

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

MESTRADO

**Caracterização citogenética e molecular das espécies
Cichla kelberi e *Cichla piquiti* e seu possível híbrido interespecífico
coletados em ambientes naturais**

ANDREA ABRIGATO DE FREITAS MOURÃO

**Botucatu, SP
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ANDREA ABRIGATO DE FREITAS MOURÃO

**Caracterização citogenética e molecular das espécies
Cichla kelberi e *Cichla piquiti* e seu possível híbrido interespecífico
coletados em ambientes naturais**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista - UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas. Área de
concentração: Zoologia.

Orientador: Dr. Fábio Porto Foresti
Co-Orientadora: Daniela Cristina Ferreira

Botucatu, SP
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Mourão, Andrea Abrigato de Freitas.

Caracterização citogenética e molecular das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* e seu possível híbrido interespecífico, coletados em ambientes naturais/
Andrea Abrigato de Freitas Mourão - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu

Orientador: Fábio Porto Foresti

Co-Orientadora: Daniela Cristina Ferreira

Capes: 20204000

1. Peixe - Genética. 2. Genética - Expressão. 3. Peixe – Identificação. 4.
Citogenética. 5. Peixe - Classificação.

Palavras-chave: Caracterização genética; Identificação de peixes; Híbridos de
peixes; Marcadores moleculares; PCR-multiplex; RFLP I.



*Por que nossa perversidade deveria ser bagagem de um passado símiesco e nossa
bondade unicamente humana? Por que não procurar a continuidade com outros
animais também para as nossas características "nobres"?*

(Frans de Waal)

Dedico este estudo aos mentores de minha vida:
Maria José Abrigato, Roberto Mourão,
Maria José M. Abrigato e
José Luiz Abrigato.

AGRADECIMENTOS

Obrigada por tudo...

Ao Prof. Dr. Fábio Porto Foresti, por me apoiar em todos os momentos de meu mestrado. Por me receber de braços abertos em seu laboratório com total confiança. Por dividir comigo seu conhecimento sobre diversos ramos da ciência, com competência, paciência e amizade.

À Dra. Daniela Cristina Ferreira, por ser minha professora, amiga e por me ensinar o amor à profissão. Por me assistir em minhas dificuldades e torcer por minhas conquistas.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti pelo apoio e confiança. Por abrir as portas de seu laboratório de olhos fechados, por contribuir com seu conhecimento e amor à genética. Um exemplo à ser seguido.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro concedido.

À pós-graduação em Ciências Biológicas da UNESP de Botucatu, ao Departamento de Zoologia e aos funcionários.

Ao Dr. Diogo Teruo Hashimoto, professor e amigo que me ensinou disciplina e me auxiliou nos momentos mais difíceis com paciência.

Aos professores Rosicleire Veríssimo e Alexandre Ninhaus por contribuir com minhas coletas com total disposição. E também aos amigos do L.I.NEO (Laboratório de Ictiologia Neotropical) pela ajuda e amizade nos momentos de dúvida.

Aos amigos do LAGENPE que me ajudam todos os dias: Fernanda (obrigada pelo auxílio na genética molecular e por tudo mais), Tatiana (obrigada pela ajuda com a citogenética), Bruna (obrigada por me ajudar a organizar minhas amostras e tabelas e pelas conversas descontraídas), Sandro (obrigada pela ajuda com os cariótipos e pelas dicas de genética) e Manolo (obrigada pela ajuda na coleta, pelas dicas em minha qualificação e no Photoshop).

Aos amigos do LAGENPE que me ajudam sempre: Aline, Maíce, Flávio, Diego, Larissa, Sarah, Camila e Carolina.

À minha amiga Rosangela por me ajudar nas escritas e na vida, por sanar minhas dúvidas sobre ecologia, biologia ou o que quer que fosse. Pela amizade, paciência e companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus de Botucatu, em

especial ao Fernando Mendonça, Bruno de Franco e Luiz Henrique Ussami. Obrigada por me ajudarem no início de tudo e até hoje.

À todos os professores do curso de Ciências Biológicas da UNIRP (Centro Universitário de Rio Preto) por fazerem parte de minha formação como bióloga. Em especial aos meus queridos professores da graduação Prof. Dra. Valéria Stranghetti, Prof. Dra. Zélia Valsechi, Prof. Dr. Irlan Leite e, principalmente, ao Prof. Dr. Fabiano Taddei por depositar confiança em mim desde minha graduação até minha pós-graduação.

Aos meus amados amigos da vida rio-pretense e bauruense: Jean (cão), Camila (agreeen), Jaqueline (jaque), Robson (bai), Mauro (darim), Mayra (mey), Vinícius (doido), Isadora (isa), Paloma (pá), Ana Silvia (aninha), Gisele (gih), Sabrina (sá), Diogo (hashi), Daniela (dani), Rosangela (rô), Maria Laura (laura), Daphine (dai), Gabriel (hudson), Mateus (têti), Filipe (ϕ), João (nelito), Thaís (taz), Cinthia (cih), Ângela (gê), Giovanna (gizinha). Vocês foram e sempre serão peça fundamental para o meu crescimento.

À minha mãe por me ensinar tudo que sei, sempre estando ao meu lado me apoiando em todas as minhas decisões. Por me mostrar o lado lúdico da infância e o lado íntegro da vida adulta. Por me ensinar o amor aos animais e ao ser humano. Mais que isso, por me dar a vida e, fazer dela, a melhor vida que se pode ter.

Ao meu avô materno José Luiz, por me ensinar a ter caráter, palavra e responsabilidade. Obrigada pelas broncas, elas me fizeram ser uma pessoa melhor. Seu carinho, amor e atenção nunca foram em vão.

À minha avó materna Maria José, por ser minha confidente e amiga, por estar ao meu lado, comprando minhas brigas, entendendo meus problemas e tentando amenizá-los sempre que possível. Obrigada pelo carinho.

Ao meu pai por me mostrar o valor da educação e da dignidade. Por ser peça fundamental na minha formação como profissional e principalmente como pessoa. Por me ensinar o amor à natureza e por ser meu amigo nos momentos difíceis. Obrigada por me surpreender a cada dia.

À minha avó paterna Aparecida, por me receber de braços abertos em sua vida e me acolher com tanto carinho e amor.

Ao meu namorado Thiago pelo amor e dedicação voltados à mim todos os dias de minha vida. Pela compreensão e paciência nos momentos difíceis e pelas alegrias vividas e divididas comigo. Obrigada por tudo.

Ao Nidoval e a Elaine por me assistirem e apoiarem sempre que necessário. Pelas comidas tão gostosas e pelo carinho dado.

RESUMO

Espécies invasoras são altamente eficientes na competição por recursos, tem alta capacidade reprodutiva e de dispersão, o gênero *Cichla* é exemplo dessas características. Os espécimes desse gênero são amplamente utilizados no controle de espécies exóticas com alta prolificidade, além de sua indiscutível importância na alimentação humana e na pesca esportiva. No presente trabalho foi estudada a diferenciação cromossômica e genética entre as espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* e seus prováveis híbridos naturais. Foram utilizadas técnicas citogenéticas e moleculares de PCR multiplex e PCR-RFLP com genes nucleares e mitocondriais e, posteriormente, tais marcadores foram aplicados em exemplares coletados em reservatórios dos rios Paraná e Tietê, SP. As técnicas citogenéticas foram realizadas para exemplares coletados no rio Tietê, município de Uru, enquanto que para o estabelecimento e aplicação dos marcadores moleculares foram utilizadas amostras de ambas localidades, rio Paraná (Uru) e rio Tietê (Rubineia, Pauliceia e Ilha Solteira). Os resultados citogenéticos indicam uma conservação cariotípica entre as espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti*, tais espécies apresentam número diploide de $2n=48$ cromossomos do tipo acrocêntrico, região organizadora de nucléolo localizado no par 2 e heterocromática constitutiva em regiões centroméricas. Além disso, os genes ribossomais estão localizados nos mesmos pares cromossômicos para ambas as espécies, sendo o 5S DNAr localizado no terceiro par cromossômico, em posição intersticial, e 18S DNAr corroborando com as marcações da NOR. Já nas análises moleculares, foram estabelecidas diferenças genômicas entre as espécies *C. kelberi* e *C. piquiti*, que permitiram o estabelecimento de marcadores de eficiente aplicabilidade para diferenciação das duas espécies, fato confirmado pela aplicação dos mesmos em exemplares de quatro localidades do estado de São Paulo. Além disso, tais marcadores genéticos indicam que os exemplares identificados como indivíduos híbridos entre as espécies *C. kelberi* e *C. piquiti*, são na verdade morfotipos da espécie *C. piquiti*, descartando a possibilidade de híbridos entre as espécies em estudos nas populações analisadas. Os resultados obtidos no presente estudo auxiliarão na observação, monitoramento e caracterização de populações do gênero *Cichla* em outras localidades, além de seu uso na identificação de espécimes.

ABSTRACT

Some invasive species are highly efficient in resource competition, have high reproductive capacity and dispersal, the genus *Cichla* exemplifies these characteristics. The specimens of this genus are widely used to control exotic species with high prolificacy, beyond its undeniable importance in food and sport fishing. In the present study, the chromosomal and genetic differentiation between species *Cichla kelberi* and *Cichla piquiti* and its likely natural hybrids. We used cytogenetic techniques and molecular markers PCR multiplex and PCR-RFLP with nuclear and mitochondrial genes and, subsequently, the markers were applied to specimens collected in rivers Parana and Tiete in São Paulo. The cytogenetic techniques were performed for samples collected from the river Tiete, Uru city, while for the establishment and application of molecular markers were used samples of both cities, river Parana (Uru) and river Tiete (Rubineia, Pauliceia e Ilha Solteira). The cytogenetic results indicate a karyotype conservation between species *Cichla piquiti* and *Cichla kelberi* such species have diploid number of $2n=48$ chromosomes acrocentric type, located nucleolus organizer regions in the pair 2 and constitutive heterochromatic centromeric regions. Furthermore, ribosomal genes are located on the same chromosome pairs for both species, but the 5S rDNA located on the third chromosome pair in interstitial position, and 18S rDNA corroborating markings NOR. Already in the molecular analysis, genomic differences were established between the species *C. kelberi* and *C. piquiti*, which allowed the establishment of efficient applicability markers for differentiation of the two species and in different populations, a fact confirmed by applying the same samples from four locations in the state of São Paulo. Furthermore, such genetic markers indicate that the samples identified as hybrid individuals of the species *C. kelberi* and *C. piquiti* are actually morphotypes of the species *C. piquiti*, ruling out the possibility of hybrids between species in the study populations. The results obtained in this study will aid in observing, monitoring and characterization of the genus *Cichla* populations elsewhere, beyond its use in the identification of specimens. Therefore, the results will be conclusive for studies of ecological character allowing a later species management.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Características biológicas dos ciclídeos	1
1.2 Estudos citogenéticos nos ciclídeos	5
1.3 Estudos genético-moleculares nos ciclídeos	8
1.4 Objetivos	11
2 MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 Materiais	12
2.2 Métodos	14
2.2.1 <i>Análises citogenéticas</i>	14
2.2.1.1 <i>Preparação de cultura de linfócitos</i>	14
2.2.1.2 <i>Estimulação de mitoses</i>	15
2.2.1.3 <i>Preparações cromossômicas diretas</i>	15
2.2.1.4 <i>Técnicas de bandamento cromossômico</i>	16
2.2.1.4.1 <i>Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NOR)</i>	17
2.2.1.4.2 <i>Caracterização da heterocromatina constitutiva (bandamento C)</i>	17
2.2.1.4.3 <i>FISH</i>	18
2.2.1.5 <i>Estudos cariotípicos</i>	20
2.2.1.6 <i>Montagem dos cariótipos</i>	21
2.2.2 <i>Análises genético-moleculares</i>	21
2.2.2.1 <i>Extração de DNA</i>	21
2.2.2.2 <i>Amplificação dos genes mitocondriais e nucleares</i>	23
2.2.2.3 <i>Limpeza dos produtos amplificados por PCR</i>	25

2.2.2.4 Sequenciamento dos genes nucleares e mitocondriais	25
2.2.2.5 PCR multiplex	27
2.2.2.6 PCR-RFLP	28
3 RESULTADOS	30
3.1 Capítulo 1	31
3.2 Capítulo 2	39
3.3 Capítulo 3	48
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
5 REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características biológicas dos ciclídeos

De acordo com Lewinsohn e Prado (2002), o Brasil possui uma das mais diversas biotas do planeta, sendo os peixes os vertebrados mais diversificados e os de maior variação genética conhecida (Torres et al. 2004). Devido a esta ampla diversidade biológica, estudos genéticos de peixes são de extrema importância, uma vez que o grupo está na base da evolução dos vertebrados superiores, desta forma, compreender sua história evolutiva é entender a evolução de todos os vertebrados, inclusive de nossa própria espécie (Helfman et al. 2009).

Segundo Nelson (2006) existem cerca de 28.000 espécies de peixes descritas sendo que 40% habita as águas quentes dos oceanos tropicais. A ictiofauna dulcícola sul-americana é ainda mais rica e diversificada, segundo Vari e Weitzman (1990) ela reúne cerca de 66 famílias e centenas de gêneros.

As espécies de *Cichla* pertencem à classe Actinopterygii, um dos maiores táxons dentre os vertebrados, o qual é considerado monofilético (Nelson 2006). Esta classe comporta peixes com nadadeiras radiadas (Santos et al. 1994) e por tal razão são denominados Actinopterygii (do grego aktis, raio + pteryx, nadadeira ou asa). O gênero *Cichla* é classificado como pertencente à ordem Perciforme, a maior ordem dentre os vertebrados, com 20 subordens, mais de 1.500 gêneros e cerca de 10.000 espécies, sendo em sua maioria, peixes costeiros, embora mais de 2.000 espécies ocorram em geral em águas continentais e mais de 2.300 espécies passem pelo menos parte de sua vida nestes ambientes (Nelson 2006). Tal gênero pertence à

família Cichlidae, considerada a família de peixes não-ostariophysi de água doce com maior número de espécies do mundo, cerca de 1.500 (Kullander 2003).

A família Cichlidae é comumente encontrada na região amazônica e, segundo Winemiller (2001), é mais amplamente distribuída em bacias hidrográficas da América do Sul. Contudo, Genner et al. (2007) afirma que sua distribuição geográfica estende-se pela América Latina, África, Madagascar, sul da Índia e Oriente Médio. Esta ampla distribuição, sobretudo, nos grandes lagos africanos tem feito com que a família sirva de modelo para estudo evolutivos (Kocher 2004; Genner et al. 2007) e, sendo assim, muitas espécies tem recebido grande atenção da comunidade científica devido sua ampla utilização em aquiculturas tropicais e subtropicais (Pullin 1991).

O gênero *Cichla*, segundo Stiassny (1987), é alvo de opiniões taxonômicas distintas devido suas semelhanças morfológicas. As espécies do gênero *Cichla* são conhecidas popularmente por diversos nomes, como tucunaré no Brasil, pávon na Venezuela, toekoenali no Suriname e lukanani nas Guianas (Kullander 2003). Possuem significativo valor comercial em razão de sua importância como fonte de alimento além de sua procura na pesca esportiva, sobretudo no continente americano (Kullander e Ferreira 2006). Embora o gênero seja encontrado em diverso habitats, desde córregos até grandes reservatórios, a grande maioria habita locais com elevada transparência da água, altas temperaturas e com acesso a ambientes lênticos tanto para sua alimentação quanto para reprodução (Winemiller et al. 2001).

Tal gênero compreende o maior grupo de ciclídeos de hábito alimentar piscívoro sul-americano (Kullander e Ferreira 2006), porém Arcifa e Meschiatti (1993) inferem que *Cichla ocellaris* possui hábitos alimentares mais amplos incluindo

crustáceos e insetos, variando de acordo com a proporção de tamanho do indivíduo em relação ao tamanho da presa, assim indivíduos menores que 8 cm apresentam uma dieta basicamente insetívora independentemente da época do ano, mas peixe é o principal alimento dos indivíduos adultos. Sua alimentação é feita a partir do meio para as camadas superiores da coluna de água ou em zonas litorais rasas (Pouilly et al. 2003). Não apresentam época reprodutiva bem definida, mas reproduzem-se em geral durante os meses quentes. Possuem desova parcelada e cuidados parentais, tais como construção de ninhos, incubação de ovos e proteção da prole (Nelson 2006).

As espécies de *Cichla* apresentam domínio sobre muitas espécies em ambiente lântico, segundo Tavares-Dias et al. (2008), um maior conteúdo de hemoglobina em algumas espécies de *Cichla* resulta em uma maior atividade metabólica o que, subsequentemente reflete em uma capacidade adaptativa para sobreviver em ambientes com flutuações sazonais dos níveis de oxigênio. Zaret (1980) propõem, ainda, que tal adaptação deve-se ao sucesso na exploração e uso destes ambientes, tais como o uso das nadadeiras em movimentos precisos para oxigenação da água e, assim formação de um constante fluxo hídrico sobre os ovos à eclodir, além da incubação oral de jovens desenvolvidos ou em nidificação, garantindo proteção à prole contra a predação.

Independente das explicações para este sucesso adaptativos dos tucunarés à ambientes lânticos, o que é incontestável é que o homem notou sua importância e os introduziu em diversas bacias hidrográficas brasileiras sobretudo, de acordo com Santos et al. (2006), para o controle de espécies exóticas com alta prolificidade e, em muitas destas introduções tornaram-se a espécie mais abundante (Petrere Júnior

1996). Segundo Barros (2004), o tucunaré foi introduzido no rio São Francisco em 1977 com mais quatro espécies, porém somente em 1989 foram registradas as primeiras pescas de *Cichla ocellaris* no reservatório de Itaparica construído neste mesmo rio. Treze anos depois, essa espécie corresponde ao segundo pescado mais capturado do reservatório, representando 22% do total de pescados. Outro estudo, realizado por Santos et al. (1994) na bacia do rio Paraná constatou que o tucunaré *Cichla* sp. dominava a ictiofauna em reservatórios da região.

