



CAMPUS CAXIAS
CURSO DE CIÊNCIAS NATURAIS LICENCIATURA

FRANCISCA KAROLINE MARINHO FERREIRA

VARIABILIDADE GENÉTICA DE TUCUNARÉS (CICHLIDAE: CICHLIFORMES)
INTRODUZIDOS EM BACIAS HIDROGRÁFICAS MARANHENSES

CAXIAS-MA

2023

FRANCISCA KAROLINE MARINHO FERREIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE TUCUNARÉS (CICHLIFORMES: CICHLIDAE)
INTRODUZIDOS EM BACIAS HIDROGRÁFICAS MARANHENSES**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Naturais
Licenciatura, Campus Caxias - UEMA como requisito para
a obtenção do grau de licenciado em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga
Coorientadores:
Prof. Msc. Marcelo Silva de Almeida
Mestranda Eline Silva Lima

CAXIAS-MA

2023

F383v Ferreira, Francisca Karoline Marinho

Variabilidade genética de tucunarés (Cichlidae: cichliformes) introduzidos em bacias hidrográficas maranhenses / Francisca Karoline Marinho Ferreira. __Caxias: Campus Caxias, 2023.

63f.

Monografia (Graduação) – Universidade Estadual do Maranhão – Campus Caxias, Curso de Licenciatura em Ciências Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga.

Orientadores: Prof. Msc. Marcelo Silva de Almeida e Eline Silva

Lima

1. Cichla. 2. Ictiofauna. 3. DNA mitocondrial. Título.

FRANCISCA KAROLINE MARINHO FERREIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE TUCUNARÉS (CICHLIFORMES:CICHLIDAE)
INTRODUZIDOS EM BACIAS HIDROGRÁFICAS MARANHENSES**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Naturais
Licenciatura, do Campus Caxias - UEMA como requisito
para a obtenção do grau de licenciado em Ciências Naturais.

Aprovado em: / /

Banca Examinadora



Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga (Orientador)

Universidade Estadual do Maranhão – UEMA/Campus Caxias



Prof^a. Me. Amanda Caroline Cardoso e Silva

Universidade Estadual do Maranhão – UEMA/Campus Lago da Pedra



Prof^a. Me. Jordânia Letícia do Nascimento Silva

Universidade Estadual do Maranhão – UEMA

Dedico a Deus por ter me dado sabedoria, força, saúde e discernimento para continuar nessa jornada acadêmica; a minha família, é meu alicerce, pois sempre esteve comigo em todos os momentos me dando apoio e incentivo ao longo desta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar meus passos e ouvir todas as minhas orações, em todos os momentos, pelo seu inexplicável amor, misericórdia e bondade, por me dá discernimento para enfrentar os obstáculos encontrados nessa caminhada, pelas conquistas que obtive em minha vida. Agradeço ainda, por colocar pessoas de bom coração que me ajudaram a concluir essa jornada acadêmica.

A todo corpo docente que contribuíram no meu crescimento acadêmico durante todo período da graduação, especialmente ao meu orientador, o professor Dr. Elmary Fraga, pela paciência, confiança e aprendizagem ao longo dessa jornada acadêmica.

A Fundação de Amparo à Pesquisa e o Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela concessão da bolsa de iniciação científica que participei no início da graduação, foi de grande importância para meu capital intelectual.

Aos meus pais, José Ferreira e Maria Helena, por sempre estarem me apoiando, dando incentivo a estudar, fazendo o possível e impossível pela minha formação, sendo meu alicerce.

A meu sobrinho, José Pedro, por sempre está preocupado, perguntando como foi minha aula, minha rotina na universidade, todos os dias quando estava indo para aula ele me desejava sorte.

Aos meus avós, Ciriaco Marinho e Maria Francisca, que sempre me motivam e acreditam em meu potencial.

Ao meu coorientador, Marcelo Almeida, que desde do início deste trabalho vem me ajudando com seu conhecimento, tendo muita paciência, mesmo com sua rotina acadêmica, ele estava sempre disponível para responder minhas dúvidas, contribuir de forma significativa na construção do meu conhecimento exposto neste trabalho

A minha coorientadora a mestrande Eline Silva Lima, pois mesmo estando com suas obrigações do mestrado, ela me ajudou na elaboração deste trabalho, com paciência, me motivando, sempre disponível para me ensinar, só tenho a agradecer contribuição dela nesse trabalho.

Quero imensamente agradecer a todos, que contribuíram para realização desse sonho, ser uma educadora, graduada pela instituição de ensino superior pública.

A todos, meu muito obrigada!

" Ninguém é tão grande que não possa aprender, nem tão pequeno que
não possa ensinar".

(Esopo)

RESUMO

O gênero *Cichla*, os tucunarés, originário da bacia amazônica, são peixes com grande importância econômica e ecológica, seja para pesca esportiva, peixamento e culinária. São predadores vorazes, apresenta-se em 16 espécies que vêm sendo introduzidos em várias bacias hidrográficas do Brasil, dentre elas as bacias maranhenses e pouco se sabe sobre essas espécies, em relação a identificação taxonômica, número de indivíduos e sua variabilidade genética. Diante disso, utilizamos os genes mitocondriais RNA ribossomal 16S (rRNA 16S) e Citocromo b (*Cyt b*) para analisar os níveis de variabilidade genética do gênero *Cichla* introduzidos nas bacias maranhenses. Os espécimes foram coletados nas bacias do Mearim e Parnaíba/MA utilizando-se apetrechos de pesca, e em seguida transportados para o Laboratório de Biologia Molecular (LABMOL) onde foram triados, etiquetados, fotografados e identificação sob auxílio de literatura específica e submetidas às técnicas de extração de DNA, amplificação dos genes rRNA 16S e *Cyt b* via PCR e sequenciamento. As sequências obtidas foram analisadas nos softwares: BioEdit, Mega X, DnaSP. Foram obtidas 23 sequências para ambos os genes, das quais, 13 do rio Flores, cinco do rio Pindaré, bacia do rio Mearim e cinco do rio Buriti, afluente da bacia do rio Parnaíba. Sequências do gênero *Cichla* provenientes do Genbank foram adicionadas, sendo 22 para o gene rRNA16S e 23 para o *Cyt b*. O fragmento de rRNA 16S apresentou valores de diversidade haplotípica (h) de 0,676 e nucleotídica (π) de 0,019, formaram-se 12 haplótipos, dentre os quais, houve a formação de um único haplótipo para os espécimes de *Cichla kelberi* dos rios maranhenses e das sequências do Genbank com uma distância genética intraespecífica de 0,0%. O gene *Cyt b* apresentou uma divergência intraespecífica que variou de 0,0 a 0,5%, com uma diversidade haplotípica (h) de 0,838 e nucleotídica (π) de 0,041, e um total de 21 haplótipos, sendo dois haplótipos para os espécimes de *C. kelberi* de bacias maranhenses e um para as sequências do Genbank. Os agrupamentos gerados pelas reconstruções filogenéticas para ambos os genes apresentaram clados fortemente sustentados, indicando concordância com a espécie *Cichla kelberi*. Os espécimes analisados pelo rRNA 16S se agruparam em um clado de forma coerente com os espécimes coletados no rio Doce e Itumbiara/MG, que são oriundos do rio Tocantins. Diante disso, é possível inferir que os espécimes de *Cichla kelberi* coletados no rio Flores, Pindaré e Buriti/MA, sejam derivados de populações do rio Tocantins. Portanto, os fragmentos dos genes rRNA 16S e *Cyt b* se mostraram uma ferramenta útil para a identificação taxonômica em nível específico, eventos recorrentes de introdução são de grande preocupação ecológica, acarretando impactos sobre a ictiofauna nativa, esses resultados podem auxiliar no rastreamento da origem dos *Cichla* nas bacias maranhenses, ajudando na análise da variabilidade genética dos estoques introduzidos.

Palavras Chaves: *Cichla*, Ictiofauna, DNA mitocondrial

ABSTRACT

The genus *Cichla*, the tucunarés, originating from the Amazon basin, are fish of great economic and ecological importance, whether for sport fishing, fish stocking or cooking. They are voracious predators, present in 16 species that have been introduced in several river basins in Brazil, among them the Maranhão basins and little is known about these species, in relation to taxonomic identification, number of individuals and their genetic variability. Therefore, we used the mitochondrial genes 16S ribosomal RNA (16S rRNA) and Cytochrome *b* (*Cyt b*) to analyze the levels of genetic variability of the genus *Cichla* introduced in the basins of Maranhão. The specimens were collected in the Mearim and Parnaíba/MA basins using fishing gear, and then transported to the Molecular Biology Laboratory (LABMOL) where they were sorted, labeled, photographed and identified using specific literature and subjected to DNA extraction techniques, amplification of 16S rRNA and *Cyt b* genes via PCR and sequencing. The obtained sequences were analyzed in the software: BioEdit, Mega X, DnaSP. 23 sequences were obtained for both genes, of which, 13 from the Flores river, five from the Pindaré river, Mearim river basin and five from the Buriti river, a tributary of the Parnaíba river basin. Sequences of the genus *Cichla* from Genbank were added to this work for analysis purposes, 22 for the rRNA16S gene and 23 for *Cyt b*. The 16S rRNA fragment showed values of haplotype diversity (h) of 0.676 and nucleotide diversity (π) of 0.019, 12 haplotypes were formed, among which, there was the formation of a single haplotype for specimens of *Cichla kelberi* from Maranhão rivers and Genbank sequences with an intraspecific genetic distance of 0.0%. The *Cyt b* gene showed an intraspecific divergence that ranged from 0.0 to 0.5%, with a haplotype diversity (h) of 0.838 and nucleotide diversity (π) of 0.041, and a total of 21 haplotypes, two haplotypes for specimens of *C. kelberi* from Maranhão basins and one for Genbank sequences. The clusters generated by phylogenetic reconstructions for both genes showed strongly supported clades, indicating agreement with the species *Cichla kelberi*. The specimens analyzed by 16S rRNA were grouped into a clade coherently with the specimens collected in the Doce and Itumbiara rivers/MG, which come from the Tocantins river. Given this, it is possible to infer that the specimens of *Cichla kelberi* collected in the Flores, Pindaré and Buriti/MA rivers are derived from populations of the Tocantins river. Therefore, fragments of the 16S rRNA and *Cyt b* genes proved to be a useful tool for taxonomic identification at a specific level, recurrent introduction events are of great ecological concern, causing impacts on the native ichthyofauna, these results can help in tracking the origin of the *Cichla* in the basins of Maranhão, helping in the analysis of the genetic variability of introduced stocks.

Keywords: *Cichla*, Ichthyofauna, Mitochondrial DNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécime de <i>Cichla kelberi</i>	15
Figura 2. Genoma mitocondrial de peixes. Em amarelo evidenciando a região do RNA ribossomal 16S (rRNA 16S) e Citocromo b (<i>Cyt b</i>)	19
Figura 3. Localização dos Rios Flores; Pindaré e Rio Buriti/MA, os pontos de coletas dos espécimes.....	23
Figura 4. Coleta dos espécimes com auxílio de redes malhadeiras e tarrafas.....	24
Figura 5. Árvore filogenética de agrupamentos de vizinhos (NJ) utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) baseada em sequências do gene mitocondrial rRNA 16S, com indicação dos valores de <i>bootstrap</i> (1.000 réplicas)	30
Figura 6. Árvore filogenética de agrupamentos de vizinhos (NJ) utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) baseada em sequências do gene mitocondrial <i>Cyt b</i> , com indicação dos valores de <i>bootstrap</i> (1.000 réplicas)	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos táxons coletados nos rios Flores, Pindaré e Buriti/MA.....	23
Tabela 2. Sequências e autores dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais	26
Tabela 3. Descrição dos ciclos de cada região mitocondrial amplificada na PCR	26
Tabela 4. Índices de diversidade para o gene rRNA 16S.....	29
Tabela 5. Médias de divergências intraespecífica (diagonal) e interespecífica para as espécies de peixes do Rio Flores, Pindaré e Buriti através do gene mitocondrial rRNA 16S.....	31
Tabela 6. Índices de diversidade para o gene <i>Cyt b</i>	32
Tabela 7. Médias de divergências intraespecífica (diagonal) e interespecífica para as espécies de peixes do Rio Flores, Pindaré e Buriti através do gene mitocondrial <i>Cyt b</i>	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Gênero <i>Cichla</i> Schneider, 1801	15
2.2 Estudos genéticos em peixes: DNA mitocondrial	17
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2 Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1. Área de Estudo e Obtenção das Amostras.....	22
4.2. Coleta do material	24
4.3. Caracterização Molecular	25
4.4. Amplificação e Sequenciamento dos genes rRNA 16S e Cyt <i>b</i>	26
4.5. Sequenciamento das regiões genômicas.....	26
5. ANÁLISES DOS DADOS.....	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6.1. Gene rRNA 16S.....	29
6.1.1. Análise do Fragmento e Composição Nucleotídica rRNA 16S	29
6.1.2. Relações Filogenética e Distância Genética.....	29
6.2. Gene Cyt <i>b</i>	32
6.2.2. Análise do Fragmento e Composição Nucleotídica Cyt <i>b</i>	32
6.2.3. Relações Filogenética e Distância Genética.....	32
7. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
MATERIAL SUPLEMENTAR	45
CAPÍTULO I: Variabilidade Genética de Tucunarés (Cichlidae: Cichliformes) Introduzidos na Bacia do Rio Mearim/Ma.....	47

1. INTRODUÇÃO

Os peixes se destacam com a maior diversidade de vertebrados do mundo, com uma estimativa de aproximadamente 36.200 espécies válidas descritas, dos quais cerca de 18.426 espécies são de água doce (FRICKE; ESCHMEYER; VAN DER LAAN, 2023). Nenhum outro grupo de animal se iguala aos peixes no seu domínio dos mares, lagos e rios (HICKMAN *et al.*, 2016). A região neotropical abriga a maior ictiofauna do mundo, com mais de 6.200 espécies conhecidas (ALBERT *et al.*, 2020), sendo que o Brasil é um dos países que lidera novas descobertas (NELSON *et al.*, 2016).

O Brasil comporta a maior diversidade de peixes de água doce quando comparado a índices mundiais, e essa diversidade está relacionada com as enormes bacias hidrográficas e com o posicionamento geográfico que o país possui (BRITO *et al.*, 2019). Apesar de apresentar uma rica ictiofauna, cerca de 10% das espécies de peixes continentais do país já se encontram ameaçadas de extinção (ICMBIO, 2018). Existem aproximadamente 3.147 espécies de peixes neotropicais conhecidos e distribuídos em suas cinco regiões, entre as quais podemos mencionar o Nordeste brasileiro, que ainda apresenta muitas lacunas relacionadas ao conhecimento de sua ictiofauna de água doce (ANTUNES *et al.*, 2021) devido escassez de pesquisas que possa suprir essas lacunas (VLIEGER, 2017).

Neste sentido, amplas pesquisas sobre peixes estão sendo realizadas em diferentes bacias hidrográficas da região Nordeste, com intuito de fornecer informações relacionadas a distribuição e divergência genética de diversos grupos taxonômicos (MEDEIROS *et al.*, 2019). Entre os vários grupos encontrados na região Neotropical um dos mais importantes é a família Cichlidae, pertencente à ordem Cichliformes, apresenta espécies que vão desde pequeno até grande porte. Caracteriza-se como uma das mais diversas nos ecossistemas de água doce, com 1.707 espécies (CAS, 2017). Esta família tem sido objeto de pesquisas filogenéticas (LOPEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2010). Atualmente são conhecidas 16 espécies do gênero *Cichla* e estas foram descritas de forma tradicional a partir de suas características merísticas e morfológicas, bem como utilizando sequenciamento de DNA para delimitação de espécies (KULLANDER, FERREIRA, 2006; SABAJ *et al.*, 2020).

Dentro da família Cichlidae, temos o gênero *Cichla*, conhecido popularmente como tucunarés, que são nativos das bacias Amazônica, Tocantins e Orinoco, sendo encontrados também em rio menores que drenam as Guianas até o Oceano Atlântico, além de registros nos rios Paraná, Paraguai, Paraíba do Sul e Paraguaçu. Estes peixes estão entre os predadores mais conspícuos, pois possuem grande plasticidade fenotípica e oferecem cuidados para sua prole,

motivos estes que as tornam invasoras de alto impacto ambiental (GASQUES *et al.*, 2014). Os tucunarés estão presentes em pelo menos 35% dos 71 reservatórios brasileiros onde não são nativos do sistema, estando entre as espécies dominantes em 10% destes (MOUILLOT *et al.*, 2012).

Assim, a introdução de espécies de peixes, seja intencional ou não, pode ter um impacto negativo nas comunidades locais (SHARP *et al.*, 2017), o fato de as 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 (PIVELLO, 2011). Um espécime fora de sua área nativa pode provocar alterações no nicho ecológico em curto prazo, além de promover a hibridização, a disseminação de parasitas e de doenças, levando à perda de espécies nativas (VITULE; PRODOCIMO, 2012), pois afetam as interações ecológicas, a estrutura do habitat e os ciclos biogeoquímicos, causando a perda da diversidade taxonômica e funcional nas comunidades naturais (CUCHEROUSSET; OLDEN, 2011).

