

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caracterização de marcadores moleculares com aplicabilidade para identificação de duas espécies de peixe com interesse forense: *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus costatus*

ORIENTADA: Aline Torres de Azevedo Chagas

ORIENTADOR: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

BELO HORIZONTE

Julho de 2015

Aline Torres de Azevedo Chagas

Caracterização de marcadores moleculares com aplicabilidade para identificação de duas espécies de peixe com interesse forense: *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus costatus*

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Genética

Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

BELO HORIZONTE

Julho de 2015

043

Chagas, Aline Torres de Azevedo.

Caracterização de marcadores moleculares com aplicabilidade para identificação de duas espécies de peixe com interesse forense : prochilodus argenteus e prochilodus costatus [manuscrito] / Aline Torres de Azevedo Chagas. - 2015.

102 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Evanguedes Kalapothakis.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Prochilodus argenteus - Teses. 2. Prochilodus costatus - Teses. 3. Prochilodus lineatus - Teses. 4. Marcadores mitocondriais - Teses. 5. Genética forense. 6. Genética - Teses. I. Kalapothakis, Evanguedes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU:575



**"Caracterização de marcadores moleculares com aplicabilidade para
identificação de duas espécies de peixe com interesse forense:
Prochilodus argenteus e Prochilodus costatus"**

Aline Torres de Azevedo Chagas

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Dr. Evangelides Kalapothakis - Orientador
(UFMG)

Dra. Maria Bernadete Lovato
(UFMG)

Dra. Sordaini Maria Caligiorne
Instituto de Criminalística de Minas Gerais

Belo Horizonte, 03 de julho de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, pela oportunidade.

Ao professor Evanguedes Kalapothakis, pela confiança em meu trabalho e pela orientação inspiradora.

A toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares, por terem me recebido tão bem e estarem sempre dispostos a compartilhar conhecimento. Tenho muita felicidade e orgulho de fazer parte de uma equipe unida e coesa como o Kalapogruppo!

Às agências de fomento, CAPES e CEMIG, pelo apoio financeiro, sem o qual a realização deste trabalho não teria sido possível.

Aos colegas da Polícia Civil, em especial às chefias e peritos da Seção Técnica Regional de Criminalística de Ribeirão das Neves, por autorizarem e incentivarem minha participação na pós-graduação.

Ao Comando de Policiamento Ambiental de Belo Horizonte da Polícia Militar de Minas Gerais, pela presteza e disponibilidade em ajudar.

À equipe do professor Gilmar Bastos Santos da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, em especial aos biólogos Tobias A. Barroso e Tiago Pessali, que auxiliaram na coleta dos espécimes de *Prochilodus* e obtenção de petrechos de pesca utilizados neste trabalho.

Aos amigos, por serem tão especiais e compreenderem as minhas ausências.

À minha família, pelo apoio e torcida, pelas vibrações nas vitórias e sábios conselhos nos momentos difíceis.

Ao Carlinhos, com quem tenho a alegria de compartilhar a vida, meu companheiro no sentindo mais amplo da palavra.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. A Biologia Forense, a proteção ao meio ambiente e a prova pericial.....	14
1.2. Recursos pesqueiros em Minas Gerais e no Brasil.....	17
1.3. Pesca ilegal	18
1.4. O gênero <i>Prochilodus</i>	19
1.5. <i>Prochilodus argenteus</i> e <i>Prochilodus costatus</i>	20
1.6. O sequenciamento de nova geração e a ecologia molecular	211
1.7. Marcadores moleculares.....	22
1.8. Marcadores moleculares para o gênero <i>Prochilodus</i>	25
1.9. Marcadores moleculares utilizados na Biologia Forense.....	26
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Aquisição de amostras	30
3.2. Obtenção de DNA.....	31
3.3. Construção da biblioteca genômica	32
3.4. Sequenciamento.....	33
3.5. Análise das sequências geradas	34
3.5.1. Montagem <i>de novo</i>	34
3.5.2. Identificação da espécie através de <i>barcoding</i> de COI	34
3.5.3. Anotação do genoma mitocondrial.....	34
3.5.4. Comparação das sequências dos genomas mitocondriais.....	35
3.5.5. Desenho de <i>primers</i>	35
3.5.6. Identificação de microssatélites	36
3.6. Padronização da PCR para identificação de gênero e espécie.....	36
3.7. Exames em petrechos de pesca.....	37

3.7.1.	Obtenção de material	37
3.7.2.	Extração de DNA.....	37
3.7.3.	Detecção de DNA de <i>Prochilodus</i> por PCR	38
4.	RESULTADOS	39
4.1.	Padronização da extração de DNA.....	39
4.2.	Construção da biblioteca genômica	41
4.3.	Sequenciamento.....	41
4.4.	Análise das sequências geradas	43
4.4.1.	Montagem <i>de novo</i>	43
4.4.2.	Identificação da espécie através de <i>barcoding</i> de COI	43
4.4.3.	Anotação do genoma mitocondrial.....	45
4.4.4.	Comparação das sequências dos genomas mitocondriais.....	53
4.4.5.	Desenho de <i>primers</i>	58
4.4.6.	Identificação de microssatélites	63
4.5.	Padronização da PCR para identificação de gênero e espécie.....	65
4.5.1.	<i>Primers</i> desenhados com o Primer-BLAST	65
4.5.2.	<i>Primers</i> desenhados manualmente	80
4.6.	Exames em petrechos de pesca.....	84
5.	DISCUSSÃO	85
5.1.	Perspectivas	92
6.	CONCLUSÃO.....	94
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cladograma proposto por Castro e Vari (2003) para o gênero <i>Prochilodus</i> , de acordo com caracteres morfológicos.	19
Figura 2: <i>Prochilodus argenteus</i>	20
Figura 3: <i>Prochilodus costatus</i>	20
Figura 4: Espécimes de peixes apreendidos em ocorrência de pesca ilegal.	26
Figura 5: Espécime fêmea de <i>P. argenteus</i> coletado.	30
Figura 6: Espécime macho de <i>P. costatus</i> coletado.	30
Figura 7: Extração de DNA genômico de <i>P. argenteus</i> e <i>P. costatus</i>	39
Figura 8: Teste enzimático com DNA extraído de <i>P. argenteus</i>	40
Figura 9: Teste enzimático com DNA extraído de <i>P. costatus</i>	40
Figura 10: Qualidade do sequenciamento de <i>P. argenteus</i>	41
Figura 11: Qualidade do sequenciamento de <i>P. argenteus</i> por ciclo.	42
Figura 12: Qualidade do sequenciamento de <i>P. costatus</i>	42
Figura 13: Qualidade do sequenciamento de <i>P. costatus</i> por ciclo.	43
Figura 14: Resultado da pesquisa realizada no BOLD com a sequência de <i>P. argenteus</i> obtida no presente trabalho.	44
Figura 15: Resultado da pesquisa realizada no BOLD com a sequência de <i>P. costatus</i> obtida no presente trabalho.	44
Figura 16: Mapa de anotação do genoma mitocondrial de <i>P. argenteus</i>	45
Figura 17: Mapa de anotação do genoma mitocondrial de <i>P. costatus</i>	46
Figura 18: Comparação dos genomas mitocondriais de <i>P. argenteus</i> , <i>P. costatus</i> e <i>P. lineatus</i>	54
Figura 19: Comparação dos genomas mitocondriais de <i>P. argenteus</i> e <i>P. costatus</i>	55
Figura 20: Comparação dos genomas mitocondriais de <i>Prochilodus</i> e espécies pertencentes a outros gêneros.	56
Figura 21: Esquema da posição de anelamento do par de <i>primers</i> Pcal01.	59
Figura 22: Esquema da posição de anelamento do conjunto de <i>primers</i> Pcal04.	60

Figura 23: Regiões com maiores concentrações de sítios variáveis para as quais foram desenhados <i>primers</i> do tipo <i>forward</i> Pcal 05 a Pcal15.....	61
Figura 24: Posição de anelamento dos <i>primers</i> Pcal01 a Pcal15.....	63
Figura 25: <i>Amplicons</i> produzidos em PCR utilizando os pares de <i>primers</i> Pcal01, Pcal02 e Pcal03 em diferentes temperaturas de anelamento.	66
Figura 26: <i>Amplicons</i> produzidos em PCR utilizando o conjunto de <i>primers</i> Pcal04 em diferentes temperaturas de anelamento.....	67
Figura 27: Teste de sensibilidade dos <i>primers</i> Pcal01, Pcal02 e Pcal03.....	68
Figura 28: Teste de sensibilidade dos <i>primers</i> Pcal04F + R1 e Pcal04F + R2.	69
Figura 29: <i>Amplicons</i> produzidos em teste de especificidade dos <i>primers</i> Pcal01 a Pcal04.	70
Figura 30: <i>Primers</i> Pcal03 em diferentes condições de reação e estringência.....	73
Figura 31: <i>Primers</i> Pcal03R + Pcal01F em diferentes temperaturas de anelamento e concentrações de DNA de <i>Leporinus</i> sp.....	77
Figura 32: Teste de especificidade para os <i>primers</i> Pcal03R + Pcal01F.....	79
Figura 33: Teste de sensibilidade para os <i>primers</i> Pcal03R + Pcal01F.....	80
Figura 34: Gel de eletroforese de produtos de PCR onde foi utilizado como molde DNA extraído de petrechos de pesca.	84
Figura 35: Ovos e larvas de <i>Prochilodus</i> coletados na bacia do rio São Francisco.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anotação do genoma mitocondrial de <i>P. argenteus</i> e <i>P. costatus</i>	48
Tabela 2: Comparação das anotações dos genomas mitocondriais de <i>P. lineatus</i> , <i>P. argenteus</i> e <i>P. costatus</i>	52
Tabela 3: Comparação entre as sequências de genes codificadores de proteínas, rRNA e D-loop utilizando a ferramenta BLASTn.....	57
Tabela 4: Características dos <i>primers</i> desenhados com o Primer-BLAST.	58
Tabela 5: Características dos <i>primers</i> desenhados manualmente.	62
Tabela 6: Microssatélites identificados pelo <i>software</i> SciRoKo para <i>P. argenteus</i>	64
Tabela 7: Microssatélites identificados pelo <i>software</i> SciRoKo para <i>P. costatus</i>	64
Tabela 8: Microssatélites identificados pelo <i>software</i> MSATCOMMANDER para <i>P. argenteus</i>	65
Tabela 9: Microssatélites identificados pelo <i>software</i> MSATCOMMANDER para <i>P. costatus</i>	65
Tabela 10: Testes dos <i>primers</i> Pcal01 a Pcal04 com o tampão IC em diferentes condições de estringência.	71
Tabela 11: Testes dos <i>primers</i> Pcal 01 a Pcal 04 com o tampão IVB em diferentes condições de estringência e concentrações de DNA de <i>P. argenteus</i> e <i>Leporinus</i> sp.	72
Tabela 12: Testes dos <i>primers</i> Pcal 03F + R e Pcal03R + Pcal01F em diferentes tipos de tampão, número de ciclos e temperaturas de anelamento.	74
Tabela 13: Testes dos <i>primers</i> Pcal 03F + R e Pcal03R + Pcal01F em diferentes concentrações de DNA de <i>Leporinus</i> sp e temperaturas de anelamento.	76
Tabela 14: Testes dos <i>primers</i> Pcal03R + Pcal01F em diferentes concentrações de DNA de <i>Leporinus</i> sp e <i>Prochilodus</i> , temperaturas de anelamento e quantidade de ciclos.....	78
Tabela 15: Testes dos <i>primers</i> Pcal05 a Pcal15 com diferentes <i>primers</i> tipo <i>reverse</i>	81
Tabela 16: Testes dos <i>primers</i> Pcal07, Pcal09, Pcal12, Pcal13 e Pcal14 em diferentes tipos de tampão.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BOLD	<i>Barcode of Life Datasystems</i>
C	Citosina
°C	Graus Celsius
COI	Citocromo oxidase - subunidade 1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxi (nucleotídeo) 5' -trifosfato
F	<i>Primer tipo forward</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
g	Giros
G	Guanina
GB	Gigabytes
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis
IEF	Instituto Estadual de Florestas
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
LBMM	Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mM	Mili-molar
mtDNA	DNA mitocondrial
mRNA	RNA mensageiro
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
ng	Nanograma

nm	Nanômetro
nM	Nano-molar
NND	<i>Nearest Neighbor Distance</i>
pb	Pares de base
R	<i>Primer tipo reverse</i>
REDS	Registro de Eventos de Defesa Social
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogenionte
pM	Pico-molar
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
T	Timina
TAE	Tampão Tris, Ácido acético, EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Taq DNA polimerase	DNA polimerase termoestável de <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris e EDTA
TEN9	Tampão EDTA e NaCl, pH 9
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	RNA transportador
UV	Ultra-violeta

RESUMO

A crescente preocupação com as questões ambientais, aliada ao advento de leis que procuram proteger os recursos naturais, tem criado uma nova demanda na área das ciências forenses que trata das perícias ambientais. Em relação às atividades de pesca, existem diversas cartas legislativas em vigor que buscam proteger os recursos pesqueiros. Em contrapartida, a correta identificação de espécimes apreendidos em ocorrências de pesca ilegal ainda é feita de modo precário. Dessa forma, seria desejável o estabelecimento de protocolos simplificados que permitam a correta identificação de materiais apreendidos como forma de fortalecer as ações de fiscalização e, posteriormente, a prova no meio jurídico. Nesse aspecto, as técnicas moleculares podem oferecer grande ajuda através do estabelecimento de marcadores espécie-específicos, que permitam afirmar se o material questionado é proveniente, de fato, de espécie cuja pesca não é permitida. O presente trabalho objetiva caracterizar marcadores moleculares para as espécies *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus costatus*, ambas de grande importância ecológica e econômica na região da bacia hidrográfica do rio São Francisco. Para tanto, foi feito o sequenciamento de DNA genômico das duas espécies, montagem *de novo* das *reads* geradas, montagem e anotação das sequências de DNA mitocondrial e comparação com a sequência de DNA mitocondrial de outra espécie do mesmo gênero: *Prochilodus lineatus*. Foram selecionados marcadores mitocondriais gênero-específicos e espécie-específicos e o desenho de *primers* foi feito levando-se em conta a possibilidade de identificação de gênero e espécie através da análise dos *amplicons* gerados em reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram identificados um par de *primers* gênero-específicos, que apresentaram boa sensibilidade e especificidade na detecção de DNA do gênero *Prochilodus*. Quanto aos *primers* espécie-específicos, foi encontrado um par que apresentou amplificação apenas para DNA de *P. argenteus*. O presente trabalho também obteve sucesso na extração de DNA de petrechos de pesca (uma rede e uma tarrafa) que foram sabidamente utilizados para coleta de espécimes de *P. argenteus* e *P. costatus*. Através de PCR utilizando marcadores mitocondriais, foi possível detectar a presença de material genético de *Prochilodus* no DNA extraído dos petrechos de pesca. Os dados obtidos a partir do sequenciamento de *P. argenteus* e *P. costatus* também permitiram a identificação de dezenas de milhares de marcadores microssatélites, que ainda precisam ser avaliados quanto à aplicabilidade para a identificação de espécies e para estudos de diversidade. A tecnologia apresentada no presente trabalho possui potencial para ser expandida para outras espécies e para ser aplicada em estudos de ecologia molecular, genética de conservação e na área forense

como meio de determinação da materialidade de delitos e, conseqüentemente, fortalecimento da prova pericial no meio jurídico.