Kullander e Ferreira (2006) afirmam ainda que pelo menos duas espécies do gênero *Cichla* foram introduzidas de 1986 à 2006 nos reservatórios do rio Grande, rio Tietê e rio Paranaíba. Dado confirmado por Carvalho et al. (2009), que ao analisar dois marcadores mitocondriais (16S e Região Controle) nas espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* Kullander e Ferreira, 2006 constatou que houve translocação dessas espécies para diversos reservatórios do sudeste do Brasil. Estudos como esses revelam a dominância de habitat dos tucunarés provavelmente devido à sua voracidade, prolificidade além de sua indiscutível adaptação à ambientes lênticos.

No presente estudo, foram estudadas as espécies *Cichla kelberi* (tucunaré amarelo) e *Cichla piquiti* (tucunaré azul), que possuem área original de ocorrência nas drenagens do rio Araguaia e Tocantins (Kullander e Ferreira 2006). A espécie *Cichla kelberi*, até revisão proposta por Kullander e Ferreira (2006) era identificada erroneamente como *Cichla ocellaris* ou *Cichla monoculus* devido suas semelhanças morfológicas, porém o fato de tais semelhanças tornarem a identificação complexa faz com que tal problemática ainda seja considerada (Santos et al. 2011). Já a espécie *Cichla piquiti*, possui área original de ocorrência na bacia Amazônica e foi

introduzida no Pantanal em meados de 1982, como consequência do escape de piscicultura no alto rio Piquiri.

1.2 Estudos citogenéticos nos ciclídeos

Thompson (1979) e Kornfield (1984) foram os primeiros autores a descreverem o cariótipo dos ciclídeos neotropicais. A família Cichlidae possui 400 espécies descritas (Nelson 2006) contudo, apenas 135 espécies tem número cromossômico determinado (Valente et al. 2012) o que salienta a escassez de estudos para os mesmos. Sendo esta uma família interessante para estudos evolutivos ideais para testes de diversidade morfológica, devido a sua ampla distribuição e enorme plasticidade morfológica (Albertson e Kocher 2006) uma enorme gama de novos estudos citogenéticos se faz interessante.

Em revisão bibliográfica desenvolvida por Feldberg et al. (2003) os autores também salientam esta escassez de informação no entanto, fornecem um interessante dado citogenético: a evolução cariotípica da família Cichlidae seguiria variações cromossômicas de $2n=32$ a $2n=60$, onde ciclídeos indianos e malgaxes apresentariam $2n=46-48$, africanos $2n=44$ e neotropicais $2n=48$. Para o gênero *Cichla* os autores analisaram cinco das quinze espécies válidas e concluíram que estes apresentam um cariótipo conservado de 48 cromossomos em espécies neotropicais, com presença de cromossomos subtelocêntricos/acrocêntricos. Estudos sob um enfoque citogenético mostraram que a fórmula cariotípica de $2n=48$ do tipo subtelocêntricos/acrocêntricos é uma característica conservadas entre os Perciformes, como observado em diversos estudos (Feldberg et al. 1999; Molina e

Galleti 2002; Nirchio et al. 2007; Accioly e Molina 2008; Kushwaha et al. 2011; Motta Neto et al. 2011; Accioly et al. 2012; Merlo et al. 2012).

Dentro da família Cichlidae foram realizados ainda estudos com relação ao mapeamento físico de famílias multigênicas (Martins et al. 2011; Gross et al. 2009; Poletto et al. 2010). Poletto et al. (2010), por exemplo, realizaram um estudo sobre a evolução cariotípica na família Cichlidae envolvendo espécies asiáticas, africanas e sul-americanas que evidenciaram uma extensiva variação cariotípica dentro da família de $2n=32$ a 60 cromossomos, como proposto anteriormente por Feldberg et al. (2003). O mapeamento cromossômico com o gene DNA ribossômico (DNAr) 18S em 26 representantes da família Cichlidae revelaram uma variação numérica entre as espécies, variando de dois a seis *clusters* nos indivíduos estudados, tal variação não segue a diversidade cromossômica encontrada para a família (Poletto et al. 2010).

Estudos relacionados a sequências repetitivas não codificantes, do tipo satélite e elementos transponíveis também foram realizados no genoma das espécies da família Cichlidae (Teixeira et al. 2009; Gross et al. 2010; Ferreira et al. 2010; Valente et al. 2011), tais estudos evidenciam uma grande concentração dessas sequências em regiões de heterocromatina na maioria dos ciclídeos, mostrando que essas podem ter um papel estrutural no genoma dessas espécies.

Uma característica citogenética importante encontrada para o gênero *Cichla* é a presença de cromossomos supranumerários. Segundo Camacho et al. (2000), cromossomos supranumerários ou cromossomos B são dispensáveis, desta forma, não são necessários para ciclo de vida normal do hospedeiro. Possuem origem intraespecífica a partir de cromossomos A ou interespecificamente como resultado

de cruzamentos entre espécies e segundo Feldberg et al. (2004) a presença de cromossomos supranumerários podem estar relacionadas com rearranjos ou quebras cromossômicas ou ainda mutações causadas por metais pesados como o mercúrio, composto utilizado na mineração que pode afetar o fuso mitótico das células. Segundo Camacho (2005), estes cromossomos são compostos principalmente por sequências de DNA repetitivo, sobretudo DNA satélite, DNA ribossômico e elementos móvel. Existem ainda, de acordo com Graphodatsky et al. (2005), casos de genes codificadores de proteínas presentes em cromossomos B.

Logo, nota-se, que diversos trabalhos apresentam características e funções para os cromossomos B, porém nem sempre as características estabelecidas para estes cromossomos estão presentes em todos os B analisados (Kasahara 2009). Mesmo assim, diversos estudos observam a presença de cromossomos supranumerários em peixes (Lui et al. 2009; Poletto et al. 2010; Fantinatti et al. 2011; Blanco et al. 2012; Machado et al. 2012) inclusive em espécies do gênero *Cichla*, onde foi relatada a presença de cromossomo B nas espécies *Cichla monoculus*, *Cichla* sp. e *Crenicichla reticulata*, as três espécies estudadas apresentaram o cariótipo padrão ao gênero ($2n=48$), porém observou-se a adição de 1 à 3 microcromossomos B heterocromáticos (Feldberg et al. 2004)

Outro enfoque bastante estudado no gênero *Cichla* é a hibridação natural entre as espécies desse gênero, Brinn et al. (2004) identificou hibridação no gênero *Cichla* através de análises morfológicas e citogenéticas. As espécies *Cichla monoculus* e *Cichla temensis* apresentaram duas linhagens híbridas, sendo uma morfológicamente mais próxima de *Cichla monoculus* e outra mais próxima à *Cichla temensis*, além disso, parte destes híbridos apresentaram marcações de NOR no 2°

par (semelhança com *Cichla monoculus*) e outra parte no 3° par (semelhança com *Cichla temensis*), esses dados foram confirmados com o uso de marcadores moleculares e corroboram os dados propostos por Alves (1998).

1.3 Estudos genético-moleculares nos ciclídeos

O uso de marcadores moleculares para a detecção e descrição da diversidade biológica teve início na década de 60, anteriormente os marcadores utilizados em estudos de genética eram feitos apenas com fenótipos (Ferreira e Grattapaglia 1998). Posteriormente passaram a ser desenvolvidos métodos mais apurados para o estudo e análise da estrutura molecular de proteínas e de ácidos nucleicos, proporcionando avanço nas metodologias de pesquisa, biotecnologia molecular e bioinformática (Moritz e Hillis 1996).

Várias técnicas aplicadas à estudos sobre a ictiologia, segundo a biologia molecular, baseiam-se na detecção da variabilidade de material genético, como as análises de regiões microssatélites, minissatélites e a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), que são utilizadas para diversos fins, tais como identificação de espécies, identificação de populações, detecção de variabilidade genética de populações naturais ou cultivadas, verificação de relações filogenéticas entre espécies, entre outras aplicações (Rosenfield et al. 2000; Perdices et al. 2005). A utilização de marcadores microssatélites pode ainda, como citado por Lima et al. (2010), responder questões de conservação e manejo de espécies, além de auxiliar em estudos de diversidade e estruturas genéticas.

Para os estudos de identificação de espécies, a técnica de PCR-RFLP vem crescendo consideravelmente, devido ao seu alto valor informativo, resultados eficazes e precisos na identificação de espécies de peixes (El-Serafy et al. 2003; Perdices et al. 2005; Cheng-Hong et al. 2010; Chien-Hung et al. 2012; Berbes et al. 2012). No entanto, outra metodologia que vem ganhando espaço quando o objetivo é identificação de espécies é o PCR multiplex, segundo Macedo et al. (2007) trata-se de uma técnica rápida, eficiente e de baixo custo, que aplica diferentes *primers* em uma mesma reação. Recentes trabalhos vem utilizando a técnica para o desenvolvimento de marcadores moleculares para a identificação de espécies (Seddon 2005; Mukherjee et al. 2007; Assis et al. 2008; Poroca et al. 2009; Mendonça et al. 2010; De-Franco et al. 2012), inclusive de grupos de peixe com importância econômica (Trotta et al. 2005; De-Franco et al. 2010; Mendonça et al. 2009; Farrell et al. 2009; Hashimoto et al. 2010; Mendonça et al. 2010; Prado et al. 2011; Gomes et al. 2012; Hashimoto et al. 2012).

Em estudo realizado por Hashimoto et al. (2012), por exemplo, foram detectados, retrocruzamentos, ou seja, cruzamento entre *Pseudoplatystoma corruscans*, *P. Reticulatum* e seus respectivos híbridos, através das técnicas de PCR multiplex e PCR-RFLP. Os autores observaram em um mesmo indivíduo um padrão eletroforético de híbrido para os dois genes nucleares testados e, um padrão eletroforético igual a cada um dos parentais para diferentes genes mitocondriais.

Estudo prévio dos marcadores são necessários para se obter uma resposta a mais às perguntas do trabalho. O DNA mitocondrial (DNAMt), por exemplo, é utilizado em estudos evolutivos de animais, para fornecer ideias sobre a estrutura populacional e fluxo gênico, biogeografia, relações filogenéticas e hibridação (Moritz

et al. 1987). Devido à grande quantidade de mitocôndrias presentes nas células de herança maternal, o DNA dessas organelas se torna uma poderosa ferramenta em diversos estudos, entretanto, segundo Scribner et al. (2001) se utilizado como o único marcador, não diferencia espécimes parentais de híbridos, já que o híbrido sempre apresentará o mesmo padrão do parental materno, mas quando utilizada em conjunto com marcadores genéticos do DNA nuclear (DNAn) pode estabelecer a origem do cruzamento do híbrido analisado.

Sendo assim, uma vez estabelecidas às questões do estudo e as respostas que podem ser dadas pelos marcadores, nota-se a utilidade dos mesmos como ferramenta nestes estudos, podendo ser utilizados desde a diferenciação e identificação de espécies parentais e produtos híbridos interespecíficos naturais e/ou artificiais até a resolução de problemáticas taxonômicas. Como decorrente com as espécies do gênero *Cichla* onde eram descritas cinco espécies para gênero porém era reconhecido, diversas vezes, que existiam mais espécies, uma vez que tanto a pesca esportiva quanto a aquariofilia observava indivíduos com caracteres diferentes das cinco espécies descritas anteriormente

1.4 Objetivos

Considerando que os estudos genéticos sobre peixes do gênero *Cichla* ainda são escassos, o presente projeto teve como objetivos principais:

- 1) Caracterizar com a utilização de marcadores citogenéticos e moleculares, as espécies *Cichla kelberi* (tucunaré amarelo) e *Cichla piquiti* (tucunaré azul)
- 2) Desenvolver marcadores genético-moleculares do tipo PCR multiplex e PCR-RFLP que permita a identificação espécie específico de *Cichla kelberi* (tucunaré amarelo) e *Cichla piquiti* (tucunaré azul);
- 3) Monitorar exemplares coletados em estoques da natureza, com a utilização de marcadores moleculares, das espécies *Cichla kelberi* (tucunaré amarelo), *Cichla piquiti* (tucunaré azul) e o tucunaré *Cichla* sp. (tucunaré “carijó”).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Foram coletados exemplares das espécies *Cichla kelberi* (tucunaré amarelo) e *Cichla piquiti* (tucunaré azul) (Figura 1). Em algumas localidades foi possível observar a presença de indivíduos com características morfológicas parciais entre as duas espécies mencionadas acima, conhecidos popularmente como “carijó”, tais espécimes são consideradas, segundo os pescadores locais, possíveis híbridos de ambas as espécies.

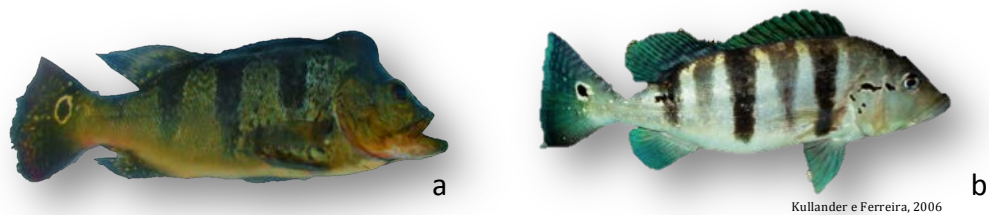


Figura 1. Espécimes coletados no rio Tietê, Uru-SP. *Cichla kelberi* (a) e *Cichla piquiti* (b).

Foram coletados um total de 125 tecidos em reservatórios do rio Paraná e rio Tietê. Sendo que no rio Paraná, foram amostrados os municípios de Rubinéia-SP, Pauliceia-SP e Ilha Solteira-SP e no rio Tietê, foi amostrado o município de Uru-SP (Figura 2 e Tabela 1). A identificação das espécies foi realizada por observação morfológica e de padrões de coloração de cada espécime.

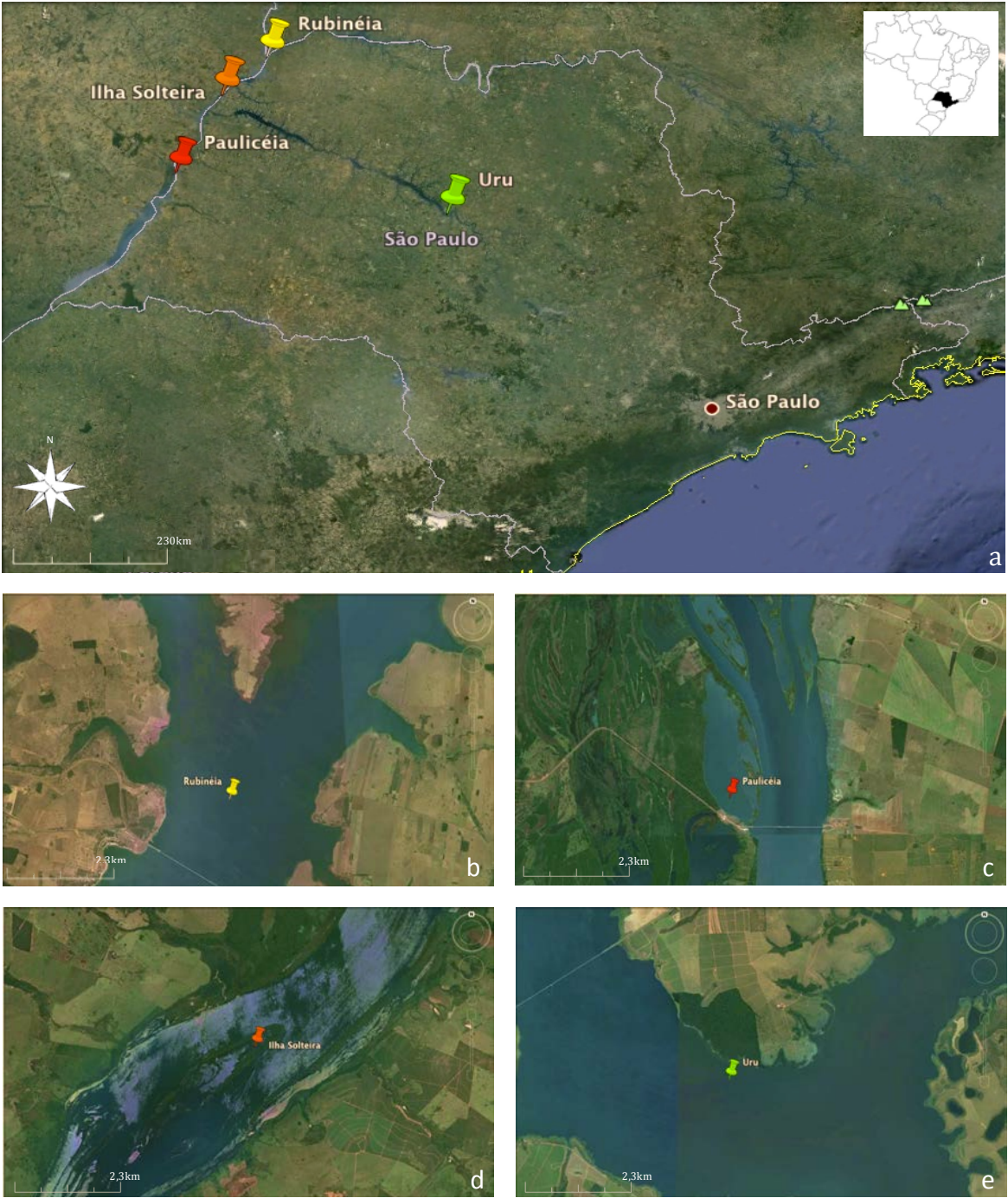


Figura 2. Locais de coleta. Estado de São Paulo (a): Ilha Solteira (b) Uru (c) Rubinéia (d) Pauliceia (e).

Tabela 1. Locais de coleta e número de espécimes coletados.