Um dos aspectos primordiais ao avaliar a colonização do tucunaré é a identidade taxonômica dos invasores, ou seja, se há uma espécie dominante ou um grupo delas. O gênero *Cichla* apresenta uma extensa variação fenotípica, especialmente relacionada ao padrão de cores, o que pode ser muito confuso para a identificação das espécies (REISS *et al.*, 2012; QUADROS *et al.*, 2020). Estudos mostram que existem divergências sobre a identificação precisa de algumas espécies de tucunarés, *Cichla* (ANDRADE *et al.*, 2001; WILLIS *et al.*, 2007; 2012).

Diante disso, a utilização dos dados moleculares em *Cichla* permite a caracterização e diferenciação das espécies, além do monitoramento em locais nos quais essas populações não são nativas, que permite aprimorar o conhecimento sobre o sistema (GASQUES *et al.*, 2014; 2015). Entre as metodologias de análise baseadas em fragmentos de DNA mitocondrial tornaram possíveis estudos moleculares envolvendo um grande número de indivíduos (DIAMANTE, 2019), pois permitem observar e explorar variações biológicas, presentes no DNA mitocondrial (JASER, 2020).

Portanto, diversos genes ou regiões do DNA têm sido historicamente empregados como marcadores moleculares para a identificação e variabilidade genética de espécies com base em suas divergências genéticas (HAJIBABAEI *et al.*, 2007). Á vista disso, estudos genéticos de populações de *Cichla* (tucunaré) introduzidas nas bacias do rio Mearim e do rio Parnaíba são de amplo valor ecológico por fornecerem informações que poderão auxiliar para uma melhor caracterização taxonômica e nortear métodos de manejo e estudos de ecologia apropriados a espécies deste gênero (FERREIRA *et al.*, 2022).

O presente estudo tem como proposta de analisar variabilidade genética espécies do gênero *Cichla* introduzidas na bacia do rio Mearim e na bacia do rio Parnaíba, dessa forma buscando contribuir com o conhecimento dos estoques de tucunaré introduzidos nestas bacias hidrográficas bem como inferir quanto a sua origem.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Cichla* Schneider, 1801

O gênero *Cichla*, representado popularmente pelos tucunarés, pode ser distinguido de outros ciclídeos por apresentar um ocelo característico na nadadeira caudal (Figura 1). São peixes de grande porte, alimentam-se preferencialmente de peixes pequenos: e são os maiores determinantes na estrutura da comunidade em muitos habitats fluviais (JEPSEN *et al.*, 1997; WINEMILLER *et al.*, 1997) produzem uma intensa pressão de seleção em uma variedade de peixes (LAYMAN; WINEMILLER, 2004) e são adaptados a ambientes lênticos (STAECK; LINKE, 1985; NELSON, 1994).

Os representantes deste gênero são endêmicos da bacia Amazônica, Tocantins e Orinoco, no entanto, foram introduzidos em outros rios brasileiros, e esse processo tem gerado discussões no que diz respeito aos impactos que podem ocasionar às populações nativas (TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2005). Reduções drásticas na diversidade de peixes nativos têm sido atribuídas à ocorrência dos tucunarés em sistemas onde estes foram introduzidos (PELICICE; AGOSTINHO, 2009; BRITTON; ORSI, 2012).

Figura 1. Espécime de *Cichla kelberi*.



Fonte: Eline Lima, 2023.

O gênero foi primeiramente descrito por Schneider em 1801, baseado na descrição da espécie *Cichla ocellaris*. Taxonomicamente foram sugeridas para *Cichla* 15 espécies diferentes, contudo apenas seis espécies foram aceitas como válidas: *Cichla temensis* Humboldt & Valenciennes (Alto Orinoco – Colômbia, Venezuela; Rio Negro e Amazônia Ocidental – Brasil); *Cichla ocellaris* Schneider em 1801 (Suriname; drenagens da Guiana e Amazônia Venezuelana); *Cichla orinocensis* Humboldt & Valenciennes, 1821 (Bacia do Rio Orinoco – Colômbia e Venezuela; Rio Negro – Brasil); *Cichla monoculus* Agassiz, 1831 (Bacia Amazônica – Brasil, Peru, Colômbia e Equador); *Cichla intermedia* Machado-Allison, 1971 (Alto Rio Negro e Médio Orinoco) (KULLANDER, 1986; KULLANDER; NIJSSEN, 1989; WINEMILLER, 2001) e *Cichla nigromaculata* Jardine, 1843 (Alto Rio Orinoco – Venezuela e Médio Rio Negro – Brasil). Entretanto Kullander; Ferreira (2006) em uma revisão taxonômica do gênero *Cichla* descreve nove novas espécies: *Cichla kelberi*, *Cichla pleiozona*, *Cichla mirinae*, *Cichla melaniae*, *Cichla piquiti*, *Cichla thyrorus*, *Cichla jarina*, *Cichla pinima*, *Cichla vazzoleri*, ficando estabelecido 15 espécies para o gênero.

Recentemente a literatura reconheceu para o gênero *Cichla* uma nova espécie, *Cichla cataractae* Carl H. Eigenmann em 1908, *endêmico* da bacia do rio Essequibo, distingue-se de todos os congêneres por evidências moleculares e padrões únicos de pigmentação adulta e juvenil (SABAJ *et al.*, 2020). Assim, o gênero passa apresentar 16 espécies descritas.

Entre os peixes alóctones, introduzidos em diversas bacias hidrográficas do Brasil, o tucunaré, destaca-se devido ao impacto ambiental gerado por suas características de predador, pois é considerado agressivo e não desiste facilmente de sua presa (AGOSTINHO; JÚLIO JR, 1999; CHELLAPPA *et al.*, 2003; KOVALENKO *et al.*, 2010). Apesar de alguns estudos em reservatórios terem analisado aspectos ecológicos dos tucunarés em condição nativa, como alimentação e reprodução (NOVAES *et al.*, 2004; MARTO *et al.*, 2015), crescimento e mortalidade (FREIRE; FREITAS, 2013), há uma deficiência em averiguar as interações interespecíficas desses peixes em reservatórios situados em áreas de origem (ANDRADE, 2021).

Considerando os impactos ambientais causados ao introduzir espécies desse grupo, faz-se necessário o entendimento taxonômico, com o uso de abordagens moleculares que colaborem para distinguir ou identificar espécies desconhecidas ou morfologicamente semelhantes (LUZ, 2016). Almeida *et al.* (2021) realizou a identificação molecular de espécies do gênero *Cichla* nos rios Flores e Pindaré afluentes do rio Mearim por meio do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), evidenciando a introdução da espécie invasora *C. kelberi*. Diante das problemáticas em que o gênero está envolvido, tais como a identificação errônea de suas

espécies, faz-se necessários estudos 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 biologia molecular (MOURÃO, 2013).

Assim, dentre as propostas para minimizar esta problemática podemos destacar a taxonomia integrativa se apresenta como uma proposta eficiente para minimizar as problemáticas (DAYRAT, 2005) nas quais a identificação baseada no DNA associa-se à descrição morfológica e imagens de alta resolução (PUGEDO *et al.*, 2016), pois a identificação de espécimes em nível específico permite a descoberta de novas espécies, um indicativo a ser investigado na bacia do rio Mearim (MORAES, 2016).

Portanto, tais fatores tornam viáveis estudo sobre os estoques dos tucunarés nessas áreas geográficas, possibilitando a identificação de ambientes com distintos estágios de estabelecimento desta espécie, proporcionando a comparação de tais informações tanto com descritores ecológicos de eventuais alterações na ictiofauna nativa, podendo ser as variáveis bióticas e abióticas que beneficiem ou restringir o desenvolvimento de suas populações (ESPINOLA, 2009).

2.2 Estudos genéticos em peixes: DNA mitocondrial

Indivíduos iguais morfológicamente de uma mesma espécie podem não ser geneticamente idênticos, suas sequências de DNA diferem em algum momento e essas diferenças formam a diversidade genética, conhecida como polimorfismo. A diversidade genética possibilita que uma espécie tenha a capacidade de se adaptar e responder às mudanças ambientais (SOUZA, 2020). Pesquisas em genética com grupos de peixes têm sido amplamente utilizadas para a elucidação de questões referentes à estruturação de populações de diversas espécies, de sua origem e características peculiares, divergências genéticas entre as mesmas, migração e eventos históricos (PARKER *et al.*, 1998).

Assim, as técnicas moleculares são instrumentos importantes nos casos em que a identificação de espécies com base em características morfológicas e citogenéticas são complexas, bem como no isolamento de populações próximas geograficamente (MARQUES *et al.*, 2016).

Partindo dessa perspectiva, a biologia molecular proporciona o estudo da variabilidade genética das populações, o que é de grande relevância para conservação e sustentabilidade das espécies estudadas. As diferenciações genéticas presentes em grupos de indivíduos da mesma espécie são essenciais para que as espécies possam resistir a mudanças ambientais e sobreviver ao longo do tempo (RAMOS, 2016).

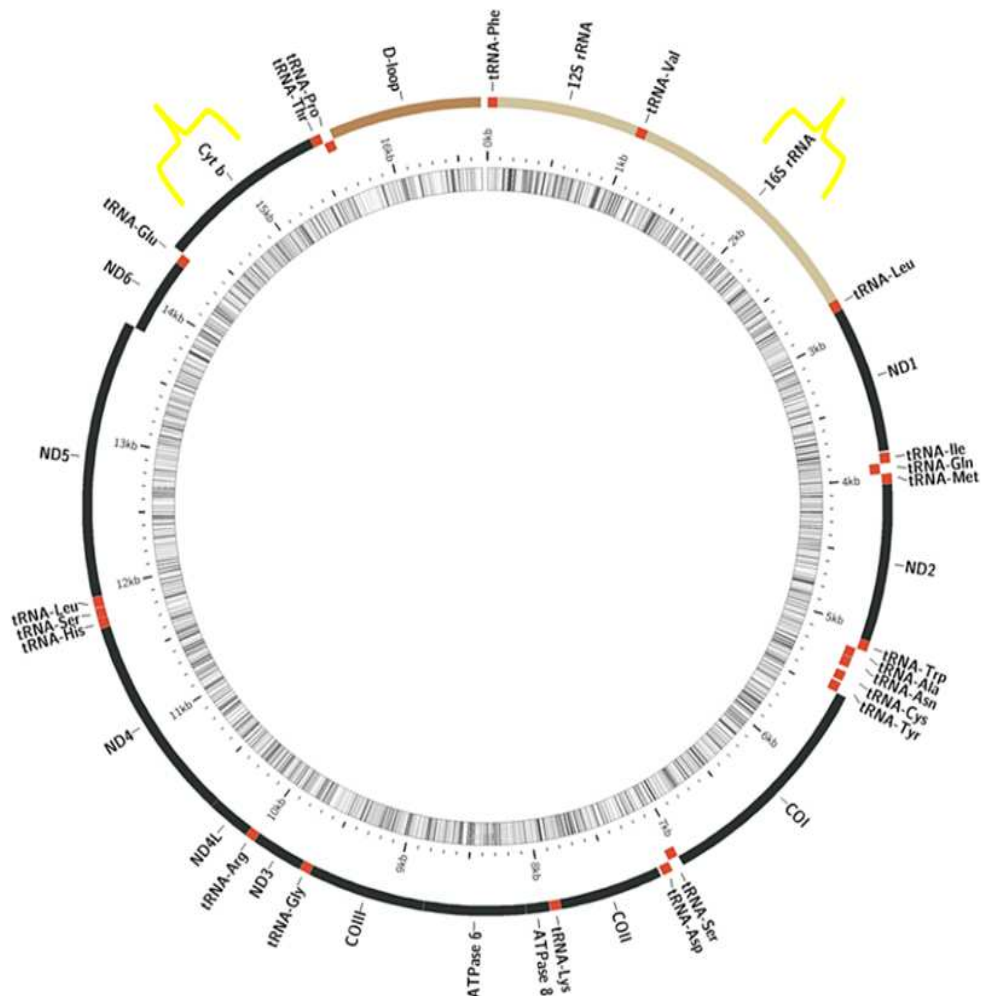
O DNA mitocondrial (mtDNA), é constituído apenas da herança materna, ao contrário dos nucleares que possuem herança bi parental. A herança materna estar altamente conservada em muitos dos genes localizados no genoma mitocondrial, estes marcadores, muitas vezes podem ser usados para resolver as relações que medem períodos de tempo muito longos e são relevantes quando se considera questões de filogenia e importância taxonômica (OLSON *et al.*, 2009). A estrutura do DNA é circular dupla fita, sendo fechado e compacto, não apresentando macromutações, permitindo que haja uma maior chance de serem gerados marcadores espécie específicos, o que torna este DNA excelente para a técnica molecular (TRESBACH *et al.*, 2015). Uma outra vantagem é a abundância de DNA mitocondrial, devido à presença em vários tecidos, gerando resultados por meio de pequenas amostras pequenas ou até mesmo degradadas (KOSMANN, 2009).

Portanto, o DNA mitocondrial funciona como um marcador micro evolutivo em nível intraespecífico, e pode ser utilizado para gerar filogenias, verificar o grau de diversidade genética das espécies e estimar a variabilidade genética entre as populações (AVISE, 2004). Este marcador molecular de diversidade animal tem sido utilizado ao longo das últimas três décadas e tem alvo preferencial para diagnóstico molecular, pois oferece muitas vantagens em relação ao DNA nuclear, como: 1) possuir um elevado número de cópias por célula; 2) apresentar diferenças de sequências entre espécies próximas de 5 a 10 vezes maiores do que em genes nucleares; 3) possuir variação intraespecífica pequena na maioria das espécies animais; 4) não apresentar íntrons, o que facilita a obtenção da amplificação de DNA mitocondrial; 5) possuir herança predominantemente materna e baixo polimorfismo ancestral (HEBERT *et al.*, 2003; STOECKLE *et al.*, 2005).

Com o advento das tecnologias que permitem trabalhar com o DNA, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), novas portas foram abertas: a identificação de espécies pelo DNA ribossomal e após, pelo DNA mitocondrial (TRESBACH *et al.*, 2015). Assim, a identificação das espécies de peixes tem sido mais fácil devido ao uso de marcadores para identificação (HASSAN *et al.*, 2022).

Diante disto, marcadores mitocondriais, como o rRNA 16S e o gene *Cyt b*, são amplamente utilizados como ferramentas moleculares para auxiliar na identificação de espécies de peixes de água doce (QURAIISHIA *et al.*, 2015; SAAD, 2019) (Figura 2). Esses marcadores são encontrados em grande quantidade em animais, dado que uma representativa porcentagem do genoma de eucariotos compreende regiões não codificadoras (THOMSON *et al.*, 2010).

Figura 2. Genoma mitocondrial de peixes. Em amarelo evidenciando a região do RNA ribossomal 16S (rRNA 16S) e Citocromo *b* (*Cyt b*).



Fonte: <http://www.ufsj.edu.br/recgenlab/>

O gene rRNA 16S que faz parte da grande subunidade ribossomal do DNA mitocondrial (PALUMBI *et al.*, 1991) têm se mostrado um bom marcador para análises de diferenciação de peixes, como em estudos comparativos intergenéricos e interespecíficos (FRAGA *et al.*, 2007; FRAGA *et al.*, 2014). Sendo o seu uso utilizado com sucesso em estudos filogenéticos de diversos grupos de vertebrados, como em peixes (CALCAGNOTTO *et al.*, 2005). Outra região do DNA mitocondrial que tem sido amplamente estudada em peixes é o gene Citocromo *b* (*Cyt b*), utilizado em análises de táxons que divergiram recentemente tais como populações e espécies (FRAGA *et al.*, 2007; GASQUES *et al.*, 2014). O uso desses genes permite esclarecer a história da divergência populacional e dispersão das espécies sendo tais conhecimentos úteis para estudos de manejo e conservação e de exploração econômica (DALIA, 2011).

Dentre os marcadores que têm por base as sequências genômicas, os genes mitocondriais são os mais comumente utilizados em estudos populacionais (OLIVEIRA,

2018), pois eles estão rodeados por sequências conservadas, o que permite isolá-los e estudá-los através destes iniciadores universais (KOSMANN, 2009). Assim, os marcadores mitocondriais rRNA 16S e *Cyt b*, se tornam úteis em estudos de genética populacional e, ainda, filogenia e filogeografia (BERTOZZI *et al.*, 2012; DOWIE *et al.*, 2017).

Portanto, neste estudo sequências do genoma mitocondrial foram utilizadas para estimar os níveis de *Cichla kelberi*, na tentativa de esclarecer o status taxonômico e as relações filogenéticas das espécies de *Cichla* das bacias maranhenses e dessa forma elucidar as incertezas taxonômicas.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- ✓ Avaliar os níveis de variabilidade genética dos tucunarés introduzidos nas bacias do rio Mearim e Parnaíba/MA utilizando sequências do DNA mitocondrial.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar as populações de *Cichla* do Maranhão através dos genes mitocondriais rRNA 16S e Cyt *b*;
- ✓ Determinar os níveis de variabilidade e distância genética das populações analisadas;
- ✓ Gerar filogenias a partir de sequências dos genes analisados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de estudos e obtenção das amostras

O estado do Maranhão dispõe de um território com cerca de 320 km² de área, incluindo 640 km de extensão costeira, o que corresponde à segunda maior dimensão costeira do Brasil (REBÊLO *et al.*, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2021). Além disso, esse estado apresenta uma extensa malha hidrográfica incluindo três sistemas hídricos e onze bacias, sendo oito de domínio estadual (Bacias dos rios Mearim, Itapecuru, Munim, Turiaçu, Maracaçumé, Pericumã, Preguiças e Peria) e três de domínio federal (Parnaíba, Tocantins e Gurupi) (IMESC, 2019).