Palavras-chave: *Prochilodus argenteus*, *Prochilodus costatus*, *Prochilodus lineatus*, marcadores mitocondriais, biologia forense.

ABSTRACT

The increasing concern about environmental issues added to specific legislation aiming inhibition of environmental damage brought give rise to new challenges for forensic science. Regarding fishing activities, there are several laws with purpose of protecting fishing resources. On the other hand, the correct identification at species-level of samples seized in enforcement actions is far from accurate. Thus, it became extremely important the establishment of techniques that enable the correct identification of the seized samples, ideally through easy handling protocols. This would strength the enforcement actions and the juridical proof. Considering this, molecular techniques can provide species-specific markers for unambiguously identification. This information is important in juridical process for determining if seized samples are indeed one of the ones of prohibited fishing. The aim of this study was to characterize molecular markers for two fish species: *Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus*. Both species present great ecological and economic relevance in São Francisco River Basin. The genomic DNA of both species were sequenced and a *de novo* assembly was carried out, as well as the annotation of mitochondrial DNA sequences and its comparison to the mitogenomes of a closely related species: *Prochilodus lineatus*. Genus-specific and species-specific markers were selected considering its potential ability of genus and species identification based just on the PCR products sizes through electrophoresis gel. One pair of genus-specific primers presented highly sensitivity and specificity for *Prochilodus* genus. Regarding species-specific primers, one pair proved to be specific for *P. argenteus*. The present study was also able to extract DNA from fishing artefacts used for *P. argenteus* and *P. costatus* capture. *Prochilodus* DNA was detected in those artefacts through PCR using mitochondrial markers. Genomic DNA sequencing also enabled the identification of dozens of thousands microsatellites markers. Later, they are going to be evaluated for species identification and genetic diversity studies. The methodology presented in this project can be potentially applied to other species and used for molecular ecology studies, conservation genetics and in the forensic science, establishing crimes materiality and, consequently, strengthening the juridical proof.

Keywords: *Prochilodus argenteus*, *Prochilodus costatus*, *Prochilodus lineatus*, mitochondrial markers, forensic biology.

1. INTRODUÇÃO

Temas atinentes à questão ambiental têm sido rotineiramente discutidos nos últimos anos pela comunidade científica e diversos setores da sociedade. Da mesma forma, percebe-se uma crescente preocupação dos legisladores em ampliar a proteção jurídica ao meio ambiente. Nessa perspectiva, as leis ambientais surgem com o intuito de oferecer maior proteção aos recursos naturais e inibir práticas degradantes.

A análise de listas de espécies ameaçadas, como a Lista Vermelha produzida pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) mostra a importância de se atentar para as políticas de proteção à biodiversidade. Dados de 2015 dão conta de que, entre as 12.941 espécies de peixes avaliadas pela instituição, 2.248 encontram-se sob o status de ameaçadas. No Brasil, existem 966 espécies de animais ameaçados. Quanto aos vertebrados, são 81 mamíferos, 164 aves, 29 répteis, 36 anfíbios e 86 peixes (IUCN 2015).

O comércio internacional de material de origem animal, tanto legal como ilegal, representa sérias ameaças à biodiversidade. Entretanto, os comércios locais em diversas partes do mundo também possuem destacada importância para a proteção da fauna. Espécies nativas e protegidas pela legislação são comumente vendidas juntamente com espécies domesticadas. Além disso, existem os eventos de captura para fins de subsistência, que promovem importantes retiradas das populações selvagens (Baker 2008).

Somado a perda de habitat, o desmatamento e a introdução de espécies exóticas, as atividades predatórias como caça e pesca praticadas de forma ilegal contribuem para a perda de biodiversidade nos diversos ecossistemas brasileiros. Como políticas de contenção do problema, salienta-se a necessidade de fortalecimento da legislação e seu cumprimento (Galetti et al 2009, Tabarelli et al 2005).

1.1. A Biologia Forense, a proteção ao meio ambiente e a prova pericial

Para melhor entender a importância das análises forenses no meio jurídico, é preciso inicialmente compreender a legislação vigente. Tal afirmativa se explica pelo fato de que a existência de leis que tipificam determinadas condutas como sendo ilícitas é que impulsiona a ciência forense a buscar junto às ciências naturais metodologias aplicáveis à resolução de demandas trazidas pelo meio jurídico.

Em termos de legislação ambiental, é importante citar, primeiramente, a Constituição Federal do Brasil, que em seu artigo 225, *caput*, reconhece o direito a um meio ambiente

ecologicamente equilibrado, cabendo ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo. O parágrafo terceiro prevê que, em caso de dano ambiental, o infrator pode responder nas três esferas de repressão: administrativa, civil (reparação do dano causado) e criminal (Brasil 1988).

Na esfera administrativa, os órgãos que integram o Sistema Nacional de Meio Ambiente (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis - IBAMA, Secretarias Estaduais e Municipais de Meio Ambiente) instauram um processo administrativo e interno ao órgão, não havendo processo judicial. Na esfera civil, ocorre a propositura de uma Ação Civil, seguindo as regras do Código de Processo Civil, visando à reparação do dano ambiental (Barbieri e Geiser 2012).

Outra carta legislativa igualmente importante no âmbito da proteção aos recursos ambientais é a lei 9.605/98, também conhecida como “Lei de Crimes Ambientais”, que estabelece de forma objetiva quais condutas são consideradas lesivas ao meio ambiente e prevê sanções penais e administrativas, que vão desde multas e penas restritivas de direitos até penas privativas de liberdade. No que diz respeito aos crimes praticados contra a fauna, a lei de crimes ambientais especifica diversas condutas lesivas, entre as quais destacamos o disposto no artigo 34, *caput*, que faz a seguinte tipificação: “Pescar em período no qual a pesca seja proibida ou em lugares interditados por órgão competente”. A pena cominada para essa infração é detenção de um a três anos, multa, ou ambas as penalidades cumulativamente. A legislação ainda prevê as mesmas penas para a prática de pesca de espécies que devam ser preservadas ou espécimes com tamanhos inferiores aos permitidos; pesca de quantidades superiores às permitidas, ou mediante a utilização de aparelhos, petrechos, técnicas e métodos não permitidos; transporte, comércio, beneficiamento ou industrialização espécimes provenientes da coleta, apanha e pesca proibidas (Brasil 1998).

A legislação referente à pesca no território nacional ainda conta com a lei 11.959/09, também conhecida como “Código da Pesca”, que regulamenta a atividade pesqueira no país através da exigência de licença para exercício da atividade e a previsão de suspensão das atividades com vistas a proteger as espécies e sua reprodução. Em seu artigo 3º, essa lei prevê que os regimes de acesso, a captura total permissível, o esforço de pesca sustentável, os períodos de defeso, as temporadas de pesca, os tamanhos de captura, as áreas interdidadas ou de reservas, as artes, os aparelhos, os métodos e os sistemas de pesca e cultivo, capacidade de suporte dos ambientes, as ações de monitoramento, controle e fiscalização da atividade e a proteção de indivíduos em processo de reprodução ou recomposição de estoques devem ser regulamentados pelo poder público (Brasil 2009).

No Estado de Minas Gerais, em termos de legislação ambiental, destaca-se o Decreto 44.844/2008, que prevê sanções administrativas para a prática de pesca sem licença ou com a mesma vencida e comércio, armazenagem e beneficiamento de pescado sem licença. Ainda, o Instituto Estadual de Florestas (IEF) regulamenta áreas de proibição de pesca, espécies protegidas, tamanho mínimo de captura e petrechos de pesca permitidos (Minas Gerais 2008).

Sobre a legislação criminal, o Código de Processo Penal prevê, a partir do artigo 158, que a realização do exame de corpo de delito é indispensável nas infrações que deixarem vestígios, devendo os exames ser realizados por perito oficial (Brasil 1941). No que se refere à prova pericial, a Lei de Crimes Ambientais também prevê a realização de exame pericial para constatação do dano ambiental (Brasil 1998).

Sabendo-se que a investigação criminal busca determinar a autoria e materialidade dos delitos, e sendo a materialidade composta pelos elementos que constatarem a ocorrência do delito, destaca-se a importância do trabalho pericial para o processo penal. Para o caso dos crimes ambientais, é de grande importância a participação do perito, que irá comparecer ao local da infração e constatar elementos de natureza objetiva com o intuito de comprovar que o crime realmente aconteceu, determinando dessa forma a materialidade do delito (Barbieri e Geiser 2012).

Para a realização de seu trabalho, o perito criminal se vale de conhecimento técnico-científico e, para tanto, observa-se uma forte tendência em promover novas tecnologias e padronização de metodologias em ciências forenses (Neufeld e Scheck 2010). Dada a grande variedade de crimes ambientais (a lei 9.605/1998 prevê crimes contra a fauna, flora, poluição e outros crimes ambientais, além de crimes contra o ordenamento urbano e o patrimônio cultural e contra a administração ambiental) e a recentidade da legislação (a lei foi promulgada em 1998), o ramo da criminalística que trata das perícias ambientais encontra-se em franco desenvolvimento (Barbieri e Geiser 2012).

Uma dificuldade recorrente enfrentada pelos órgãos de fiscalização ambiental diz respeito à indisponibilidade de técnicas capazes de identificar com eficácia em nível de espécie o material de origem animal provenientes de pesca ilegal. A simples observação de características morfológicas das peças encaminhadas geralmente é pouco informativa para a caracterização da espécie, principalmente quando o material apreendido se encontra processado para o consumo de alguma forma (por exemplo, na forma de filés). Na ausência de tais informações, os órgãos de fiscalização ficam impossibilitados de exercer seu papel, uma vez que não se sabe com certeza se o material apreendido pertence ou não a espécie protegida pela legislação.

A prática pericial mostra que a grande maioria de requisições de exames periciais que aportam nas seções de criminalística são referentes a exames de constatação de artefatos relacionados à pesca (armas, munição, armadilhas, redes, tarrafas, etc.), sendo a materialidade dos crimes estabelecida a partir da análise desses objetos. O aporte do pescado propriamente dito é raro, principalmente devido à falta de condições de encaminhamento que permitam a correta conservação do material. Em ocorrências onde há apreensão de pescado, os destinos mais comuns são: doação para instituições filantrópicas, descarte em aterro sanitário e encaminhamento para instituição de ensino.

A Polícia Civil de Minas Gerais não dispõe de profissionais em número suficiente e materiais para realizar a correta identificação dos animais que chegam apreendidos às delegacias, principalmente naquelas localizadas no interior do Estado. Assim sendo, a prova pericial que compõe o inquérito policial e, futuramente, o processo judicial, fica prejudicada devido a não identificação da espécie apreendida. A perícia mineira ainda conta com o problema de centralização na capital do Estado da maioria dos exames referentes à Biologia Forense. A Seção Técnica de Bacteriologia e Biologia Forense recebe exames provenientes de todo o Estado de Minas Gerais, sendo a grande maioria da demanda referente a exames envolvendo identificação humana.

Assim sendo, seria desejável o estabelecimento de técnicas que permitam a identificação de produtos de origem animal como forma de fortalecer a prova pericial. Nesse aspecto, as técnicas moleculares podem oferecer grande ajuda através do estabelecimento de marcadores espécie-específicos, que permitam afirmar se o material questionado é proveniente, de fato, de espécie cuja pesca não é permitida. As análises moleculares ainda possuem a vantagem de permitir que os exames sejam feitos utilizando-se pequenas quantidades de tecido, que podem ser coletados utilizando protocolos simplificados que não demandam refrigeração e espaço.

De modo similar, os Institutos de Criminalística de outros Estados também não oferecem tais tipos de exames. Análises dessa natureza são feitas em poucas situações, geralmente em parceria com Universidades (Ferreira et al 2011, Sanches et al 2011, 2012).

1.2. Recursos pesqueiros em Minas Gerais e no Brasil

Estima-se que no Brasil ocorram aproximadamente 2.300 espécies de peixes de água doce (Reis et al 2003). Entretanto, acredita-se que esses números sejam ainda maiores, uma vez que, muitas espécies se encontram em processo de descrição e revisão taxonômica, além daquelas descobertas a cada ano (Machado et al 2008).

Minas Gerais é um estado-chave para a biodiversidade brasileira, uma vez que no território mineiro podem ser encontradas regiões representativas de três biomas brasileiros, Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga (Minas Gerais 2015). O Estado também abriga importantes bacias hidrográficas, como: São Francisco, Grande e Paranaíba (dois dos principais formadores da bacia do rio Paraná), Doce, Jequitinhonha, Paraíba do Sul, Mucuri e Pardo. A ictiofauna nativa do Estado é estimada em cerca de 354 espécies, 12% do total estimado para o Brasil (Drummond et al 2005).