Local de coleta	<i>Cichla kelberi</i>	<i>Cichla piquiti</i>	“Carijó”	Não identificados
Ilha Solteira-SP	22	31	3	5
Uru-SP	14	2	-	-
Rubineia-SP	11	29	1	-
Pauliceia-SP	-	7	-	-
Total	47	69	4	5

2.2 Métodos

2.2.1 *Análises citogenéticas*

Para as análises citogenéticas das amostras, foram empregados os métodos de preparação de cultura com linfócitos, estimulação de mitoses (Lozano et al. 1988; Oliveira et al. 1988) seguida de preparações diretas de células renais (Foresti et al. 1993), coloração por Giemsa, coloração de regiões organizadoras de nucléolo (NOR) com nitrato de prata (Howell e Black 1980), caracterização dos padrões de bandamento C, com identificação de regiões com heterocromatina constitutiva (Sumner 1972) e hibridação in situ com sondas fluorescentes DNAr 18S e 5S (Porto-Foresti et al. 2002).

2.2.1.1 *Preparação de cultura de linfócitos*

Foi realizada a preparação conforme descrito:

- 1) anestesiar os exemplares
- 2) retirar de 2 a 3ml de amostra sanguínea da região caudal (limpa com álcool iodado)
- 3) transferir para seringas com 0,2ml de heparina
- 4) agitar para a completa mistura (heparinização)
- 5) manter o sangue em repouso em local fresco e escuro
- 6) retirar os linfócitos para a preparação da cultura
- 7) manter os meios de cultura em estufa à 27°C
- 8) acrescentar os linfócitos aos meios de cultura

- 9) descartar o soro e as hemácias
- 10) manter a solução em estufa à 27°C por 72h
- 11) adicionar 13µl de colchicina à 0,0125%
- 12) agitar por 15 minutos e transferir a solução para um tubo de centrifuga
- 13) hipotonizar e fixar a solução segundo as técnicas de rotina.

2.2.1.2 Estimulação de mitoses

Os animais que sobreviveram à viagem até o Laboratório de Genética de Peixes foram estimulados com uma injeção de solução de fermento biológico, tal técnica é utilizada a fim de obter-se um maior número de mitoses (Oliveira et al. 1988; Lozano et al. 1988).

Foi preparada a solução:

- 0,5g de fermento biológico (Fleischmann)
- 0,5g de açúcar
- 7ml de água destilada

Esta foi incubada em banho-maria à 40°C por 20 minutos e injetada na porção dorsolateral do peixe, na proporção de 1ml por 100g de peso do animal o animal foi então mantido em aquário areado de 24-48h.

2.2.1.3 Preparações cromossômicas diretas

Para os animais estimulados foi realizada a técnica (Foresti et al. 1993):

- 1) retirar os rins e/ou brânquias dos animais com mais de 5cm
- 2) dissociá-los em placa de petri contendo 7ml de meio de cultura RPMI
- 3) adicionar 12µl de solução de colchicina a 0,0125% por 10 minutos
- 4) transferir a solução obtida para um tubo de microcentrífuga
- 5) centrifugar por 7 minutos e descartar o sobrenadante
- 6) colocar 7ml da solução hipotônica e misturar
- 7) levar à estufa à 37°C por 21 minutos
- 8) acrescentar 7 gotas de fixador (metanol 90ml e ácido acético 10ml)
- 9) misturar e deixar descansar por 5 minutos
- 10) adicionar 7ml de fixador e pipetar
- 11) centrifugar por 10 minutos e descartar o sobrenadante
- 12) acrescentar 7ml de fixador e pipetar
- 13) centrifugar por 7 minutos e descartar o sobrenadante
- 14) acrescentar 7ml de fixador e pipetar
- 15) centrifugar por 7 minutos e descartar o sobrenadante
- 16) acrescentar uma pequena quantidade de fixador
- 17) pingar a solução em lâminas limpas.

2.2.1.4 *Técnicas de bandamento cromossômico*

Para melhor caracterização dos cromossomos, foram empregadas diferentes técnicas citogenéticas, todas disponíveis no laboratório.

2.2.1.4.1 *Detecção das regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NOR)*

Foi preparada a solução:

- Solução A (solução coloidal reveladora): 1g de gelatina dissolvida em 50ml de água destilada e 0,5ml de ácido fórmico
- Solução B (solução de nitrato de prata): 1g de AgNO_3 dissolvida em 2ml de água destilada.

E foi empregada a técnica de coloração por prata (Howell e Black 1980):

- 1) hidrolisar as lâminas por 3 minutos em HCl 1N à 60°C
- 2) secar as lâminas e pingar uma gota de solução A e duas gotas de solução B e cobrir com uma lamínula
- 3) colocar as lâminas em banho-maria à 60°C, assim que modificaram sua coloração para marrom dourado lavar a lâmina em água destilada
- 4) retirar a lamínula e deixar secar
- 5) corar a lâmina com Giemsa na proporção 1:30 em tampão fosfato (pH 6,7) por aproximadamente 10 segundos e deixar secar

2.2.1.4.2 Caracterização da heterocromatina constitutiva (bandamento C)

Para a caracterização da heterocromatina constitutiva foi empregada a técnica descrita por Sumner (1972), com algumas modificações:

- 1) hidrolisar as lâminas por 30 minutos em HCl 0,2N em temperatura ambiente e posteriormente lavá-las com água destilada

- 2) passar por uma solução de BaOH₂ a 5% por cerca de 7 segundos e posteriormente lavar com água destilada
- 3) banhar em HCl 1N à 60°C e lavar novamente com água destilada
- 4) incubar por 20 minutos em 2xSSC (pH 6,8) a 60°C e lavar com água destilada
- 5) corar por aproximadamente 30 minutos com Giemsa a 7,5% em tampão fosfato (pH 6,7)

2.2.1.4.3 FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*)

- Obtenção das sondas:

Para realização da técnica de hibridação in situ com sondas fluorescentes foram obtidas duas sequências de DNA ribossômico (DNAr 18S e 5S). Inicialmente, foi realizada uma técnica de PCR com ambos os genes para a marcação dos mesmos com digoxigenina-dUTP (18S) e biotina-dATP (5S) pela técnica de PCR. As sondas de DNAr 18S e 5S foram obtidas com amostras de *Cichla kelberi*. Após as marcações, procedeu-se à técnica de hibridização utilizada por Porto-Foresti et al. (2002) e as lâminas foram contra coradas com DAPI.

- Hibridação:

- 1) lavar as lâminas em tampão de PBS 1x durante 5 minutos em temperatura ambiente
- 2) desidratar as lâminas em série alcoólica (70%, 85% e 100%) gelado durante 3 minutos cada (secar)

- 3) incubar as lâminas em 60µl de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37°C por 60 minutos em câmara úmida
- 4) lavar 3x por 5 minutos em 2xSSC
- 5) lavar durante 5 minutos em PBS 1x
- 6) incubar as lâminas por 10 minutos em solução de pepsina 0,005% (em 10mM HCl) à 37°C
- 7) lavar em PBS 1x durante 5 minutos a temperatura ambiente
- 8) fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 minutos a temperatura ambiente
- 9) lavar em PBS 1x por 5 minutos
- 10) desidratar as lâminas em série alcoólica (70%, 85% e 100%) gelado por 3 minutos cada (secar)
- 11) desnaturar o DNA cromossômico em Formamida 70% em 2xSSC à 70°C por 5 minutos
- 12) desidratar em série alcoólica (70%, 85% e 100%) gelado, durante 5 minutos cada
- 13) desnaturar a solução de hibridação à 100°C por 10 minutos
- 14) preparar a câmara úmida à 37°C
- 15) montar cada lâmina com 50µl de solução de hibridação com ambas as sondas (DNAr 18S e 5S), cobrir com lamínula e deixar *overnight* à 37°C
- 16) lavar 2 vezes em Formamida 15%/0,2xSSC (pH 7) à 42°C durante 10 minutos cada
- 17) lavar as lâminas 3 vezes em 0,1xSSC à 60°C por 5 minutos cada

- 18)** lavar durante 5 minutos em solução de Tween 0,5%/4xSSC em temperatura ambiente
- 19)** incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/4xSSC por 15 minutos
- 20)** lavar 2 vezes com Tween 0,5%/4xSSC em temperatura ambiente por 5 minutos
- 21)** montar um mix de anticorpos contendo 100µl NFDM + 1,5µl de avidina FITC conjugada + 1,5µl de anti digoxigenina rodamina conjugada
- 22)** incubar as lâminas com 100µl de mix de anticorpos durante 45 minutos em câmara úmida e escura à temperatura ambiente
- 23)** lavar 3 vezes com Tween 0,5%/4xSSC em temperatura ambiente por 5 minutos
- 24)** desidratar em série alcoólica (70%, 85% e 100%) por 5 minutos cada
- 25)** colocar 40µl de Vectashield com DAPI na lâminas e cobrir com lamínula
- 26)** guardar no escuro.

2.2.1.5 Estudos cariotípicos

A partir dos dados obtidos pelas análises e contagens dos cromossomos em cerca de 30 metáfases em cada indivíduo estudado, procurou-se estabelecer um número diploide modal para os exemplares de cada espécie. Assim, as melhores metáfases ou as que apresentaram uma melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos foram fotografadas em fotomicroscópio da marca OLYMPUS, modelo BX50, com objetiva de imersão de 100X. O software CAPTURE PRO foi utilizado para a captura de imagens.

2.2.1.6 Montagem dos cariótipos

Os cromossomos foram organizados no software PHOTOSHOP, inicialmente foram arranjados de acordo com seu tamanho e morfologia, sendo classificados como metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), emparelhados com seus prováveis homólogos e dispostos em ordem decrescente de tamanho para a organização final do cariótipo, conforme descrito por Levan et al. (1964).

2.2.2 Análises genético-moleculares

As amostras foram analisadas com a utilização dos métodos de extração do DNA total dos exemplares, PCR, sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares, a partir de amostras de tecido (nadadeiras). Amplificação de genes mitocondriais e nucleares, PCR multiplex e PCR-RFLP.

2.2.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo do kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega, com algumas alterações de acordo com o tecido utilizado:

- 1)** numerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1,5ml)

- 2) retirar um pequeno pedaço de tecido, o adicionar aos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos
- 3) adicionar 300µl de *Nuclei Lysis Solution* ao tecido
- 4) adicionar 2,5µl de *Proteinase K* e passar pelo vortex
- 5) colocar em banho-maria a 60 °C por aproximadamente 2h (vortexar sempre que possível)
- 6) retirar do banho-maria e deixar voltar à temperatura ambiente
- 7) adicionar 2,5µl de RNase e colocar em banho-maria à 37 °C por 30 minutos
- 8) retirar do banho-maria e deixar voltar à temperatura ambiente
- 9) adicionar 200µl de *Protein Precipitation Solution* e misturar
- 10) levar ao gelo por 5 minuto
- 11) centrifugar por 4 minutos a 13.000rpm
- 12) transferir o sobrenadante para a segunda série de tubo de microcentrífuga contendo 600µl de Isopropanol e misturar por inversão
- 13) centrifugar por 4 minutos a 13.000rpm e descartar o sobrenadante
- 14) adicionar 600µl de etanol 70% à temperatura ambiente e centrifugar por 4 minutos à 13.000rpm
- 15) descartar o sobrenadante e deixar secar em temperatura ambiente *overnight* ou em estufa por cerca de 20 minutos
- 16) adicionar 50µl de *DNA Rehydration Solution* por 12h em temperatura ambiente.

Posteriormente, a integridade das amostras de DNA foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA (0,015µL/ml) e

visualizadas em transluminador, sob luz ultravioleta (UV). Para a quantificação do DNA foram realizadas comparações diretas com o marcador padrão com peso molecular e concentração conhecidos (*Low DNA Mass Ladder* - Invitrogen). As amostras de DNA obtidas foram armazenadas no Laboratório de Genética de Peixes do Departamento de Ciências Biológicas de Bauru - UNESP, formando um banco de tecidos e de moléculas, para o processo de análises genético-moleculares posteriores.

2.2.2.2 Amplificação dos genes mitocondriais e nucleares

Após a extração de DNA, foram realizadas amplificações de genes específicos no genoma das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti*, com os genes COI-Fish1, COI-Fish2, 18S, ATPase, RAG1, ENC1 e ZIC1, a fim de isolar genes que apresentam diferenciação entre as espécies em estudos e seus possíveis híbridos. A concentração dos reagentes e as sequências dos *primers* utilizados estão descritos nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Concentração dos reagentes.

Reagente	Concentração
H ₂ O	-----
tampão da Taq polimerase + MgCl ₂	10X
dNTP	1,25mM
<i>primer</i> universal R	10μ/um
<i>primer</i> universal F	10μ/um
Taq polimerase (Invitrogen)	5U/μl
DNA genômico	10-50 ng

Tabela 3. Primers universais utilizados para amplificação dos genes mitocondriais e nucleares.

Primer	Sequência dos primers	Referência
COI-Fish1 F	5'-ACGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'	Ward et al. 2005
COI-Fish1 R	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	
COI-Fish2 F	5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3'	Ward et al. 2005
COI-Fish2 R	5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'	
18S R	5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'	White et al. 1990
18S F	5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3	
RAG1 <i>Cichla</i> F	5'-GGCTCTCTGGATGGTCTTCCT-3'	Presente estudo
RAG1 <i>Cichla</i> R	5'-ACACTTCYCCAATYTCATCCTGGA-3'	
ENC1 F	5'-CCGTCCAACGTCTYGGCAT-3'	Presente estudo
ENC1 R	5'-AGAGCCATGCCAAACCTGG-3'	
ZIC1 F	5'-GATGGGATGGGCGCCTTCA-3'	Presente estudo
ZIC1 R	5'-ACACGGAAAGGGYTTTTACC-3'	
ATPase R	5'- GTTAGTGGTCAGGGGCTTGG – 3'	Willis et al. 2010
ATPase F	5'- GGGTCYAGCATTAGCCTTT – 3'	

Com exceção dos genes ATPase (energiza o processo da contração muscular) e COI-Fish1 (*Cytochrome Oxidase Subunit I*) que foram descartados por não apresentarem banda na amplificação, todos os outros genes da Tabela 3 foram amplificados e, posteriormente utilizados para sequenciamento. Para os testes de amplificação de genes foram padronizadas as temperaturas de anelamento de *primer* e posteriormente a concentração de reagentes nas reações, no caso dos genes nucleares ENC1, ZIC1 e RAG1 foram testadas reações com volume final 25µl e temperatura de anelamento à 50 °C, como apresentaram subbandas em gel de agarose foram testadas as temperaturas 52 °C e 55 °C a fim de se obter bandas nítidas. Essa modificação de temperatura de anelamento de *primer* é uma prática comum na padronização de reação de PCR, para bandas fraca ou ausência de bandas é testada uma diminuição de temperatura de anelamento de *primer* a fim de se obter uma reação menos específica e para a presença de subbandas é testado um

aumento de temperatura a fim de se obter uma reação mais específica. Caso a padronização da reação não tenha sido possível com a modificação desta temperatura é necessária uma modificação na concentração de reagentes ou no tempo de cada etapa do programa.

Após a amplificação dos genes mitocondriais e nucleares os produtos gerados pela PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe DNA (0,015µL/ ml) e visualizadas em transiluminador, sob luz ultravioleta (UV) e fotografadas com câmera OLYMPUS, C-5060.

2.2.2.3 Limpeza dos produtos amplificados por PCR

Após a amplificação e visualização dos genes foi realizada uma limpeza dos produtos amplificados com enzima ExoSap-IT (USB corporation), responsável por destruir os nucleotídeos que não estão formando uma cadeia. Para isso foi feita uma solução de volume final 2µl sendo 1,5µl de H₂O e 0,5µl de enzima ExoSap-IT. E para a reação completa dessa solução de volume final 7µl, sendo 2µl de mix (H₂O+ExoSap-IT) e 5µl de PCR, essa reação foi colocada em um termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf), onde seguiu a programação: 37 °C/60 minutos e 80 °C/15 minutos.

2.2.2.4 Sequenciamento dos genes nucleares e mitocondriais

As espécies em estudo possuem algumas regiões consideradas de interesse, tanto no genoma nuclear quanto no genoma mitocondrial, após passarem pelo

processo de limpeza com enzima ExoSap-IT, as amostras foram sequenciadas. Foi feita uma reação de PCR de sequenciamento utilizando o kit *Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems) (Tabela 4), com as seguintes condições de amplificação, 2 minutos de desnaturação, seguida de 35 ciclos de 96 °C/30seg, 56 °C/15seg, 60 °C/4 minutos.

Tabela 4. Concentração dos reagentes.

Reagente	Concentração
H ₂ O	-
tampão do Big Dye TM	10X
Big Dye TM	1,25mM
primer universal R	10mM
primer universal F	10mM
produto da PCR	10-50ng

Após o PCR de sequenciamento, as amostras foram purificadas, seguindo o protocolo:

- 1) colocar 0,7µl de EDTA 125mM, 0,7µl de acetato 3M e 17,5µl de álcool 100% em cada tubo de microcentrífuga
- 2) deixar as amostras em local escuro por 15 minutos em temperatura ambiente
- 3) centrifugar durante 15 minutos à 13.000rpm em temperatura ambiente
- 4) descartar o sobrenadante
- 5) colocar 24,5µl de álcool 70%
- 6) centrifugar por 10 minutos à 13.000rpm em temperatura ambiente
- 7) repetir as etapas 4, 5 e 6
- 8) remover bem o sobrenadante

- 9) secar as amostras em termociclador por 2 minutos à 96°C
- 10) guardar em local escuro e fresco até o momento do sequenciamento.

Posteriormente as amostras foram aplicadas em um sequenciador automático por capilaridade ABI3130 (Perking-Elmer). As sequências resultantes foram alinhadas por parâmetro ClustalW através do software BioEdit e a divergência genética e o número de sítios polimórficos foi estimada através do software MEGA (modelo Kimura 2-parâmetros). As sequências obtidas foram utilizadas para as análises de PCR multiplex e PCR-RFLP.

