregação.

Um comportamento bem comum nos indivíduos adultos e juvenis de maior porte, era se manter ocultos sob a vegetação, e saírem para forragear no horário do crepúsculo. Indivíduos maiores se camuflam no fundo de areia e galhos, permanecendo estacionários por minutos, quando percebem perturbações.

### **3.6. A participação social na conservação**

Com a parceria realizada com o Projeto Saíra apunhalada, que abriga em sua área de atuação a o bagrinho *T. claviger*, a espécie que até então era anônimo ao público não-cientista, passou a ser conhecida na região. Com o apoio foi possível voltar a localidade tipo da espécie e coletar os cinco primeiros exemplares, tendo em vista que a área até o ano de 2019 pertencia a uma empresa privada, o que dificultava o acesso ao local.

Com a popularização da espécie na região, uma descoberta inesperada foi feita no início de 2023. Um agricultor local relatou a presença de *T. claviger* em uma outra sub-bacia, localizado no Braço do Sul (Ribeirão Braço do Sul), pertencente ao município de Castelo.

Em visita ao local foi possível verificar que, além de abrigar centenas de indivíduos, o local correspondia a um berçário, onde a espécie se reproduzia. Graças ao apoio da família Faccini, foi possível descobrir uma nova localidade para o bagrinho, que rapidamente se popularizou na região, se tornando conhecido pela comunidade local (Figura 11).



**Figura 11.** Espécie *Trichogenes claviger* desenhada em um dos pontos de coleta seletiva na localidade de Alto Castelinho, Castelo- ES.

### **3.7. Mídias sociais e a popularização da ciência**

As mídias sociais têm se tornado cada vez mais uma ferramenta importante de aproximação dos projetos de pesquisa, com a população não-cientista, tendo em vista a facilidade e agilidade que as informações são repassadas.

Pensando nesse canal de comunicação, foi criado recentemente, um perfil do projeto no Instagram, com o objetivo de repassar as informações geradas pelo projeto, de forma mais sintetizada e de fácil entendimento (Figura 12).



**Figura 12.** Perfil no instagram criado para divulgação do projeto.

#### 4. DISCUSSÃO

As populações da espécie *T. claviger*, mesmo apresentando um alto número de indivíduos por trecho, ainda estão isoladas em fragmentos florestais, o que representa um risco eminente para a espécie. A população que vive na Reserva de Caetés e Ribeirão Braço do Sul, podem ser consideradas restritas, pois conforme a vegetação marginal é alterada a espécie desaparece, mostrando-se extremamente exigente quanto às condições ambientais.

As observações comportamentais da espécie em campo e aquário, mostraram que os bagrinhos são nadadores ativos durante o dia e, ocupam o meio da coluna d'água e não o fundo do rio, como acontece com a maioria dos Trichomictérídeos. Sua dieta sugere dependência de recurso alimentar alóctone pela presença de besouros Coleoptera e formigas Hymenoptera (Sarmiento-Soares et al.,2018). Em aquário, mostrou-se ser uma

espécie altamente territorialista, cujos indivíduos juvenis competiam entre si por oferta de alimento, além de apresentar comportamento agonístico, onde perseguia outros indivíduos sempre que o alimento era ofertado e atacando nas vezes que se sentiu ameaçado por outra espécie, como *Hypostomus* sp., por exemplo.

A descoberta de indivíduos alevinos em campo, na localidade de Ribeirão Braço do Sul, mostrou que a espécie está se reproduzindo e em grande quantidade, dado aos numerosos indivíduos vistos nadando. Pelo fato dessa população não estar em uma Unidade de Conservação, os riscos que esse grupo sofre são eminentes, tendo em vista que a área é rodeada de pastagem, eucalipto e cultivares agrícolas.

Com a criação da área RPPN Mata de Kaetés, através do Projeto Saíra-apunhalada, grandes avanços foram tomados para a preservação desta espécie e de todas as outras que ali vivem, servindo de refúgio e proteção efetiva. Porém, para que essa espécie esteja de fato protegida, será preciso proteger ainda mais os remanescentes florestais do alto Itapemirim, em especial na sub-bacia do rio Caxixe. Envolver a população local é fundamental, tendo em vista o reconhecimento da população sobre a importância da espécie. A ampliação e/ou construção de novas áreas protegidas, seria mais um grande avanço para a preservação do bagrinho-de-kaetés, nome adotado pela população local e que sugerimos como nome popular para a espécie.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvares, C. A., Stape, J. L., Sentelhas, P. C., Gonçalves, J. D. M., & Sparovek, G. (2013). Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische zeitschrift*, 22(6), 711-728.

Ambientais, M. E. (2000). Plano de manejo do Parque Estadual do Forno Grande. *MRS Estudos Ambientais*, Brasília, Brasil, 300pp.

Bichuette, M. E., & Trajano, E. (2004). Three new subterranean species of Ituglanis from central Brazil (Siluriformes: Trichomycteridae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 15, 243-256.