1.3. Pesca ilegal

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão pertencente à Organização das Nações Unidas, as atividades pesqueiras ilegais, não-reportadas e não reguladas ainda são uma preocupação em relação aos ecossistemas aquáticos. Em relação às atividades em águas continentais, se reconhece a grande dificuldade em se obter dados estatísticos sobre produção e captura de pescado (FAO 2014).

A pesca ilegal, não reportada e não regulada traz impactos deletérios às comunidades onde ocorre de modo não sustentável, uma vez que promove a redução na quantidade e qualidade do recurso disponível para aquela população. Uma dificuldade quanto às ações de controle é a elevada adaptabilidade dos infratores em relação à fiscalização, reduzindo o risco de detecção da atividade e aplicação das sanções (FAO 2014).

Para proteção dos recursos pesqueiros, recomenda-se a aplicação de ações conjuntas, envolvendo organizações regionais de manejo, execução e cumprimento das legislações relativas às atividades ilegais e mecanismos para proteção do habitat (Gjerde et al 2013).

As atividades ilegais e não declaradas, ainda, contribuem para a sobre-exploração dos recursos pesqueiros. Dados levantados em 54 países estimam que as perdas econômicas decorrentes da atividade ilegal em áreas marítimas esteja entre 10 e 23,5 bilhões de dólares, perfazendo entre 11 e 26 milhões de toneladas (Agnew et al 2009).

O perfil das apreensões de pescado no estado de Minas Gerais ainda é pouco conhecido. Levantamento feito junto à base de dados de Registro de Eventos de Defesa Social (REDS) da Secretaria de Estado de Defesa Social utilizando as palavras-chave “pesca ilegal” e “pescado” encontrou 64 ocorrências registradas pela Polícia Militar do Meio Ambiente no ano de 2013 e primeiro semestre de 2014. As espécies que mais aparecem nos registros são: traíra (15 vezes), curimba e piau (14 vezes cada), mandi (12 vezes), pacu

e tilápia (8 vezes cada) e tucunaré (7 vezes). Outras 17 espécies foram citadas, porém em menores quantidades (Chagas e Kalapothakis 2014). A seleção das espécies para estudo levou em consideração as espécies nativas mais citadas nos registros de ocorrência, dentre as quais optou-se pelo gênero *Prochilodus*, que compreende as espécies vulgarmente conhecidas como “curimbas”. Além de serem espécies de interesse para a biologia forense, como demonstrado no levantamento de espécies com maior número de apreensões em Minas Gerais, o gênero *Prochilodus* também apresenta importância ecológica e econômica nos locais onde ocorre.

1.4. O gênero *Prochilodus*.

O gênero *Prochilodus* pertence à família Prochilodontidae e é um grupo monofilético que compreende 13 espécies caracterizadas pela presença de lábios, dentes e maxilas altamente estruturados. Possui ampla distribuição na América do Sul, onde representa grande importância para atividades pesqueiras comerciais e de subsistência. A Figura 1 mostra um cladograma do gênero *Prochilodus* proposto com base em características morfológicas (Castro e Vari 2003).

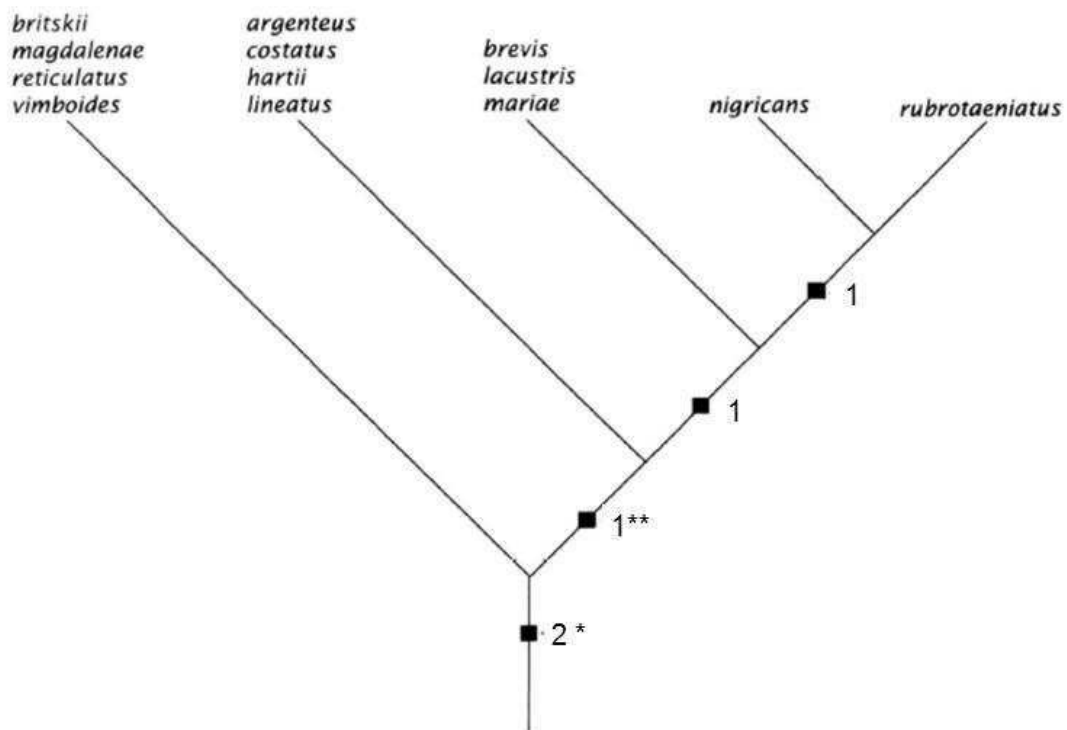


Figura 1: Cladograma proposto por Castro e Vari (2003) para o gênero *Prochilodus*, de acordo com caracteres morfológicos. Os números indicam a quantidade de sinapomorfias apresentadas pelos membros de cada ramo. *: ossificação da porção basal dos arcos branquiais e escamas

espinóides formando fileiras alternadas e achatadas nas margens. **: presença de listras horizontais e onduladas no corpo.

Existe um grande interesse comercial nas espécies de *Prochilodus*, uma vez que as mesmas servem como fonte alimentar para populações de baixa renda. Além disso, são espécimes de elevada prolificidade e que se desenvolvem com facilidade (FAO 2002).

No estado de Minas Gerais ocorrem as seguintes espécies: *Prochilodus lineatus* na bacia do rio Grande, *Prochilodus vimboides* na bacia do rio Doce e *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus costatus* na bacia do rio São Francisco (Castro e Vari 2003).

1.5. *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus costatus*

P. argenteus (Agassiz 1829), mostrado na Figura 2, foi previamente classificado como *P. marggravii*. Popularmente conhecido como “curimba-pacu”, é o maior membro da família Prochilodontidae, uma vez que seu peso pode chegar a 15 quilogramas (Arantes et al 2013). A espécie *P. costatus* (Valenciennes 1850), mostrada na Figura 3, também é conhecida por “curimba-pioa” e já foi classificada sob o nome de *P. affinis*.



Figura 2: *Prochilodus argenteus*. Foto gentilmente cedida pelo biólogo Tobias A. Barroso.



Figura 3: *Prochilodus costatus*. Foto gentilmente cedida pelo biólogo Tobias A. Barroso.

Morfologicamente semelhantes, as espécies podem ser distinguidas pelo número de fileiras transversais de escamas contadas a partir da origem da nadadeira dorsal até a linha lateral: *P. argenteus* apresenta 10 ou 11 fileiras e *P. costatus* apresentam 8 ou 9 fileiras (Castro e Vari 2003).

A biologia de ambas as espécies é bastante similar: são simpátricas e endêmicas da bacia do rio São Francisco, mas foram posteriormente introduzidas na bacia do rio Jequitinhonha (Castro e Vari 2003) e bacia do rio Doce (Alves et al 2007). As espécies realizam migrações rio acima para desova durante o período reprodutivo, que geralmente coincide com o período chuvoso, quando a temperatura e o fotoperíodo são mais elevados (Sato e Godinho 2003).

Quanto à ecologia, as espécies de *Prochilodus* participam da ciclagem de matéria orgânica, uma vez que apresenta hábitos bentopelágicos (vivem e se alimentam nas camadas médias e profundas) e detritívoros (se alimentam de detritos orgânicos) (Flecker 1996).

No aspecto econômico, constituem um importante recurso pesqueiro nos locais onde ocorrem, tanto para a modalidade comercial como para a recreativa. Juntas, as espécies *P. argenteus* e *P. costatus* representam aproximadamente 50% do total de capturas na região de Três Marias (Sato e Godinho 2003).

1.6. O sequenciamento de nova geração e a ecologia molecular

Técnicas baseadas em sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) têm sido empregadas na ecologia molecular, uma vez que permitem gerar uma enorme quantidade de dados de forma rápida. Vários estudos utilizando NGS têm sido conduzidos com aplicações em estudos de genética de populações e genética da conservação, inclusive em espécies não-modelo, cujos genomas são pouco conhecidos. As abordagens utilizando NGS têm sido utilizadas com diferentes propósitos, dentre os quais destacam-se a montagem de genomas de espécies não modelo (ou seja, espécies cujo conhecimento sobre o genoma é escasso ou ausente), estudos de *barcoding* e identificação de marcadores moleculares em larga escala.

A partir de dados gerados em uma única rodada de sequenciamento, é possível identificar centenas de microssatélites e milhares de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (Ekblom e Galindo 2011).

1.7. Marcadores moleculares

Entende-se por marcadores moleculares todo fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA que pode ou não estar ligado a uma característica fenotípica (Ferreira e Grattaglia 1998). Os marcadores moleculares são ferramentas importantes no estudo da genética e, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, novos marcadores vêm sendo localizados em regiões do genoma nuclear e mitocondrial. O uso de marcadores moleculares se difundiu no meio acadêmico e a escolha da técnica para análise de um marcador depende do tipo de análise a ser executada, nível de variabilidade, a natureza da informação (dominância, co-dominância, ploidia) e os equipamentos disponíveis em laboratório para sua realização (Anne 2006).

Microssatélites ou SSR (do inglês, *single sequence repeats*) são fragmentos de DNA constituídos de pequenas unidades de repetição em *tandem*, com ampla distribuição pelo genoma e motivos de repetição contendo geralmente entre 1 e 6 pares de bases. Características como altas taxas de mutação, modo de herança Mendeliana e ampla distribuição pelo genoma fazem com que tais marcadores tenham grande aplicação em biologia, principalmente em estudos populacionais. Entretanto, para muitas espécies, marcadores microssatélites têm que ser desenvolvidos *de novo*. Tradicionalmente, a identificação de microssatélites era feita a partir de clonagem e sequenciamento de Sanger. Entretanto, com o advento de técnicas de NGS aliado a ferramentas de bioinformática, a identificação de microssatélites pode ser feita em grande quantidade e a baixo custo (Abdelkrim et al 2009, Cai et al 2013).

O DNA mitocondrial tem sido mais eficientemente utilizado em estudos genealógicos e evolutivos de populações devido a características como padrões de herança materna e clonal e alta taxa de mutação (Avise et al 1987). Dentre os marcadores nucleares, os microssatélites têm se revelado melhores para análise de dinâmica e estrutura genético-populacional. Rastogi et al (2007) compararam a eficácia de marcadores nucleares e mitocondriais para identificação de espécies. O estudo comparou os marcadores 16S rDNA, subunidade 4 da NADH desidrogenase e gene da actina, sendo que foram obtidos melhores resultados quando da utilização de marcadores mitocondriais.

Outra característica importante relacionada aos marcadores mitocondriais é o seu elevado número de cópias por célula: enquanto a maioria dos tipos celulares é mononuclear (existe apenas uma cópia do genoma nuclear), as mitocôndrias ocorrem em grande abundância. Além disso, cada organela apresenta várias cópias do genoma mitocondrial, o que aumenta consideravelmente o número de cópias de mtDNA em uma amostra biológica. Dessa forma, um fragmento de DNA mitocondrial tem mais chances de ser amplificado com

sucesso em uma PCR que um fragmento de DNA nuclear. Isso é particularmente importante em casos de amostras que apresentam DNA com alto nível de degradação, como é o caso das amostras forenses (Teletchea 2009).

O termo *barcoding* de DNA se refere ao uso de uma determinada região do DNA como marcador para identificação de espécies. A definição *lato sensu* diz respeito à identificação de qualquer nível taxonômico utilizando um fragmento de DNA. Já a definição *strictu sensu* se refere à identificação em nível de espécie utilizando um fragmento de DNA padronizado (Valentini et al 2009).

O *barcoding* de DNA tem sido amplamente utilizado para identificação de espécies, uma vez que analisa sequências que apresentam, de modo geral, muita variação entre espécies distintas e pouca variação entre indivíduos de uma mesma espécie. Entre as diversas aplicações, destaca-se o desenvolvimento de ferramentas padronizadas para estudos de identificação, a possibilidade de detecção de fraudes comerciais, identificação de hospedeiros intermediários de parasitos e insetos de interesse para a infectologia, estudos de taxonomia, delimitação de táxons e suas relações, descrição de novas espécies, identificação de espécies crípticas, caracterização de dietas e estudos de paleoecologia (Gross 2012, Savolainen et al 2005, Valentini et al 2009).

O genoma mitocondrial é um alvo interessante para esse tipo de análise, uma vez que apresenta características como ausência de íntrons e exposição limitada a eventos de recombinação. Ainda, dentro do genoma mitocondrial, as regiões codantes, como o gene da citocromo c oxidase (*cox1* ou simplesmente COI), são amplamente utilizados na literatura, dado o alto nível de diversificação apresentado, possuindo potencial para ser utilizado como um sistema global de identificação de animais (Hebert et al 2003). Também existem outros marcadores mitocondriais que foram empregados com sucesso na identificação de espécies, como o citocromo b, o qual já foi utilizado com sucesso em estudos de filogenia e investigações forenses (Parson et al 2000).