2.2.2.5 PCR multiplex

As sequências dos genes obtidas foram alinhadas com programa ClustalW (Thompson et al. 1994) implementado no programa BIOEDIT e verificados os pontos de mutação entre as espécies analisadas. Foram desenhados *primers* específicos, para ambas as espécies de estudo, localizados em regiões de maior número de mutações e próximas à extremidade 3' do *primer*. Para desenhar os *primers* da reação de PCR multiplex foram seguidos modelos teóricos descritos por Rychlik et al. (1990) e Burpo (2001) e foi utilizado o programa NetPrimer disponível gratuitamente no site PREMIER Biosoft International <http://www.premierbiosoft.com/netprimer>. As sequências selecionadas possuem temperatura de anelamento e conteúdo de GC semelhantes livres de potenciais dímeros ou formação de alças intramoleculares. Foi desenhado para cada espécie um *primer* específico e um *primer* anti-senso universal.

Desta forma foram utilizados os *primers* descritos na tabela 5, sob as concentrações descritas na tabela 6.

Tabela 5. *Primers* espécie-específicos utilizados na reação de PCR multiplex.

Gene	Sequência
RAG1 Ck F	5' - AACCCCTTTTCTGAGTCCGTA - 3'
RAG1 Cp F	5' - TACATCTGCACTCTATGTGACTCA - 3'
COI Ck F	5' - ATGATCGGAGGCTTTGGAAAC - 3'
COI Cp F	5' - GGTGTGTCCTCAATCCTGGT - 3'

Tabela 6. Concentração dos reagentes.

Reagente	Concentração
H2O	-
tampão do Big DyeTM	10X
Big DyeTM	1,25mM
<i>primer</i> universal R	10mM
<i>primer</i> universal F	10mM
produto da PCR	10-50ng

Os produtos das reações de PCR multiplex foram aplicados em gel de agarose 2% SYBR[®] Safe DNA (0,015µL/ ml) e visualizados em transiluminador, sob luz UV e fotografadas com câmera OLYMPUS, C-5060.

2.2.2.6 PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

As regiões sequenciadas foram submetidas ao programa NEBcutter V2.0 (Vincze et al. 2003) onde foram obtidos mapas de restrição enzimática. Após analisados os mapas de restrição e observadas regiões de clivagem espécie-

específicas. Foram escolhidas e testadas duas enzimas para cada gene, para o gene COI as enzimas NlaIV e HphI e para o gene RAG1 BsrI e SmaI. As enzimas que apresentaram o melhor padrão eletroforético foram utilizadas na diferenciação das espécies, no caso as enzimas NlaIV e BsrI foram as enzimas escolhidas.

Foram realizadas reações com volume final de 8µL, sendo 5µL de produto da amplificação dos genes universais, 1x de tampão da enzima e 5U de enzima de restrição (10U/µL). As reações de PCR-RFLP seguiram as seguintes condições: 65°C/60 minutos e 80°C/20 minutos para BsrI e 37°C/60 minutos e 65°C/20 minutos para NlaIV. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram determinados por gel de agarose 2% corado com SYBR® Safe DNA (0,015µL/ ml), visualizados sob iluminação UV e fotografados por câmera OLYMPUS, C-5060.

3 RESULTADOS

Os resultados e a discussão dos dados obtidos na análises citogenéticas e moleculares encontram-se apresentados em forma de capítulos, referentes aos tópicos abordados. As citações bibliográficas referentes a cada capítulo estão descritas no item Referências, visando otimizar a apresentação da dissertação.

3.1 Capítulo 1 - Caracterização citogenética das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* (Teleostei:Perciformes:Cichlidae)

3.2 Capítulo 2 - Desenvolvimento de marcadores espécie-específicos para *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* (Teleostei:Perciformes:Cichlidae)

3.3 Capítulo 3 - Identificação genética das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* (Teleostei: Perciformes, Cichlidae) em reservatórios do rio Paraná e rio Tietê, SP

**Caracterização citogenética das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti*
(Teleostei:Perciformes:Cichlidae)**

Resumo

A família Cichlidae é considerada a família de peixes não-ostariophysi de água doce com maior número de espécies do mundo e com ampla distribuição geográfica. Mesmo com sua ampla distribuição notamos a escassez de informações citogenéticas para o grupo. O presente estudo teve como objetivo analisar o cariótipo das espécies, *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti*, pertencentes a família Cichlidae, utilizando técnicas de coloração convencionais, bandamentos e mapeamento de genes. Exemplares das espécies *Cichla kelberi* (tucunaré amarelo) e *Cichla piquiti* (tucunaré azul), foram coletadas no rio Tietê, município de Uru-SP. Foram empregadas técnicas citogenéticas clássicas para bandamento cromossômico, tais como: Ag-NOR e bandamento C, e técnica de hibridação in situ fluorescente com sondas de DNA ribossomal (DNAr 18S e 5S). As duas espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* apresentaram um número diploide de 48 cromossomos acrocêntricos, característica plesiomórfica dos ciclídeos neotropicais. As NORs foram localizadas em posição terminal do 2º par cromossômico em ambas as espécies, característica comum nos ciclídeos. O bandamento C revelou blocos de heterocromatina constitutiva nas regiões centroméricas de alguns cromossomos, para ambas as espécies. O gene ribossomal 18S corroboram com localização da NOR, na região terminal do 2º par cromossômico, enquanto DNAr 5S foi localizado em posição intersticial no 3º par cromossômico. O presente estudo veio à acrescentar informações pertinentes à caracterização citogenética das espécies *C. kelberi* e *C. piquiti* que apresenta ampla distribuição nas bacias hidrográficas brasileiras e que, por apresentarem descrição recente, necessitam de trabalhos que suplementem as mais diversas áreas de estudo.

Introdução

Os Perciformes compreendem a maior ordem dentro dos vertebrados, com a maior riqueza de espécie dentre os Teleostei e um grupo de dominância em águas continentais tropicais e subtropicais (Nelson 2006). Dentro da ordem Perciformes, destaca-se a família Cichlidae, considerada a família de peixes de água doce com maior número de espécies do planeta, cerca de 1.500 e com ampla distribuição geográfica (Kullander 2003).

Do ponto de vista citogenético, as espécies dessa família apresentam características basais, como vistos em trabalhos de Farias et al. (2001) e Poletto et al. (2010) que afirmam que, embora haja uma variação de $2n=32$ a 60 cromossomos nos cariótipos dos ciclídeos, o número modal em espécies sul-americanas é de 48 cromossomos e para os africanos é de 44 cromossomos. E a majoritária presença de 48 cromossomos do tipo subtelocêntricos/acrocêntricos é observada como uma característica conservada entre os Perciformes como observado em diversos estudos (Feldberg et al. 1999; Molina e Galletti 2002; Nirchio et al. 2007; Accioly e Molina 2008; Kushwaha et al. 2011; Motta Neto et al. 2011; Accioly et al. 2012; Merlo et al. 2012).

O gênero *Cichla* é composto por 15 espécies com ampla distribuição nas regiões neotropicais, tais espécies apresentam significativo valor comercial em razão de sua importância como fonte de alimento, além de sua procura na pesca esportiva, sobretudo no continente americano (Kulander e Ferreira 2006). Do ponto de vista citogenético, o gênero *Cichla* apresenta poucos estudos, estando esses restritos a apenas algumas espécies do gênero. Brinn et al. (2004), realizaram um estudo com

as espécies *Cichla monoculus*, *Cichla temensis* e o respectivo híbrido coletados na bacia amazônica, foram realizadas técnicas citogenéticas clássicas, NOR e bandamento C. Poletto et al. (2010) estudaram diversos ciclídeos entre eles *Cichla orinocensis*, *C. temensis*, *C. piquiti* e *C. kelberi* coletados em diversas localidades do Brasil e no rio Orinoco (Venezuela) onde foi realizado, dentre outras técnicas citogenéticas, um mapeamento do gene rDNA 18S. Teixeira et al. (2009) estudaram o genoma da espécie *C. kelberi* com as técnicas Giemsa, Ag-NOR e bandamento C, além da localização física dos genes rDNA 5S, rDNA 18S, Rex1, Rex3, Rex6, Tc1 e Rck. Valente et al. (2012) estudaram diversos ciclídeos inclusive *C. piquiti*, onde foram realizadas técnicas citogenéticas clássicas (Giemsa, Ag-NOR, bandamento C e cromomicina). Todos esses trabalhos indicam que as espécies do gênero *Cichla* apresentam um número diploide conservado de 48 cromossomos, concordando com o número modal para os ciclídeos sul-americanos descritos por Poletto et al. (2010), porém a fórmula cariotípica difere dos demais ciclídeos, devido a presença no cariótipo de somente cromossomos do tipo subtelocêntricos/acrocêntricos.

Com o intuito de conhecer melhor as características cariotípicas do gênero *Cichla*, o presente estudo teve como objetivo analisar o cariótipo das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* provenientes da região de Uru-SP, utilizando diferentes técnicas de coloração, bandamento e mapeamento de genes.

Materiais e Métodos

Foram coletados exemplares das espécies *Cichla kelberi* (tucunaré amarelo) e *Cichla piquiti* (tucunaré azul). As coletas foram realizadas no rio Tietê, município de

Uru-SP. A identificação das espécies foram feita através de observação da morfologia e dos padrões de coloração de cada espécime. Os espécimes foram capturados com linha, anzol e iscas naturais ou artificiais.

De alguns exemplares foi retirado de 2 a 3ml de amostra sanguínea com seringas heparinizadas, as quais foram levadas ao Laboratório de Genética de Peixes e seguidos os procedimentos padrão para a preparação da cultura com linfócitos. E para os exemplares que resistiram ao transporte foi seguida a metodologia de estimulação de mitoses e o protocolo de preparação cromossômica direta com rins, segundo Foresti et al. (1993).

Para melhor caracterização dos cromossomos, foram empregadas as técnicas citogenéticas para bandamento cromossômico: Ag-NOR (Howell e Black 1980) e bandamento C (Sumner 1972). Foi realizada ainda a técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) com duas sequências de DNA ribossômico (DNAr 18S e 5S) em uma única lâmina (double FISH) para isso o DNA foi marcado com biotina-dATP (18S) e digoxigenina-dUTP (5S) pela técnica de PCR e posteriormente e as lâminas foram contra coradas com DAPI (Porto-Foresti et al. 2002)

A partir dos dados obtidos pelas análises e contagens dos cromossomos em cerca de 30 metáfases em cada indivíduo estudado, procurou-se estabelecer um número diploide modal para os exemplares de cada espécie. Assim, as melhores metáfases ou as que apresentaram uma melhor dispersão e morfologia mais nítida dos cromossomos foram fotografadas em fotomicroscópio da marca OLYMPUS, modelo BX50, com objetiva de imersão de 100X. O software CAPTURE PRO foi utilizado para a captura de imagens.

Os cromossomos foram organizados no software PHOTOSHOP, inicialmente foram arranjados de acordo com seu tamanho e morfologia, sendo classificados segundo Levan et al. (1964).

Resultados e Discussão

As populações de *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* analisadas no presente estudo com a técnica de Giemsa apresentaram um número diploide de 48 cromossomos acrocêntricos (Figura 1), corroborando com estudos de Brinn et al. (2004) que analisaram o cariótipo das espécies *Cichla monoculus* e *Cichla temensis* e constataram que tais espécies apresentam cromossomos do tipo acrocêntricos. Porém, estudos já publicados na literatura para as espécies *C. kelberi* (Teixeira et al 2009) e *C. piquiti* (Valente et al. 2012) encontraram 48 cromossomos do tipo subtelocêntricos/acrocêntricos compondo o cariótipo dessas espécies, diferindo com apresentado no presente trabalho.

Segundo Feldberg et al. (2003), a presença de 48 cromossomos está relacionada ao padrão de distribuição da família Cichlidae, os ciclídeos africanos têm um número diploide modal de 44 cromossomos e os neotropicais apresentam um número diploide modal de 48 cromossomos, sendo que os africanos possuem uma variação de 32 a 48 cromossomos e um FN entre 44 e 88 enquanto os neotropicais possuem variação de 38 a 60 cromossomos e um FN variando de 44 a 118. Tradicionalmente, atribui-se o número diploide igual a 48 cromossomos acrocêntricos, semelhante ao encontrado no presente estudo, à uma característica plesiomórfica da subclasse Teleostei (Gold 1979; Thompson 1979; Feldberg e

Bertollo 1985), uma vez que um cariótipo composto por cromossomos acrocêntricos é o menos derivado (Feldberg et al. 2003). No entanto, estudo de Brum (1997) propõem que a fórmula $2n=48$ cromossomos acrocêntricos provavelmente tenha surgido mais tarde, durante a dispersão dos teleósteos, e que possivelmente seja um cariótipo plesiomórfico para a superordem Clupeomorpha e Euteleostei.

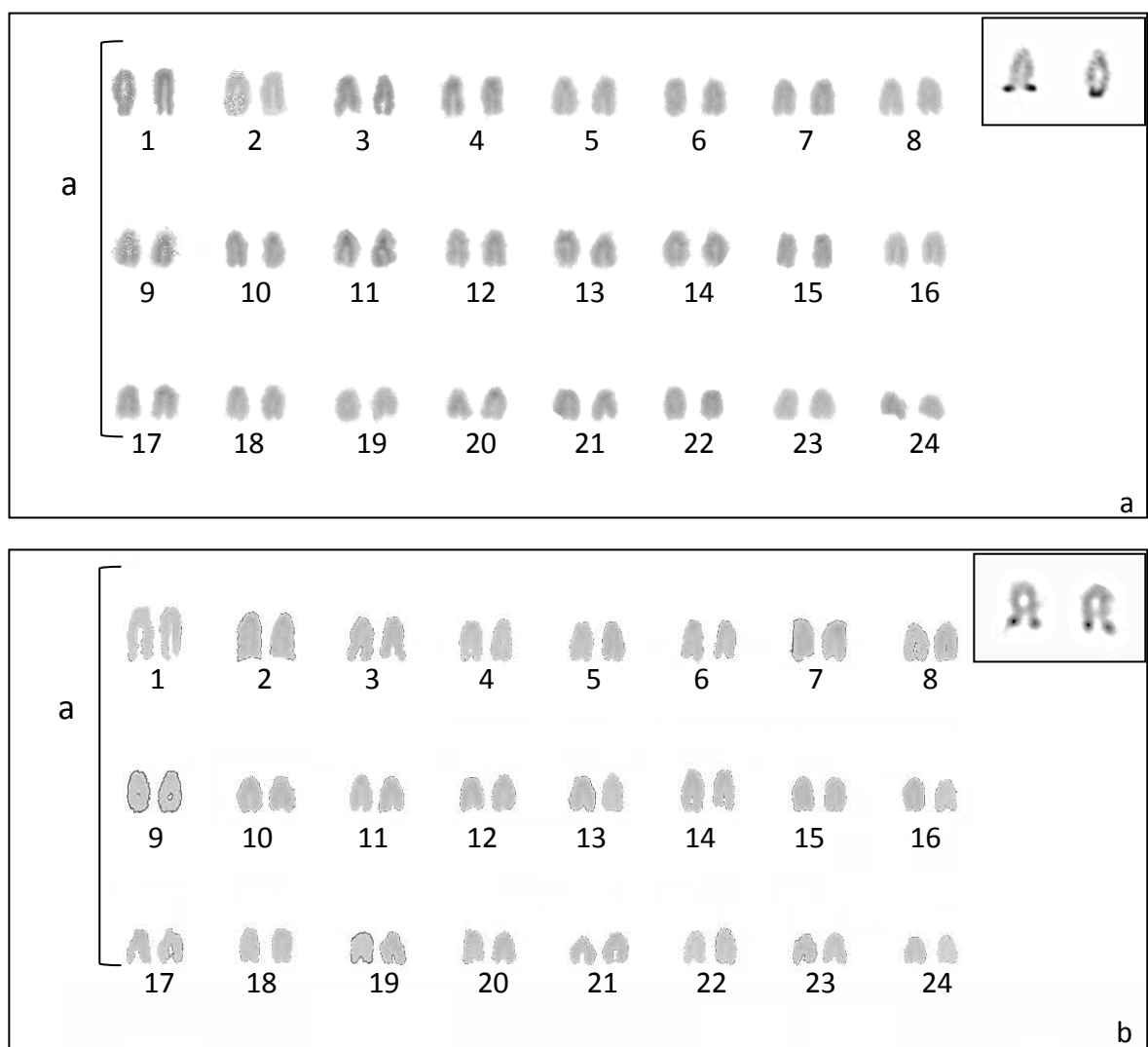


Figura 1. Cariótipo de metáfase corada com Giemsa. *Cichla kelberi* (a) *Cichla piquiti* (b). Em evidência marcação de NOR.

As regiões organizadoras de nucléolo estão localizadas em posição terminais no 2º par cromossômico em ambas as espécies estudadas (Figura 1), corroborando com o observado por Teixeira et al. (2009) onde uma única marcação de NOR em posição terminal no braço longo do 2º par cromossômico foi localizada em *Cichla kelberi* e como proposto por Valente et al. (2012) que também observam uma única marcação de NOR em posição terminal no braço longo do 2º par cromossômico na espécie *Cichla piquiti*. A posição da NOR nos cromossomos maiores parece ser uma característica comum nos ciclídeos, em estudo de Feldberg et al. (2003) é observado que, com algumas exceções, os ciclídeos são caracterizados por apresentar NOR em um único par de cromossomos maiores, indicando uma possível simplesiomorfia para a família (Feldberg e Bertollo 1985; Vicari et al. 2006; Benzaquem et al. 2008; Mazzuchelli e Martins 2009; Poletto et al. 2010; Zhu et al. 2010) .