Essa grande riqueza em recursos hídricos presente no Maranhão é empregada para os mais diversos fins (IMESC, 2019). A biodiversidade de peixes presente no estado, é o grande destaque, pois além de ser fonte de renda, os hábitos culturais estão vinculados à história da própria região (GUIMARÃES *et al.*, 2020). As amostras analisadas neste trabalho, sempre que possível, foram obtidas em número de cinco exemplares ou mais em ambientes que os tucunarés foram introduzidos (Figura 3).

As amostras dos espécimes de Tucunaré foram obtidas na barragem do rio Flores, localizado no município de Josêlandia/MA, já no rio Pindaré os espécimes foram obtidos no município de Pindaré-Mirim, ambos os rios são afluentes da bacia do rio Mearim, também foram coletados espécimes de tucunarés no rio Buriti, afluente da bacia do rio Parnaíba, os espécimes foram obtidos nas cidades de Milagres do Maranhão/MA e Santa Quitéria do Maranhão/MA. Os cursos d'água da região fazem parte da bacia hidrográfica do Mearim (IMESC, 2019). O rio Flores compõe o alto Mearim, afluente pela margem direita, com uma extensão aproximada de 400 km (FILHO *et al.*, 2011).

O rio Pindaré, principal afluente do rio Mearim, nasce nas elevações que formam o divisor entre as bacias Mearim e Tocantins, com aproximadamente 686 km². Sua nascente está localizada na Serra do Gurupi, com aproximadamente 300 metros de elevações (SILVA *et al.*, 2017). Seus principais afluentes são os rios Água Preta, Buriticupu, Negro, Paragominas, Santa Rita, Timbira e Zutiua (SILVA *et al.*, 2017). O rio Buriti, pertencente a bacia do rio Parnaíba, está situado ao leste Maranhense e sua nascente está localizada no povoado de Santa Rosa, município de Buriti/MA.

Foram coletados 23 espécimes de Tucunaré. Sendo que 13 espécimes foram coletados no rio Flores, cinco no rio Pindaré e cinco no rio Buriti/MA (Tabela 1), as demais sequências são provenientes do Genbank, que foram agrupadas ao banco de dados dos genes rRNA 16S e

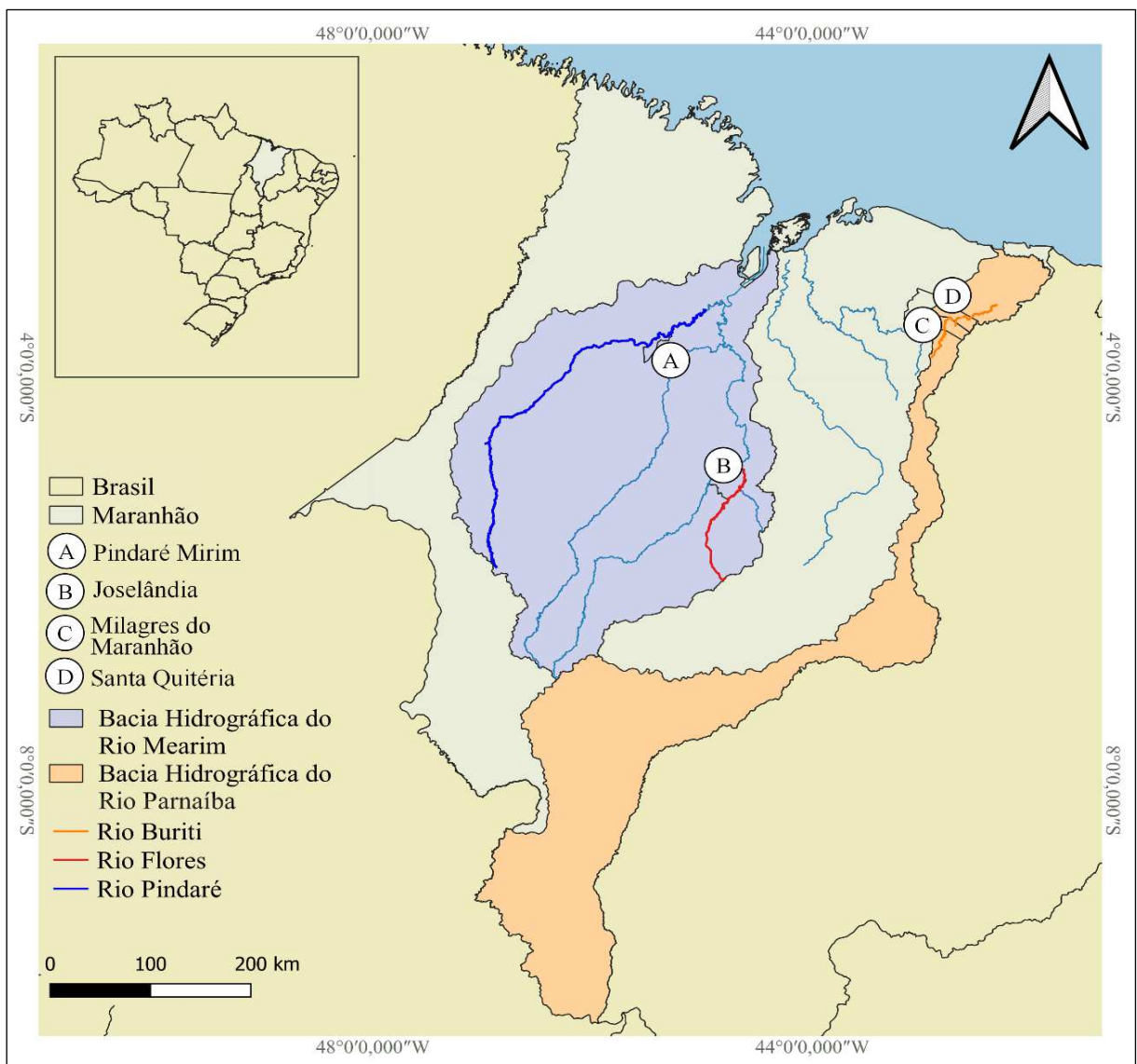
Cytb para análises filogenéticas. A riqueza e a diversidade da ordem citada vêm sendo evidenciada em outros trabalhos com peixes neotropicais (REIS *et al.*, 2016).

Tabela 1. Relação dos táxons coletados nos rios Flores, Pindaré e Buriti/MA.

Rio	Coordenadas Geográficas	Ordem	Família	Gênero	Espécies	Nº Amostrado
Rio Flores	05°05'508"S e 044°39'811"W				<i>kelberi</i>	13
Rio Pindaré	3°39'54"S e 45°25'31"W	Cichliformes	Cichlidae	<i>Cichla</i>	<i>kelberi</i>	5
Rio Buriti	3°47'60.0" S e 42°54' 33.5" W				<i>Cichla</i> sp.	5

Fonte: Elaboração própria, 2023.

Figura 3. Mapa da localização dos pontos de coleta nas bacias maranhenses. Ponto A: rio Pindaré; ponto B: rio Flores; pontos C e D: rio Buriti.



Fonte: Elaboração própria, 2023.

4.2. Coleta do material

As amostras foram coletadas utilizando-se apetrechos de pesca como redes de malhadeiras e tarrafas (Figura 4). Os espécimes coletados foram acondicionados em sacos plásticos e transportados em gelo ao Laboratório de Biologia Molecular (LABMOL), no complexo Genbimol, do Campus Caxias da Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA.

As coletas dos exemplares foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade e Conservação (ICMBIO), por meio das licenças: ICMBIO nº 46367-1- Rio Pindaré; ICMBIO -MMA nº 64.601-2 – Rio Mearim; ICMBIO/MMA nº 84339-1- Rio Buriti. Os peixes coletados foram etiquetados, fotografados e as amostras de tecido muscular retiradas para posteriores análises. Os tecidos foram preservados em álcool 80% e mantidos sob refrigeração a -20°C. Os exemplares foram fixados em formalina 10% e conservados em álcool 70%.

Figura 4. Coleta dos espécimes com auxílio de redes malhadeiras e tarrafas.



Fonte: Eline Silva, 2023.

A identificação taxonômica foi realizada com o auxílio de literatura específica (KULLANDER; FERREIRA, 2006). Um exemplar do rio Pindaré material testemunho (voucher) utilizado nesta proposta foi depositado no Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL) e os restantes dos espécimes encontra-se depositados na coleção Zoológica do Laboratório de Biologia Molecular (LABMOL) no complexo GENBIMOL do Campus Caxias da Universidade Estadual do Maranhão/UEMA.

4.3 Caracterização molecular

O DNA total foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) seguindo as instruções do fabricante adaptadas para microtubos de 1,5 mL. Para isso, foi retirado um fragmento de 20 mg de tecido muscular de cada espécime.

Depois, uma solução composta de 60 μL de EDTA a 0,5 M e 250 μL de Nucleic Lysis Solution foi preparada e armazenada em freezer por cinco minutos (proporcional à quantidade das amostras), tomando-se o cuidado para não congelar.

Adicionou-se 300 μL da solução em cada um dos tubos onde os fragmentos de tecidos foram acondicionados. Colocou-se 15 μL de proteinase K e deixou-se as amostras no sheik a 65 °C por 30 minutos até degradar todo o tecido.

Colocou-se 10 μL de RNase Solution nos tubos que foram levados à estufa a 37 °C por 30 minutos. Após retirar as amostras da estufa, adicionou-se 150 μL do reagente Protein Precipitation Solution. Os tubos foram agitados delicadamente, logo após foram agitados no vórtex para garantir a homogeneização dos reagentes, em seguida colocados no freezer por cinco minutos e centrifugou-se por 10 minutos a 15.000 rpm.

Adicionou-se 600 μL de isopropanol para precipitar o DNA em um novo tubo. Em seguida retirou-se o sobrenadante do material centrifugado, colocando-o junto com isopropanol no novo tubo. O material foi centrifugado novamente a 15.000 rpm por 10 minutos, sendo, depois, o isopropanol descartado com cuidado e colocou-se os turbos aberto e invertido em papel absorvente.

Em seguida, colocou-se 500 μL de álcool 70% aos tubos e agitou-se gentilmente para visualizar o pellet de DNA. O material foi novamente centrifugado a 15.000 rpm por 10 minutos. O álcool foi descartado e as amostras submetidas a um spin. Retirou-se o excesso de álcool, tomando cuidado para não remover o pellet, e os tubos foram colocados abertos na estufa por 10 minutos.

Por fim, adicionou-se 50 μL de solução DNA rehydratation em cada tubo. O DNA que foram utilizados no mesmo dia foram colocados na estufa por um período mínimo de três horas, caso contrário seria deixado em temperatura ambiente por no mínimo 12 horas.

Depois do overnight, colocou-se as amostras de DNA no freezer para posterior visualização em gel de agarose a 1% em uma proporção de 3 μL do tampão (azul de bromofenol e xilenocianol) para 5 μL da amostra.

4.4 Amplificação e Sequenciamento dos genes rRNA 16S e Cyt *b*

O isolamento e amplificação dos genes mitocondriais rRNA 16S e Cyt *b* foram realizados através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando-se *primers* específicos (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências e autores dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos mitocondriais.

MARCADOR	PRIMER	PRIMER SEQUÊNCIA (5'-3')	AUTOR
rRNA 16S	16SL1987	GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC	Palumbi <i>et al.</i> (1996)
	16SH2609	CCGGTCTGAACTCAGATCA CGT	
Cyt <i>b</i>	LNF	GACTTGAAAAACCAAYCGTTGT	Oliveira <i>et al.</i> (2011)
	H08R2	GCTTTGGGAGTTAGDGGTGGGAGTTAGAATC	

As reações das PCRs foram feitas em um volume final de 25 µL com os seguintes reagentes:

- ✓ 1 µL de DNA (250 ng/µL);
- ✓ 0,25 µL de cada um dos *primers* (200 ng/µL);
- ✓ 2,5 µL tampão 10X Buffer (200 mM de Tris-HCl, pH 8.4 e 500 mM de KCl);
- ✓ 4 µL de dNTPs (1,25 M);
- ✓ 1 µL MgCl₂ (50 mM);
- ✓ 0,2 µL Taq DNA polimerase (5 U/µL) e água de injeção para completar o volume final da reação.

Em seguida, os tubos foram colocados no termociclador e o protocolo de amplificação dos fragmentos gênicos de rRNA 16S e Cyt *b* foi constituído dos seguintes parâmetros (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição dos ciclos de cada região mitocondrial amplificada na PCR.

<i>Primers</i>	Desnaturação inicial	Ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
rRNA 16S	95°C/2 mim	25	94°C/1 min	50°C/1 min	72°C/2 min	72°C/7 min
Cyt <i>b</i>	95°C/2 mim	30	94°C/30 s	50°C/1 min	72°C/2 min	72°C/7 min

4.5 Sequenciamento das regiões genômicas

Após a amplificação e corrida das amostras em gel de agarose, os produtos da PCR foram purificados com o kit ExoSap-IT (USB Corporation) conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA pelo método de Sanger *et al.* (1977) usando-se o kit Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems). A reação consistiu de um volume final de 7 µL: 1µL do produto amplificado, 0,35 µL de cada primer (Forward ou Reverse, 0,8 pmol/µL), 0,7 µL de Big Dye

Terminator, 1,05 μL de Tampão 5X para sequenciamento (kit Big Dye) e água de injeção para completar o volume da reação.

As reações de sequenciamento foram realizadas em uma placa com 96 poços, utilizando-se um termociclador com os seguintes ciclos: 35 ciclos de 96 °C por 60 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por quatro minutos. Os oligonucleotídeos utilizados na reação de sequenciamento são os mesmos utilizados na reação de PCR para amplificação dos produtos.

Após a reação, as amostras foram precipitadas para retirar do excesso de reagentes não incorporados. Para isso, a placa foi submetida a um spin (centrífuga de placa), adicionou-se 2,5 μL de EDTA a 125 mM, vedou-se a placa e submeteu-se a um spin. Em seguida, adicionou-se 30 μL de Etanol 100% e vedando a placa para misturar seu conteúdo invertendo de quatro a cinco vezes. Envolheu-se a placa em papel alumínio e deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos (centrífuga refrigerada 4 °C). Depois ocorreu a centrifugação a 4.000 rpm por 30 minutos e invertida bruscamente para descartar o álcool que foi embebido por papel absorvente.

Por fim, centrifugou-se a placa invertida a 1.150 rpm por 1 minuto, sendo, em seguida, foram adicionados 30 μL de Etanol a 70%. A placa foi vedada, centrifugada a 3.440 rpm por 15 minutos (centrífuga refrigerada a 4 °C) e invertida bruscamente para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente. A placa invertida foi centrifugada 1.150 rpm por 1 minuto e deixada na estufa a 37 °C por aproximadamente 10 minutos para evaporar o excesso de álcool.

Após a precipitação, adicionou-se em cada amostra 10 μL de formamida HI-DI (Applied Biosystems), seguido de uma etapa de desnaturação das amostras a 95 °C por dois minutos. Em seguida, as amostras foram sequenciadas em sequenciador automático de DNA (modelo ABI 3500/ Life Technologies).

5. ANÁLISE DOS DADOS

As sequências analisadas neste trabalho foram editadas e alinhadas no CLUSTAL W (THOMPSON; HIGGINS; GIBONS, 1994) do BIOEDIT 7.0 (HALL, 1999). A matriz de distância genética e análises filogenéticas, foram geradas software MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018), utilizando o método de agrupamento de vizinhos com o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980, SAITOU; NEI, 1987). A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* (1000 réplicas) (FELSENSTEIN, 1985). As análises populacionais (diversidade haplotípica, nucleotídica, sítios polimórficos e número de haplótipos) foram realizadas no programa DNASP 6.11.01 (ROZAS *et al.*, 2017).