Nesse sentido, o *Consortium for Barcode of Life*, criado em 2004, se propôs a desenvolver o *barcoding* de DNA como padrão global para identificação de espécies, utilizando como marcador uma região de 648 pb do gene COI (site Barcode of Life - <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-dna-barcoding>).

Quanto ao uso de *barcoding* de DNA para identificação de peixes, a iniciativa *Fish Barcode of Life* (FishBOL) propõe a identificação de espécies do mundo inteiro utilizando *barcoding* de COI, com potencial para aplicação na taxonomia, área forense e identificação de fraudes comerciais (Hanner et al 2011). Outras iniciativas como o *FishPopTrace* surgiram

com o intuito de gerar painéis de SNPs para identificação da origem geográfica de espécies de peixes com importância econômica (Martinsohn e Ogden 2009).

As técnicas de *barcoding* de DNA têm sido utilizadas com sucesso na identificação de espécies de peixes ao redor do mundo. Ward et al (2005) conseguiram identificar 207 espécies de peixes australianos através do sequenciamento de uma região do gene COI. Para os casos em que a região 5' do gene COI é insuficiente para identificação da espécie, protocolos multi-locus têm sido descritos. Sevilla et al (2007) padronizaram uma PCR utilizando 21 *primers* para identificação de mais de 200 espécies de peixes teleósteos utilizando como marcadores o citocromo b e o gene nuclear rodopsina.

A ictiofauna neotropical de água doce é estimada em aproximadamente seis mil espécies reconhecidas, sendo que aproximadamente 80% delas estão incluídas em três ordens: Characiformes, Siluriformes e Perciformes, com diversificação recente. Apesar disso, através de *barcoding* de DNA, tem sido possível identificar as diferentes espécies que ocorrem na região. Pereira et al (2013) conseguiram identificar corretamente 252 das 254 espécies de peixes analisadas através do gene COI. Estudo similar conduzido por De Carvalho et al (2011) conseguiu diferenciar 100 espécies de peixes do rio São Francisco através de *barcoding* utilizando o gene COI. Ribeiro et al (2012) conseguiram distinguir corretamente 97% de 135 espécies de peixes marinhos do litoral do estado de São Paulo utilizando o gene COI.

As técnicas moleculares baseadas em PCR possuem características como simplicidade e rapidez na execução que as tornam adequadas para serem utilizadas por agências fiscalizadoras, que geralmente possuem demandas para análise de um grande número de amostras. Os *amplicons* gerados através de PCR utilizando *primers* específicos podem ser sequenciados e comparados com sequências de referência utilizando análises filogenéticas (geralmente utilizando marcadores mitocondriais). Outra possibilidade parte do maior conhecimento acerca das sequências nucleotídicas das espécies, que permite a identificação de polimorfismos filogeneticamente informativos e o posterior desenvolvimento de *primers* espécie-específicos. Em condições ideais de reação, esses *primers* podem anelar apenas com fragmentos de DNA de uma determinada espécie. Além disso, conhecendo o tamanho da sequência gerada, é possível visualizar a presença do *amplicon* através de gel de eletroforese. A partir daí, processos de multiplexagem podem ser desenvolvidos para a identificação de um número maior de espécies em uma única reação.

Existem outras metodologias possíveis de serem utilizadas, como a amplificação utilizando *primers* universais e posterior tratamento com enzimas de restrição (PCR-RFLP), identificação de polimorfismos e conformação tridimensional a partir da migração diferencial

em um gel não desnaturante de fragmentos de DNA fita simples (PCR-SSCP) e utilização de um único *primer* e posterior comparação dos perfis de amplificação (PCR-RAPD). Entretanto, tais metodologias podem gerar dificuldades quanto à reprodutibilidade dos resultados. Além disso, existem metodologias descritas para identificação de peixes utilizando genes nucleares como marcadores, como microssatélites, genes do hormônio GnRH, hormônio do crescimento e subunidade 5S ribossomo (Gil 2007).

1.8. Marcadores moleculares para o gênero *Prochilodus*

Na literatura é possível encontrar diversos estudos que realizaram a identificação e caracterização de marcadores moleculares para espécies de *Prochilodus*.

Marcadores microssatélites polimórficos para *Prochilodus* foram descritos por Hatanaka et al (2002), Barbosa et al (2008), Melo (2011) e Rueda et al (2013), sendo que a ocorrência de amplificação cruzada com espécies do mesmo gênero é frequentemente reportada. O foco de tais estudos, entretanto, foi o isolamento de marcadores polimórficos para serem utilizados em estudos de diversidade genética.

Também existem trabalhos demonstrando a ocorrência de amplificação heteróloga de microssatélites isolados em espécies de *Prochilodus* em espécies pertencentes a outros grupos taxonômicos, como o gênero *Leporinus* (Morelli et al 2007, Olivatti et al 2011).

O Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (LBMM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde o presente estudo foi desenvolvido, também atua nessa seara, já tendo produzido diversos estudos com caracterização de marcadores moleculares para espécies de peixes, com foco na análise de diversidade genética em populações de peixes encontradas em regiões onde houve construção de usinas hidroelétricas. Barroca (2009, 2012) caracterizou a diversidade genética e estrutura populacional de espécies do gênero *Prochilodus* coletados nas regiões dos rios Paraopeba, Pará e Grande através de marcadores tipo microssatélite. Yazbeck (2007) descreveu cinco *loci* de microssatélites com potencial para estudos populacionais de *P. lineatus*. Ladeira (2007) também identificou regiões microssatélites com potencial para aplicação em estudos de genética de populações para as espécies *P. lineatus* e *Salminus brasiliensis*. Paiva (2007) identificou marcadores tipo microssatélites com potencial para utilização em estudos de genética de populações para *Pimelodus maculatus* coletados na região da bacia do rio Grande.

1.9. Marcadores moleculares utilizados na Biologia Forense

Uma grande dificuldade encontrada pelos órgãos de fiscalização ambiental diz respeito à correta identificação do material apreendido. A identificação morfológica fica particularmente comprometida quando se trata de formatos processados e prontos para consumo, quando características morfológicas importantes para a identificação são reduzidas ou já foram perdidas. A Figura 4 ilustra uma apreensão de peixes realizada pela Polícia Ambiental do Estado do Amazonas, em que o material já não apresentava características morfológicas individualizadoras.



Figura 4: Espécimes de peixes apreendidos em ocorrência de pesca ilegal. Os caracteres morfológicos que permitem a identificação das espécies não estavam presentes, prejudicando o processo de delimitação de espécie. Imagem gentilmente cedida pelo Tenente-Coronel Flávio Diniz, do Batalhão de Polícia Ambiental do Amazonas.

Outro problema para os órgãos de fiscalização e controle são as espécies com identificação ambígua ou indefinida. Por exemplo, o nome “pacu” é utilizado para identificar diversas espécies que pertencem a diferentes gêneros e famílias (Ardura et al 2012).

Além disso, em grande parte das regiões onde ocorrem apreensões de material proveniente de pesca ilegal, existe o empecilho da falta de taxonomistas treinados e a baixa resolução taxonômica dependendo do grupo analisado (Stein et al 2014). Nesse aspecto, a genética pode auxiliar através do fornecimento de ferramentas que auxiliam na identificação de espécimes apreendidos (Ardura et al 2012, Ko et al 2013). Vários tipos de marcadores moleculares têm sido aplicados na área ambiental da ciência forense: microssatélites, *indels* e SNPs, juntamente com métodos como sequenciamento e análise de fragmentos (Ogden 2008).

A literatura mostra diversos trabalhos que já foram desenvolvidos em diferentes países utilizando variadas metodologias, principalmente em casos envolvendo a detecção de fraudes comerciais. Os marcadores mais utilizados na ciência forense para identificação de animais são os genes mitocondriais COI e citocromo b (Filonzi et al 2010, Keskin e Atar 2012, Kyle e Wilson 2007, Tzika et al 2010), mas outros genes como das subunidades 12S e 16S do RNA ribossomal e regiões D-loop também são utilizadas (Teletchea 2009, Tobe e Linacre 2010).

A genética forense também tem sido utilizada na aquicultura em outras situações. Ardura et al (2012) identificaram a presença de espécies de peixes pertencentes a níveis tróficos superiores em ração de peixes de aquário, utilizando como marcador fragmentos do gene mitocondrial da subunidade 16S de RNA ribossômico. Glover (2010) relatou o sucesso do emprego de identificação baseada em DNA de espécies de peixes provenientes de aquicultura em populações selvagens.

Quanto aos custos, estudos mostram que técnicas de *barcoding* de DNA baseados em sequenciamento de Sanger custam entre 1,7 e 3,4 vezes mais que os métodos tradicionais de identificação baseados em morfologia. O uso de métodos baseados em NGS resulta em custos similares ou até mesmo inferiores, dependendo do tipo de análise. Além disso, a questão do tempo necessário para análise é mais um fator favorável ao NGS, que tem potencial para gerar dados em questão de dias (Stein et al 2014). Particularmente, o uso de metodologias baseadas em NGS é interessante quando o número de amostras a serem utilizadas é grande, pois quanto maior o número de amostras avaliadas em uma única rodada de sequenciamento, menor o custo por indivíduo.

No Brasil, o uso de técnicas baseadas em biologia molecular para identificação de espécies apreendidas em ocorrências de pesca e caça ilegal pelos órgãos de perícia oficial ainda é restrito. Ao contrário do que acontece em perícias que envolvem a identificação humana, em que existem marcadores moleculares bem estabelecidos e amplamente utilizados na rotina dos laboratórios forenses, a identificação de espécies em perícias

ambientais ainda é feita de modo precário. Além do mais, esse tipo de análise, quando acontece, é feito em parceria com institutos de pesquisa, notadamente as Universidades.

Sanches et al (2012) reportaram sucesso na identificação para fim forense de fragmentos de carne de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) e veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) e um fragmento de asa de aracuã (*Ortalis canicollis*) através de *barcoding* de DNA utilizando como marcadores o gene do citocromo b. Um dado interessante é que, no caso da identificação da carne de capivara, o autor do delito havia alegado que se tratava de carne de porco, o que pôde ser desmentido somente após a análise genética do material.

A literatura também reporta um relato de investigação para fim forense em que foi possível realizar a identificação de espécie a partir da análise de *barcoding* de DNA extraído de duas amostras de carne apreendidas pelo IBAMA. O estudo revelou tratar-se de carne de anta (*Tapirus terrestris*), a qual era proveniente de caça ilegal (Sanches et al 2011).

Ferreira et al (2011), da Universidade Federal de Pernambuco, através de *barcoding* de citocromo b, também obtiveram sucesso na padronização de protocolo para identificação de sirênios e diferenciação entre espécies domésticas, as quais geralmente são utilizadas como fonte alimentar na região.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Esse trabalho tem como objetivo realizar o isolamento e caracterização de marcadores moleculares em *P. argenteus* e *P. costatus* que tenham potencial para serem utilizados na identificação de materiais apreendidos em ocorrências relacionadas a crimes ambientais e/ou estudos populacionais.

2.2. Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral, foram delimitados os seguintes objetivos específicos:

- 1- Coletar material das espécies selecionadas e padronizar da etapa de extração de DNA;
- 2- Construir bibliotecas genômicas através do DNA extraído;
- 3- Realizar o sequenciamento do DNA genômico de *P. argenteus* e *P. costatus*;
- 4- Avaliar a qualidade das *reads* geradas no sequenciamento e realizar a montagem *de novo* das sequências;
- 5- Identificar os *contigs* referentes ao DNA mitocondrial e proceder à anotação genética;
- 6- Buscar marcadores mitocondriais nas sequências de mtDNA obtidas utilizando ferramentas de bioinformática;
- 7- Comparar as sequências de mtDNA obtidas para *P. argenteus* e *P. costatus* com a sequência publicada de *P. lineatus* (Carmo et al 2014);
- 8- Buscar marcadores microssatélites nos *contigs* obtidos a partir da montagem *de novo* utilizando ferramentas de bioinformática;
- 9- Gerar sequências nucleares que possam ser caracterizadas como espécie-específicos e gênero-específicos em estudos futuros;
- 10- Avaliar a aplicabilidade dos marcadores selecionados para a identificação de DNA de *Prochilodus* em petrechos de pesca.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aquisição de amostras

Um exemplar fêmea da espécie *P. argenteus* e um exemplar macho de *P. costatus* foram coletados no rio Paraopeba, na região da usina hidroelétrica Retiro Baixo, no município de Felixlândia (MG). O ponto de coleta distava aproximadamente 300 metros à jusante da barragem da represa (coordenadas geográficas 18°52'23.9" S e 44°46'52.8" W). O procedimento foi feito com licença do órgão ambiental competente (licença n.º 007/2014 emitida pelo IEF de Minas Gerais, Processo 02000004485/14). As figuras 5 e 6 mostram os exemplares coletados.

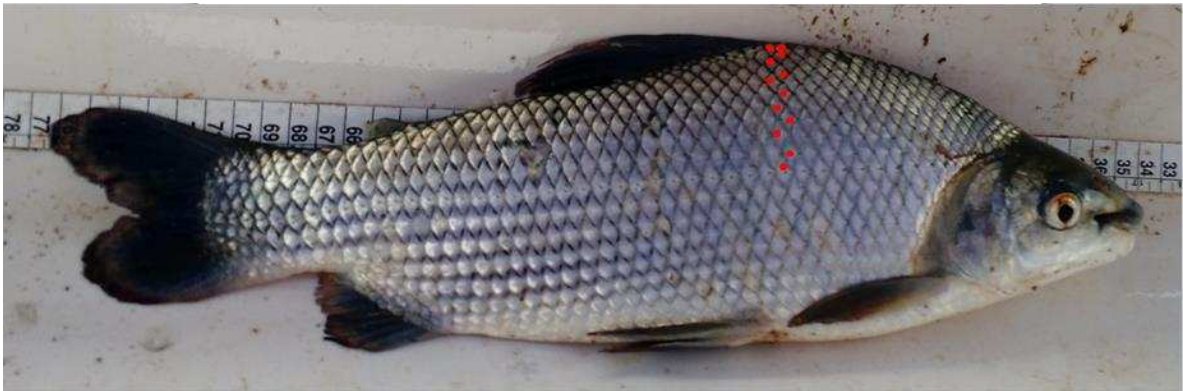


Figura 5: Espécime fêmea de *P. argenteus* coletado. Os círculos vermelhos mostram a contagem de linhas transversais de escamas entre a origem da nadadeira dorsal e a linha lateral que, para o exemplar coletado, eram 11,5.