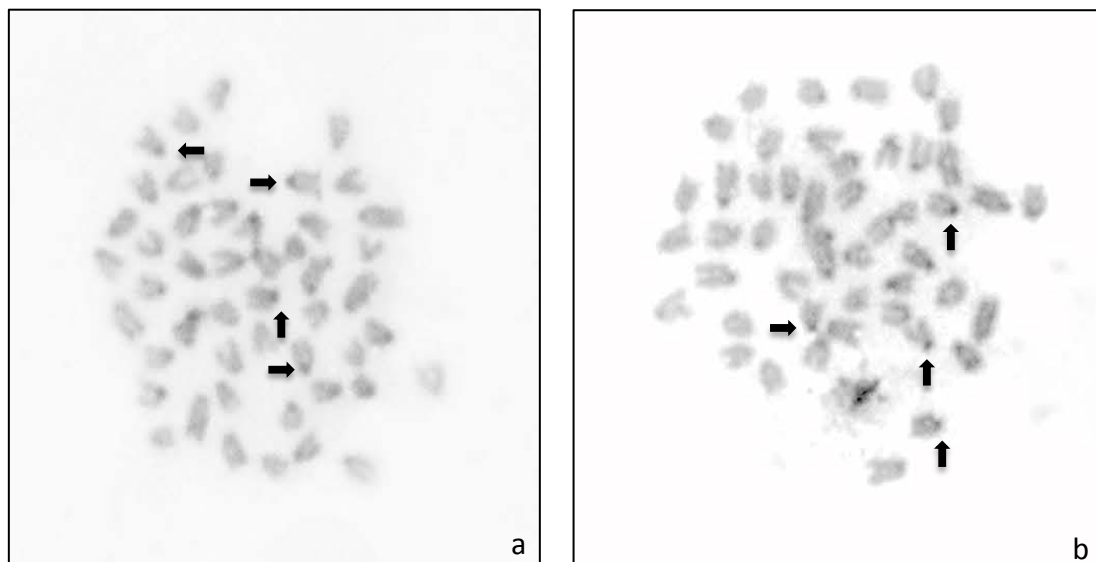


Figura 2. Metáfase com técnica de bandamento C em *Cichla kelberi* (a) *Cichla piquiti* (b).

A técnica de bandamento C, revelou blocos de heterocromatina constitutiva nas regiões centroméricas de alguns cromossomos, para ambas as espécies (Figura 2). Diversos estudos observaram este mesmo padrão para outras espécies de ciclídeos, por exemplo *Cichlasoma facetum* (Vicari et al. 2006); *Astronotus ocellatus* (Mazzuchelli e Martins 2009); *Geophagus brasiliensis* (Pires et al. 2008); *Laetacara prope dorsigera* (Martins-Santos et al. 2005); *Geophagus cf. proximus* (Rocha et al. 2013). Além de estudo proposto por Teixeira et al. (2009) que observaram este mesmo padrão de bandamento C na região centromérica dos cromossomos de *C. kelberi*.

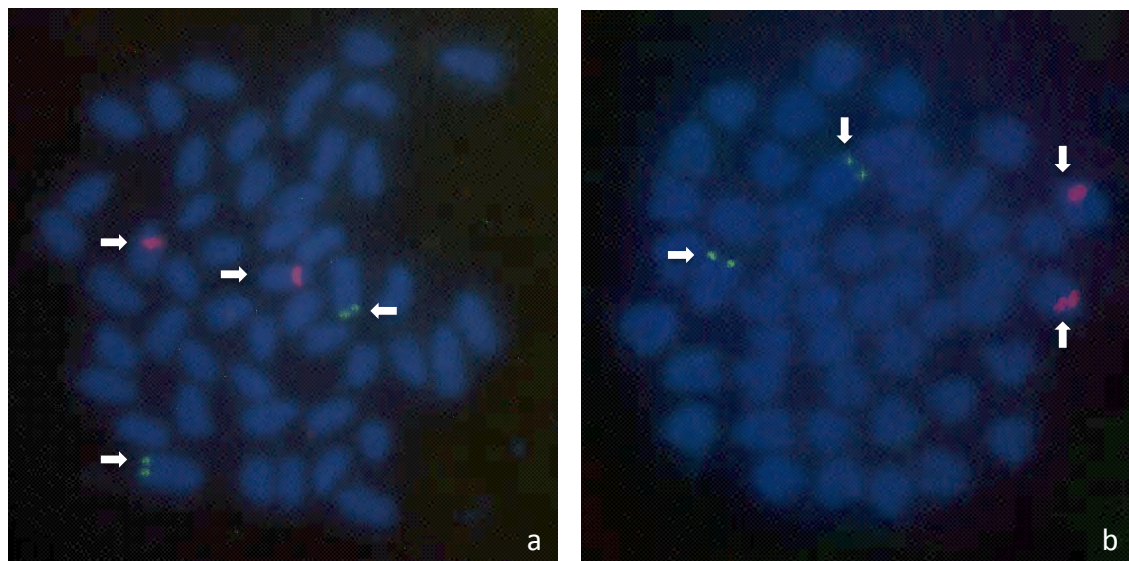


Figura 3 Metáfase com técnica de FISH (18S, verde; 5S, vermelho) de *Cichla kelberi* (a) *Cichla piquiti* (b).

Foi verificado também o mapeamento físico dos genes ribossomais 5S e 18S no genoma das espécies *C. kelberi* e *C. piquiti*. O gene 5S DNAr foi localizado em posição intersticial no 3º par cromossômico em ambas espécies. Segundo Martins e Galetti (2001), a localização cromossômica do gene 5S DNAr foi descrita em espécies

de peixes de grupos distintos e, em sua maioria, posicionam-se na região intersticial dos cromossomos, fato que sugere uma possível vantagem relacionada com a organização destes genes no genoma, enquanto que localização do gene 18S DNAr corroboram dos resultados encontrados para a região da NOR, apresentando-se na região telomérica do 2º par cromossômico, como já proposto para *Cichla kelberi* em estudo de Teixeira et al. (2009).

Os dados apresentados no presente trabalho acrescentam dados já disponível na literatura para a família Cichlidae, bem como para o gênero *Cichla*, aumentando assim o conhecimento a respeito dos cromossomos dessa família que possuem ampla distribuição nas bacias hidrográficas brasileiras e que, por apresentarem descrição recente, necessitam de trabalhos que suplementem as mais diversas áreas de estudo.

Desenvolvimento de marcadores espécie-específicos para *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* (Teleostei:Perciformes:Cichlidae)

Resumo

Espécies do gênero *Cichla*, popularmente conhecidas como tucunaré, são encontradas em todos os represamentos de água do território brasileiro devido ao sucesso adaptativo de suas introduções. Devido a possível hibridação e controversas identificações morfológicas desta espécie, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de marcadores moleculares PCR multiplex e PCR-RFLP para a identificação de *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti*. Após a extração do DNA, fragmentos de genes RAG1 e COI foram sequenciados e desenhados *primers* espécie-específicos internos a *primers* universais para a utilização da técnica de PCR multiplex, além da análise dos mapas de restrição para utilização da técnica de PCR-RFLP. Na reação de PCR multiplex, a amplificação do gene nuclear RAG1 demonstrou uma banda de aproximadamente 850pb, que correspondeu ao controle de reação, e outra banda característica de aproximadamente 140pb para *C. kelberi* e 260pb para *C. piquiti*. Já o gene mitocondrial COI apresentou fragmentos de aproximadamente 650pb, correspondendo ao controle da reação e uma banda característica de cerca de 260pb para *C. kelberi* e 500pb para *C. piquiti*. Enquanto para obtenção dos marcadores moleculares do tipo PCR-RFLP, os produtos de PCR foram digeridos por duas enzimas de restrição, uma para cada gene, gerando para o gene nuclear RAG1 uma banda controle de aproximadamente 850pb para ambas as espécies analisadas e após a digestão com a enzima BsrI bandas de aproximadamente 40pb, 150pb, 250pb e 360pb em *C. kelberi* e em *C. piquiti* bandas de aproximadamente 40pb, 150pb e 610pb. Enquanto o gene mitocondrial COI apresentou bandas controle de aproximadamente 670pb para ambas as espécies analisadas e posteriormente à clivagem da enzima NlaIV, *C. kelberi* manteve bandas de cerca de 180pb e 260pb, enquanto que *C. piquiti* demonstrou bandas de aproximadamente 120pb, 140pb e 180pb. Todos os produtos foram testados em géis de agarose e gerados perfis eletroforéticos que identificam ambas as espécies para *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti*. Tais marcadores podem ser utilizados como ferramentas no monitoramento de estoques naturais e cultivados e em estudos de conservação.

Introdução

Espécies do gênero *Cichla*, popularmente conhecida como tucunaré, são encontrados em todo o território brasileiro (Kullander 2003). Zaret (1980) confirmam o tucunaré como espécie dominante em 10% dos 71 reservatórios inventariados fora da região amazônica devido ao sucesso adaptativo em exploração e uso desses ambientes.

Ambas as espécies, *Cichla kelberi* (tucunaré amarelo) e *Cichla piquiti* (tucunaré azul), possuem área original de ocorrência nas drenagens do rio Tocantins e possuem controversa identificação, devido as suas semelhanças morfológicas, *Cichla kelberi*, por exemplo, era identificado como *Cichla ocellaris* ou *Cichla monoculus*, e *Cichla piquiti* como *Cichla* sp. (Kullander e Ferreira 2006). Outros trabalhos também analisaram estas espécies e seus possíveis híbridos (Carvalho et al. 2009; Oliveira et al. 2006).

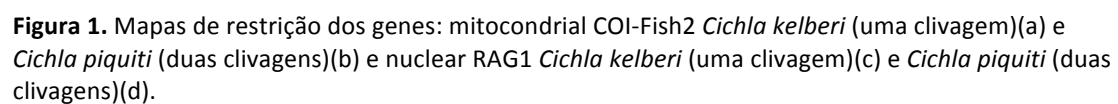
Assim, o desenvolvimento de marcadores que permitam sua identificação é de grande importância, sobretudo, devido a falta de informação sobre os produtos genéticos da hibridação (Toledo-Filho et al. 1994). E por estas espécies serem muito apreciadas na pesca esportiva e como fonte de alimento são utilizadas em vários estabelecimentos comerciais de lazer, sendo assim, os riscos de hibridação se tornam ainda maiores, especialmente pelo o despreparo dos proprietários, que permitem escapes que por sua vez interferem diretamente em ambientes naturais (Fernandes et al. 2003).

O presente estudo teve como objetivo desenvolver marcadores moleculares do tipo de PCR multiplex e PCR-RFLP para identificar as espécies de tucunarés *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti*.

Materiais e Métodos

Foi realizada uma identificação taxonômica de exemplares das duas espécies de tucunarés *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* com base na morfologia e padrões de coloração dos indivíduos. Cerca de 110 amostras foram coletadas em reservatórios do rio Paraná e do rio Tietê, ambas localizadas no Estado de São Paulo: nas regiões de Ilha Solteira (36 *Cichla kelberi*, 50 *C. piquiti*, 14 amostras não-identificados) e Uru (11 *C. kelberi* e 2 *C. piquiti*).

Em seguida, foi realizada uma extração de DNA com base no protocolo do kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Para a técnica de PCR multiplex e PCR-RFLP, utilizou-se sequências parciais do gene nuclear RAG1 (*Recombination activating 1*) e gene mitocondrial COI (*Citocromo Oxidase 1*), com os pares de *primers* universais RAG1 (*Cichla*F) e RAG1 (*Cichla*R); e Fish2 R e Fish2 F, respectivamente (Tabela 1). O DNA foi analisado num sequenciador de DNA ABI3130, usando o kit *DYEnamic Terminator Cycle Sequencing* com *primers forward* e *reverse* de cada gene.



Em seguida, foram analisados os mapas de restrição utilizando o software NEBCUTTER V2.0 (Vincze et al. 2003). Os produtos de PCR foram digeridos por duas enzimas de restrição (BsrI gene nuclear e NlaIV gene mitocondrial) em um volume final de 8µL: 5µL produto da PCR, 1X de tampão de enzima e 5U de enzima de restrição (10U/µL) (Tabela 2). Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram determinados por géis de agarose a 2% corados com SYBR® Safe DNA (0,015µL/ ml) e visualizadas em transiluminador, sob luz ultravioleta (UV) e fotografadas com câmera OLYMPUS, C-5060.

As sequências foram alinhadas usando o programa CLUSTALW (Thompson 1994), que foi implementado pelo programa BioEdit (Hall 1999). Os *primers* foram desenvolvidos utilizando o software NETPRIMER disponível no site <http://www.premierbiosoft.com/netprimerPREMIERBiosoftInternational>. Os *primers* espécie-específicos (COI CKF; RAG1 CKF para *C. kelberi* e COICp F; RAG1 CPF para *C. piquiti*) foram desenhados internos aos *primers* universais a fim de produzir fragmentos de tamanhos diferentes para cada espécie por PCR multiplex (Tabela 3). Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram determinados em géis de agarose a 2% corados com SYBR® Safe DNA (0,015µL/ ml) e visualizadas em transiluminador, sob luz ultravioleta (UV) e fotografadas com câmera OLYMPUS, C-5060.

Tabela 1. Sequências de *primers* universais.

Gene	Sequência do gene	Referencias
RAG1 (<i>Cichla</i> F)	5' - GGCTCTCTGGATGGTCTTCCT - 3'	Presente estudo
RAG1 (<i>Cichla</i> R)	5' - ACACTTCYCCAATYTCATCCTGGA - 3'	Presente estudo
Fish2 F*	5' - TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC - 3'	Ward et al. (2005)
Fish2 R*	5' - ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA - 3'	Ward et al. (2005)

Tabela 2. Condições utilizadas para a técnica de PCR-RFLP.

Enzima (gene)	Programa
Bsrl (RAG1)	65 °C / 60 minutos, 80 °C / 20 minutos
NlaIV (COI-FISH2)	37 °C / 60 minutos, 65 °C / 20 minutos

Tabela 3. Sequências de *primers* espécie-específicos.

Gene	Sequência do gene	Referencias
RAG1 Ck F	5' - AACCCCTTTCTGAGTCCGTA - 3'	Presente estudo
RAG1 Cp F	5'- TACATCTGCACTCTATGTGACTCA - 3'	Presente estudo
COI Ck F	5'- ATGATCGGAGGCTTTGGAAAC - 3'	Presente estudo
COI Cp F	5'- GGTGTGTCCTCAATCCTGGT - 3'	Presente estudo

Resultados e Discussão

Sequências parciais dos genes nuclear e mitocondrial RAG1 e COI, respectivamente, revelaram algumas diferenças na composição de nucleotídeos entre as espécies. Os mapas de restrição obtidos a partir destas sequências foram utilizados para identificar enzimas com clivagem exclusiva para cada espécie.

A amplificação do gene nuclear RAG1 revelou fragmentos de aproximadamente 850pb (pares de bases) em ambas as espécies analisadas e depois de digeridos com a enzima Bsrl foram revelados bandas de aproximadamente 40pb, 150pb, 250pb e 360pb em *C. kelberi* enquanto que em *C. piquiti* as bandas possuíam aproximadamente 40pb, 150pb e 610pb (Figura 1a). Em relação à amplificação do gene mitocondrial COI foram observadas bandas de aproximadamente 650pb para ambas as espécies analisadas e posteriormente à clivagem da enzima NlaIV, *C.*

kelberi manteve bandas de cerca de 180pb e 260pb, enquanto que *C. piquiti* demonstrou bandas de aproximadamente 120pb, 140pb e 180pb (Figura 1b).

Na reação de PCR multiplex, a amplificação do gene nuclear RAG1 demonstrou uma banda de aproximadamente 850pb, que correspondeu ao controle de reação, e outra banda característica de aproximadamente 140pb para *C. kelberi* e 260pb para *C. piquiti* (Figura 2a). Já a técnica de PCR multiplex do gene mitocondrial COI apresentou fragmentos de aproximadamente 650pb, correspondendo ao controle da reação e uma banda característica de cerca de 260pb para *C. kelberi* e 500pb para *C. piquiti* (Figura 2b).

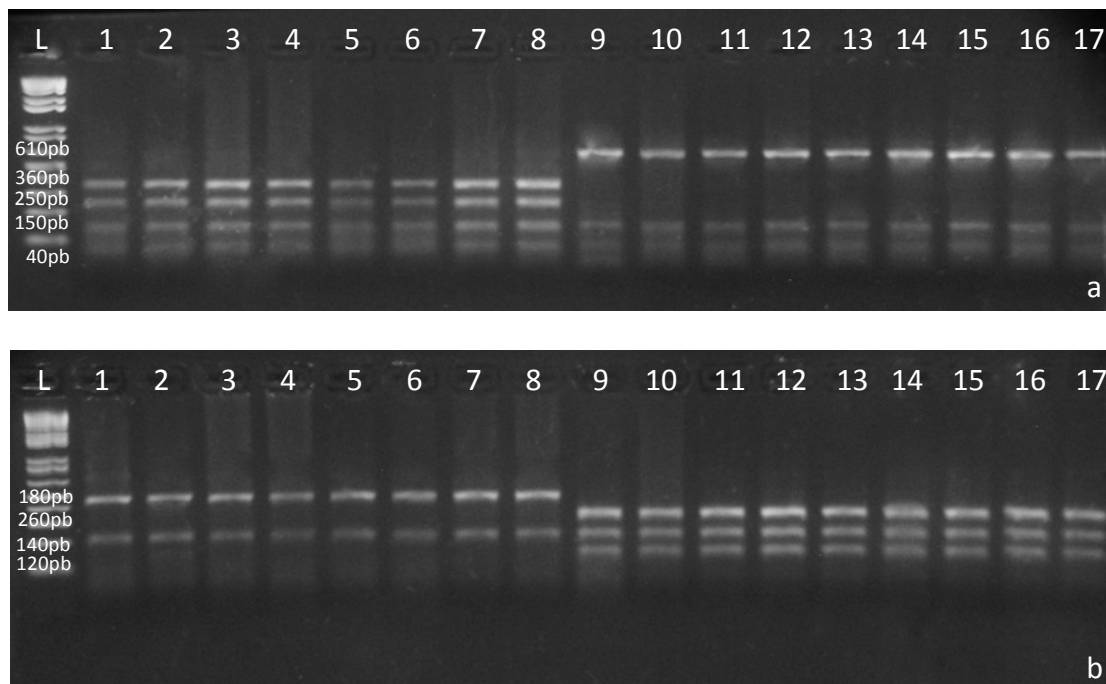


Figura 1. Padrões de PCR-RFLP para a clivagem das enzimas BsrI (a) e NlaIV (b). Linhas: 1-8, *Cichla kelberi*; 9-17, *Cichla piquiti*; L, marcador molecular de peso conhecido 1kb.