Foram adicionadas sequências do Genbank para os genes rRNA 16S e Cyt *b*. Para o gene rRNA 16S as sequências foram de *Cichla kelberi*: FJ904291.1; DQ779581.1 (CARVALHO *et al.*, 2009); *Cichla ocellaris*: AY263831.1; KR150863.1; NC030272.1; KU878410.1 (SPARKS, 2004; MUSILOVA, STAROS TOVA, 2015; LIN, MU, SHI, 2016); *Cichla orinocensis*: AF049018.1 (FARIAS *et al.*, 1999); *Cichla monoculus*: AF049017.1, FJ904288.1; MH699844.1 (FARIAS *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2009; VU *et al.*, 2018); *Cichla intermedia*: GU737116.1 (LÓPEZ-FERNÁNDEZ, WINEMILLER, HONEYCUTT, 2010); *Cichla temensis*: GU737114.1; AF049019.1; AY662729.1; GU817247.1 (LÓPEZ-FERNÁNDEZ, WINEMILLER, HONEYCUTT, 2010; FARIAS *et al.*, 1999; SPARKS, 2004; CHAKRABARTY, ALBERT, 2010); *Cichla* sp.: AF112640.1 (FARIAS, MEYER, ORTI, 1998); *Cichla piquiti*: FJ904286.1; FJ904287.1; DQ779579.1 (CARVALHO, 2009; CARVALHO *et al.*, 2009); foram utilizadas sequências de *Retroculus xinguensis*: AF049012.1 (FARIAS *et al.*, 1999) e *Geophagus brasiliensis*: GU737148.1 (LÓPEZ-FERNÁNDEZ, WINEMILLER, HONEYCUTT, 2010) para o grupo externo.

Para o gene Cyt *b*, foram utilizadas sequências de *Cichla kelberi*: GU295669.1; GU295668.1 (WILLIS *et al.*, 2010); *Cichla ocellaris*: KR150863.1; NC030272.1; KU878410.1 (MUSILOVA, STAROS TOVA, 2015; LIN, MU, SHI, 2016); *Cichla orinocensis*: AF370643.1; GQ199902.1 (FARIAS *et al.*, 2001; KULLANDER *et al.*, 2010); *Cichla monoculus*: AF370642.1; DQ990686.1 (FARIAS *et al.*, 2001; PEREZ *et al.*, 2007); *Cichla temensis*: AF370644.1; GU295689.1; GU295674.1 (FARIAS *et al.*, 2001; WILLIS *et al.*, 2010); *Cichla pinima*: GU295678.1; GU295686.1; GU295683.1; GU295684.1; GU295682.1 (WILLIS *et al.*, 2010); *Cichla miriana*: GU295685.1; GU295671.1; GU295688.1; GU295687.1 (WILLIS *et al.*, 2010), o grupo externo é constituído por *Retroculus xinguensis*: AF370641.1 (FARIAS *et al.*, 2001) e *Geophagus brasiliensis*: AF370659.1 (FARIAS *et al.*, 2001).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Gene rRNA 16S

6.1.1 Análise do Fragmento e Composição Nucleotídica

Obteve-se um fragmento de 499 pares de bases do gene mitocondrial rRNA 16S para 45 sequências, sendo 25 sequências para espécies *C. kelberi*, apresentando 429 sítios conservados, 70 sítios variáveis e 27 informativos para parcimônia. A composição nucleotídica encontrada foi de 21,08% de timina, 25,5% de citosina, 30,4% de adenina e 22,3% de guanina.

Na análise conjunta de amostras das populações de espécies do gênero *Cichla*, foram observados baixos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica (Tabela 4). Um único haplótipo foi observado para os espécimes de *Cichla kelberi* dos rios maranhenses, incluindo duas sequências do Genbank, sendo uma do rio Doce e outra do reservatório de Itumbiara/MG.

Tabela 4. Diversidade genética nos espécimes de *Leporinus piau* baseado em 499 pb do gene rRNA 16S.

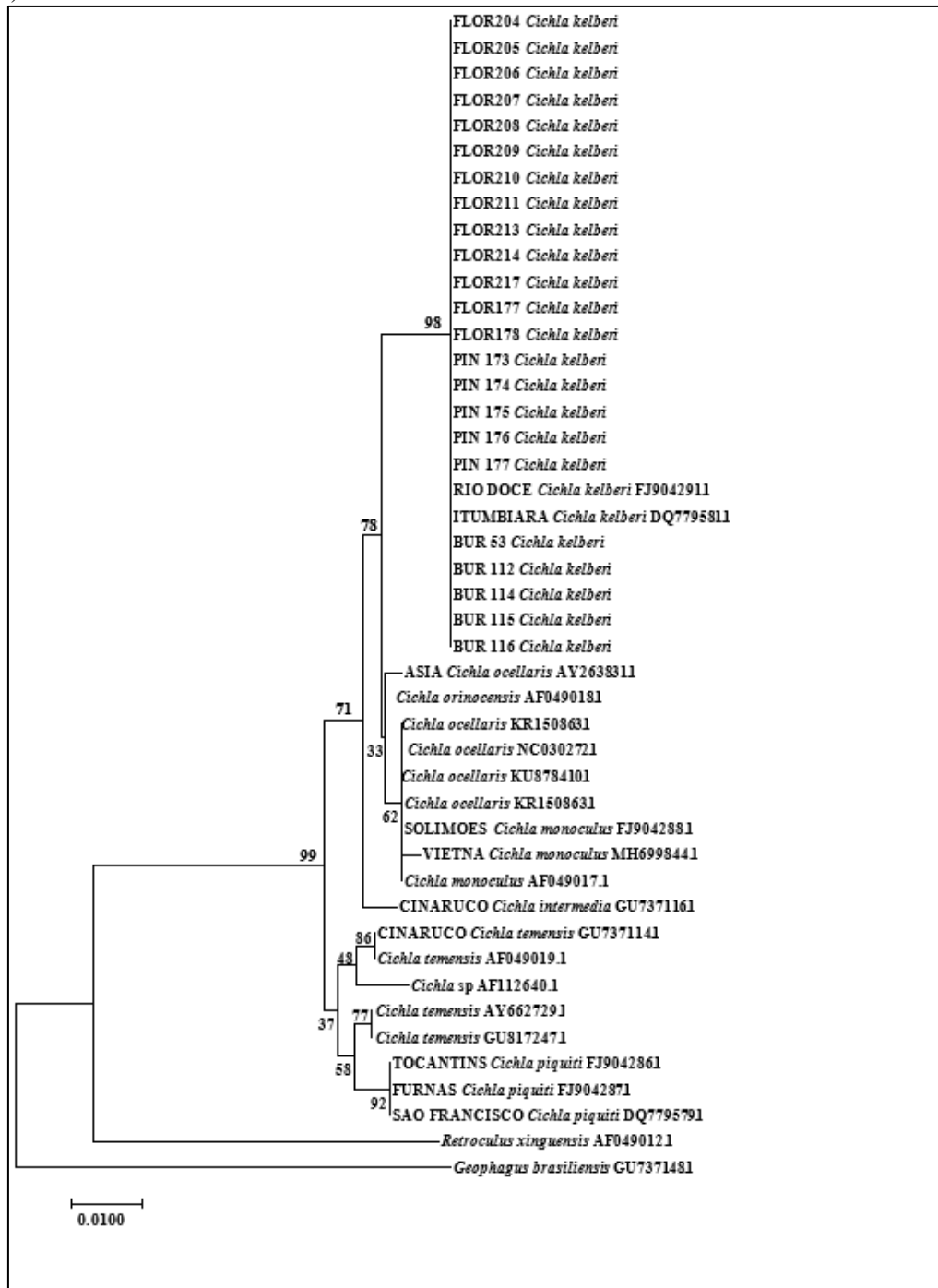
N	NH	S	Índice de Diversidade Molecular	
			<i>h</i>	π
45	12	12	0,676	0,019

N = número amostral NH = número de haplótipos S = sítios polimórficos *h* = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica.

6.1.2. Relações Filogenéticas e Distância Genética

A reconstrução filogenética utilizando-se os métodos baseados em distância, revelou que os indivíduos considerados pertencentes à espécie *C. kelberi* se agruparam em conjuntos coerentes. Com relação as amostras de *C. kelberi*, observa-se a formação de um único clado fortemente suportado com as amostras do Genbank com 98% de *bootstrap* (Figura 5).

Figura 5. Árvore filogenética de agrupamentos de vizinhos (NJ) utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) baseada em sequências do gene mitocondrial rRNA 16S, com indicação dos valores de *bootstrap* (1.000 réplicas).



Fonte: Elaboração própria, 2023.

Em nossas análises identificamos que as amostras de tucunaré introduzidos em bacias maranhenses, obtiveram resultados semelhantes ao de Almeida *et al.* (2021), em que os indivíduos considerados pertencentes à mesma espécie se agrupam em conjuntos coerentes com a formação de clados fortemente suportados com 98% de *bootstrap*. As informações obtidas na árvore filogenética indicam que os *Cichla* obtidos nos rios: Flores, Pindaré e Buriti/MA foram

agrupadas com *Cichla kelberi*, provenientes no rio Doce e do reservatório de Itumbiara, no estado de Minas Gerais, sendo estes oriundos da bacia do rio Tocantins (CARVALHO *et al.*, 2009). Dessa forma, nossos resultados evidenciam que os espécimes analisados neste estudo por terem se agrupados com 0% de divergência genética com aqueles introduzidos em bacias e reservatórios de Minas Gerais tenham a mesma origem, ou seja, da bacia do rio Tocantins.

Marcadores moleculares têm sido utilizados como um importante método para a identificação de espécies com problemas taxonômicos (MOURÃO *et al.*, 2017). 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 ferramentas moleculares. Vários estudos vêm demonstrando a confiabilidade dos marcadores moleculares para a identificação exata e o monitoramento de diferentes espécies de peixes (HASHIMOTO *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2012; PRADO *et al.*, 2012).

A média de distância genética intraespecífica do gene rRNA 16S para *C. kelberi* foi de 0,0%. No entanto, a distância genética entre as demais espécies de tucunarés analisados variou de 0,2 a 2,8%. Palumbi *et al.* (2002) afirma que as sequências do gene rRNA 16S são mais conservadas, com taxa de mutações menores do que a média do genoma mitocondrial, estando nossos resultados de acordo com o que o autor afirma (Tabela 5).

Tabela 5. Médias de divergências intraespecífica (diagonal) e interespecífica para as espécies de peixes do Rio Flores, Pindaré e Buriti através do gene mitocondrial rRNA 16S.

Espécies	% Divergência Genética						
	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>Cichla kelberi</i>	0,0						
2. <i>Cichla ocellaris</i>	1,5	0,8					
3. <i>Cichla monoculus</i>	1,3	0,4	0,0				
4. <i>Cichla temensis</i>	2,5	1,6	1,8	0,7			
5. <i>Cichla piquiti</i>	2,8	1,9	2,0	1,0	0,0		
6. <i>Cichla intermedia</i>	1,8	1,2	1,0	1,6	1,3	NC	
7. <i>Cichla orinocensis</i>	1,0	0,5	0,2	1,5	1,8	0,7	NC

NC – Não calculado.

6.2. Gene Cyt *b*

6.2.2. Análise do Fragmento e Composição Nucleotídica

Obteve-se um fragmento de 1.048 pares de bases do gene mitocondrial Cyt *b* para 46 sequências utilizadas, sendo 13 sequências do rio Flores, cinco do rio Pindaré e cinco do rio Buriti/MA e 23 sequências obtidas no Genbank. Foram observados 768 sítios conservados, 280 sítios variáveis e 132 informativos para parcimônia. A composição nucleotídica encontrada foi de 27,7% para timina, 33,5% de citosina, 25,5% de adenina e 13,3% para guanina (Figura 6).

Analises dos índices de diversidade estimados para esta região gênica apresentou-se alta diversidade haplotípica e baixos valores de diversidade nucleotídica (Tabela 6). O autor Marques *et al.* (2016), obteve através do gene Cyt *b*, resultados semelhantes diversidade haplotípica $h = 0,93$ superior a diversidade nucleotídica de $\pi = 0,007$ ao analisar divergência genética entre populações nativas e invasoras de ciclídeos no rio Paraíba do Sul. Este índice de diversidade haplotípica e o esperado em populações invasoras, pois refletem parcialmente a diversidade genética de populações não nativas, chamado efeito fundador (BRIÑEZ *et al.*, 2013). Foram observados dois haplótipos para os espécimes de *C. kelberi* dos rios maranhenses e um haplótipo para sequências do Genbank procedentes da bacia Amazônica.

Tabela 6. Índices de diversidade para o gene Cyt *b*.

N	NH	S	Índice de Diversidade Molecular	
			<i>h</i>	π
46	21	165	0,838	0,041

N = número amostral NH = número de haplótipos S = sítios polimórficos *h* = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica.

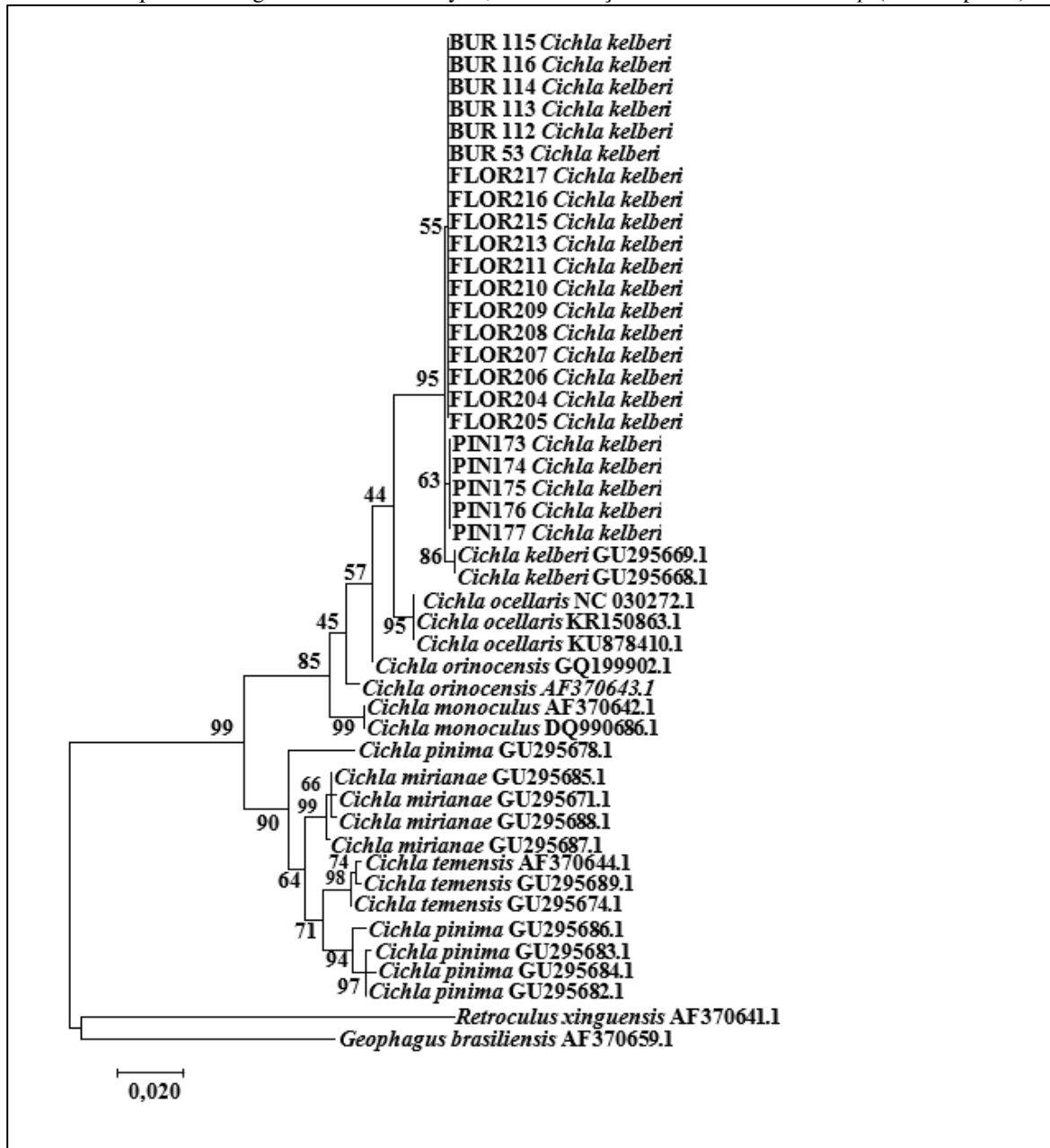
6.2.3. Relações Filogenéticas e Distância Genética

A reconstrução filogenética utilizando-se os métodos baseados em distância, evidenciou que os espécimes *Cichla kelberi*, agruparam-se em um único clado com suporte de 95% de *bootstrap* (Figura 6). Resultados semelhantes foram obtidos por Marques *et al.* (2016), em análises realizada com gênero *Cichla* do reservatório do rio Paraíba do Sul, onde foi avaliado os níveis de diversidade genética entre as populações nativas e as invasoras de *C. kelberi*, esses espécimes formaram um grupo monofilético com forte suporte de 88% de *bootstrap*.

A análise da região Cyt *b* tem sido utilizada em estudos filogenéticos, pois contém regiões de baixa e alta variabilidade, ou seja, regiões mais preservadas e regiões de domínio mais amplo (OSMAN *et al.*, 2023). Neste cenário, pode ser assim considerado um bom marcador para o estudo de identificação molecular em espécies do gênero *Cichla* (GASQUES

et al., 2015; MARQUES *et al.*, 2016). Esta região também, tem sido utilizada em pesquisas de estudo biogeográficos do gênero *Cichla* e demonstrou seu potencial para esta finalidade (WILLIS *et al.*, 2010).

Figura 6. Árvore filogenética de agrupamentos de vizinhos (NJ) utilizando o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) baseada em sequências do gene mitocondrial *Cyt b*, com indicação dos valores de *bootstrap* (1.000 réplicas).