Figura 6: Espécime macho de *P. costatus* coletado. Os círculos vermelhos mostram a contagem de linhas transversais de escamas entre a origem da nadadeira dorsal e a linha lateral que, para o exemplar coletado, eram 8,5.

A identificação morfológica da espécie foi feita de acordo com a chave de identificação proposta por Castro e Vari (2003), pelo biólogo Tobias A. Barroso, membro da equipe de trabalho do Prof. Dr. Gilmar Bastos Santos, da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. A delimitação do sexo dos espécimes apreendidos foi feita pelo biólogo Leonardo Cardoso Resende, membro da equipe do LBMM.

Foram coletados fragmentos de tecido muscular de cada espécie, os quais foram acondicionados em microtubos de 1,5 mL. Os tubos, por sua vez, foram transportados em caixa térmica contendo gelo seco até o LBMM, em Belo Horizonte (MG), onde foram realizadas as demais etapas a seguir descritas. Amostras de tecidos foram depositadas no banco UFMG-BDT da UFMG (*vouchers* UFMG-BDT-PP000001 para *P. argenteus* e UFMG-BDT-PP000002 para *P. costatus*).

3.2. Obtenção de DNA

Para a extração de DNA utilizou-se aproximadamente 02 (dois) gramas de tecido muscular. A extração foi conduzida de acordo com o método de proteinase K e fenol-clorofórmio adaptado de Sambrook et al (1989). Basicamente, esse protocolo consiste na digestão enzimática de células e tecidos, via proteinase K, na presença de EDTA, que tem a função de sequestrar cátions divalentes e, conseqüentemente, inibir a ação de DNases. A solubilização de membranas e desnaturação de proteínas é feita pelo SDS, que possui ação detergente. Em seguida, os ácidos nucleicos são purificados através de extrações utilizando solventes orgânicos.

O tecido foi macerado em gelo seco, utilizando-se gral e pistilo. Após a maceração, o material foi transferido para um tubo de 15 mL com posterior adição de 1,5 mL de TEN 9 (50 mM Tris-HCl, pH 9, 100 mM EDTA, 200 mM NaCl). O tubo foi agitado suavemente por inversão durante 10 a 30 minutos até que fosse formada uma mistura homogênea. 150 µL de SDS 20% foram acrescentados à solução e o tubo agitado novamente por 10 minutos. Um volume de 150 µL de proteinase K (10 mg/mL) foi adicionado e, após ser homogeneizada, a mistura foi incubada a 56°C *overnight*. Após a incubação procedeu-se à purificação de DNA pelo método fenol-clorofórmio.

A purificação foi feita utilizando um volume de 500 µL de fenol equilibrado pH 7,4 – 8 (Phoneutria). O material foi homogeneizado e incubado em banho-maria a 56°C. Posteriormente, foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio, seguido de leve agitação e incubação por 10 minutos, centrifugação a 16.000 g e coleta da fase superior, que foi transferida para um novo tubo. A etapa de purificação com clorofórmio foi repetida uma vez,

para a remoção completa do fenol. Em seguida, o DNA foi precipitado com 1 mL de solução de precipitação de DNA (Phoneutria) por 10 minutos e, após centrifugação a 16.000 g por 10 minutos, a fase aquosa foi desprezada. O DNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e seco à temperatura ambiente. Para a realização de testes, o DNA foi ressuspensionado em 100 µL de TE (Phoneutria - 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM de EDTA).

Para a padronização do protocolo de extração, foram feitos testes com diferentes lotes de fenol disponíveis no laboratório (Fenol 1 e Fenol 2, sendo o primeiro referente a um lote mais antigo) e diferentes tempos de incubação com fenol (10 minutos e 45 minutos). Para verificar a integridade do DNA extraído, uma alíquota de 4µL de amostra referente a cada tratamento foi submetida a eletroforese em gel de agarose 0,7% em TAE (40 mM Tris-HCl pH 7,5; ácido acético 20 mM; 1 mM EDTA pH 8,0) corado com brometo de etídio.

Como as etapas subsequentes de construção da biblioteca genômica e sequenciamento são realizadas através de reações enzimáticas, procedeu-se a uma etapa de verificação da possível contaminação das amostras de DNA com inibidores da atividade enzimática. O teste foi conduzido da seguinte forma:

- 1- 4µL de DNA extraído + 6µL de água ultra pura;
- 2- 4µL de DNA extraído + 1µL de enzima de restrição Eco R1 (Invitrogen) + 2µL de tampão React 3 (Invitrogen) + 3µL de água ultra pura;
- 3- 4µL de DNA extraído + 2µL de tampão React 3 + 4µL de água ultra pura.

Após 1 hora de incubação em banho-maria a 37°C, as amostras foram submetidas a corrida eletroforética em gel de agarose 0,7% em TAE.

3.3. Construção da biblioteca genômica

O DNA precipitado foi ressuspensionado em 50 µL de água ultrapura para biologia molecular (Phoneutria). A quantificação da amostra solubilizada foi feita com o fluorímetro Qubit 2.0 (Life) e a análise de integridade foi realizada em gel de agarose 0,7% em TAE. A análise de qualidade foi feita em Nanodrop (Thermo), com base nos valores das razões das absorbâncias a 260/280 nm e 260/230 nm. Em seguida, 50 ng de DNA de cada espécie foram utilizados para a construção das bibliotecas genômicas utilizando o kit Nextera DNA Sample Preparation (Illumina) conforme orientação do fabricante.

A construção da biblioteca genômica consiste basicamente em uma primeira etapa de tagmentação, em que é feita a fragmentação enzimática do DNA genômico, via transposase, com ligação de sequências adaptadoras às extremidades. Em seguida

procede-se à etapa de purificação em coluna utilizando o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). Posteriormente é feita a etapa de adição de sequências *indexes* (que irão posteriormente identificar as sequências) através de PCR, seguida de uma nova etapa de purificação utilizando *beads* magnéticas (AMPure XP beads). Finalmente, a biblioteca é quantificada via PCR quantitativa utilizando Library Quantification Kit - Illumina/Universal (Kapa), conforme orientação do fabricante.

Ao final do processo, os fragmentos de DNA possuem, então, ligado às extremidades, sequências complementares às sequências de oligonucleotídeos fixados na célula de sequenciamento, sequências complementares aos *primers* de sequenciamento e sequências *index*.

O tamanho médio das bibliotecas, em pares de base, foi estimado após corrida eletroforética em gel de agarose 0,7% em TAE.

3.4. Sequenciamento

Para a etapa de sequenciamento, as bibliotecas genômicas foram preparadas em concentrações de 18 pM, conforme orientação do fabricante. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático de nova geração MiSeq da Illumina, utilizando o MiSeq Reagent Kit V3-600 (com dois ciclos de 300 reações) para a espécie *P. argenteus*. Para a espécie *P. costatus* foi utilizado o MiSeq Reagent Kit V2-500 (com dois ciclos de 250 reações).

Os fragmentos de DNA que constituem a biblioteca genômica se ligam à célula de sequenciamento por complementaridade de bases entre sequências presentes em sua superfície e sequências presentes nas extremidades das moléculas de DNA da biblioteca. Posteriormente, cada fragmento de DNA que se ligou à célula de sequenciamento é amplificado via PCR, num processo chamado amplificação em ponte, de modo que, ao final, são gerados *clusters* que serão, então, sequenciados.

A plataforma Illumina utiliza metodologia de sequenciamento por síntese, que consiste basicamente na utilização de dNTPs marcados com fluorescência que, após cada ciclo de sequenciamento, têm seu sinal captado por um sensor que registra no equipamento qual nucleotídeo foi adicionado. Para ambos os sequenciamentos foi utilizada estratégia *paired-end*, que consiste no sequenciamento a partir de ambas as extremidades do fragmento de DNA.

3.5. Análise das sequências geradas

3.5.1. Montagem *de novo*

Após o sequenciamento, a leitura de cada fragmento da biblioteca genômica é convertida em sequências de nucleotídeos que são denominadas *reads*. As *reads* geradas foram montadas *de novo* no software CLC Genomics Workbench (disponível em www.clcbio.com), de modo a produzir sequências maiores a partir das *reads*, que ao final do processo são denominadas *contigs*.

Os *contigs* referentes à molécula de DNA mitocondrial foram identificados e testados quanto à estrutura (se linear ou circular).

3.5.2. Identificação da espécie através de *barcoding* de COI

Para ambas as sequências de mtDNA obtidas, procedeu-se à identificação da região de 648 pb referente ao marcador utilizado para *barcoding* de COI. As sequências foram submetidas ao sistema de identificação do BOLD (*Barcode of Life Datasystems*) para identificação de espécies (Ratnasingham e Hebert 2007).

3.5.3. Anotação do genoma mitocondrial

A anotação do genoma mitocondrial, que consiste na identificação de regiões codificadoras na sequência de mtDNA, foi feita utilizando a ferramenta MitoFish (Iwasaki et al 2013). Para cada espécie, foram gerados mapas circulares esquematizando as regiões codificadoras, bem como tabelas de anotação. Os genomas mitocondriais de *P. argenteus* e *P. costatus* foram comparados entre si e com o mitogenoma de *P. lineatus*, descrito por Carmo et al (2014), que até então era a única espécie de *Prochilodus* que possuía a sequência de DNA mitocondrial publicada.

As sequências completas de genoma mitocondrial foram depositadas no GenBank sob os seguintes números de acesso: KR014816 para *P. argenteus* e KR014817 para *P. costatus* (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

3.5.4. Comparação das sequências dos genomas mitocondriais

As sequências de mtDNA de *P. argenteus* e *P. costatus* foram comparados com o genoma mitocondrial da espécie *P. lineatus* (número de acesso no GenBank KM245045) utilizando a ferramenta CGView Comparison Tool. Essa ferramenta faz a comparação de sequências circulares com uma sequência de referência utilizando o algoritmo BLAST. Os resultados são apresentados em forma de mapas circulares que destacam as regiões de alinhamento com diferentes graus de identidade entre as sequências comparadas (Grant et al 2012).

As análises foram feitas utilizando a sequência de DNA mitocondrial de *P. lineatus* como referência. Também foram feitas análises comparativas com genomas mitocondriais de espécies de peixes pertencentes a outros gêneros produzidos pela equipe do LBMM: *Piaractus mesopotamicus*, número de acesso KM245046 (Pimentel et al 2014); *Brycon orbignyanus*, número de acesso KM245044 (Siqueira et al 2014); e *Salminus brasiliensis*, número de acesso KM245047 (Brandão-Dias et al 2014), todos pertencentes à ordem Characiformes.

Para melhor caracterizar as regiões com maiores níveis de similaridade de sequências entre as espécies de *Prochilodus* avaliadas neste trabalho, os percentuais de identidade entre os genes de mtDNA foram avaliados através da ferramenta BLASTn (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3.5.5. Desenho de primers

Foram desenhados primers para as sequências mitocondriais de *P. argenteus*, *P. costatus* e *P. lineatus* utilizando a ferramenta Primer-BLAST, que permite o desenho de primers alvo-específicos (Ye et al 2012). Para o desenho de primers foram utilizados os seguintes parâmetros: temperatura de anelamento entre 57 e 63°C e tamanho de amplicon entre 300 e 1.000 pb.

Os primers obtidos para cada uma das três espécies de *Prochilodus* foram testados quanto à especificidade nas sequências das demais espécies utilizando a característica do Primer-BLAST que permite verificar, *in silico*, a especificidade de primers previamente desenhados. Dessa maneira, foram selecionados primers comuns às três espécies que geravam amplicons do mesmo tamanho e que potencialmente poderiam ser utilizados para a identificação do gênero *Prochilodus*. Tais primers foram denominados gênero-específicos e também foram testados nas sequências de DNA mitocondrial de outros gêneros de peixes,

de forma a pesquisar se haveria amplificação desses *primers* em gêneros que não o *Prochilodus*.

Também foram selecionados *primers* espécie-específicos, ou seja, cujas simulações no Primer-BLAST indicaram a ocorrência de amplificação para apenas uma espécie de *Prochilodus*. Buscou-se por *primers* que gerassem *amplicons* de tamanhos diferentes e que, potencialmente, permitissem a identificação da espécie através de análise de um gel de eletroforese.

As sequências completas de DNA mitocondrial das três espécies de *Prochilodus* foram alinhadas utilizando o software MEGA 6.0 (Tamura et al 2013). A partir da análise do alinhamento, foi feito desenho manual de *primers* em sequências que apresentavam menores níveis de identidade entre as espécies, de modo a também se obter *primers* espécie-específicos.

3.5.6. Identificação de microssatélites

Para a pesquisa de microssatélites, os *contigs* obtidos foram convertidos em formato FASTA e a busca por microssatélites perfeitos foi feita através do software SciroKo (Kofler et al 2007).

Também foi feita pesquisa de microssatélites utilizando a ferramenta MSATCOMMANDER (Faircloth 2008). Além de detectar a presença de microssatélites, esse *software* identifica os marcadores para os quais é possível fazer o desenho de *primers* que permitam sua amplificação. Dessa forma, se o microssatélite identificado se localiza próximo a uma das extremidades do *contig*, o mesmo é automaticamente descartado (Abdelkrim et al 2009).