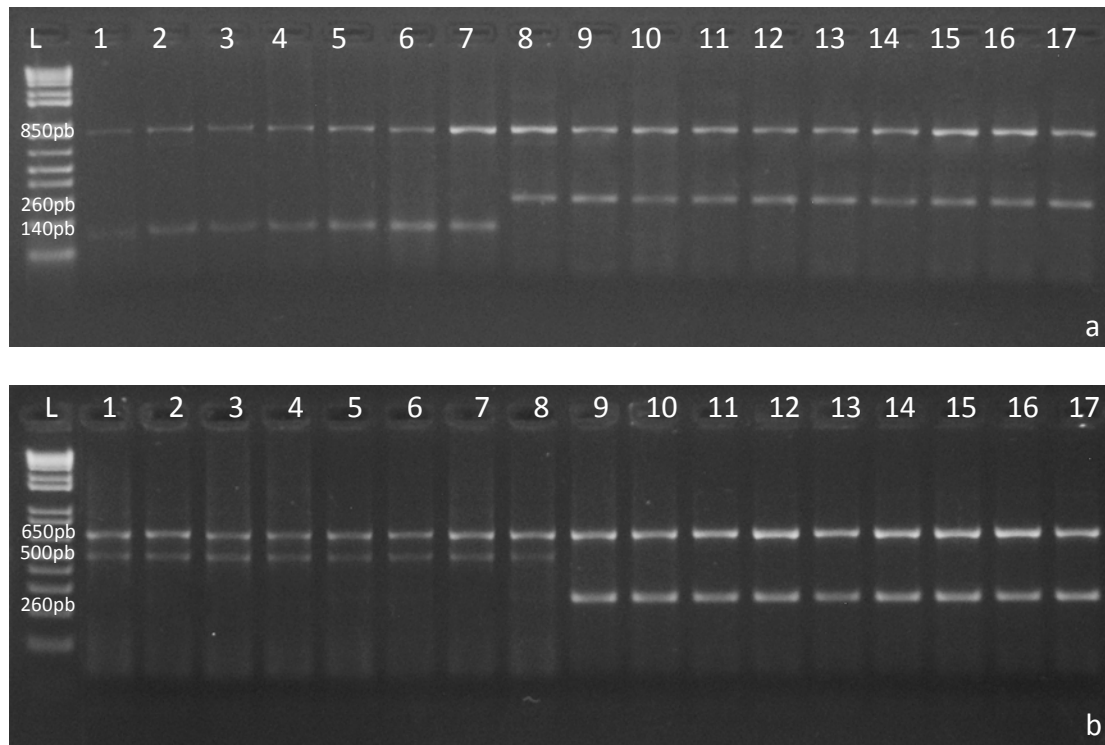


Figura 2. Padrão de PCR multiplex para o gene nuclear RAG1; Linhas: 1-7, *Cichla kelberi*; 8-17, *Cichla piquiti* (a) e gene mitocondrial COI-FISH2; Linhas: 1-8, *Cichla kelberi*; 9-17, *Cichla piquiti* (b); L, marcador de peso molecular conhecido 1Kb.

Os marcadores moleculares têm sido utilizados como um importante método para a identificação de espécies com problemas taxonômicos (Avisé 1994; Puerto et al. 2001). Outros autores descrevem a utilização desses marcadores, confirmando a eficácia da técnica de PCR-RFLP e PCR multiplex na identificação de espécies de Characiformes (Hashimoto et al. 2010), Siluriformes (Hashimoto et al. 2012; Prado et al. 2011), Carcharhiniformes (Mendonça et al. 2012; De-Franco et al. 2010), Perciformes (Trotta et al. 2005), entre outros. Logo, a problemática de identificação morfológica ocorrente em algumas espécies de *Cichla*, sobretudo por variações de coloração reveladas por efeitos sexuais secundários (Reiss et al. 2012), pode ser facilmente solucionada com o uso destes marcadores.

Identificação genética das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* (Teleostei: Perciformes, Cichlidae) em reservatórios do rio Paraná e rio Tietê, SP

Resumo

O fato das espécies invasoras serem altamente eficientes na competição por recursos, terem alta capacidade reprodutiva e de dispersão, faz com que dominem os ambientes em que são introduzidas, o que muitas vezes resulta na alteração do novo habitat em que são transpostas, modificando toda uma cadeia trófica. Dentre as espécies mais utilizadas em introduções, sobretudo na prática do “peixamento”, está o gênero *Cichla*, conhecido popularmente como tucunaré, é muito utilizado na pesca esportiva e exerce um papel importante na economia e alimentação humana. Além disso, outra questão que causa divergência de informação é a questão da hibridação interespecífica, ocorrente em diversos grupos de peixes, que teoricamente também ocorreria entre *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* gerando um híbrido conhecido pelos ribeirinhos como “carijó”. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo analisar exemplares coletados na natureza das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* e o possível híbrido “carijó”, utilizando ferramentas moleculares de identificação, PCR multiplex e PCR-RFLP, em diferentes reservatórios do rio Tietê e rio Paraná no estado de São Paulo. Foram coletados indivíduos das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* e “carijó” para a identificação genética através da utilização dos genes RAG1 e COI. Todas as amostras analisadas com a técnica de PCR multiplex apresentaram sítios mutacionais que diferenciaram *Cichla kelberi* de *Cichla piquiti*. Já para a identificação do provável híbrido, tanto para a técnica de PCR multiplex como para a técnica PCR-RFLP, o “carijó” apresentou padrão genético da espécie *C. piquiti*, demonstrando que o mesmo é um morfotipo da espécie *Cichla piquiti*. Logo, o estudo observou a eficiência dos marcadores moleculares propostos, o que permite a elaboração de um futuro projeto de avaliação do processo de introdução das espécies *C. kelberi* e *C. piquiti* fora dos locais de ocorrência.

Introdução

A introdução intencional ou acidental de espécies resulta, muitas vezes, em seu estabelecimento fora dos locais de origem (Cohen e Carlton 1995). Segundo Pivello (2011), o fato das espécies invasoras serem altamente eficientes na competição por recursos, terem alta capacidade reprodutiva e de dispersão, faz com que dominem os ambientes em que são introduzidas. Introduções geralmente ocorrem por diferentes razões mas em sua maioria deve-se à ação antrópica, dentre estas está a prática do “peixamento”, atividade comumente utilizada em décadas passadas, que consiste em introduzir espécies alóctones em diferentes bacias hidrográficas (Gollasch 2006). Esta atividade muitas vezes altera o novo habitat em toda a cadeia trófica, segundo Fuller (1999) a introdução de espécies não nativas corresponde à 35% da causa de extinção de peixes e as espécies utilizadas para a introdução, em geral, apresentam fácil adaptação aos ambientes de destino. As espécies do gênero *Cichla* são bons exemplos à adaptação à ambientes lênticos e vem se fazendo interessantes espécies de introdução em bacias hidrográficas brasileiras (Santos et al. 2006).

O gênero *Cichla* é utilizado no controle de espécies exóticas com alta prolificidade e, em muitas destas introduções tornaram-se a espécie mais abundante (Petrere Júnior 1996). Em 1967 a espécie foi introduzida no Lago Gatun localizado no Panamá e eliminou cerca de 6 a 8 espécies nativas além da depleção numérica de outras espécies de peixes, aves, zooplânctons, fitoplânctons e insetos (Delariva e Agostinho. 1999). Sendo assim, é possível avaliar as perturbações exercidas pelo gênero *Cichla* em vários níveis da cadeia trófica, controverso a isto, é indiscutível o

papel beneficiador da espécie para a economia e alimentação humana. Segundo Kullander e Ferreira (2006), seu valor comercial se dá em razão de sua importância como fonte de alimento além de sua intensa utilização na pesca esportiva por ser popularmente conhecido como um peixe “brigador”, ou seja, um peixe que oferece resistência ao ser pescado.

Estudos como esse podem revelar a dominância de habitat dos tucunarés provavelmente devido à sua voracidade, prolificidade e adaptação à ambientes lênticos, características que fazem com que a espécie se torne potencialmente invasora. Devido às problemáticas em o gênero esta envolvido, tais como a identificação errônea das espécies, tornam-se necessários estudos que proporcionem ferramentas capazes de caracterizar e identificar espécies de peixe que são cultivadas ou simplesmente que alteram ambientes naturais. E, dentre as ferramentas utilizadas neste tipo de estudo está a genética molecular.

A genética molecular oferece diversos marcadores moleculares espécie-específicos sobretudo para peixes. As técnicas de maior utilização baseiam-se na detecção da variabilidade de DNA nuclear (DNAn) e DNA mitocondrial (DNAm), dentre elas estão a técnica de PCR multiplex e PCR-RFLP. Além disso, tais marcadores proporcionam identificação de híbridos recíprocos e a detecção de eventos históricos de hibridação (Toledo-Filho et al. 1994). As análise de PCR-RFLP, segundo El-Serafy et al. (2003) e Perdices et al. (2005) têm resultado eficientemente na identificação de espécies de peixes e, recentes estudos utilizando a técnica de PCR multiplex em conjunto com tal técnica tem gerado excelentes resultados de identificação. Como observado em estudo proposto por Prado et al. (2012), onde espécies de bagres e seus respectivos híbridos foram coletados na natureza e

identificados com a utilização de ambas as técnicas. Tais ferramentas moleculares quando utilizadas em conjunto geram bons resultados devido à rapidez e baixo custo da técnica de PCR multiplex e a eficiência e praticidade da técnica de PCR-RFLP como observado por Teletchea (2009). O presente estudo teve como objetivo identificar indivíduos das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti*, bem como sua possível hibridação, em diferentes regiões do estado de São Paulo utilizando as técnicas de PCR multiplex e PCR-RFLP.

Materiais e Métodos

Foram coletados 125 indivíduos (fragmentos de nadadeira) das espécies *Cichla kelberi* (tucunaré amarelo) e *Cichla piquiti* (tucunaré azul), além dos tucunarés “carijós” em reservatórios do rio Paraná e rio Tietê, nos municípios de Ilha Solteira, Uru, Rubineia e Pauliceia, todos localizados no estado de São Paulo.

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo do kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), foi observada a integridade das amostras de DNA através de gel de eletroforese 1% corado com SYBR® Safe DNA (0,015µL/ ml) e visualizadas em transluminador, sob luz ultravioleta (UV). Foram realizadas comparações diretas com o marcador padrão com peso molecular e concentração conhecidos (*Ladder Low Mass*) para quantificação do DNA. Tais amostras foram posteriormente armazenadas no Laboratório de Genética de Peixes do Departamento de Ciências Biológicas de Bauru - UNESP, formando um banco de tecidos e de moléculas. Reações de PCR multiplex foram realizadas com condições e programas conforme descritos no Capítulo 2 dessa Dissertação.

A técnica de PCR-RFLP foi utilizada no presente estudo para confirmar os dados apresentados pela técnica de PCR multiplex, para tais análises foram realizadas amplificações dos genes universais COI-Fish2 e RAG1 e, posteriormente, foi realizada a metodologia de PCR-RFLP conforme descrito no Capítulo 2.

Ambas técnicas tiveram seus produtos aplicados em gel de agarose 2% corado com SYBR® Safe DNA (0,015µL/ ml) e visualizadas em transluminador, sob luz ultravioleta (UV).

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos nas análises genéticas mostraram que todas as amostras analisadas com a técnica de PCR multiplex apresentaram sítios mutacionais que diferenciaram *Cichla kelberi* de *Cichla piquiti*. Foi testada a identificação das espécies tanto com gene mitocondrial quanto com o nuclear, uma vez que nas análises com espécies parentais o DNA_n gera perfis eletroforéticos idênticos aos perfis gerados pelo DNA_{mt} (Scribner et al. 2001), no entanto, para análises de híbridos os padrões de bandamento seriam diferentes para o DNA_n e DNA_{mt}, uma vez que o segundo apresentará padrões idênticos ao parental materno, devido à ausência de mitocôndrias paternas passada ao embrião do momento da fertilização.

Dentre outras questões envolvidas no estudo havia a possível hibridação a ser testada devido ao fato de alguns animais, popularmente conhecidos como “carijós”, apresentarem um padrão morfológico intermediário ao das duas espécies *C. kelberi* e *C. piquiti*. Contudo, segundo as análises genéticas, tanto para a técnica de PCR multiplex como para a técnica PCR-RFLP, os espécimes chamados de “carijó”,

apresentaram padrão genético idênticos aos da espécie *Cichla piquiti* (tucunaré azul). A partir dos dados encontrados no presente trabalho propõem-se que o “carijó”, não trata-se de um híbrido de ambas as espécies, e sim de um morfotipo da espécie *C. piquiti*, tal conclusão está embasada, além dos dados genéticos apresentados no presente trabalhos, em estudos anteriores, como de Barlow (2000), que descreve mudanças nos padrões de coloração para diversas espécies de peixes pertencentes à família Cichlidae, característica que também ocorre em espécies do gênero *Cichla* (Winemiller 2001; Kullander e Ferreira 2006; Reiss et al. 2012). Estas mudanças podem estar associadas a comportamentos agonísticos, comportamentos de desova, de maturação e de seleção sexual (Barlow 2000), além da inibição de canibalismo relatado em *Cichla ocellaris* (Zaret 1977).

Tabela 1. Resultado das análises de PCR multiplex e PCR-RFLP.

LOCALIDADE	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	n	GENE RAG1		GENE COI		IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA
			Ck	Cp	Ck	Cp	
ILHA SOLTEIRA	<i>Cichla kelberi</i>	22	X	-	X	-	<i>Cichla kelberi</i>
	<i>Cichla piquiti</i>	31	-	X	-	X	<i>Cichla piquiti</i>
	<i>Cichla</i> sp. (carijó)	3	-	X	-	X	<i>Cichla piquiti</i>
	<i>Cichla</i> sp. (não identificado)	1	X	-	X	-	<i>Cichla kelberi</i>
	<i>Cichla</i> sp. (não identificado)	4	-	X	-	X	<i>Cichla piquiti</i>
URU	<i>Cichla kelberi</i>	14	X	-	X	-	<i>Cichla kelberi</i>
	<i>Cichla piquiti</i>	2	-	X	-	X	<i>Cichla piquiti</i>
RUBINÉIA	<i>Cichla kelberi</i>	11	X	-	X	-	<i>Cichla kelberi</i>
	<i>Cichla piquiti</i>	29	-	X	-	X	<i>Cichla piquiti</i>
	<i>Cichla</i> sp. (carijó)	1	-	X	-	X	<i>Cichla piquiti</i>
PAULÍNEA	<i>Cichla piquiti</i>	7	-	X	-	X	<i>Cichla piquiti</i>
TOTAL		125					

Ck-*Cichla kelberi*; Cp-*Cichla piquiti*.

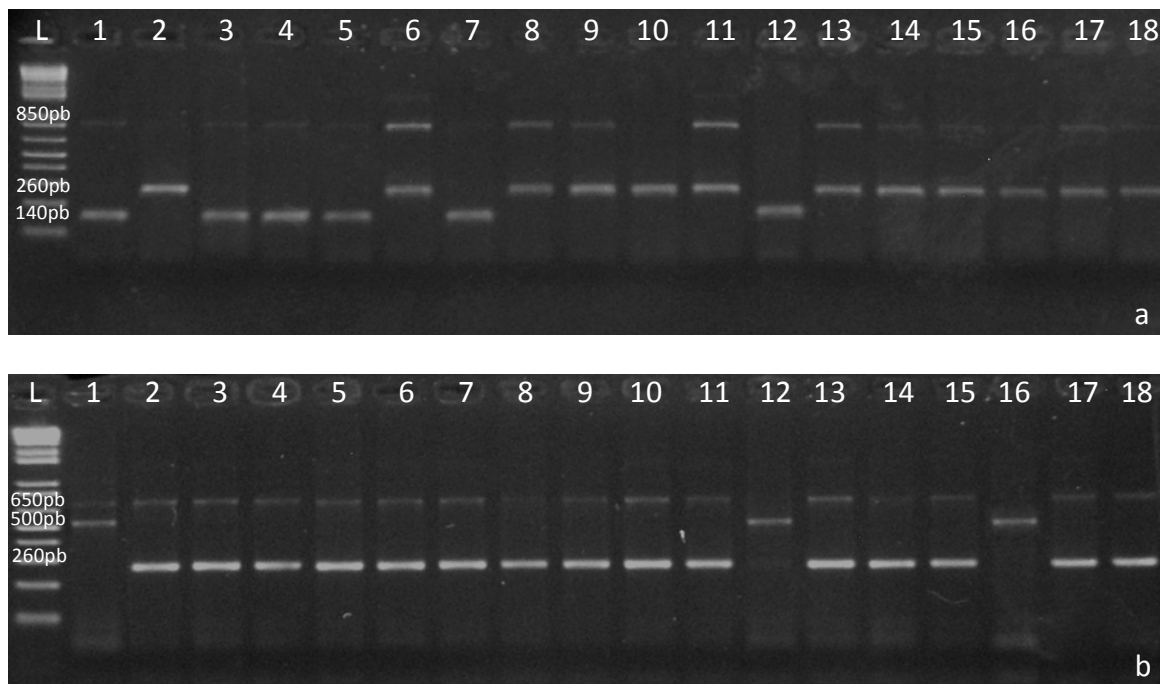


Figura 1. Resultados da aplicação dos marcadores moleculares pela técnica de PCR multiplex coletados em ambientes naturais. *Cichla kelberi*(a) *Cichla piquiti*(b).

Segundo Kullander (2003), alguns autores descrevem os "tipos" discerníveis morfologicamente como espécies distintas ou subespécies, o que resulta em um problema taxonômico. Por outro lado, algumas publicações sugerem que os resultados das variações morfológicas tratam-se de dimorfismo sexual, isto é, que as variantes mais coloridas seriam machos sexualmente maduros e as variantes mais escuras seriam fêmeas ou indivíduos imaturos (Braga 1953; Kullander e Ferreira 2006). Porém, ao observar os resultados do estudo, ambas teorias não responderiam com êxito à questão proposta, uma vez que a genética mostrou que os "carijós" possuíam padrão genético idêntico ao *C. piquiti* e, foram coletados exemplares de ambos os sexos e diferentes tamanhos.