Fonte: Elaboração própria, 2023.

A matriz de divergência genética revelou que a média intraespecífica para *C. kelberi* variou de 0 a 0,5% (Tabela 7), estando de acordo com os estudos de Santos *et al.* (2016), que utilizando o gene *Cyt b* obtiveram 0,7% de média intraespecífica para espécies do gênero *Cichla*.

Tabela 7. Médias de divergências intraespecífica (diagonal) e interespecífica para as espécies de peixes do Rio Flores, Pindaré e Buriti através do gene mitocondrial *Cyt b*.

% Divergência Genética				
Espécies	1	2	3	4
1. <i>Cichla kelberi</i> FLOR	0,0			
2. <i>Cichla kelberi</i> BURITI	0,0	0,0		
3. <i>Cichla kelberi</i> PINDARÉ	0,2	0,2	0,0	
4. <i>Cichla kelberi</i> CASIQUIARE	0,3	0,3	0,5	0,0

NC – Não calculado.

Nossos resultados confirmam a introdução de *C. kelberi* nos rios Pindaré, Flores e Buriti. Santos *et al.* (2016) através do gene *Cyt b* também detectaram populações não nativas de *C. kelberi* em grandes bacias hidrográficas: bacia do alto rio Paraná e o reservatório do rio Paraíba do Sul (BRÍÑEZ *et al.*, 2013; GASQUES *et al.*, 2015; MARQUES *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2016).

Eventos de introdução de espécies exóticas são de grande preocupação ecológica, pois podem confundir estudos que rastreiam a disseminação de populações invasoras, esse processo de introdução pode contribuir para manter as populações não nativas em altas densidades, agravando os impactos sobre a ictiofauna nativa (HAMILTON; MILLER, 2016; PFENNIG *et al.*, 2016). Nesse contexto, destaca-se a importância de marcadores moleculares como ferramentas para identificação precisa espécies invasoras de peixes, especialmente no caso de populações introduzidas (FITZPATRICK *et al.*, 2012).

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos através das análises dos genes RNA ribossomal 16S (rRNA 16S) e Citocromo *b* (Cyt *b*), conclui-se:

- ✓ Foi possível observar que houve baixa divergência genética em espécie de *Cichla kelberi*;
- ✓ Os resultados obtidos com o gene rRNA 16S apontam apenas uma linhagem para táxon *Cichla kelberi*, sendo possível inferir que os espécimes coletados nos rios: Flores, Pindaré e Buriti/MA sejam provenientes de populações nativas da bacia do rio Tocantins, pois estes agruparam com os espécimes do rio Doce e reservatório de Itumbiara, Minas Gerais, oriundos do rio Tocantins.
- ✓ Portanto, através os genes rRNA 16S e Cyt *b* indicam a ocorrência da espécie *C. kelberi* na bacia do rio Mearim e Parnaíba/MA. Sendo esses genes, uma ferramenta robusta na identificação em nível específico em peixes.

REFERÊNCIAS

- ALBERT, James San; TAGLIACOLLO, Victor Alberto; DAGOSTA, Fernando. Diversification of neotropical freshwater fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 51, p. 27-53, 2020.
- ALMEIDA, M. S.; FERREIRA, F. K. M.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. C. Identificação molecular de tucunarés (Cichlidae, Perciformes) introduzidos em bacias hidrográficas maranhenses através do DNA mitocondrial. **Coletânea Estudos Ambientais e Agrônomicos: resultados para o Brasil**, Nobre, Camila Pinheiro, Oliveira, Anna Christina Sanazario (Org). São Luís – Editora Pascal, p. 79 – 90, 2021.
- ANDRADE, Fernanda et al. Análise filogenética de duas espécies simpátricas de tucunaré (Cichla, Perciformes), com registro de hibridização em diferentes pontos da bacia Amazônica. **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**. v.1, p.1–11, 2001.
- ANDRADE, Geovana de Souza. **Biologia e ecologia comparativas de Cichla Kelberi e Cichla Piquiti (Cichliformes, Cichlidae) no reservatório da UHE de Lajeado, rio Tocantins**. 2021.
- ANTUNES, Dhenes Ferreira; ALCÂNTARA, Bruno Melo de; SANTOS, Edinalva da Silva Santos. Diversidade e Conservação de Peixes Neotropicais da Caatinga, Nordeste, Brasil- Revisão Integrativa. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 4, p. 01-01, 2021.
- AGOSTINHO, Ângelo Antônio; JÚLIO JÚNIOR, Horácio Ferreira. Peixes da bacia do alto rio Paraná. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**, p. 374-400, 1999.
- AVISE, John Charles. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Georgia: University of Georgia, **Sinauer Associates**, 2004.
- BERTOZZI, Terry et al. Anonymous nuclear loci in non-model organisms: making the most of high-throughput genome surveys. **Bioinformatics**, v. 28, n. 14, p. 1807-1810, 2012.
- BRÍÑEZ, Boris et al. Molecular identification of Cichla (Perciformes: Cichlidae) introduced in reservoirs in Southern Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 233-239, 2013.
- BRITO, Pâmella Silva de et al. Freshwater fishes of the Parque Nacional dos Lençóis Maranhenses and adjacent areas. **Biota Neotropica**, v. 19, p. e20180660, 2019.
- BRITTON, J. Robert; ORSI, Mário Luís. Non-native fish in aquaculture and sport fishing in Brazil: economic benefits versus risks to fish diversity in the upper River Paraná Basin. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 1-11, 2012.
- CALCAGNOTTO, Daniela.; SCHAEFER, Scott Allen.; DESALLE, Rob. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetic and Evolution**. v. 36, p. 135-153, 2005.

CARVALHO, Daniel Cardoso de et al. Genetic characterization of native and introduced populations of the neotropical cichlid genus *Cichla* in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 601-607, 2009.

CARVALHO, Daniel Cardoso de. **Caracterização genética de invasões biológicas: o caso do Tucunaré (*Cichla spp.*) em Minas Gerais**. 2009.

CHELLAPPA, Sathyabama.; CÂMARA, Mércia Rocha.; CHELLAPPA, Naithirithi Thiago. Ecology of *Cichla monoculus* (Osteichthyes: Cichlidae) from a reservoir in the semi-arid region of Brazil. **Hydrobiologia**, v. 504, n. 1-3, p. 267-273, 2003.

CUCHEROUSSET, Julien, OLDEN.; Julian Dimas. Ecological impacts of nonnative freshwater fishes. **Fisheries**, v. 36, n.5, p. 215–230, 2011.

DALIA, Ricardo Luiz. **Variabilidade genética e filogeografia de populações de *Prochilodus lineatus* (Pisces: prochilodontidae) das bacias dos rios Paraguai-Paraná e da bacia Amazônica**: bases para programas de conservação e de piscicultura. 2011.

DAYRAT, Benoit. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 407–415. 2005.

DIAMANTE, Nathália Alves. **Variabilidade, Estrutura e Caracterização Genética de Populações de *Cichla* de Diferentes Bacias Hidrográficas Brasileiras**. Orientador: Prof. Dr. Alberto Prioli. 2019. 72 folhas. Tese (doutorado)- Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas. Maringá-PR, 2019.

DOWIE, Nicholas Joseph et al. Development of anonymous nuclear loci for *Pterospira andromeda* (Monotropeidae) using Illumina and Ion Torrent sequencing data. **Conservation Genetics Resources**, v. 9, p. 371-373, 2017.

ESPINOLA, Luís Alberto. ***Cichla kelberi*, Kullander e Ferreira, 2006**; um piscívoro introduzido na Planície de inundação do alto rio Paraná: aplicação do modelo INVASS. 2009.

FARIAS, Izeni Pires. et al. Mitochondrial DNA phylogeny of the family Cichlidae: monophyly and fast molecular evolution of the Neotropical assemblage. **Journal of Molecular Evolution**, v. 48, p. 703-711, 1999.

FARIAS, Izeni P. et al. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. **Journal of molecular evolution**, v. 53, p. 89-103, 2001.

FELSENSTEIN, Joseph. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p.783-791, 1985.

FERREIRA, Francisca Karoline Marinho et al. **Variabilidade genética de tucunarés (*Cichlidae*, *Cichliformes*) introduzidos na bacia do rio Mearim/MA**. Coletânea SEMIC [recurso eletrônico] - UEMA produzindo conhecimento (Ciclo 2020-2021): Ciências Agrárias, Ciências Biológicas, Ciências da Saúde, Engenharias, Ciências Exatas e da Terra, volume 1 / organizadoras Marina Bezerra Figueiredo, Eliane Pinheiro de Sousa e Rita de Maria Seabra Nogueira. – São Luís: Editora UEMA, 2022.

FILHO, Francisco Lages Correia et al. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea: estado do Maranhão: relatório diagnóstico do município de Joselândia**. Teresina: Cprm – Serviço Geológico do Brasil, p. 39, 2011.

FITZPATRICK, Benjamin M. et al. What can DNA tell us about biological invasions? **Biological Invasions**, v. 14, p. 245-253, 2012.

FRAGA, Emary da Costa et al. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. **Jornal off Applied Ichthyology**, v.23, p. 598-604, 2007.

FRAGA, Emary da Costa et al. Variabilidade genética em populações naturais de *Leporinus piau* (Anostomidae, Characiformes) da bacia do Rio Itapecuru. **Revista Trópica**, v.8, n. 2, p.28-40, 2014.

FRICKE, Ron.; ESCHMEYER, William. Neil; VANDER LAAN, Richard. **Catalogo fishes: genera, species, references**. 2023. Disponível em: <http://researcharchive.Calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Versão eletrônica acessada em: 14 de junho de 2023.

FREIRE, Guilherme Martinez; FREITAS, Carlos Eduardo. **Crescimento e mortalidade de Cichla temensis do reservatório de Balbina, Amazônia Central**. Scientia Amazonia, v.2, p. 13-19, 2013.

GASQUES, Luciano Seraphim et al. A introdução do gênero Cichla [Block e Schneider, 1801] na planície de inundação do Alto Rio Paraná. Arq. **Ciências Veterinária Zoologia**. UNIPAR, Umuarama, v. 17, n. 4, p. 261-266, out. /dez. 2014.

GASQUES, Luciano Seraphim et al. Prospecting molecular markers to distinguish Cichla kelberi, C. monoculus and C. piquiti. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 37, n. 4, p. 455-462, 2015.

GOMES, Fátima et al. Innovative molecular approach to the identification of Colossoma macropomum and its hybrids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 517-526, 2012.

GUIMARÃES, Erick Cristofore; BRITO, Pâmella Silva; OTTONI, Felipe Polivanov. Peixes. In: Rubem Augusto da Paixao Dornas; Samir Gonçalves Rolim. (Org.). **Peixes**. 1ed. Belo Horizonte: Editora Rupestre, v. 1, p. 32-51, 2020.

GUIMARÃES. Erick Cristofore et al. Biodiversidade, Potencialidades Ornamentais e Guia Peixes do Rio Pindaré e suas potencialidades ornamentais Ilustrado dos Peixes da Mata Itamacaoca Município de Chapadinha-MA. In: Erick Cristofore Guimarães; Luiz Jorge Bezerra da Silva Dias. (Org.). **Biodiversidade, Potencialidades Ornamentais e Guia Ilustrado dos Peixes da Mata Itamacaoca Município de Chapadinha-MA**. 1ed. São Luís: Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos - IMESC, v. 1, p. 1-45, 2021.

HALL, Thomas A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41: 95-98, 1999.

HAJIBABAEI, Merhrdad et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends Genet**, v.23, p.167-172, 2007.

HAMILTON, Jill A.; MILLER, Joshua M. Adaptive introgression as a resource for management and genetic conservation in a changing climate. **Conservation Biology**, v. 30, n. 1, p. 33-41, 2016.

HASHIMOTO, Diogo Teruo et al. Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: Approaches for genetic management in aquaculture. **Aquaculture Research**, v. 44, n. 6, p. 876-884, 2012.

HASSAN, Shoaib et al. Molecular based identification and phylogenetic relationship by using cytochrome b gene of *Pangasius pangasius*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. 1-6, 2022.

HEBERT, Paul David. Neil; RATNASINGHAM, Sujeevan; DE WAARD, Jeremy. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B**, v. 270, p. 596–599. 51, 2003.

HICKMAN, Jacob Rodolf et al. **Princípios Integrados de Zoologia**. 16 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 536, 2016.

ICMBIO – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I / -- 1. ed.** Brasília, DF: ICMBio/ MMA, 492 p, 2018.

Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos - IMESC. **Zonificação do território** – etapa Bioma Amazônico. Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos e Cartográficos-IMESC. São Luís: IMESC, 143p, 2019.

Instituto Maranhense de Estudos Socioeconômicos Cartográficos - IMESC. **Relatório Técnico de Recursos Hídricos Superficiais: hidrografia e hidrologia do Zoneamento Ecológico Econômico do Estado do Maranhão (ZEE) - Etapa Bioma Amazônico.** DOS SANTOS, José de Ribamar Carvalho; DIAS, Luiz Jorge Bezerra da Silva.; CATUNDA, Paulo Henrique de Aragão. (coordenadores). São Luís: IMESC, 96 p, 2019.

JASER, Suhaila Karim Khalil. **Marcadores moleculares aplicados aos estudos genéticos de peixes-de-bico do Atlântico ocidental: aspectos populacionais e técnicas forenses para manejo e conservação.** Orientador: Alexandre Wagner Silva Hilsdorf. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. São Paulo- SP, p. 133, 2020.

JEPSEN, David Brun.; WINEMILLER, Kirk Owen.; TAPHORN, Donald Charles. Temporal patterns of resource partitioning among *Cichla* species in a Venezuelan blackwater river. **Journal Fish Biology** v.51, n.6, p.1085-1108, 1997.

KIMURA, Motoo. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KOVALENKO, Katya et al. Recognition of non-native peacock bass, *Cichla kelberi* by native prey: testing the naiveté hypothesis. **Biological Invasions**, v. 12, n. 9, p. 3071-3080, 2010.

KOSMANN, Cecília. **Código de barras (DNA barcode) de dípteros de interesse forense**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Entomologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.74, 2009.

KULLANDER, Sven Oscar. Cichlid Fishes of the Amazon River drainage of Peru. **Swedish Museum of Natural History**. Springer, Berlin, p. 1-431, 1986.

KULLANDER, Sven Oscar.; NIJSSEN, Han. The Cichlids of Suriname. Brill, Leiden, **Netherlands**. 1989.

KULLANDER, Sven Oscar; FERREIRA, Efrem Jorge Gondim. **A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae)**. Ichthyological Exploration of Freshwaters, v. 17, n. 4, p. 289-398, 2006.

KULLANDER, Sven O. et al. Phylogenetic relationships of species of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae) from southern South America based on the mitochondrial cytochrome b gene. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 48, n. 3, p. 248-258, 2010.

KUMAR, Sudhir et al. Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**. v. 35, p. 1547-1549, 2018.

LAYMAN, Craig.; WINEMILLER, Kirk Owen. Size-based responses of prey to piscivore exclusion in a species-rich Neotropical River. **Ecology**, v. 85, n.5, p. 1311-1320, 2004.

LOPEZ-FERNANDEZ, Héran; WINEMILLER, Kirk Owen.; HONEYCUTT, Rodney Louis. Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 55, n. 3, p. 1070-1086, 2010.

LUZ, Sandra Cristina Soares. **Identificação molecular e biologia reprodutiva do *Cichla* e suas interações morfológicas**. Tese de Doutorado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2016.

MARQUES, Antonio Carlos Paraíba Binaque et al. Genetic divergence among invasive and native populations of the yellow peacock cichlid *Cichla kelberi*. **Journal of Fish Biology**, v.89, n.6, 2016.

MARTO, Vanílvia Clementino de Oliveira; AKAMA, Alberto; PELICICE, Fernando Mayer. Feeding and reproductive ecology of *Cichla piquiti* Kullander & Ferreira, 2006 within its native range, Lajeado reservoir, rio Tocantins basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, p. 625-636, 2015.

MEDEIROS, Lucas Silva de et al. Ichthyofauna of Trairí river basin, Rio Grande do Norte state, northeastern Brazil: a century after the study of the naturalist Edwin Starks in the Papari lagoon. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 59, 2019.

MORAES, Paulo Sérgio da Silva. **DNA Barcode, da ictiofauna da bacia do rio Mearim, Maranhão, brasil**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Caxias, p. 57. 2016.