3.6. Padronização da PCR para identificação de gênero e espécie

A PCR utilizando os *primers* desenhados neste trabalho foi padronizada levando-se em consideração diferentes temperaturas de anelamento (53°C, 56°C, 63°C, 65°C, 67°C e 69°C), número de ciclos (28, 30, 33 e 35 ciclos), concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO) (1%, 3%, 5%, 7% e 10%) e dois tipos de tampão: IC e IVB (ambos da Phoneutria). As reações foram feitas em termociclador Applied Biosystems, modelo Veriti.

Os testes mantiveram as seguintes condições de reação: 94°C por 02 minutos; ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento com temperaturas variáveis por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos e; extensão final a 72°C por 05 minutos.

Os *amplicons* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,7% em TAE corado com brometo de etídio.

Foram realizados testes de especificidade para verificação de reações cruzadas com outras espécies de peixes: *Leporinus* sp. (piauí), *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *Brycon orbignyanus* (piracanjuba), *Salminus brasiliensis* e *Salminus franciscanus* (dourado).

Os testes de sensibilidade foram realizados a partir de diluições seriadas de DNA de *Prochilodus* a uma concentração inicial de 50 ng/μl para *P. argenteus* e *P. costatus* e 2,5 ng/ul para *P. lineatus*. As diluições foram feitas seguindo um fator de 10 até 1:100.000 em água ultra-pura.

3.7. Exames em petrechos de pesca

3.7.1. Obtenção de material

Uma rede de pesca e fragmentos de uma tarrafa (ambos confeccionados em nylon) que foram sabidamente utilizadas para coleta de espécimes de *Prochilodus* em diferentes pontos da bacia do rio São Francisco foram gentilmente cedidos pela equipe do Professor Dr. Gilmar Bastos Santos, da Pontifícia Universidade Católica. O material foi mantido a -20°C até ser utilizado para análise.

Anteriormente à doação do material, os petrechos de pesca estavam sendo mantidos em temperatura ambiente, na casa de pescadores.

3.7.2. Extração de DNA

Para cada petrecho, utilizou-se dois pequenos fragmentos de material retirado próximo aos nós da malha, medindo aproximadamente 02 (dois) centímetros cada. Optou-se por coletar fragmentos em regiões onde o nylon encontrava-se com coloração mais escura, que possivelmente estiveram por maior tempo em contato com a água.

Foram utilizados como controle positivo: um fragmento de barbante que foi atritado por 1 minuto contra as escamas de um exemplar de *P. lineatus* e um fragmento de plástico que era utilizado para acondicionar o espécime de *P. lineatus*.

Os fragmentos coletados foram colocados em tubos de 1,5 mL contendo 50 μL de TE e foram incubados em banho-maria a 65°C *overnight*.

A extração de DNA foi conduzida com kit GTS (Phoneutria), conforme orientação do fabricante.

3.7.3. Detecção de DNA de *Prochilodus* por PCR

O DNA extraído dos petrechos de pesca e controles foi submetido à amplificação por PCR utilizando *primers* desenhados no presente estudo. Também foram feitas reações utilizando outros dois pares de *primers*:

1. *Primers* COI, que amplificam uma região COI de peixes possui as seguintes sequências: COIF 5' TTC TCC ACC AAC CAC AAA GAC ATT GG 3' e COIR 5' ACT TCG GGG TGG CCG AAG AAT CAA AA (Ivanova et al 2007). O tamanho esperado do *amplicon* é de aproximadamente 700 pb;
2. *Primers* denominados Pro5, desenvolvidos para amplificação de uma região de microsatélite de *P. lineatus* e que apresentavam reação cruzada com *P. argenteus* e *P. costatus*. O referido par de *primers* foi desenvolvido pela equipe do LBMM e tem sido utilizado com sucesso na identificação de ovos e larvas de *Prochilodus* coletados na bacia do rio São Francisco. A sequência dos *primers* é: Pro5F2 5' GAT GTC GGT TCT TGT ACA GTG GTG 3' e Pro5R1 5' AGG GGC TGG TAT CAG TCG GGT 3'. O tamanho esperado do *amplicon* é 262 pb.

O controle positivo da PCR foi feito com 50 ng de DNA de *P. argenteus*.

4. RESULTADOS

4.1. Padronização da extração de DNA

Após a realização de etapa de extração utilizando diferentes tempos de exposição ao Fenol 1, observou-se que as amostras apresentavam-se degradadas ao final do procedimento. Os testes com Fenol 2 mostraram-se satisfatórios, com amostras apresentando bandas com alta massa molecular referentes ao DNA genômico. Quanto ao tempo de extração com fenol, as amostras tratadas por 10 minutos apresentaram melhores resultados quanto à integridade (Figura 7).

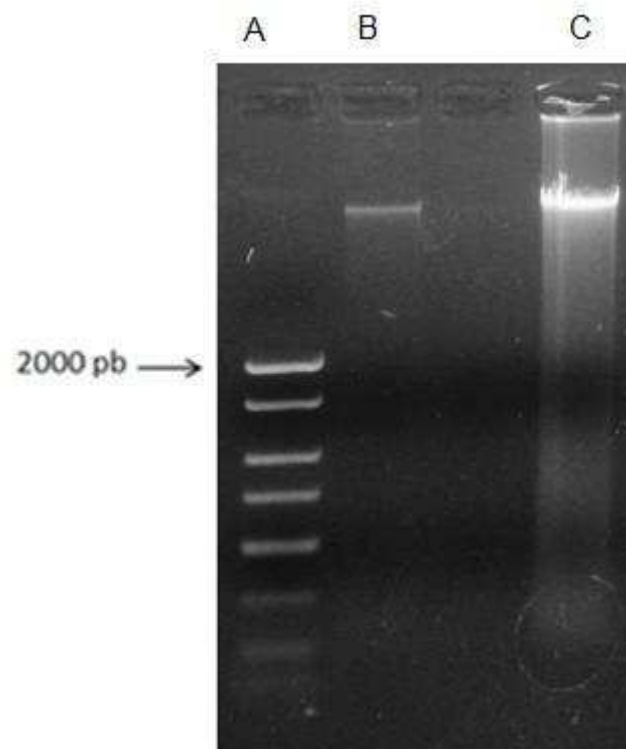


Figura 7: Extração de DNA genômico de *P. argenteus* e *P. costatus*. A figura mostra gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV mostrando resultados obtidos após padronização da extração de DNA. A = padrão de massa molecular; B = DNA purificado de *P. costatus*; C = DNA purificado de *P. argenteus*.

Os testes enzimáticos também se mostraram satisfatórios, uma vez que houve degradação do DNA mediante tratamento com enzima de restrição, indicando que as amostras não estavam contaminadas com inibidores enzimáticos (Figuras 8 e 9).

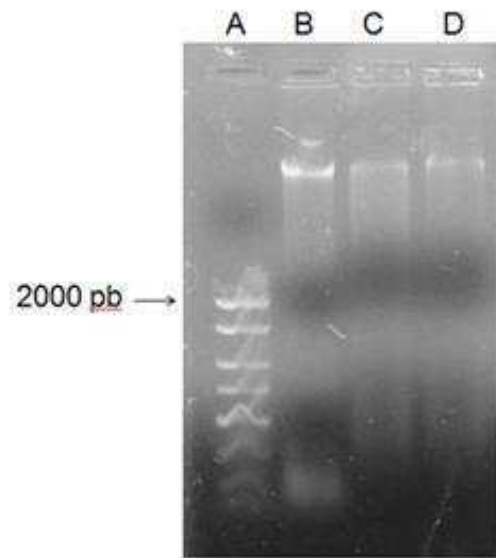


Figura 8: Teste enzimático com DNA extraído de *P. argenteus*. A figura mostra gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV mostrando resultados obtidos após teste enzimático com DNA extraído de *P. argenteus*. A = padrão de massa molecular; B = DNA purificado; C = DNA purificado + enzima + tampão da enzima; D = DNA purificado + tampão da enzima.

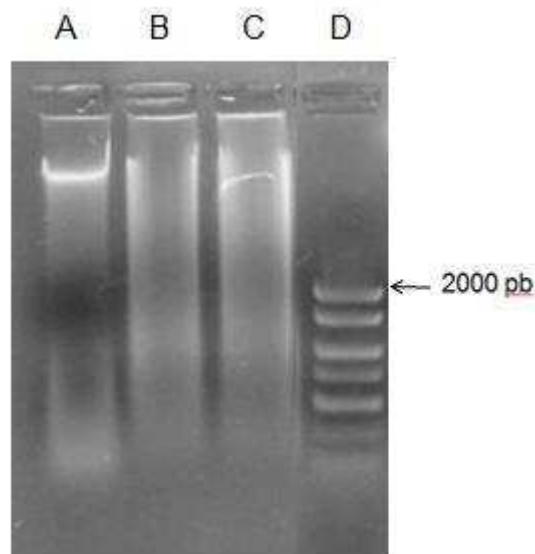


Figura 9: Teste enzimático com DNA extraído de *P. costatus*. A figura mostra gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV mostrando resultados obtidos após teste enzimático com DNA extraído de *P. costatus*. A = DNA purificado; B = DNA purificado + enzima + tampão da enzima; C = DNA purificado + tampão da enzima; D = padrão de massa molecular.

4.2. Construção da biblioteca genômica

Para a espécie *P. argenteus*, a quantificação realizada no Qubit mostrou que a amostra apresentava uma concentração de DNA de 64,6 ng/μl. Os testes de absorvância efetuados no Nanodrop mostraram as seguintes razões 260/280 nm = 2,57 e 260/230 nm = 3,73. A concentração da biblioteca foi aferida em 4,65 nM e o tamanho médio foi estimado em aproximadamente 250 pb.

Para *P. costatus*, a quantificação realizada no Qubit mostrou que a amostra apresentava uma concentração de DNA de 91,6 ng/μl. Os testes de absorvância efetuados no Nanodrop mostraram as seguintes razões 260/280 nm = 1,94 e 260/230 nm = 2,02. A concentração da biblioteca foi aferida em 8,9 nM e o tamanho médio foi estimado em aproximadamente 450 pb.

4.3. Sequenciamento

O sequenciamento de *P. argenteus* gerou 9 GB de dados. 61,5% das *reads* geradas apresentaram valor de qualidade de Phred (Q) superior a 30 (o que significa dizer que a chance de erro na determinação da sequência é de 1 em 1.000 por base sequenciada). No total, foram obtidas 17.486.428 *reads*, com comprimento médio de 207,92 pb por *read* e um total de 3.635.782.166 bases (Figura 10). A qualidade do sequenciamento se manteve boa durante o processo, tendo sido observado uma queda no valor de Q nos últimos ciclos (Figura 11).

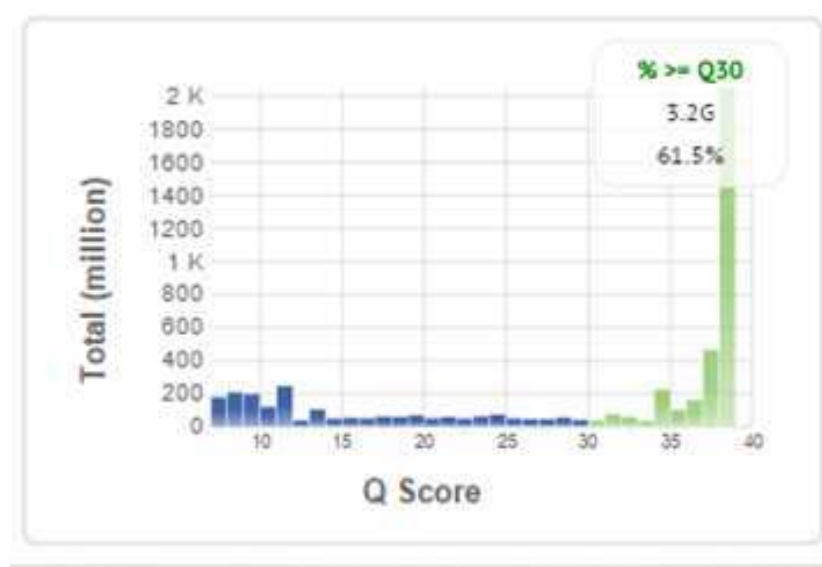


Figura 10: Qualidade do sequenciamento de *P. argenteus*.

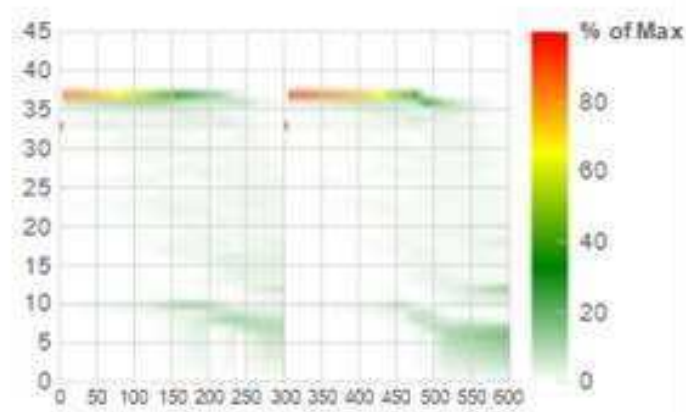


Figura 11: Qualidade do sequenciamento de *P. argenteus* por ciclo.

Para a espécie *P. costatus*, o sequenciamento gerou 17 GB de dados, sendo que 43,1% das *reads* geradas apresentaram valor de Q superior a 30. Foram obtidas 37.834.586 *reads*, com comprimento médio de 140,91 pb por *read* e um total de 5.331.379.551 bases (Figura 12). A qualidade do sequenciamento se manteve boa durante o sequenciamento da fita *forward*, o que não aconteceu durante o sequenciamento da fita *reverse* (Figura 13).