O estudo de Reiss et al. (2012), por possuir uma problemática semelhante, traz uma hipótese alternativa de que as variantes da espécie *Cichla temensis* são uma espécie única e, através de análises observando o índice gonadosomático, foi

constatado que tais variações ocorrem de forma cíclica, tratando-se, portanto de uma característica sexual secundária, indicando o estado reprodutivo de ambos os sexos, ou seja, estimando a maturidade sexual. Ou ainda, como concluído por Val e Almeida-Val (1995), é uma adaptação fisiológica às condições ambientais variáveis, característica comumente observada em muitos peixes amazônicos.

Devido aos resultados semelhantes em ambas as regiões de estudo do trabalho de Reiss et al. (2012), é possível confirmar que as características analisadas não são fenômenos regionais para a espécie *C. temensis*. Sendo assim, a partir dos dados encontrados no presente trabalho e, as informações propostas pela literatura, podemos propor que o “carijó”, é um morfotipo da espécie *C. piquiti*. Dados como este são de grande importância, uma vez que a detecção de possíveis hibridações, sobretudo, em populações selvagens é de grande valia para o desenvolvimento de estratégias de gestão ecológica (Allendorf et al. 2001) e a confirmação de um caso de não-hibridação também vem a ser, por assim dizer, um dado de grande valia.

Outra questão observada pelas análises realizadas no presente trabalho foi a identificação molecular exata da espécie *Cichla kelberi* que até recentemente era erroneamente identificada como *Cichla ocellaris* ou *Cichla monoculus*, devido suas semelhanças morfológicas, só após revisão taxonômica proposta por Kullander e Ferreira (2006) foram separadas em três espécies distintas, porém devido a complexidade taxonômica dessas três espécies, a problemática ainda é considerada (Santos et al. 2011). Com a elaboração do presente estudo o uso desses marcadores moleculares para a identificação dessas espécies do gênero *Cichla* se torna facilmente executável, o que possui importância tanto ecológica quanto econômica.

Vários estudos vêm demonstrando a confiabilidade destes marcadores molecular para a identificação exata e o monitoramento de diferentes espécies de peixes (Magnussen et al. 2007; Apostolidis et al. 2007; Mendonça et al. 2009; Farrell et al. 2009; Mariguela et al. 2009; Hashimoto et al. 2010; De-Franco et al. 2010; Mendonça et al. 2010; Aboim et al. 2010; Prado et al. 2011; Hashimoto et al. 2012; Gomes et al. 2012; De-Franco et al. 2012; Karlsson et al. 2012; Prado et al. 2012).

Logo, o presente estudo não somente levanta a questão da existência de um morfotipo da espécie *Cichla piquiti* e a eficiência dos marcadores moleculares propostos, como também, permite a elaboração de um futuro projeto de monitoramento de identificação e avaliação do processo de introdução das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* fora dos locais de ocorrência.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a ictiofauna brasileira represente uma das mais diversas, estudos sobre sua biologia, taxonomia e genética são escassos. Desta forma, o presente estudo tem importância, haja visto que a ictiofauna constitui um valioso banco genético e há uma crescente preocupação quanto à manutenção de estoques naturais. Além disso, a identificação de espécies bem como a investigação de hibridações entre peixes sobretudo, de espécies com alta prolificidade, é de grande valia. Tendo em vista tal problemática, a utilização de marcadores moleculares para a identificação de espécies de peixes vem aumentando, tanto para observar a diversidade de espécies neotropicais, quanto para preservar unidades evolutivamente significativas para a manutenção dessa biodiversidade (Ryder 1986).

Primeiramente, observamos as características citogenéticas das espécies e, a observação do número cariotípico de ambas espécies (*Cichla kelberi* e *Cichla piquiti*), nos permitiu aumentar os dados citogenéticos para o gênero, uma vez que existem poucos estudos para as mesmas. As análises, como observado no Capítulo 1, corroboraram com o esperado para os ciclídeos já que, o número diploide de 48 cromossomos acrocêntricos ($2N=48$), parece ser característica basal para a ordem Perciformes, propondo uma possível derivação próxima às espécies marinhas (Galetti Júnior et al. 2000). Sendo assim, tal número cariotípico sugere uma manutenção de uma condição plesiomórfica do grupo. O posicionamento e o número de marcações da NOR também corroboraram com estudos anteriores (Teixeira et al. 2009; Valente et al. 2012) onde tais características apresentam-se como uma possível simplesiomorfia para a família (Feldberg e Bertollo 1985; Hsu et

al. 1975). O bandamento C também confirma estudos precedentes. Outro dado citogenético que nos fornece boas informações quanto à evolução da família é o posicionamento dos genes 5S e 18S DNAr, que se mostrou altamente conservado entre as espécies. Uma vez que o DNAr em peixes são sequências altamente repetitivas pressupõem-se que a diferenciação de tamanho ou localização das mesmas pode estar relacionada com duplicações, deleções e/ou rearranjos cromossômicos (Yogeeswaran et al. 2005). Logo, a observação de bandamentos cromossômicos, bem como a localização de genes ribossômicos pode fornecer importantes *insights* sobre a evolução do cariótipo dos Cichlidae.

Posteriormente foram observadas as características moleculares das espécies, tanto para propor sua identificação quanto para analisar a possível hibridação decorrente de um suposto cruzamento entre elas. A possibilidade de uma hibridação natural decorrente do cruzamento entre tucunaré azul e tucunaré amarelo parece ter surgido devido relatos de pescadores e população ribeirinha que vem observando um tucunaré com padrão de coloração intermediário entre ambas espécies, esta ocorrência foi então analisada por alguns autores. Oliveira et al. (2006), analisou populações de *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* do alto rio Paraná e utilizou marcadores moleculares para a aplicação da técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), com o estudo foi confirmada uma hibridação natural entre ambas as espécies gerando híbridos férteis que supostamente realizariam retrocruzamentos. Mais tarde, Almeida-Ferreira et al. (2011) analisou as mesmas populações com marcadores moleculares aplicados à técnica de SPAR (*Single Primer Amplification Reaction*) e as análises confirmaram o estudo anterior. Porém, devido à baixa confiabilidade de ambas as técnicas utilizadas pelos autores foi proposto, no

presente estudo, a identificação molecular das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* e, também, de seu possível híbrido, através de uma técnica molecular mais eficaz, que vem demonstrando excelência na aplicabilidade. Primeiramente os espécimes coletados foram identificados morfológicamente e posteriormente analisados como descrito anteriormente no Capítulo 2. A eficiência dos marcadores moleculares para a técnica de PCR-multiplex e RFLP foi confirmada, contudo os possíveis híbridos apresentaram um perfil eletroforético de *Cichla piquiti* (tucunaré azul) o que, sugere que o espécime analisado como híbrido possa ser um morfotipo do tucunaré azul. A hipótese corrobora com estudo proposto por Reiss et al. (2012) que observaram morfotipos de espécies do gênero *Cichla* que apresentam padrões morfológicos próximos uns aos outros. Além disso, com tais análises foi possível desenvolver *primers* espécie-específicos para ambas as espécies (*Cichla kelberi* e *Cichla piquiti*). Com a elaboração dos marcadores propostos no Capítulo 2 foi possível identificar amostras coletadas em diferentes localidades do estado de São Paulo, o que demonstra a aplicabilidade e eficiência dos marcadores desenvolvidos.

Apesar da quantidade de estudo demonstrando o valor sócio-econômico da pesca esportiva (Vander Zanden et al. 2007; Jensen 2009), segundo Holley et al. (2008) algumas espécies do gênero *Cichla* ainda possuem uma pesca comercial não controlada. Sendo assim, esforços de regulamentação da pesca esportiva e da pesca comercial são necessárias. Sendo assim, os marcadores poderão ser amplamente utilizados para a identificação destas espécies em outros estudos de importância ecológica e/ou econômica.

Desta forma, o presente estudo não somente levanta a questão da existência de um morfotipo da espécie *Cichla piquiti* e a eficiência dos marcadores moleculares

propostos, como também, permite a elaboração de um futuro projeto de monitoramento de identificação e avaliação do processo de introdução das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* fora dos locais de ocorrência, ou mesmo estudos que proponham o levantamento de espécies do gênero *Cichla* em outras bacias hidrográficas.

5 REFERÊNCIAS

- Aboim, M.A.; Mavarez, J.; Bernatchez, L. e Coelho, M.M. 2010. Introgressive hybridization between two Iberian endemic cyprinid fish: a comparison between two independent hybrid zones. **J. Evol. Biol.** 23:817–828.
- Accioly, I.V. e Molina, W.F. 2008. Cytogenetic studies in Brazilian marine Sciaenidae and Sparidae fishes (Perciformes). **Genet Mol Res.** 7:358– 370.
- Accioly, I.V.; Bertollo, L.A.C.; Costa, G.W.W.F.; Jacobina, U.P. e Molina, W.F. 2012. Chromosomal population structuring in carangids (Perciformes) between the north-eastern and south-eastern coasts of Brazil. **African Journal of Marine Science.** 34(3):383-389.
- Albertson, R.C. e Kocher, T.D. 2006. Genetic and Development Basis of Cichlid Trophic Diversity. **Heredity** 97:211-221.
- Allendorf, F.W.; Leary, R.F., Spruell, P. e Wenburg, J.K. 2001. The problem with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in Ecology e Evolution.** 16(11):613- 622.
- Alves, M.N. 1998. **Análise citogenética da família Cichlidae: gênero *Cichla* (Schneider, 1801) Perciformes, Labroidei.** Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- Apostolidis, A.P.; Apostolou, P.K.; Georgiadis A. e Sandaltzopoulos R. 2007. Rapid identification of *Salmo trutta* lineages by multiplex PCR utilizing primers tailored to discriminate single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the mitochondrial. **Conservation Genetics.** 8(5):1025-1028.
- Arcifa, M.S. e Meschiatti, A.J. 1993. Distribution and feeding ecology of fishes in a Brazilian reservoir: Lake Monte Alegre. **Interciencia.** 18(6):83-87.
- Assis, R.A.; Lobato, F.C.F.; Lobato, Z.I.P.; Camargos, M.F.; Nascimento, R.A.P.; Vargas, A.P.C.; Salvarani, F.M. e Uzal F.A. 2008. PCR multiplex para identificação de isolados de *Clostridium chauvoei* e *Clostridium septicum*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 60(2):294-298.
- Avise, J.C. 1994. **Molecular Markers, Natural History and Evolution.** New York, Chapman and Hall.

- Barlow, G.W. 2000. **The cichlid fishes: nature's grand experiment in evolution.** Cambridge. Perseus Books. 352.
- Barros, A.C. 2004. **Evolução de fatores hidrobiológicos no reservatório de Itaparica, rio São Francisco (1987, 1989, 2002).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- Benzaquem, D.C.; Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Gross, M.C.; Zuanon, J.A.S. 2008. Cytotaxonomy and karyoevolution of the genus *Crenicichla* (Perciformes, Cichlidae). **Genet Mol Biol.** 31:250–255.
- Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Traldi, J.B. e Moreira-Filho O. 2012. Chromosomal Characterization of Armored Catfish *Harttia longipinna* (Siluriformes, Loricariidae): First Report of B Chromosomes in the Genus. **Zoological Science.** 29(9):604-609.
- Braga, R. 1953. Crescimento de tucunaré pinima, *Cichla temensis* (Humboldt) em cativeiro (Actinopterygii: Cichlidae). **Dusenía.** IV:41-47.
- Brinn, M.N.A.; Porto, J.I.R. e Feldberg, E. 2004. Karyological evidence for interspecific hybridization between *Cichla monoculus* and *Cichla temensis* (Perciformes, Cichlidae) in the Amazon. **Hereditas.** 141:252-257.
- Brum, M.J.I.; Galetti, P.Jr. 1997. Teleostei ground plan karyotype. **J Comp Biol.** 2:91-102.
- Camacho, J.P.M.; Sharbel, T.F.; Beukeboom, L.W. 2000. **B-chromosome evolution.** Phil Trans. R. Soc. Lond. B. 355:163–178
- Camacho, J.P.M. 2004. B chromosomes in the eukaryote genome. **Cytogenet Genome Res.** 106:147–148.
- Carvalho, D.C.; Oliveira, D.A.A.; Santos, J.E.; Teske, P.; Beheregaray, L.B.; Schneider, H. e Sampaio, I. 2009. Genetic characterization of native and introduced populations of the neotropical cichlid genus *Cichla* in Brazil. **Genetics and Molecular Biology.** 32(3):601-607.
- Cheng-Hong, H.; Wen-Teish, C.; Hebron, C.C.; Hung-Sheng, H.; Yun-Lung, C. e Deng-Fwu, H. 2010. Puffer fish-based commercial fraud identification in a segment of cytochrome b region by PCR–RFLP analysis. **Food Chemistry.** 121(4):1305-1311.
- Chien-Hung, C.; Cheng-Hong, H. e Deng-Fwu, H. 2012. Species identification of Cyprinidae fish in Taiwan by FINS and PCR–RFLP. **Food Control.** 28(2):240-245

- Cohen, A.N. e Carlton, J.T. 1995. **Biological study: non-indigenous aquatic species in a United States estuary: a case study of the biological invasions of the San Francisco Bay and Delta**. US Fisheries and Wildlife and National Sea Grant College. USA.
- De-Franco, B.; Mendonça, F.F.; Hashimoto, D.T.; Porto-Foresti, F.; Oliveira, F.C. e Foresti, F. 2010. Forensic identification of the guitarfish species *Rhinobatos horkelli*, *R. percellens* and *Zapteryx brevirostris* using multiplex-PCR. **Molecular Ecology Resources**. 10:197–199.
- De-Franco, B.; Mendonça, F.F.; Oliveira, F.C. e Foresti, F. 2012. Illegal trade of the guitarfish *Rhinobatos horkelii* on the coasts of central and southern Brazil: genetic identification to aid conservation. **Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst**. 22:272–276.
- Delariva, R.L. e Agostinho, A.A. 1999. Introdução de espécies: uma síntese comentada. **Acta Scientiarum**. 21(2):255-262.
- El-Serafy, S.S.; Awwad, M.H.; Abdel-Hamde, N.A.H. e Azab M.S. 2003. Restriction fragment length polymorphism's (RFLPs) of the small subunit ribosomal DNA as a tool for identification of *Tilapia* spp. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**. 4:465-482.
- Fantinatti, B.E.A.; Mazzuchelli, J.; Valente, G.T.; Cabral-de-Mello, D.C. e Martins, C. 2011. Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. **Genetica**. 139:1273–1282.
- Farias, I.P.; Ortí, G.; Sampaio, I.; Schneider, H. e Meyer, A. 2001. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. **Journal of Molecular Evolution**. 53:89-103.
- Farrell, E.D. e Mariani, S. 2009. Marine Biodiversity, Ecology and Evolution. University College Dublin. Ireland.
- Feldberg, E. e Bertollo, L.A.C. 1985. Karyotypes of 10 species of Neotropical Cichlids (Pisces, Perciformes). **Caryologia**. 38:257-268.
- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Santos, E.P. e Valentim, F.C. 1999. Cytogenetic studies of two freshwater sciaenids of the genus *Plagioscion* (Perciformes, Scianidae) from the Central Amazon. **Genetics and Molecular Biology**. 22:351-356.

- Feldberg, E.; Porto, J.I.R. e Bertollo, L.A.C. 2003. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. **In:** Val, A.L. e Kapoor, B.G. (Eds) *Fish Adaptations*. Science Publishers Inc. New Delhi. 285–30.
- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Alves-Brinn, M.N.; Mendonça, M.N.C. e Benzaquem, D.C. 2004. B-chromosomes in Amazonian cichlid species. **Cytogenet. Genome Res.** 106:195–198.
- Fernandes, R.; Gomes, L.C. e Agostinho A.A. 2003. Pesque-pague: negócio ou fonte de dispersão de espécies exóticas? **Acta Scientiarum: Biological Sciences.** 25(1):115-120.
- Ferreira, I.A.; Poletto, A.B.; Kocher, T.D.; Mota-Velasco, J.C.; Penman, D.J. e Martins, C. 2010. Chromosome evolution in African cichlid fish: contributions from the physical mapping of repeated DNAs. **Cytogenet Genome Res.** 129:314–322.
- Ferreira, M.E. e Grattapaglia, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa-Cenargen. Brasília. 3:15-16.
- Foresti, F.; Oliveira, C. e Almeida-Toledo, L.F. 1993. A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. **Experientia.** 49:810-813.
- Fuller, P.L.; Nico, L.G. e Williams, J.D. 1999. Nonindigenous Fishes Introduced into Inland Waters of the United States. **American Fisheries Society.** Special Publication 27:613.
- Genner, M.; Seehausen, O.; Lunt, D.; Joyce, D.; Shaw, P.; Carvalho, G. e Turner, G. 2007. Age of cichlids: new dates for ancient lake fish radiations. **Mol. Biol. Evol.** 24:1269-1282.
- Gold, J.R. 1979. Cytogenetics. **In:** Fish physiology, 8. W. S. Hoar, D. J. Randall and J. R. Brett (eds.). Academic Press. New York. 353-405.
- Gollasch; S. 2006. Overview on introduced aquatic species in European navigational and adjacent waters. **Helgol Mar Res.** 60(2):84-89.
- Gomes, F.; Schneider, H.; Barros, C.; Sampaio, D.; Hashimoto, D. T.; Porto-Foresti, F. e Sampaio, I. 2012. Innovative molecular approach to the identification of *Colossoma macropomum* and its hybrids. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences.** 84(2):517-525.