- MOUILLOT, David et al. A functional approach reveals community responses to disturbances. **Trends Ecology Evolution**. v.28, n.3, p.167–77, 2012.
- MOURÃO, Andrea Abrigato Freitas. **Caracterização citogenética e molecular das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* e seu possível híbrido interespecífico, coletados em ambientes naturais/ Botucatu**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2013.
- MOURÃO, Andrea Abrigato Freitas et al. Molecular and morphological approaches for species delimitation and hybridization investigations of two *Cichla* species. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 107, 2017.
- NELSON, Joseph Schieser. Fishes of the world. New York: **John Wiley & Sons, Inc.**, 600p. 1994.
- NELSON, Joseph S.; GRANDE, Terry C.; WILSON, Mark VH. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016.
- NOVAES, José Luis Costa; CARAMASHI, Érica Pellegrini; WINEMILLER, Kirk Owen. Feeding of *Cichla monoculus* Spix, 1829 (Teleostei: Cichlidae) during and after reservoir formation in Tocantins River, Central Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.16, n.1, p. 41-49, 2004.
- OLIVEIRA, Viviane Fatima et al. Obtaining 5S rDNA molecular markers for native and invasive *Cichla* populations (Perciformes - Cichlidae), in Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 30, n. 1, p. 83-89, 2011.
- OLIVEIRA, Daniela José de. **Identificação de populações e de padrões de migração de *Prochilodus lineatus* no ecossistema dos rios Mojiguaçu, Pardo e Grande com o uso de marcadores genéticos moleculares**. 2018.
- OLSON, Zachary H.; WHITTAKER, Donald G.; RHODES JR, Olin. E. The use of molecular markers in wild sheep research in North America: a review. **Proceeding of the Northern Wild Sheep and Goat Council Biennial Symposium**, v.16, p.251–269, 2009.
- OSMAN, Nurul Fizatul Nabilah et al. Development of Species-Specific *Cichla* Species eDNA Primers for Rapid Alien Invasive Species (AIS) Monitoring. In: **3rd International Conference on Biology, Science and Education (IcoBioSE 2021)**. Atlantis Press, p. 39-50, 2023.
- PALUMBI, Stephen Robert et al. **The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0, privately published document compiled by S. Palumbi**. Department Zoology, Univ. Hawaii, Honolulu, 1991.
- PALUMBI, Stephen Robert et al. **The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0, privately published document compiled by S. Palumbi**. Department Zoology, Univ. Hawaii, Honolulu, 1996.
- PALUMBI, Stephen Robert et al. **The simple fool's guide to PCR ver. 2.0**. University of Hawaii Honolulu, 2002.

PARKER, Patrícia et al. **What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker.** *Ecology*, Durham, v.79, n.2, p.361-382, 1998.

PELICICE, Fernando Mayer; AGOSTINHO, Ângelo Antônio. **Fish fauna destruction after the introduction of a nonnative predator (*Cichla kelberi*) in a Neotropical reservoir.** *Biological Invasions*, v.11, p. 1789 – 1801, 2009.

PÉREZ, Gustavo A. Concheiro et al. Phylogeny and biogeography of 91 species of heroine cichlids (Teleostei: Cichlidae) based on sequences of the cytochrome b gene. **Molecular phylogenetics and Evolution**, v. 43, n. 1, p. 91-110, 2007.

PFENNIG, Karin S.; KELLY, Audrey L.; PIERCE, Amanda A. Hybridization as a facilitator of species range expansion. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1839, p. 20161329, 2016.

PIVELLO, Vânia Regina. The use of fire in the cerrado and Amazonian rainforests of Brazil: past and present. **Fire Ecology**, v.7, p.24–39, 2011.

PRADO, Fernanda Dotti et al. Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two catfish species (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. **Fisheries Research**, v. 125, p. 300-305, 2012.

PUGEDO, Marina Lages et al. Integrative taxonomy supports new candidate fish species in a poorly studied neotropical region: the Jequitinhonha River Basin. **Springer**, v. 144, p. 341–349, 2016.

QUADROS, Janice et al. Comparative cytogenetic of six species of Amazonian Peacock bass (*Cichla*, Cichlinae): intrachromosomal variations and genetic introgression among sympatric species. **Comparative Cytogenetics**, v. 14, n. 3, p. 437-451. 2020.

QURAIISHIA, Siti Farah et al. Caracterização molecular de espécies de peixes marinhos da Malásia utilizando a sequência parcial de marcadores de RNAr 12S e 16S de DNA mitocondrial. **Sains Malaysiana**, v. 44, n. 8, p. 1119-1123. 2015.

RAMOS, Maíce Giovanini. **DNA Barcoding na identificação de espécies de tubarões exploradas comercialmente no litoral de São Paulo.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia) – Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, 2016.

REBÊLO, José Manuel Macario; RÊGO, Márcia Maria Corrêa; ALBUQUERQUE, Patrícia Maia Corrêa. **Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) da região setentrional do estado do Maranhão, Brasil.** *Apoidea Neotropical*, p.265-278, 2003.

REISS, Paul et al. Color pattern variation in *Cichla temensis* (Perciformes: Cichlidae): resolution based on morphological, molecular, and reproductive data. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 1, p. 59-70, 2012.

REIS, Roberto E. et al. **Fish Biodiversity and Conservation in South America.** *Journal of fish biology*, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

ROZAS, Julio et al. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v.19, p. 2496-2497, 2017.

- SAAD, Yasser Mormani. Análise das variações da sequência de DNA ribossomal mitocondrial 16S e das relações filogenéticas entre alguns peixes Serranidae. **South African Journal of Animal Science**, v. 49, n. 1, p. 80-89, 2019.
- SABAJ, Mark Henry et al. *Cichla cataractae* (Cichliformes: Cichlidae), new species of peacock bass from the Essequibo Basin, Guyana and Venezuela. **Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia**, v. 167, n.1, p.69–86, 2020.
- SAITOU, Naruya; NEI, Masatoshi. O método de neighbor-joining: um novo método para a reconstrução de árvores filogenéticas. **Molecular Biology Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SANGER, Frederick; NICHLEN, Silver.; COULSON, Alan Rider. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, p. 5463-5468, 1977.
- SANTOS, Luciano Neves et al. First record of the invasive blue peacock cichlid *Cichla piquiti* Kullander and Ferreira 2006 (Cichliformes: Cichlidae) in the Paraíba do Sul river basin, south eastern Brazil. **BioInvasions Record**, v. 5, n. 4, 2016.
- SHARP, Diana Moreira Tereza et al. Tropical fish community does not recover 45 years after predator introduction. **Ecology**, v. 98, p. 412–424. 2017.
- SILVA, Maria Raimunda Chagas et al. Quality of the water from the Pindare river Basin, In the facts corresponding to the municipalities of Pindare Mirim, Tufilandia and Alto Alegre In the State of Maranhão. **Revista Águas Subterrâneas**, v. 1, n. 4, p. 347-354, 2017.
- SOUZA, Daiane Machado. **Estimativa da diversidade genética do peixe-rei (*Odontesthes humensis* e *Odontesthes bonariensis*) por marcadores de microssatélite e CYTB nas lagoas Mirim e Mangueira no Rio Grande do Sul**. Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Elisei Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, p.58,2020.
- SPARKS, John S. Molecular phylogeny and biogeography of the Malagasy and South Asian cichlids (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 30, n. 3, p. 599-614, 2004.
- SPARKS, John S.; SMITH, Wm Leo. Phylogeny and biogeography of cichlid fishes (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). **Cladistics**, v. 20, n. 6, p. 501-517, 2004.
- STAECK, Wolfgang; LINKE, Horst. Large Cichlids: American Cichlids II, A Handbook for their identification, care and breeding. Tetra-Verlag. Melle, **Germany**, 216p, 1985.
- STOECKLE, Mark; WAGGONER, Paul Ernandes.; AUSUBEL, Jesse Huntley. **Barcoding life**, illustrated. Goals, rationale, disponível em (www.barcoding.si.edu), 2005.
- TEIXEIRA, Aylton Santurnino; OLIVEIRA, Suzana da Silva de. Evidence for a natural hybrid of peacock bass (*Cichla monoculus* vs *Cichla temensis*) based on esterase electrophoretic patterns. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 1, p. 74-83, 2005.
- TREBACH, Rafael Hencke et al. Dna barcoding: uma ferramenta de apoio molecular para identificação de espécies de peixes. São Gabriel, RS, **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 2, p. 77-81, 2015.

THOMSON, Robert Craig; WANG, Ian J.; JOHNSON, Jarrett Reed. Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 11, p. 2184-2195, 2010.

THOMPSON, Julie Dawn; HIGGINS, Desmond Gerar; GIBONS, Toby Jhonson. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

VITULE, Jean Ricardo Simões; PRODOCIMO, Viviane. Introdução de espécies não nativas e invasões biológicas. **Estudos de Biologia**, v. 34, n. 83, p. 225-237, 2012.

VLIEGER, Isis Tamara. **Distribuição do ictioplâncton no médio rio Uruguai, município de São Borja (RS, BRASIL)**. Cerro Largo, 2017. Disponível em :< <http://rd.uffs.edu.br/bits/tream/prefix/2606/1/Vlieger.pdf>>. Acesso em: 04. jan. 2021.

VU, Quyen et al. Molecular phylogeny of catfishes (teleostei: Siluriformes) inferred from mitochondrial markers—implications for lower Mekong River basin. **European Journal of Advanced Research in Biological and Life Sciences Vol**, v. 6, n. 3, 2018.

WILLIS, Stuart Carl et al. Systematics, biogeography, and evolution of the neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 44, n. 1, p. 291-307, 2007.

WILLIS, Stuart Carl et al. The Casiquiare river acts as a corridor between the Amazonas and Orinoco river basins: biogeographic analysis of the genus *Cichla*. **Molecular ecology**, v. 19, n. 5, p. 1014-1030, 2010.

WILLIS, Stuart Carl et al. Simultaneous delimitation of species and quantification of interspecific hybridization in Amazonian peacock cichlids (genus *Cichla*) using multi-locus data. **BMC evolutionary biology**, v. 12, n. 1, p. 1-24, 2012.

WINEMILLER, Kirk Owen; TAPHORN, Donald Charles.; BARBARINO-DUQUE, Aniello. Ecology of *Cichla* (Cichlidae) in two blackwater rivers of southern Venezuela. **Copeia**, p. 690-696, 1997.

WINEMILLER, Kirk Owen. Ecology of peacock cichlids (*Cichla* spp.) in Venezuela. J. Aquaric. Aquatic Science: **Cichlid Research: State of the Art IX**, 93–112. 2001.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela suplementar 1. Números de acesso do GenBank do gene rRNA 16 S para espécies do gênero *Cichla*.

Espécies	Localidades	Acesso GenBank rRNA 16 S	Referência
<i>Cichla kelberi</i>	Rio Doce, Minas Gerais	FJ904291.1	
<i>Cichla kelberi</i>	Reservatório Itumbiara, Minas Gerais	DQ779581.1	Carvalho <i>et al.</i> , 2009
<i>Cichla ocellaris</i>		AY263831.1	Sparks, 2004
<i>Cichla ocellaris</i>		KR150863.1	Musilova, Staros Tova, 2015
<i>Cichla ocellaris</i>		NC030272.1	
<i>Cichla ocellaris</i>		KU878410.1	Lin, Mu, Shi, 2016
<i>Cichla orinocensis</i>		AF049018.1	
<i>Cichla monoculus</i>		AF049017.1	Farias <i>et al.</i> , 1999
<i>Cichla monoculus</i>	Rio Solimões, Amazona	FJ904288.1	Carvalho <i>et al.</i> , 2009
<i>Cichla monoculus</i>	Vietña	MH699844.1	Vu <i>et al.</i> , 2018
<i>Cichla intermedia</i>		GU737116.1	
<i>Cichla temensis</i>	Rio Cinaruco, Venezuela	GU737114.1	López-Fernández, Winemiller, Honeycutt, 2010
<i>Cichla temensis</i>		AF049019.1	Farias <i>et al.</i> , 1999
<i>Cichla temensis</i>		AY662729.1	Sparks, 2004
<i>Cichla temensis</i>		GU817247.1	Chakrabarty, Albert, 2010
<i>Cichla</i> sp.		AF112640.1	Farias, Meyer, Orti, 1998
<i>Cichla piquiti</i>	Rio Tocantins, Reservatório Tucuri, Pará.	FJ904286.1	Carvalho, 2009
<i>Cichla piquiti</i>	Rio Grande, Reservatório de Furnas, Minas Gerais.	FJ904287.1	
<i>Cichla piquiti</i>	Lagoa Marginal São Francisco, Minas Gerais.	DQ779579.1	Carvalho <i>et al.</i> , 2009
<i>Retroculus xinguensis</i>		AF049012.1	Farias <i>et al.</i> , 1999
<i>Geophagus brasiliensis</i>		GU737148.1	López-Fernández, Winemiller, Honeycutt, 2010

Tabela suplementar 2. Números de acesso do GenBank do gene *Cyt b* para espécies do gênero *Cichla*.

Espécies	Localidades	Acesso GenBank Cyt b	Referência
<i>Cichla kelberi</i>	Rio Casiquiare	GU295669.1	
<i>Cichla kelberi</i>	(corredor entre os rios Amazonas e Bacias do rio Orinoco)	GU295668.1	Willis <i>et al.</i> ,2010
<i>Cichla ocellaris</i>		KR150863.1	Musilova, Staros Tova, 2015
<i>Cichla ocellaris</i>		NC030272.1	
<i>Cichla ocellaris</i>		KU878410.1	Lin, Mu, Shi, 2016
<i>Cichla orinocensis</i>		AF370643.1	Farias <i>et al.</i> ,2001
<i>Cichla orinocensis</i>		GQ199902.1	Kullander <i>et al.</i> , 2010
<i>Cichla monoculus</i>		AF370642.1	Farias <i>et al.</i> ,2001
<i>Cichla monoculus</i>		DQ990686.1	Perez <i>et al.</i> , 2007
<i>Cichla pinima</i>		GU295678.1	
<i>Cichla pinima</i>	Rio Casiquiare	GU295686.1	
<i>Cichla pinima</i>	(corredor entre os rios Amazonas e Bacias do rio Orinoco)	GU295683.1	
<i>Cichla pinima</i>		GU295684.1	
<i>Cichla pinima</i>		GU295682.1	Willis <i>et al.</i> ,2010
<i>Cichla mirianae</i>		GU295685.1	
<i>Cichla mirianae</i>	Rio Casiquiare	GU295671.1	
<i>Cichla mirianae</i>	(corredor entre os rios Amazonas e Bacias do rio Orinoco)	GU295688.1	
<i>Cichla mirianae</i>		GU295687.1	
<i>Cichla temensis</i>		AF370644.1	Farias <i>et al.</i> ,2001
<i>Cichla temensis</i>	Rio Casiquiare	GU295689.1	
<i>Cichla temensis</i>	(corredor entre os rios Amazonas e Bacias do rio Orinoco)	GU295674.1	Willis <i>et al.</i> ,2010
<i>Retroculus xinguensis</i>		AF370641.1	
<i>Geophagus brasiliensis</i>		AF370659.1	Farias <i>et al.</i> ,2001

**CAPÍTULO I: VARIABILIDADE GENÉTICA DE TUCUNARÉS (CICHLIDAE,
CICHLIFORMES) INTRODUZIDOS NA BACIA DO RIO MEARIM/MA.**

Coletânea SEMIC [recurso eletrônico] - UEMA PRODUZINDO CONHECIMENTO (Ciclo 2020-2021): Ciências Agrárias, Ciências Biológicas, Ciências da Saúde, Engenharias, Ciências Exatas e da Terra, volume 1 / organizadoras Marina Bezerra Figueiredo, Eliane Pinheiro de Sousa e Rita de Maria Seabra Nogueira. – São Luís: Editora UEMA, 2022.

ISBN: 978-85-8227-278-7 (E-book)



SEMIC

XXXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - UEMA

UEMA PRODUZINDO CONHECIMENTO

(Ciclo 2020-2021)

**CIÊNCIAS AGRÁRIAS, CIÊNCIAS BIOLÓGICAS,
CIÊNCIAS DA SAÚDE, ENGENHARIAS,
CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA**

VOLUME I

**Comissão Organizadora:
Marina Bezerra Figueiredo
Eliane Pinheiro de Sousa
Rita de Maria Seabra Nogueira**



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



**UEMA PRODUZINDO
CONHECIMENTO
(Ciclo 2020-2021)**

**CIÊNCIAS AGRÁRIAS,
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS,
CIÊNCIAS DA SAÚDE,
ENGENHARIAS,
CIÊNCIAS EXATAS E
DA TERRA
Vol. I**



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



EDITORA LEMA



FAPENIA
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão
Ciências e Tecnologia do Maranhão



CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



FAPEAD
FUNDAÇÃO DE APOIO
ÀS CIÊNCIAS, CULTURA E ESPORTE

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE TUCUNARÉS (CICHLIDAE,
CICHLIFORMES) INTRODUZIDOS NA BACIA DO RIO
MEARIM/MA.542**

Francisca Karoline Marinho Ferreira

Marcelo Silva de Almeida

Maria Claudene Barros

Elmary da Costa Fraga

VARIABILIDADE GENÉTICA DE TUCUNARÉS (CICHLIDAE, CICHLIFORMES) INTRODUZIDOS NA BACIA DO RIO MEARIM/MA.