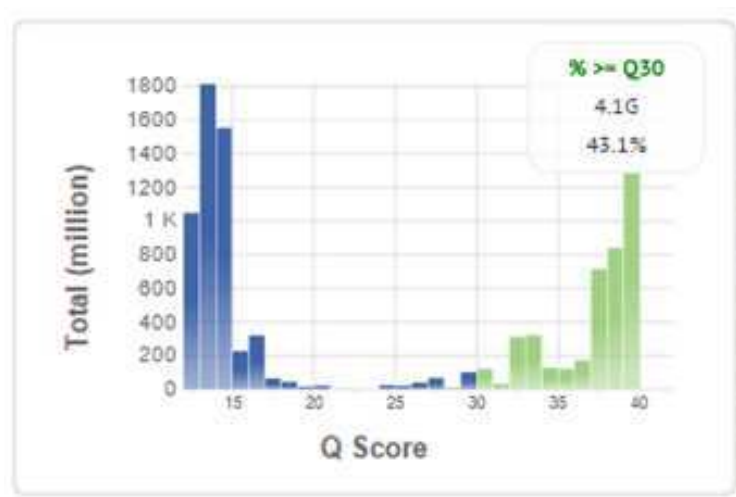


Figura 12: Qualidade do sequenciamento de *P. costatus*.

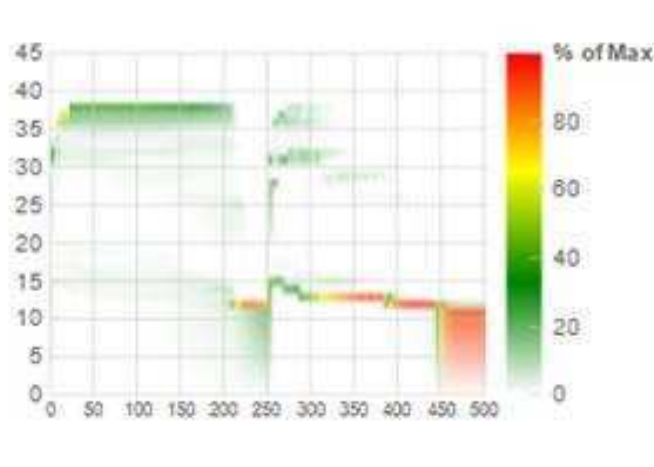


Figura 13: Qualidade do sequenciamento de *P. costatus* por ciclo.

4.4. Análise das sequências geradas

4.4.1. Montagem *de novo*

As 17.486.428 *reads* obtidas para *P. argenteus* foram montadas em 173.679 *contigs*, com tamanho médio de 930 pb. O *contig* de maior tamanho possuía 16.697 pb e comportou-se como sendo circular ao ser submetido à análise de linearidade.

Para *P. costatus* foram montados 179.857 *contigs*, com tamanho médio de 867 pb. O *contig* de maior tamanho possuía 16.699 pb e comportou-se como sendo circular ao ser submetido à análise de linearidade.

As sequências de DNA circular foram, então, identificadas como sendo referentes ao genoma mitocondrial. O mitogenoma de *P. argenteus* foi resolvido com uma cobertura média de 378 vezes e o de *P. costatus* com uma cobertura média de 345 vezes. A cobertura denota a quantidade de vezes que o genoma mitocondrial foi sequenciado.

4.4.2. Identificação da espécie através de *barcoding* de COI

A sequência do gene COI de *P. argenteus* utilizada como marcador de *barcoding* no BOLD, ao ser submetida à ferramenta de identificação do sistema, não foi capaz de realizar identificação em nível de espécie. Apesar de ter apresentado 99,85% de similaridade com sequências depositadas de *P. argenteus*, também foram observados níveis de similaridade superiores a 98% com sequências depositadas de *P. costatus* e *P. hartii*. A Figura 14 mostra

P. costatus), comprimento do gene *16S* (951 pb em *P. argenteus* e 952 pb em *P. costatus*) e comprimento da região D-loop (1.040 pb em *P. argenteus* e 1.041 pb em *P. costatus*).

Tabela 1: Anotação do genoma mitocondrial de *P. argenteus* e *P. costatus*

Gene	<i>P. argenteus</i>						<i>P. costatus</i>						Fita (*)
	De (pb)	Até (pb)	Tamanho (pb)	Aminoácido	Codon Início	Codon Parada	De (pb)	Até (pb)	Tamanho (pb)	Aminoácido	Codon Início	Codon Parada	
tRNA ^{Phe} (GAA)	1	68	68				1	68	68				H
12S rRNA	69	1019	951				69	1020	952				H
tRNA ^{Val} (TAC)	1020	1091	72				1021	1092	72				H
16S rRNA	1092	2770	1679				1093	2771	1679				H
tRNA ^{Leu2} (TAA)	2771	2845	75				2772	2846	75				H
<i>Nd1</i>	2846	3820	975	324	ATG	TAA	2847	3821	975	324	ATG	TAA	H
tRNA ^{Ile} (GAT)	3829	3900	72				3830	3901	72				H
tRNA ^{Gln} (TTG)	3899	3969	71				3900	3970	71				L
tRNA ^{Met} (CAT)	3969	4037	69				3970	4038	69				H
<i>Nd2</i>	4038	5082	1045	348	ATG	T--	4039	5083	1045	348	ATG	T--	H
tRNA ^{Trp} (TCA)	5083	5154	72				5084	5155	72				H
tRNA ^{Ala} (TCG)	5157	5225	69				5158	5226	69				L

tRNA ^{Asn} (GTT)	5227	5299	73				5228	5300	73				L
tRNA ^{Cys} (GCA)	5331	5397	67				5332	5398	67				L
tRNA ^{Tyr} (GTA)	5399	5469	71				5400	5470	71				L
<i>COI</i>	5471	7018	1548	515	GTG	TAA	5472	7019	1548	515	GTG	TAA	H
tRNA ^{Ser2} (TGA)	7019	7089	71				7020	7090	71				L
tRNA ^{Asp} (GTC)	7095	7167	73				7096	7168	73				H
<i>COII</i>	7182	7872	691	230	ATG	T--	7183	7873	691	230	ATG	T--	H
tRNA ^{Lys} (TTT)	7873	7947	75				7874	7948	75				H
<i>Atp8</i>	7949	8116	168	55	ATG	TAA	7950	8117	168	55	ATG	TAA	H
<i>Atp6</i>	8107	8789	683	227	ATG	TA-	8108	8790	683	227	ATG	TA-	H
<i>COIII</i>	8790	9574	785	261	ATG	TA-	8791	9575	785	261	ATG	TA-	H
tRNA ^{Gly} (TCC)	9575	9646	72				9576	9647	72				H
<i>Nd3</i>	9647	9995	349	116	ATG	T--	9648	9996	349	116	ATG	T--	H
tRNA ^{Arg} (TCG)	9996	10065	70				9997	10066	70				H
<i>Nd4L</i>	10066	10362	297	98	ATG	TAA	10067	10363	297	98	ATG	TAA	H

<i>Nd4</i>	10356	11736	1381	460	ATG	T--	10357	11737	1381	460	ATG	T--	H
tRNA ^{His} (GTG)	11737	11805	69				11738	11806	69				H
tRNA ^{Ser1} (GTC)	11806	11873	68				11807	11874	68				H
tRNA ^{Leu1} (TAG)	11875	11947	73				11876	11948	73				H
<i>Nd5</i>	11948	13786	1839	612	ATG	TAA	11949	13787	1839	612	ATG	TAA	H
<i>Nd6</i>	13783	14301	519	172	ATG	TAA	13784	14302	519	172	ATG	TAA	L
tRNA ^{Glu} (TTC)	14302	14370	69				14303	14371	69				L
<i>Cytb</i>	14376	15516	1141	380	ATG	T--	14377	15517	1141	380	ATG	T--	H
tRNA ^{Thr} (TGT)	15517	15588	72				15518	15589	72				H
tRNA ^{Pro} (TGG)	15588	15657	70				15589	15658	70				L
D-loop	15658	16697	1040				15659	16699	1041				N/A

(*): Fita onde o gene é codificado. H (de *heavy*) para genes codificados na fita pesada e L (de *light*) para genes codificados na fita leve. As fitas onde os genes são codificados são as mesmas para *P. argenteus* e *P. costatus*.

Para ambas as espécies, todos os genes codificadores de proteínas usam ATG como códon de iniciação, exceto o gene *COI*, que usa GTG. Dos 13 genes codificadores de proteínas, 06 apresentavam TAA como códon de terminação (*Nd1*, *COI*, *Atp8*, *Nd4L*, *Nd5*, and *Nd6*), 05 apresentavam o códon de terminação incompleto T-- (*Nd2*, *COII*, *Nd3*, *Nd4*, and *Cytb*) e dois apresentavam o códon de terminação incompleto TA- (*Atp6* e *COIII*). Os códons de terminação incompletos devem ser completados durante evento de poliadenilação pós-transcricional (Ojala et al 1981).

Para ambas as espécies, a região D-loop localizava-se entre os genes de RNA transportador de prolina e fenilalanina. Oito genes de RNA transportador (tRNA^{Gln}, tRNA^{Ala}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Tyr}, tRNA^{Ser2}, tRNA^{Glu} e tRNA^{Pro}) e o gene *Nd6* são codificados na fita leve e os demais genes são codificados na fita pesada. Alguns genes apresentam sobreposição de sequências: tRNA^{Ile}, tRNA^{Gln} e rRNA^{Met}; *Atp8* e *Atp6*; *Nd4L* e *Nd4*; *Nd5*, *Nd6* e tRNA^{Glu}; tRNA^{Thr} e tRNA^{Pro}.

As anotações dos genomas mitocondriais das três espécies de *Prochilodus* mostraram resultados bastante similares. Em termos de tamanho dos genes e posição dos códons de iniciação e terminação, *P. costatus* e *P. lineatus* apresentaram-se iguais. A Tabela 2 mostra a comparação da anotação dos genomas mitocondriais das três espécies, sendo que as diferenças estão destacadas em vermelho.

Tabela 2: Comparação das anotações dos genomas mitocondriais de *P. lineatus*, *P. argenteus* e *P. costatus*

Gene	<i>P. lineatus</i>		<i>P. costatus</i>		<i>P. argenteus</i>	
	Tamanho (pb)	Fita	Tamanho (pb)	Fita	Tamanho (pb)	Fita
tRNA ^{Phe} (GAA)	68	H	68	H	68	H
12S rRNA	952	H	952	H	951	H
tRNA ^{Val} (TAC)	72	H	72	H	72	H
16S rRNA	1679	H	1679	H	1679	H
tRNA ^{Leu2} (TAA)	75	H	75	H	75	H
<i>Nd1</i>	975	H	975	H	975	H
tRNA ^{Ile} (GAT)	72	H	72	H	72	H
tRNA ^{Gln} (TTG)	71	L	71	L	71	L
tRNA ^{Met} (CAT)	69	H	69	H	69	H
<i>Nd2</i>	1045	H	1045	H	1045	H
tRNA ^{Trp} (TCA)	72	H	72	H	72	H
tRNA ^{Ala} (TCG)	69	L	69	L	69	L
tRNA ^{Asn} (GTT)	73	L	73	L	73	L
tRNA ^{Cys} (GCA)	67	L	67	L	67	L
tRNA ^{Tyr} (GTA)	71	L	71	L	71	L
<i>COI</i>	1548	H	1548	H	1548	H
tRNA ^{Ser2} (TGA)	71	L	71	L	71	L
tRNA ^{Asp} (GTC)	73	H	73	H	73	H
<i>COII</i>	691	H	691	H	691	H
tRNA ^{Lys} (TTT)	75	H	75	H	75	H

<i>Atp8</i>	168	H	168	H	168	H
<i>Atp6</i>	683	H	683	H	683	H
<i>COIII</i>	785	H	785	H	785	H
tRNA ^{Gly} (TCC)	72	H	72	H	72	H
<i>Nd3</i>	349	H	349	H	349	H
tRNA ^{Arg} (TCG)	70	H	70	H	70	H
<i>Nd4L</i>	297	H	297	H	297	H
<i>Nd4</i>	1381	H	1381	H	1381	H
tRNA ^{His} (GTG)	69	H	69	H	69	H
tRNA ^{Ser1} (GTC)	68	H	68	H	68	H
tRNA ^{Leu1} (TAG)	73	H	73	H	73	H
<i>Nd5</i>	1839	H	1839	H	1839	H
<i>Nd6</i>	519	L	519	L	519	L
tRNA ^{Glu} (TTC)	69	L	69	L	69	L
<i>Cytb</i>	1141	H	1141	H	1141	H
tRNA ^{Thr} (TGT)	72	H	72	H	72	H
tRNA ^{Pro} (TGG)	70	L	70	L	70	L
D-loop	1041	N/A	1041	N/A	1040	N/A

4.4.4. Comparação das sequências dos genomas mitocondriais

A comparação dos genomas mitocondriais feita com a ferramenta CGView Comparison Tool mostrou que a sequência de *P. lineatus* apresentou mais de 98% de identidade com a sequência de *P. costatus* e mais de 96% de identidade com a sequência de *P. argenteus* (Figura 18).