Britski, H.A. & H. Ortega (1983). Trichogenes longipinnis, novo gênero e espécie de Trychomycterinae do sudeste do Brasil (Pisces, Siluriformes). *Revta bras. Zool.* 1 (3):211-216.

Buckup, P. A. 1999. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. In: Caramaschi, E. P.; Mazzoni, R. & Peres-Neto, P. R. eds. *Ecologia de Peixes de Riachos. Série Oecologia Brasiliensis*. Rio de Janeiro, UFRJ, p. 91-138.

de Pinna, M. C., Helmer, J. L., Britski, H. A., & Nunes, L. R. (2010). A new species of Trichogenes from the rio Itapemirim drainage, southeastern Brazil, with comments on the monophyly of the genus (Siluriformes: Trichomycteridae). *Neotropical Ichthyology*, 8, 707-717.

de Pinna, M., Reis, V., & Britski, H. (2020). A new species of Trichogenes (Siluriformes, Trichomycteridae), with a discussion on the homologies of the anterior orbital bones in trichomycterids and other loricarioids. *American Museum Novitates*, 2020(3951), 1-27.

Fraga, C. N.; Peixoto, A. L.; Leite, Y. L. R.; Santos, N. D.; Oliveira, J. R. P. M.; Sylvestre, L. S.; Schwartsburd, P. B.; Tuler, A. C.; Freitas, J.; Lírio, E. J.; Couto, D. R.; Dutra, V. F.; Waichert, C.; Sobrinho, T. G.; Hostim-Silva, M.; Ferreira, R. B.; Bérnils, R. S.; Costa, L. P.; Chaves, F. G.; Formigoni, M. H.; Silva, J. P.; Ribeiro, R. S.; Reis, J. C. L.; Capellão, R. T.; Lima, R. O.; Saiter, F. Z. & al. 2019. Lista da fauna e flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo. In Fraga, C. N.; Formigoni, M. H. & Chaves, F. G. (Orgs) *Fauna e Flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo*. Santa Teresa, Instituto Nacional da Mata Atlântica, p 342-419.

Greene, H. W. (1994). Systematics and natural history, foundations for understanding and conserving biodiversity. *American Zoologist*, 34(1), 48-56.

Greene, H. W., & Losos, J. B. (1988). Systematics, natural history, and conservation: Field biologists must fight a public-image problem. *BioScience*, 38(7), 458-462.

Köppen, W., & Geiger, R. (1928). *Klimate der erde*. Gotha: verlag justus perthes. *Wall-map 150cmx200cm*, 91-102.

Langeani, F.; Casatti, L.; Gameiro, H. S.; Carmo, A. B. & Rossa-Feres, D. C. 2005. Riffle and pool fish communities in a large stream of southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology* 3(2):305-311.

Rizzato, P. P., Trajano, E., & Bichuette, M. E. (2011). *Trichomycterus dali*: A new highly troglomorphic catfish (Siluriformes: Trichomycteridae) from Serra da Bodoquena, Mato Grosso do sul state, central Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 9, 477-491.

Sarmiento Soares, L. M., Martins-Pinheiro, R. F. M., Martins, L. S. F., Nunes, S., & Helmer, J. L. (2018). *Trichogenes claviger* um peixinho capixaba criticamente ameaçado de extinção: “Caetés” uma Unidade de Conservação que pode protegê-lo. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia*, 127, 13-19.

Silva, J. P., Nunes, L. A., Tonini, L., Sarmiento-Soares, L. M. (2017). Avaliação da morfometria da cabeça entre as espécies de *Trichogenes claviger* e *T. longipinnis*, (Siluriformes, Trichomycteridae, Trichogeninae). *Anais XXII Encontro Brasileiro de Ictiologia*, Porto Seguro. 2017.

Silva, J. P.; Sarmiento-Soares, L. M.; Martins-Pinheiro, R. F.; Oliveira, E. J. F.; Freitas, L. T.; Novelli, B. F. E.; Freitas, J. Desafios à conservação de *Trichogenes claviger*. In: XI Simpósio sobre a Biodiversidade da Mata Atlântica. SIMBIOMA, 2022, Santa Teresa. *Anais do XI SIMBIOMA*. Simpósio sobre a Biodiversidade da Mata Atlântica, 2022. v. 11. p. 169-173.

Spotte, S., Petry, P., & Zuanon, J. A. (2001). Experiments on the feeding behavior of the hematophagous candiru, *Vandellia cf. plazaii*. *Environmental Biology of Fishes*, 60, 459-464.

Winemiller, K. O., & Yan, H. Y. (1989). Obligate mucus-feeding in a South American trichomycterid catfish (Pisces: Ostariophysi). *Copeia*, 1989(2), 511-514.

Zanata, A. M., & Primitivo, C. (2014). Natural history of *Copionodon pecten*, an endemic trichomycterid catfish from Chapada Diamantina in northeastern Brazil. *Journal of Natural History*, 48(3-4), 203-228.

Zuanon, J., & Sazima, I. (2004). Natural history of *Stauroglanis gouldingi* (Siluriformes: Trichomycteridae), a miniature sand-dwelling candiru from central Amazonian streamlets. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 15, 201-208.