Francisca Karoline Marinho Ferreira¹

Marcelo Silva de Almeida²

Maria Claudene Barros³

Elmary da Costa Fraga⁴

INTRODUÇÃO

Cerca de 60.000 espécies de vertebrados já foram descritas, destas 32.000 (53%) são peixes, e esse número só faz crescer ano a ano, sendo que o Brasil é um dos países que lideram novas descobertas (NELSON *et al.*, 2016). Nenhum outro grupo animal iguala os peixes no seu domínio dos mares, lagos e rios (HICKMAN *et al.*, 2016). O Brasil abriga grande parte dos peixes neotropicais, com 4.697 espécies já registradas (FROESE; PAULY, 2019). A alta diversidade de peixes de água doce do Brasil deve-se principalmente à presença de grandes sistemas hidrográficos, com considerável distinção ictiofaunística entre si, além de apresentar condições climáticas apropriadas (ICMBIO, 2016). Entretanto, deve-se enfatizar que o número de espécies para o país tende a aumentar, pois as amostragens ainda são insuficientes e muitas áreas permanecem inexploradas (ALVES *et al.*, 2014), como é o caso dos afluentes Flores e Pindaré da bacia do rio Mearim/MA.

Entre os vários grupos encontrados na região Neotropical um dos mais importantes é a família Cichlidae, pertencente à ordem Cichliformes, apresenta espécies que vão desde pequeno até grande porte. Caracteriza-se como uma das mais diversas nos ecossistemas de água doce, com 1.707 espécies (CAS, 2017). Esta família tem sido objeto de muitas pesquisas filogenéticas (LOPEZ-FERNANDEZ *et al.*, 2010).

As espécies do gênero *Cichla* (tucunarés) estão entre os predadores mais conspícuos possuindo grande plasticidade fenotípica e oferecem cuidados com sua prole, motivos estes que as tornam invasoras de alto impacto ambiental (GASQUES *et al.*, 2014). Estes peixes distribuem-se nas bacias da Amazônia, Tocantins e Orinoco, além de rios menores que drenam as Guianas até o Oceano Atlântico. São registrados ainda nos rios Paraná, Paraguai, Paraíba do

¹ Graduando em Ciências Naturais, Centro de Estudos Superiores de Caxias – CESC/UEMA; Bolsista PIBIC/UEMA, Caxias-MA.

² Pós-Graduando em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, São Luís-MA.

³ Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Pará, Centro de Estudos Superiores de Caxias CESC/UEMA, Caxias-MA.

⁴ Doutor em Genética e Biologia Molecular Universidade Federal do Pará, Centro de Estudos Superiores de Caxias – CESC/UEMA, Caxias-MA

Sul e Paraguai. O gênero compreende 15 espécies reconhecidas por caracteres externos, dos quais o padrão cor e os caracteres merísticos são os mais significativos (KULLANDER; FERREIRA, 2006).

Os tucunarés estão entre os principais recursos para alimentação e pesca esportiva em várias regiões do continente sulamericano (KULLANDER; FERREIRA, 2006), sendo então, peixes alóctones quando introduzidos em diversas bacias que não são de sua origem no Brasil (AGOSTINHO; JÚLIO JR, 1999; CHELLAPPA *et al.*, 2003; KOVALENKO *et al.*, 2010) e podem impactar significativamente comunidades nativas devido ao seu comportamento agressivo e piscívora voraz (AGOSTINHO *et al.*, 2007) podendo colonizar rapidamente ambientes com condições favoráveis (FUGI *et al.*, 2008).

A introdução de espécies de peixes, seja intencional ou não, pode têm um impacto negativo nas comunidades locais (PELICICE; AGOSTINHO, 2009; SHARP *et al.*, 2017), o fato de as 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 (PIVELLO, 2011). No Brasil pouco é conhecido sobre a origem das populações de tucunarés introduzidos, bem como, sua identificação taxonômica e número de indivíduos (ALMEIDA *et al.*, 2008). Em várias regiões tem sido utilizado para peixamentos em barragens e açudes, por ter uma carne excelente e apresentar qualidades para a pesca esportiva (NASCIMENTO; CATELLA; MORAES, 2002).

A falta de conhecimento deixa evidente a grande necessidade de intensificar esforços e com isso desenvolver pesquisas a fim de suprir essa insuficiência (VLIEGER, 2017).

Propostas para amenizar esse problema incluem abordagens como a taxonomia integrativa (DAYRAT, 2005) e “turbo-taxonômico” (RIEDEL *et al.*, 2013) nas quais a identificação baseada no DNA atrela-se à descrição morfológica e imagens de alta resolução (PUGEDO *et al.*, 2016). A identificação de espécimes em nível específico permite a descoberta de novas espécies, um indicativo a ser investigado nessa bacia (MORAES, 2016).

Diante disso, 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). E, dentre as ferramentas utilizadas neste tipo de estudo está a genética molecular. Portanto, diversos genes ou regiões do DNA têm sido historicamente empregados como marcadores moleculares para a identificação de espécies com base em suas

divergências genéticas – tais como o rRNA 16S e o Citocromo *b* obtidos do genoma mitocondrial (HAJIBABAEI *et al.*, 2007).

Com isso, estudos genéticos de populações de *Cichla* (tucunaré), introduzidas nas bacias maranhenses e seus afluentes, são de amplo valor ecológico, por fornecerem informações que poderão auxiliar para uma melhor caracterização taxonômica e nortear métodos de manejo e estudos de ecologia apropriados as espécies do gênero. Portanto, o presente estudo tem como proposta identificar e caracterizar variabilidade genética espécies do gênero *Cichla* introduzidas na bacia do rio Mearim- MA, dessa forma buscando contribuir com o conhecimento dos estoques de tucunaré introduzido em bacias hidrográficas maranhenses e inferir quanto a sua origem.

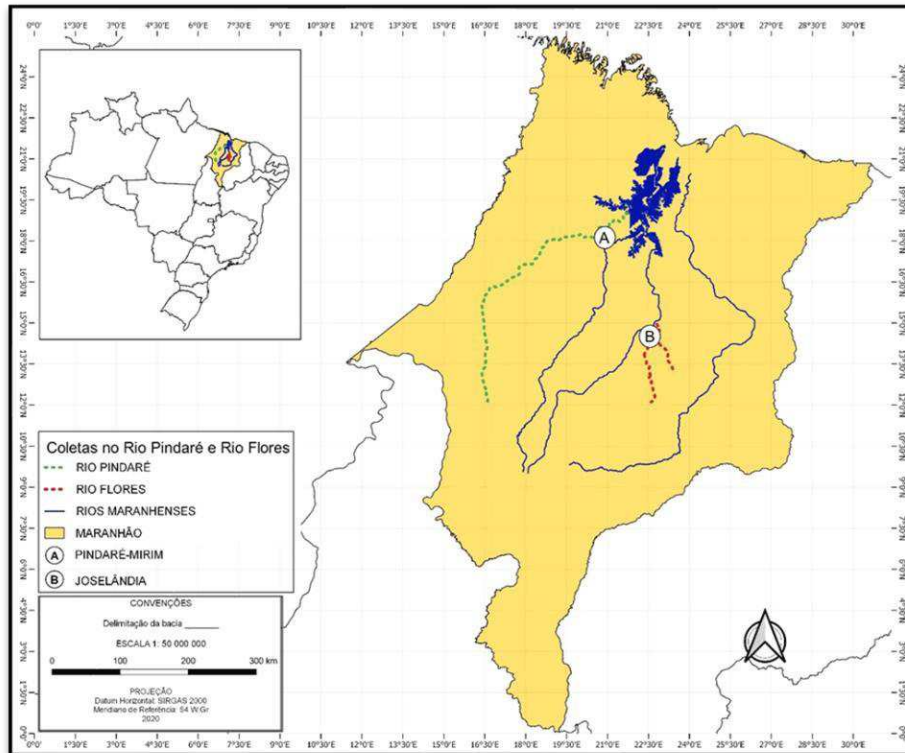
METODOLOGIA

Área de estudos e obtenção das amostras

As amostras dos espécimes de Tucunaré foram obtidas no rio Flores, afluente do rio Mearim, localizado no município de Josêlandia/MA. As coordenadas geográficas do rio Flores estão em latitude 05°05'508"S, longitude 044°39'811"W e com altitude de 68m. Os cursos d'água da região fazem parte da bacia hidrográfica do Mearim (IMESC, 2008). O rio Flores compõe o alto Mearim, afluente pela margem direita, com uma extensão aproximada de 400 km (FILHO *et al.*, 2011).

Amostras do rio Pindaré foram coletadas nas seguintes coordenadas 3°39'54"S e 45°25'31"W pertencente ao município de Pindaré-Mirim (Figura 1). Este rio é o principal afluente do rio Mearim e nasce nas elevações que formam o divisor entre as bacias Mearim e Tocantins. Com aproximadamente 686 Km², sendo navegável no trecho compreendido entre a sua foz no Km 41 do rio Mearim até a foz do rio Buriticupu no Km 456 (STELLA, 2011).

Figura 1. Localização dos rios Flores e Pindaré/MA onde foram obtidos os espécimes. Ponto A: Rio Pindaré; ponto B: Rio



Fonte: Adaptado por Teixeira (2020) no programa Quantum GIS 2.6.0.

Coleta do material

As amostras foram coletadas utilizando-se instrumentos de pesca como redes de malhadeiras e tarrafas. Os espécimes coletados foram acondicionados em sacos plásticos e transportados em gelo ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL) do Centro de Estudos Superiores de Caxias da Universidade Estadual do Maranhão - CESC/UEMA.

Os peixes coletados foram etiquetados, fotografados e retirouse amostras de tecido muscular. Os tecidos foram preservados em álcool 80% e mantidos sob refrigeração a 20°C. Os exemplares foram fixados em formalina 10% e conservados em álcool 70%. A identificação taxonômica foi realizada com o auxílio de literatura específica (KULLANDER; FERREIRA, 2006). Os espécimes encontram-se depositados no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do CESC/UEMA.

Técnicas moleculares

O DNA total foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA Purification Promega seguindo as instruções do fabricante. O isolamento e amplificação da região do genoma mitocondrial rRNA 16S e Cyt *b*, a partir de DNA total foi realizado através da técnica de Reação

em Cadeia da Polimerase (PCR) usando *primers* específicos para cada gene, para o gene **16S**: 16SL1987: ‘5-GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC-3’, 16SH2609:5’CCGGCTGAACTCAG ATCACGT-3’ (PALUMBI *et al.*, 1996); e o gene **Cyt b**: LNF: 5’- GACTTGAAAAACCAAYC GTTGT-3’, H08R2: 5’- GCTTTGGGAGTTAGDGGTGGGAGTTAGAATC-3’ (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Inicialmente ocorreu um ciclo de desnaturação de 5 minutos a 94°C e no final uma extensão de 7 minutos a 72°C. Os produtos da PCR serão visualizados em minigel de agarose a 1%. Os produtos das PCRs foram purificados utilizando-se o kit “*ExoSap-IT*” seguindo as recomendações do fabricante e em seguida submetidos à uma reação de sequenciamento de DNA seguindo o método de Sanger *et al.* (1977) utilizando o Kit “*Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems)”. Após a precipitação os produtos foram submetidos à eletroforese em um sequenciador automático de DNA (ABI 3500).

Análise dos dados

As sequências de DNA foram editadas e alinhadas no Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994) do programa BioEdit 7.0 (HALL, 1999). A composição nucleotídica, matriz de distância genética e análises filogenéticas, foram geradas no programa MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018) utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos (SAITOU; NEI, 1987) e o modelo Kimura2-parâmetros (K2P). A significância dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* (1000 réplicas) (FELSENSTEIN, 1985). O número de sítios conservados e variáveis, diversidades haplotípicas e nucleotídicas foram obtidos por meio do programa DnaSP v6.10.01 (ROZAS *et al.*, 2017). Foram utilizadas como grupo externo sequências *Cichla monoculus* (MH699844.1) e *Cichla piquiti* (DQ779579.1) para o gene rRNA16S e para gene *Cyt b* *Cichla monoculus* (AF370642.1) e *Cichla temensis* (AF370644.1) obtidas do Genbank.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 18 sequências de Tucunaré, pertencentes à ordem Cichliformes, a família Cichlidae, gênero *Cichla*. (Quadro 1).

Quadro 1. Relação dos táxons coletados nos rios Flores e Pindaré /MA.

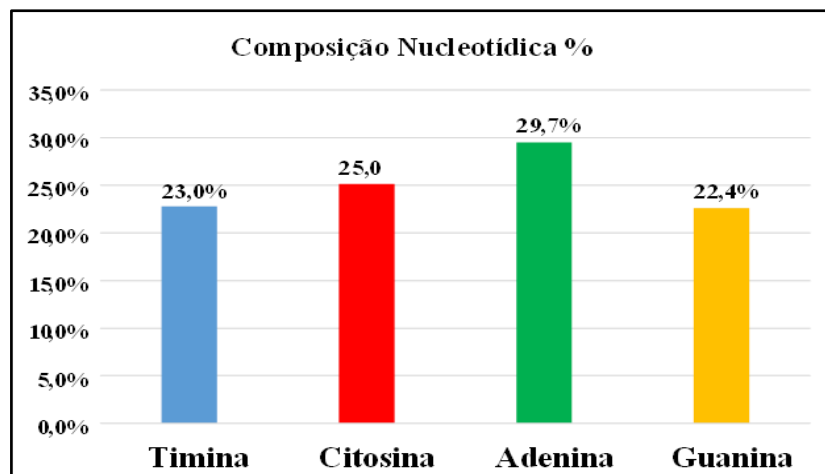
Bacias Hidrográficas	Táxons	Nº Amostral
Bacia do Pindaré	<i>Cichla kelberi</i>	5
Rio Flores	<i>Cichla kelberi</i>	13
Total		18

Fonte: Elaboração própria (2021)

Gene rRNA 16S

Obteve-se um fragmento de 549 pares de bases do gene mitocondrial rRNA 16S para 18 espécimes utilizados nesta análise. Sendo verificados 537 sítios conservados, 12 sítios variáveis e 12 informativos para parcimônia. A composição nucleotídica encontrada foi de 23% de timina, 25% de citosina, 29,7% de adenina e 22,4% de guanina (Gráfico 1). Análise resultou em um único haplótipo com diversidade haplotípica e nucleotídica de 0.

Gráfico 1. Composição média de nucleotídeos das sequências do gene rRNA 16s dos peixes da bacia do rio Flores.

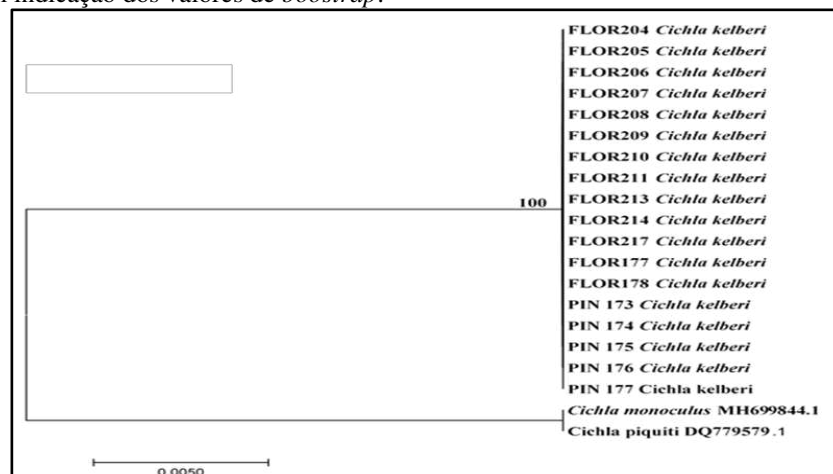


Fonte: Elaboração própria (2021)

Relações Filogenéticas e Distância Genética

A reconstrução filogenética utilizando-se os métodos baseados em distância (Agrupamentos de Vizinhos –NJ), evidenciou a ocorrência de um clado fortemente suportado com 100% de *bootstrap*, agrupando os espécimes de *Cichla kelberi* do rio Flores e Pindaré (Figura 2).

Figura 2. Árvore filogenética de agrupamentos de vizinhos (NJ) baseada em *sequências* do gene mitocondrial rRNA 16S, com indicação dos valores de *bootstrap*.



Fonte: Elaboração própria(2021).

Estudos realizados por Almeida *et al.* (2021) através do DNA Mitocondrial na identificação molecular de tucunaré introduzidos em bacias maranhenses, encontraram resultados similares ao descrever que os indivíduos considerados pertencentes à mesma espécie se agruparam em conjuntos coerentes com a formação de clados fortemente suportados com 100% de *bootstrap*.

Portanto, a identificação precisa das espécies de peixes constitui o primeiro passo para o sucesso em programas de manejo e conservação de recursos pesqueiros (LUDWIG, 2006). Assim, a utilização de regiões do genoma mitocondrial (rRNA 16S) tem sido bastante informativa em estudos filogenéticos de peixes que apresentam taxonomia problemática (SANTOS *et al.*, 2003; VINSON *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2006b; FRAGA *et al.*, 2007).

A média K2P de divergência genética intraespecífica para o gene rRNA 16S foi de 0%. O princípio para identificação de espécies fundamentado em dados moleculares depende da competência de distinguir a variação intraespecífica da variação interespecífica (CYWINSKA *et al.*, 2006).

O gene rRNA 16S que faz parte da grande subunidade ribossomal do DNA mitocondrial (PALUMBI *et al.*, 1996) também tem se mostrado um bom marcador para análises de diferenciação de peixes, como em estudos comparativos intergenéricos e interespecíficos (CALCAGNOTTO *et al.*, 2005; FRAGA *et al.*, 2007; FRAGA *et al.*, 2014). Sendo o seu uso utilizado com sucesso em estudos filogenéticos de diversos grupos de vertebrados, como em peixes (CALCAGNOTTO *et al.*, 2005).