- Graphodatsky, A.S.; Kukekova, A.V.; Yudkin, D.V. 2005. The proto-oncogene C-KIT maps to canid B chromosomes. **Chromosome Res.** 13:113–122.
- Gross M.C., Feldberg F., Cella D.M., Schneider M.C., Schneider C.H., Porto J.I.R. e Martins C. 2009. Intriguing evidence of translocations in Discus fish (*Symphysodon*, Cichlidae) and report of the largest meiotic chromosomal chain observed in vertebrates. **Heredity.** 102:435-441.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Porto, J.I.R.; Martins, C. e Feldberg E. 2010. Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): Chromosomal Characteristics of Retrotransposons and Minor Ribosomal DNA. **Cytogenet Genome Res.** 127:43–53.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp.** 41:95-98.
- Hashimoto, D.T.; Ferguson-Smith, M.A.; Rens, W.; Foresti, F. e Porto-Foresti, F. 2011. Chromosome Mapping of H1 Histone and 5S rRNA Gene Clusters in Three Species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenet Genome Res.** 134:64–71.
- Hashimoto, D.T.; Prado, F.D.; Senhorini, J.A.; Foresti, F. e Porto-Foresti, F. 2012. Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. **Aquaculture Research.** 1-9.
- Helfman, G.S.; Collette, B.B.; Facey, D.E. e Bowen, B.W. 2009. **The Diversity of Fishes: Biology, Evolution and Ecology.** 2 ed. Hong Kong, Wiley-Blackwell.
- Holley, M.H.; Maceina, M.J.; Thomé-Souza, M. e Forsberg, B.R. 2008. Analysis of the trophy sport fishery for the speckled peacock bass in the Rio Negro River, Brazil. **Fisheries Management and Ecology.** 15:93-98.
- Howell, W.M. e Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer. **In:** A 1-step method. *Experientia.* 36:1014-1015.
- Jensen, O.P.; Gilroy, D.J.; Hogan, Z.; Allen, B.C.; Hrabik, T.R.; Weidel, B.C.; Chandra, S. e Vander Zanden, M.J. 2009. Evaluating recreational fisheries for an endangered species: a case study of taimen, *Hucho taimen*, in Mongolia. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.** 66:1707-1718.
- Karlsson, S.; Hagen, M.; Eriksen, L.; Hindar, K.; Jensen, A.J.; Leaniz, C.G.; Cotter, D.; Guðbergsson, G.; Kahilainen, K.; Guðjó nsson, S.; Romakkaniemi, A. e Ryman, N.

2012. A genetic marker for the maternal identification of Atlantic salmon 3 brown trout hybrids. **Conservation Genet Resour.**
- Kasahara, S. 2009. Introdução à Pesquisa em Citogenética de Vertebrados. Sociedade Brasileira de Genética.
- Kocher, T. 2004. Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nat. Rev. Genet.* 5:288-298.
- Kornfield, I.L. 1984. Descriptive genetics of cichlid fishes. **In:** Evolutionary Genetics Of Fishes. Turner. New York. 591-616.
- Kullander, S.O. 2003. Family Cichlidae (Cichlids) **In:** Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris, C. L. Check list of the freshwater fishes of the South and Central America. Edipucrs. Porto Alegre. 605-607.
- Kullander, S.O. e Ferreira, E.J.G. 2006. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with description of nine new species (Teleostei: Cichlidae). **Ichthyol. Explor. Freshwaters.** 17(4):289-398.
- Kushwaha, B.; Kumar, R.; Nagpure N.S., Srivastava, S.K.; Basheer, V.S.; Anill, M.K. e Lakra, W.S. 2011. Chromosomal studies of three vulnerable marine fishes from west coast of India. **Indian Journal of GeoMarine Sciences.** 40(1):62-66.
- Levan, A.; Fredga, K. e Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas.** 52:201-220.
- Lewinsohn, T.M. e Prado, P.I. 2002. Biodiversidade Brasileira. **In:** Síntese do estado atual do conhecimento. Editora Contexto.
- Lima, M.P.; Campos, T.; Sousa, A.C.B.; Souza, A.P. e Almeida-Val, V.M.F. 2010. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cichla monoculus* (Agassiz, 1831), an important freshwater fish in the Amazon. **Conservation Genetic Resour.** 2:215–218.
- Lozano, R.; Rejon, C.R. e Rejon, M.R. 1988. A method for increasing the number of mitoses available for cytogenetic analysis in rainbow trout. **Stain Technology.** 66(6).
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Margarido, V.P. e Moreira-Filho, O. 2009. First description of B chromosomes in the family Auchenipteridae, *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes) of the São Francisco River basin (MG, Brazil). **Micron.** 40(5–6):552–559.

- Macêdo, N.R.; Menezes, C.P.L.; Lage, A.P.; Ristow, L.E.; Reis, A. e Guedes R.M.C. 2007. Detection of pathogenic strains by multiplex PCR and antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* isolated from piglets. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 59(5):1117-1123.
- Machado, S.N.; Neto, M.F. Bakkalic, M.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Oliveira, C. e Foresti, F. 2012. Natural triploidy and B chromosomes in *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae): a new occurrence. **Caryologia: International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics.** 65(1):40-46.
- Magnussen, J.E.; Pikitch, E.K.; Clarke, S.C.; Nicholson, C.; Hoelzel, A.R. e Shivji, M.S. 2007. Genetic tracking of basking shark products in international trade. **Animal Conservation.** 1367-9430.
- Mariguela, T.C.; De-Franco, B.; Almeida, T.V.V.; Mendonça, F.F.; Gadig, O.B.F.; Foresti, F. e Oliveira, C. 2009. Identification of guitarfish species *Rhinobatos percellens*, *R. horkelli*, and *Zapteryx brevirostris* (Chondrichthyes) using mitochondrial genes and RFLP technique. **Conservation Genet Resour.** 1:393–396.
- Martins, C. e Galetti, P.M.Jr. 2001. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: two different genomic locations are characterized by distinct nontranscribed spacers. **Genome.** 44:903–910.
- Martins, F.D.M. 2011. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society.** 104:499–509.
- Martins-Santos, I.C.; Portela-Castro, A.L.B. e Julio Jr., H.F. 2005. Chromosomal polymorphism and speciation in *Laetacara* cf. *dorsigera* (Teleostei, Perciformes, Cichlidae) from the river Paraná, PR Brazil. **Caryologia.** 58(2):95–101.
- Mazzuchelli, J. e Martins, C. 2009. Genomic organization of repetitive DNAs. In: The cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica.* 136:461-469.
- Mendonça, F.F.; Hashimoto, D.T.; Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Gadig, O.B.F. e Foresti, F. 2009. Identification of the shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques. **Molecular Ecology Resources.** 9:771–773.

- Mendonça F.F., Hashimoto, D.T., Porto-Foresti, F.; Gadig, O.B.F.; Oliveira, C. e Foresti, F. 2010. Genetic identification of lamniform and carcharhiniform sharks using multiplex-PCR. **Conserv Genet Resour.** 1:31-35.
- Mendonça, F.F.; Ussami, L.H.F.; Hashimoto, D.T.; Pereira, L.H.G.; Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Gadig O.B.F. e Foresti F. 2012. Identification and characterization of polymorphic microsatellite loci in the blue shark *Prionace glauca* and cross-amplification in other shark species. **Journal of Fish Biology.** 80:2643–2646.
- Merlo, M.A.; Pacchiarini, T.; Portela-Bens, S.; Cross, I.; Machado, M. e Rebordinos, L. 2012. Genetic characterization of *Plectorhinchus mediterraneus* yields important clues about genome organization and evolution of multigene families. **BMC Genetics.** 13:33.
- Molina, W.F. e Galetti JR., P.M. 2002. Robertsonian rearrangements in the reef fish *Chromis* (Perciformes, Pomacentridae) involving chromosomes bearing 5S rRNA genes. **Genetics and Molecular Biology.** 25:373-377.
- Moritz, C. e Hillis, D.M. 1996. Molecular Systematics: Context and Controversies. In: Hillis, Moritz C e Mable BK (eds.). Molecular systematics. Sunderland. 51-120.
- Motta Neto, C.C.; Lima-Filho, P.A.; Araújo, W.C.; Bertollo, L.A.C. e Molina, W.F. 2012. Differentiated evolutionary pathways in Haemulidae (Perciformes): karyotype stasis versus morphological differentiation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 22(2):457-465.
- Mukherjee, N.; Mondol, S.; Andheria, A. e Ramakrishnan, U. 2007. Rapid multiplex PCR based species identification of wild tigers using non-invasive samples. **Conserv Genet.** 8:1465–1470.
- Nelson, J.S. 2006. **Fishes of the world.** John Wiley & Sons. New York. Ed 4:600.
- Nirchio, M.; Oliveira, C.; Ferreira, I. A.; Pérez, J. E.; Gaviria, J. I.; Harrison, I.; Rossi, A. R. e Sola, L. 2007. Comparative cytogenetic and allozyme analysis of *Mugil rubrioculus* and *Mugil curema* (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela. **Interciencia.** 32:757- 762.
- Oliveira, A.V.; Prioli, A.J.; Prioli, S.M.A.P; Bignotto T.S.; Júlio Jr., H.F.; Carrer, H.; Agostinho C.S. e Prioli, L.M. 2006. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. **Journal of fish biology.** 69(SupB):260–277.

- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Toledo-Filho, S.A. 1988. Supernumerary chromosomes, robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Caryologia**. 41:227-236.
- Perdices, A.; Doadrio, I. e Bermingham, E. 2005. Evolutionary history of the synbranchid eels (Teleostei: Synbranchidae) in Central America and the Caribbean Islands inferred from their molecular phylogeny. **Mol. Phylogenet. Evol.** 37:460–47.
- Petrere Jr., M. 1996. Fisheries in large tropical reservoirs in South America. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**. 2:111-133.
- Larissa, P.B.; Giuliano-Caetano, L. e Dias, A.L. 2008. Karyotype similarities among two populations of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae) from the Tibagi river basin/PR/Brazil. **Caryologia**. 61:135-138.
- Pivello, V. R. 2011. The use of fire in the cerrado and Amazonina rainforest of Brazil: past and present. **Fire Ecol**. 7:24–39.
- Poletto, A. B.; Ferreira, A. e Martins, C. 2010. The B chromossomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbor 18S rRNA gene copies. **BioMed Central Genetics**. 11:1.
- Poroca, D.R.; Lima, A.S.; Lima, J.F.A.; Cruz, H.L.A.; Montenegro, R.A.; Melo, F.L.; Shindler, H.C. e Montenegro, L.M.L. 2009. Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 42(6):716-722.
- Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Tabata, Y. A.; Rigolino, M. G. e Foresti, F. 2002. NORs inheritance analysis in crossings including individuals from two stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Hereditas**. 136:227-230.
- Pouilly, M.; Lino, F.; Bretenoux, J.G. e Rosales, C. 2003. Dietary morphological relationships in a fish assemblage of the Bolivian Amazonian floodplain. **J. Fish. Biol.** 62:1137-1158.
- Prado, F.D.; Hashimoto, D.T.; Mendonça, F.F.; Senhorini, J.A.; Foresti, F. e Porto-Foresti, F. 2011. Molecular identification of hybrids between Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Aquaculture Research**. 42:1890-1894.
- Prado, F.D.; Hashimoto, D.T.; Senhorini, J.A.; Foresti, F. e Porto-Foresti, F. 2012. Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two catfish species

- (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. **Fisheries Research**. (125–126):300–305.
- Pullin, R.S.V. 1991. Cichlids in aquaculture. In: Keenleyside MHA (Eds) Cichlid fishes: behaviour, ecology and evolution. London. 280–309.
- Puerto, G.; Salomão, M.G.; Theakston, R.D.G.; Thorpe, R.S.; Warrel, D.A.; Wuster, W. 2001. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). **Journal of Evolutionary Biology**. 14:527-538.
- Reiss, P.; Kenneth, W.; Able, Nunes, M.S. e Hrbek, T. 2012. Color pattern variation in *Cichla temensis* (Perciformes: Cichlidae): Resolution based on morphological, molecular and reproductive data. **Neotropical Ichthyology**. 10(1):59-70.
- Rocha, C.A.M.; Souza, A.C.P.; Rayol, R.S. e Ribeiro, H.F. 2013. Description of the karyotype of *Geophagus* cf. *proximus* (Perciformes, Cichlidae, Geophaginae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**. 35(1):83-87
- Rosenfield, J.A.; Todd, T. e Greil, R. 2000. Asymmetric Hybridization And Introgression Between Pink Salmon And Chinook Salmon In The Laurentian Great Lakes. **Trans. Of The Am. Fish. Soc.** 129:670-679.
- Santos, A.F.G.N. e Santos, L.N. 2011. Feeding morphology of the Neotropical piscivorous fish *Cichla kelberi* (Perciformes: Cichlidae) introduced into an oligotrophic Brazilian reservoir. **Rev. Biol. Trop.** 59(3).
- Santos, C.A. 2006. **Caracterização Cromossômica de espécies de acarás da subfamília Cichlasomatinae (Perciformes: Cichlidae) da Amazônia Central**. Tese de mestrado. INPA.
- Santos, M.; Ward, R.H. e Barrantes, R. 1994. mtDNA variation in the *Chibcha amerindian huetar* from Costa Rica. **Hum Biol.** 66:963-97.
- Scribner, K.T.; Page, K.S. e Bartron, M.L. 2001. Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. **Reviews in fish biology and fisheries**. 10:293–323.
- Seddon, J.M. 2005. Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. **Conservation Genetics**. 6:147–149

- Stiassny, M.L. 1987. Cichlid familial intrarelationships and the placement of the Neotropical genus *Cichla*. **Journal of Natural History**. 21:1311-1331.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental cell research**. 75:304-306.
- Tavares-Dias, M.; Marcon, J.L.; Lemos, J.R.G.; Fim, J.D.I.; Affonso, E.G. e Ono, E.A. 2008. Índices de condição corporal em juvenis de *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) e *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) na Amazônia. **Boletim do Instituto de Pesca**. 34:197-204.
- Teixeira, W.G. Ferreira, I.A. Cabral-de-Mello, D.C. Mazzuchelli, J. Valente, G.T. Pinhal, D. Poletto, A.B. Venere, P.C. Martins, C. 2009. Organization of Repeated DNA Elements in the Genome of the Cichlid Fish *Cichla kelberi* and Its Contributions to the Knowledge of Fish Genomes. **Cytogenet Genome Res**. 125:224–234.
- Teletchea, F. 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. **Rev Fish Biol Fisheries**. 19(3):265-293.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G. e Clustalw, G.T.J. 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting positions - Specific GAP penalties and weight matrix choice. **Nucleic. Acids Res**. 22:4673-4680.
- Thompson, K.W. 1979. Cytotaxonomy of 41 species of neotropical Cichlidae. **Copeia**. 4:679-691.
- Toledo-Filho, S.A.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Bernardino, G. e Calcagnotto, D. 1994. Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui. In: Cadernos de Ictiogenética II. São Paulo.
- Torres, R.A.; Matoso, D.A e Artoni, R.F. 2004. Neotropical Fish Genetics. II. Molecular Biology Of Neotropical Fish. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**. 10(2):27-37
- Trotta, M.; Schonhuth, S.; Pepe, T.; Cortesi, M.L.; Puyet, A. e Bautista, J.M. 2005. Multiplex PCR Method for Use in Real-Time PCR for Identification of Fish Fillets from Grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* Species) and Common Substitute Species. **J. Agric. Food Chem**. 53:2039–2045.
- Val, A.L. e Almeida-Val, V.M.F. 1995. Fishes of the Amazon and their Environment: Physiological and Biochemical Aspect. **Springer-Verlag**. 224.

- Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; Ferreira, I.A.; Poletto, A.B.; Fantinatti, B.E.A.; Martins, C. 2011. Cytogenetic Mapping of the Retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among Cichlid Fish: New Insights on the Chromosomal Distribution of Transposable Elements. **Cytogenet Genome Res.** 133:34–42.
- Valente, G.T.; Vitorino, C.A; Cabral-de-Mello, D.C.; Oliveira, C.; Souza, I.L.; Martins, C. e Venere, P.C. 2012. Comparative cytogenetics of ten species of cichlid fishes (Teleostei, Cichlidae) from the Araguaia River system, Brazil, by conventional cytogenetic methods. **Cytogenetics International Journal of Plant & Animal Cytogenetics, Karyosystematics and Molecular Systematics.** 6(2):163–181.
- Vander Zanden, M.J.; Joppa, L.N.; Allen, B.C.; Chandra, S.; Gilroy, D.; Hogan, Z.; Maxted, J.T. e Zhu J. 2007. Modeling spawning dates of *Hucho taimen* in Mongolia to establish fishery management zones. **Ecological Applications.** 17:2281-2289.
- Vari, R.P. e Weitzman, S.H. 1990. A review of the phylogenetic biogeography of the freshwater fishes of South America. In: Peters, G. & Hutterer, R. Vertebrates In The Tropic: Proceedings Of The International Symposium. Museum Alexander Koenig, Bonn. 381-393.
- Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. e Bertollo, L.A.C. 2006. Basic and Molecular Cytogenetics in Freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). **Caryologia.** 59:260-266.
- Vicari, M.R., Almeida, M.C., Bertollo, L.A.C., Moreira-Filho, O. e Artoni, R.F. 2006. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetics and Molecular Biology.** 29:621-625.
- Vincze, T.; Posfai, J. e Roberts, R.J. 2003. Nebcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic acids res.** 31:3688-3691.
- Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R. e Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transaction Royal Society.** 360:1847–1857.
- Winemiller, K.O. 2001. Ecology of peacock Cichlids (*Cichla* spp.) in Venezuela. **Journal of aquariculture and aquatic sciences.** 9:93-112.
- Zaret, T.M. 1977. Inhibition of cannibalism in *Cichla ocellaris* and hypothesis of predator mimicry among South American fishes. **Evolution.** 31:421-437.

- Zaret, T.M. 1980. Life history and growth relationships of *Cichla ocellaris*, a predatory South American cichlid. **Biotropica**. 12:144-157.
- Zhu, H.P; Lu, M.X.; Gao, F.Y.; Huang, Z.H.; Yang, L.P. e Gui, J.F. 2010. Chromosomal localization of rDNA genes and genomic organization of 5S rDNA in *Oreochromis mossambicus*, *O. urolepis hornorum* and their hybrid. **Journal of Genetics**. 89(2)