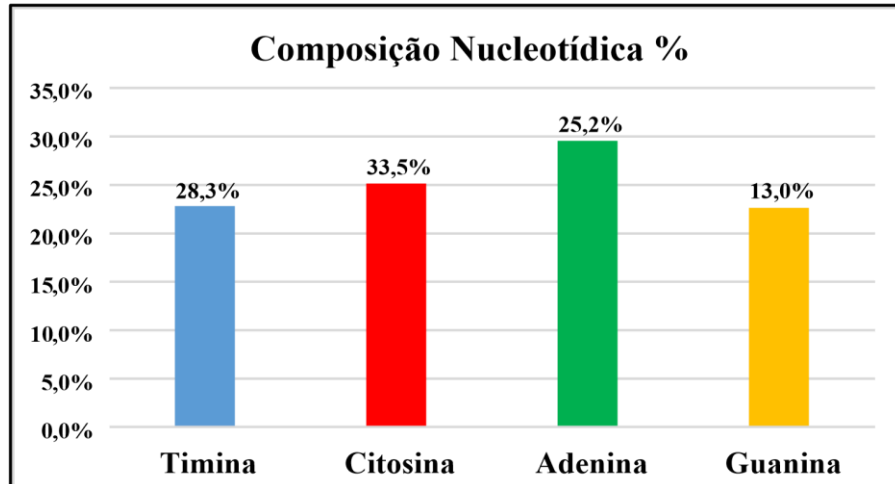
Gene Cyt *b*

Análise do Fragmento e Composição Nucleotídica Cyt *b*

Um fragmento de 1066 pares de base do gene Cyt *b* foi obtido para 18 espécimes de tucunarés analisados, sendo trezes sequências do rio Flores, cinco do rio Pindaré.

Foram observados 981 sítios conservados, 85 variáveis e 12 informativos para parcimônia, a composição nucleotídica foi de 28,3% timina (T), 33,5% citosina (C), 25,2% adenina (A) e 13,0% guanina (G) (Gráfico 2). Análise resultou em dois haplótipos com diversidade haplotípica de 0,4 e nucleotídica de 0,5.

Gráfico 2. Composição média de nucleotídeos das sequências do gene *Cyt b* dos peixes da bacia do rio Flores e Pindaré.

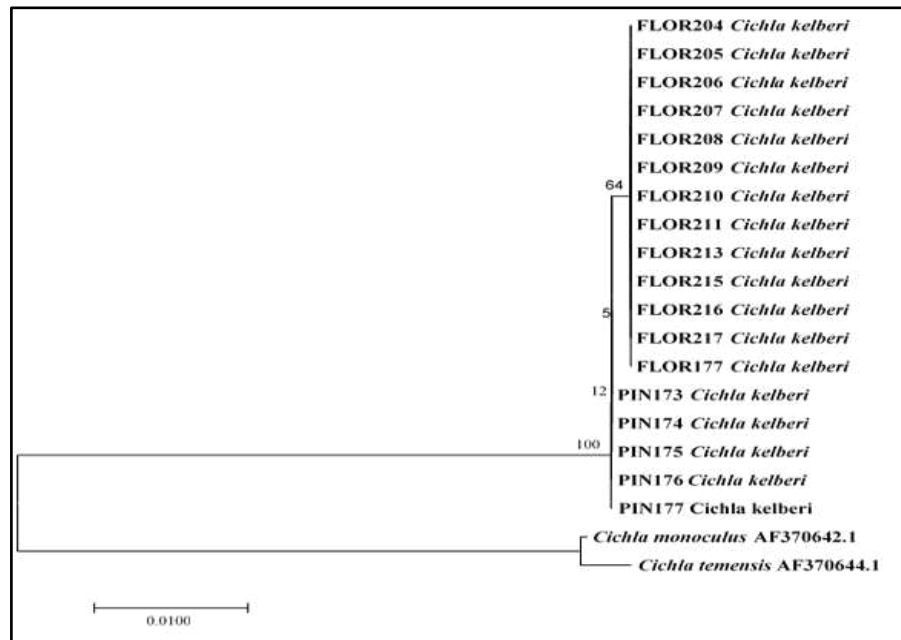


Fonte: Elaboração Própria (2021)

Relações Filogenéticas e Distância Genética

Os resultados mostraram que os espécimes *Cichla kelberi*, agruparam-se em um único clado com suporte de 100% de *bootstrap*, apresentando também um subclado de 64% (Figura 3).

Figura 3. Árvore filogenética para o gene *Cyt b* obtida através do modelo GTR+I+G, rodadas 5 000 000 gerações. O suporte dos ramos foi estimado através do teste aproximado de Verossimilhança “Shimodaira-Hasegawa - like interpretation”.



Fonte: Elaboração própria (2021).

Através da análise do gene *Cyt b* Marques *et al.* (2016) e Santos *et al.* (2016) evidenciaram em seus estudos que houve a formação de um grupo monofilético na reconstrução

filogenética com alto suporte de *bootstrap* para os haplótipos de *C. kelberi* do reservatório de Paraíba do Sul, no qual a distância genética interespecífica encontrada foi de 1,7% vezes maior que a divergência genética média dentro das espécies. Diante da análise, é possível observar a ausência da divergência intraespecífica e interespecífica para o gene *Cyt b*, por ter apresentado apenas uma espécie.

A análise da região *Cyt b* tem sido utilizada em estudos filogenéticos por conter regiões de baixa e alta variável, ou seja, regiões mais preservadas e regiões de domínio mais amplo. Pode ser considerado um bom marcador para o estudo da filogenia molecular em famílias monofiléticas (FARIAS *et al.*, 2001; GENNER *et al.*, 2007; MUSILOVÁ *et al.*, 2008; SMITH *et al.*, 2008; PUEBLA, 2009).

Estudos genéticos/moleculares são usados para traçar rotas de introduções de espécies e com base nessas informações auxiliar na classificação taxonômica das mesmas. Tais dados são subsídios relevantes para a tomada de decisões sobre políticas de conservação e sobre medidas que visem reduzir impactos ambientais (CARVALHO *et al.*, 2009).

Portanto, mais estudos das populações invasivas de *C. kelberi* são necessários, incluindo estudos taxonômicos e genéticos que podem ajudar a rastrear a origem das introduções e auxiliar no manejo (FITZPATRICK *et al.*, 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos, os genes utilizados no trabalho constituem bons marcadores moleculares na caracterização dos estoques de *Cichla*, nos quais foi possível observar baixos valores de variabilidade genética nas análises dos diferentes marcadores (Cyt *b* e rRNA 16S).

Os resultados apontam apenas uma linhagem para o táxon *Cichla kelberi*. Portanto, fragmentos do gene rRNA 16S e Cyt *b* se mostrou uma ferramenta favorável a identificação biológica em nível específico em peixes coletados nos rios Flores e Pindaré/MA.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A. et al. Ecologia e Manejo dos Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil. Maringá: **EDUEM**, 2007.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO JR, HORÁCIO F. Peixes da bacia do alto rio Paraná. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**, p. 374-400, 1999.
- ALMEIDA, M. S.; FERREIRA, F. K. M.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. C. Identificação molecular de tucunarés (Cichlidae, Perciformes) introduzidos em bacias hidrográficas maranhenses através do DNA mitocondrial. **Coletânea Estudos Ambientais e Agrônômicos: resultados para o Brasil**, Nobre, Camila Pinheiro, Oliveira, Anna Christina Sanazario (Org). São Luís – Editora Pascal, 2021.p. 79 – 90, 2021.
- CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetic and Evolution**. v. 36, p. 135-153, 2005.
- CALIFORNIA ACADEMY OF SCIENCES (CAS). Catalog of fishes.
Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily> Acessado junho de 2021.
- CARVALHO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; SANTOS, J. E.; TESKE, P.; BEHEREGARAY, L. B.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO I. Genetic characterization of native and introduced populations of the neotropical cichlid genus *Cichla* in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v. 32, p.601–607, 2009.
- CHELLAPPA, S.; CÂMARA, M. R.; CHELLAPPA, N. T. Ecology of *Cichla monoculus* (Osteichthyes: Cichlidae) from a reservoir in the semi-arid region of Brazil. **Hydrobiologia**, v. 504, n. 1-3, p. 267-273, 2003.
- CYWINSKA, A.; HUNTER, F. F.; P. D. N HEBERT. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. **Medical and Veterinary Entomology**. v.20, p. 413- 424. 2006.
- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 407–415. 2005.
- FARIAS I. P.; ORTÍ G.; SAMPAIO I.; SCHNEIDER H.; EYER A. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 53, n. 2, p. 89-103, 2001.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the *bootstrap*. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.
- FILHO, F. L. C.; GOMES, E. R.; NUNES, O. O.; FILHO, J. B. L. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea: relatório diagnóstico do município de Joselândia. Teresina: **Cprm – Serviço Geológico do Brasil**, p. 39, 2011.
- FRAGA, E.; SCHNEIDER, H.; NIRCHIO, M.; SANTA-BRIGIDA, E.; RODRIGUES FILHO, L. F.; SAMPAIO, I. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae,

Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. **Jornal off Applied Ichthyology**, v.23, p. 598604. 2007.

FRAGA, E.; SILVA, L. M. M.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; BARROS, M. C. Variabilidade genética em populações naturais de *Leporinus piau* (Anostomidae, Characiformes) da bacia do Rio Itapecuru. **Revista Trópica**, v.8, n. 2, p.28-40, 2014.

FITZPATRICK, B. M.; FORDYCE, J. A.; NIEMILLER, M. L.; REYNOLDS, R. G. What can DNA tell us about biological invasions? **Biological Invasions**. v. 14, 245–253, 2012.

FROESE, R.; PAULY, D. Fish Base, World Wide Web electronic publication. Disponível em <http://www.fishbase.com>, version (08/2019). Consulta em junho de 2021.

FROESE, R.; PAULY, D. FishBase, World Wide Web electronic publication. Disponível em <https://www.fishbase.com>, version (10/2018). Consulta em janeiro de 2021.

FUGI, R.; LUZ-AGOSTINHO K. D. G., AGOSTINHO A. A. Trophic interaction between an introduced (peacock bass) and a native (dogfish) piscivorous fish in a Neotropical impounded river. **Hydrobiologia**. v.607, p. 143–150, 2008.

GASQUES, L. S.; FABRIN, T. M. C.; PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J. A introdução do gênero *Cichla* [Block e Schneider, 1801] na planície de inundação do Alto Rio Paraná. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, **Umuarama**, v. 17, n. 4, p. 261-266, out. /dez. 2014.

GENNER, M. J.; SEEHAUSEN, O.; LUNT, D. H.; JOYCE, D. A.; SHAW, P. W.; CARVALHO, G. R.; TURNER, G. F. Age of cichlids: new dates for ancient lake fish radiations. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 5, p. 1269-1282, 2007.

HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAJIBABAEI, M.; SINGER, E. A. C.; HEBERT, P. D. N.; HICKEY, D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends Genet**, v.23, p. 167-172.

HELFMAN, G. S.; COLLETTE, B. B.; FACEY, D. E. e BOWEN, B.W. The Diversity of Fishes: Biology, **Evolution and Ecology**. 2 ed. Hong Kong, WileyBlackwell, 2009.

HICKMAN, JR. C. P.; ROBERT L. S.; KEEN, S. L.; EISENHOUR, D. J.; LARSON, A. l'ANSON, H. 2016. **Princípios Integrados de Zoologia**. 16ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 536, 2016.

INSTITUTO MARANHENSE DE ESTUDOS SOCIOECONÔMICOS E CARTOGRÁFICOS. Perfil do Maranhão 2006/2007. v.1. São Luís: IMESC, 2008.

KOVALENKO, K. E.; DIBBLE, E. D.; AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M. Recognition of non-native peacock bass, *Cichla kelberi* by native prey: testing the naiveté hypothesis. **Biological Invasions**, v. 12, n. 9, p. 3071-3080, 2010.

- KULLANDER, S.; FERREIRA, E. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 17, n. 4, p. 289-398, 2006.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAR, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**. v. 35, p. 1547-1549, 2018.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H.; WINEMILLER, K. O.; HONEYCUTT, R. L. Multilocus phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 55, n. 3, p. 1070-1086, 2010.
- LUDWIG, A. A sturgeon view on conservation genetics. *Eur. J. Wildl. Res.*, 52, p. 3-8, 2006.
- MARQUES, A. C. P. B.; FRANCO, A. C. S.; SALGUEIRO, F.; GARCÍABERTHOU, E.; SANTOS, L. N. Genetic divergence among invasive and native populations of the yellow peacock cichlid *Cichla kelberi*. **Journal of Fish Biology**, 89(6), p. 2595–2606, 2016.
- MORAES, P. S. S. **DNA Barcode, da ictiofauna da bacia do rio Mearim, Maranhão, Brasil**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Ambiente e Saúde, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Caxias, p. 57. 2016.
- MUSILOVÁ, Z.; RÍCAN, O.; JANKO, K.; NOVÁK, J. Molecular phylogeny and biogeography of the neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 46, n. 2, p. 659-672, 2008.
- NASCIMENTO, F. L.; CATELLA, A. C.; MORAES, A. S. Distribuição espacial do tucunaré, *Cichla* sp. (Pisces, Cichlidae), peixe amazônico introduzido no Pantanal, Brasil. Boletim de Pesquisa Embrapa, n. 24, p. 17. 2ª ed. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, 2002.
- NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. Fishes of the world. 5 ed. **John Wiley & Sons**. p. 752, 2016.
- PALUMBI, S. R.; MARTIN, A.; ROMANO, S.; MCMILLAN, W. O.; STICE, L.; GRABOWSKI, G. The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0, privately published document compiled by S. Palumbi. **Department Zoology**, Univ. Hawaii, Honolulu, 1996.
- PELICICE, F. M.; AGOSTINHO, A. A. Fish fauna destruction after the introduction of a nonnative predator (*Cichla kelberi*) in a Neotropical reservoir. **Biological Invasions**, 11, p. 1789– 1801. 2009.
- PIVELLO, V. R. The use of fire in the cerrado and Amazonian rainforests of Brazil: past and present. **Fire Ecology**. 7, p. 24–39. 2011.
- PUEBLA, O. Ecological speciation in marine v. freshwater fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 75, n. 5, p. 960-996, 2009.
- PUGEDO, M. L.; DE ANDRADE NETO, F. R.; PESSALI, T. C.; BIRINDELLI, J. L. O. CARVALHO D. C. Integrative taxonomy supports new candidate fish species in a poorly studied neotropical region: the Jequitinhonha River Basin. **Springer**, v. 144, p. 341–349, 2016.

REIS, R. E., KULLANDER, S. O.; FERRARIS-JUNIOR, C. J., orgs. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. **EdPUCRS**, Porto Alegre, 2003.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S; DARIO, F. DI; MINCARONE, M. M; PETRY, P; ROCHA, L.A. Fish Biodiversity and Conservation in South America. **Journal of fish biology**, June, 2016.

RIEDEL, A.; SAGATA, K.; SUHARDJONO, Y. R.; TÄNZLER, R., BALKE, M. Integrative taxonomy on the fast track-towards more sustainability in biodiversity research. **Frontiers in Zoology**, v.10, n. 15. 2013.

ROZAS, J., FERRER-MATA, A., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C., GUIRAO-RICO, S., LIBRADO, P., RAMOS-ONSINS, S.E., SÁNCHEZ-GRACIA, A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. **Molecular Biology and Evolution**. 34: 3299-3302, 2017.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4, p. 406-425, 1987.

SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Genetic differentiation of Macrodon ancylodon (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. **Genetics and Molecular Biology**, 26, p. 151-161, 2003.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. Peixes Comerciais de Manaus. Manaus: Ibama/AM, **PróVarzea**, 2006b.

SHARP, D. M. T.; DE LEÓN, L.F.; GONZÁLEZ, R., TORCHIN, ME. Tropical fish community does not recover 45 years after predator introduction. **Ecology** 98, p. 412-424, 2017.

SMITH, L. L.; FESSLER, J. L.; ALFARO, M. E.; STREELMAN, J. T.; WESTNEAT, M. W. Phylogenetic relationships and the evolution of regulatory gene sequences in the parrotfishes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 1, p. 136-152, 2008.

STELLA, A. Síntese do diagnóstico, matriz do plano e contribuições do processo de consulta pública para elaboração do PPCD-MA. **Secretaria de Estado do Meio Ambiente**. Brasília, Distrito Federal, 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBONS, T. J. CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p. 4673-4680, 1994.

VINSON, C. C.; GOMES, G.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Sciaenidae fish of the Caeté River estuary, Northern Brazil: mitochondrial DNA suggests explosive radiation for the Western Atlantic assemblage. **Genetics and Molecular Biology**, 27, p. 174180, 2004.

VLIEGER, Isis Tamara. Distribuição do ictioplâncton no médio rio Uruguai, município de São Borja (RS, BRASIL). Cerro Largo, 2017.