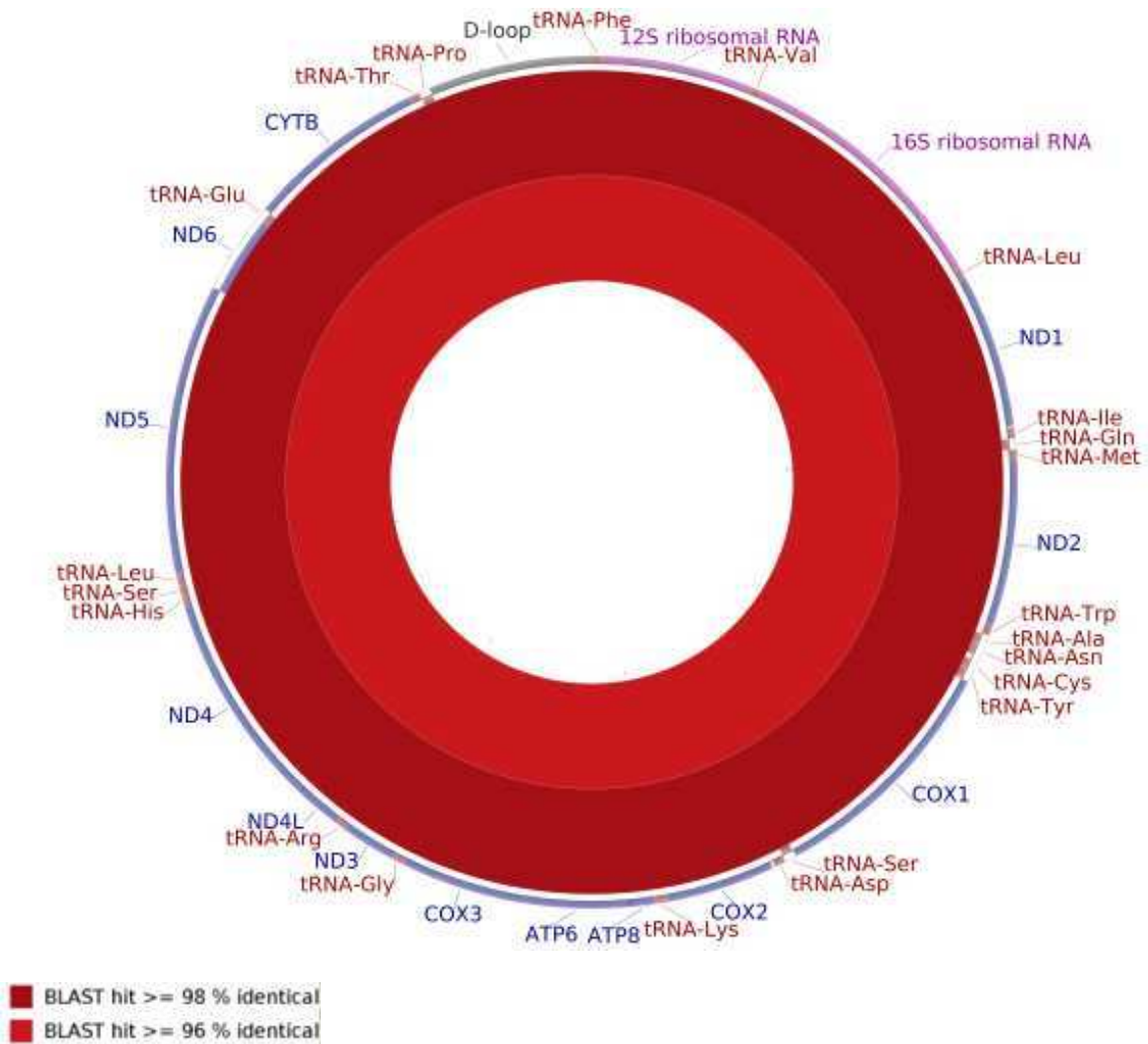


Figura 18: Comparação dos genomas mitocondriais de *P. argenteus*, *P. costatus* e *P. lineatus*.

O anel mais externo mostra a anotação dos genes e se refere ao mitogenoma de *P. lineatus*. Os genes codificadores de proteínas são representados em azul, os genes de rRNA são representados em rosa, os genes de tRNA são representados em vermelho e a região D-loop está respresentada em cinza. O anel intermediário mostra a comparação entre *P. lineatus* e *P. costatus* e o anel interno mostra a comparação entre *P. lineatus* e *P. argenteus*. A cor vermelho-escura representa regiões onde houve mais de 98% de identidade de seqüências. A cor vermelho-clara representa regiões onde houve mais de 96% de identidade de seqüências. A similaridade de seqüências foi calculada pelo algoritmo BLAST, implementado no *software* CGView Comparison Tool.

A comparação das seqüências de mtDNA feita apenas entre *P. argenteus* e *P. costatus* mostrou que as espécies apresentam mais de 96% de identidade de seqüências (Figura 19).

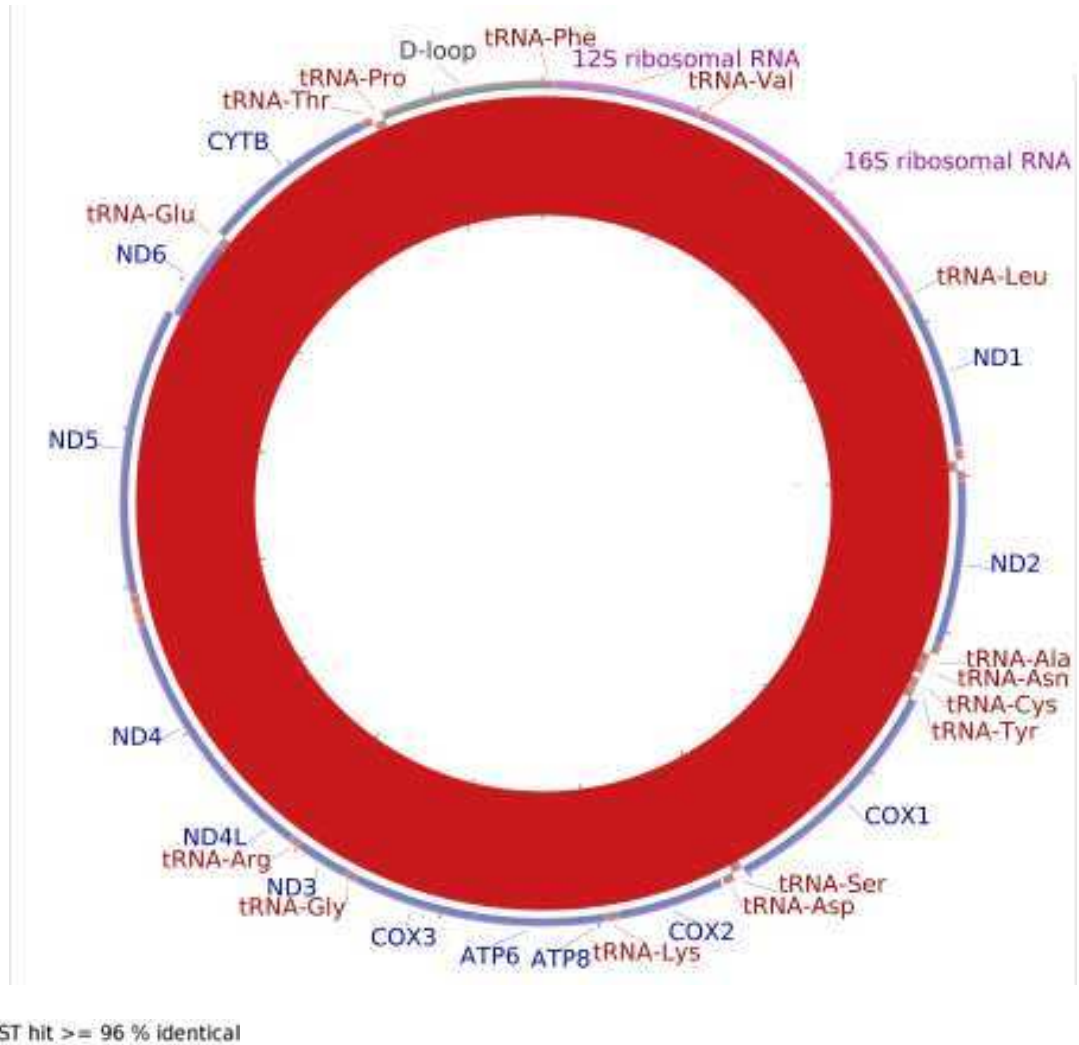


Figura 19: Comparação dos genomas mitocondriais de *P. argenteus* e *P. costatus*. O anel mais externo mostra a anotação dos genes e se refere ao mitogenoma de *P. costatus*. Os genes codificadores de proteínas são representados em azul, os genes de rRNA são representados em rosa, os genes de tRNA são representados em vermelho e a região D-loop está respresentada em cinza. O anel interno mostra a comparação entre *P. costatus* e *P. argenteus*. A cor vermelho-clara representa regiões onde houve mais de 96% de identidade de seqüências. A similaridade de seqüências foi calculada pelo algoritmo BLAST, implementado no *software* CGView Comparison Tool.

O grau de similaridade entre as seqüências de DNA mitocondrial das espécies de *Prochilodus*, quando comparado com seqüências de espécies de outros gêneros, mostrou grandes regiões de identidade entre *Prochilodus* e *Piaractus*, que apresentaram mais de 88% de similaridade. As comparações com *Brycon* e *Salminus* mostraram regiões menores de identidade de seqüências (Figura 20).

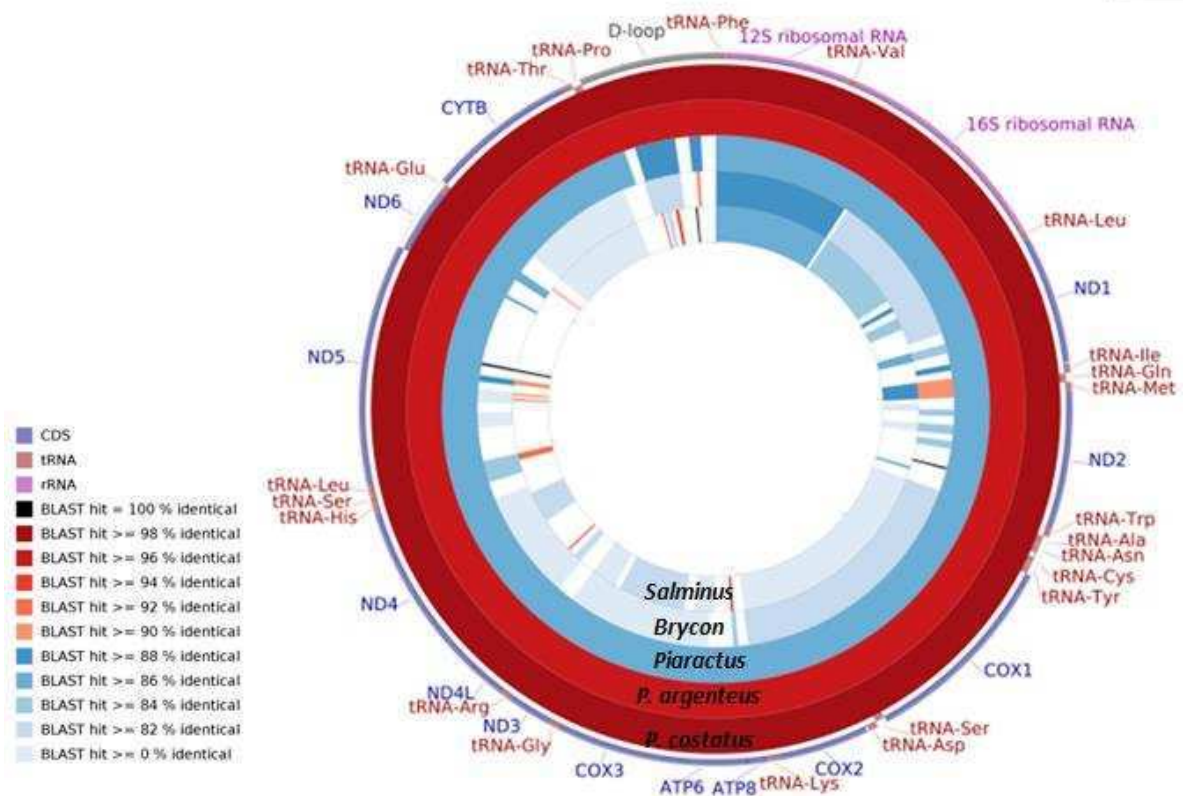


Figura 20: Comparação dos genomas mitocondriais de *Prochilodus* e espécies pertencentes a outros gêneros. O anel mais externo mostra a anotação dos genes e se refere ao mitogenoma de *P. lineatus*. Os genes codificadores de proteínas são representados em azul, os genes de rRNA são representados em rosa, os genes de tRNA são representados em vermelho e a região D-loop está respresentada em cinza. Os anéis internos mostram a comparação entre *P. lineatus* e outras espécies, cujo nome está indicado na parte inferior do anel. As cores que compõem os anéis indicam o grau de similaridade das sequências comparadas, de acordo com a legenda mostrada à esquerda da figura. A similaridade de sequências foi calculada pelo algoritmo BLAST, implementado no *software* CGView Comparison Tool.

A comparação de sequências dos genes feitas utilizando a ferramenta BLASTn mostrou um grande nível de conservação entre as espécies de *Prochilodus*. A região controladora D-loop foi a que apresentou menor nível de identidade de sequências. A Tabela 3 mostra os percentuais de identidade encontrados para os genes codificadores de proteínas, rRNA e D-loop. A maioria dos genes que codificam tRNA apresentaram uma ou duas diferenças na composição de nucleotídeos, sendo que os genes tRNA^{Ala}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Glu}, tRNA^{His}, tRNA^{Ile}, tRNA^{Lys}, tRNA^{Met}, tRNA^{Phe}, tRNA^{Pro} e tRNA^{Ser2} apresentaram 100% de identidade.

Tabela 3: Comparação entre as sequências de genes codificadores de proteínas, rRNA e D-loop utilizando a ferramenta BLASTn.

Gene	Identidade de sequência (%)		
	<i>P. lineatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>
	X <i>P. argenteus</i>	X <i>P. costatus</i>	X <i>P. costatus</i>
12S rRNA	99	99	99
16S rRNA	99	99	99
<i>Nd1</i>	97	98	97
<i>Nd2</i>	97	99	98
<i>COI</i>	98	99	98
<i>COII</i>	99	99	99
<i>Atp8</i>	99	100	99
<i>Atp6</i>	98	99	98
<i>COIII</i>	98	99	98
<i>N</i>			
<i>Nd3</i>	96	99	97
<i>Nd4L</i>	97	98	98
<i>Nd4</i>	96	99	96
<i>Nd5</i>	97	99	97
<i>Nd6</i>	97	99	97
<i>Cytb</i>	97	99	97
D-loop	94	96	95
Média	97,375	98,75	97,625

4.4.5. Desenho de *primers*

Os *primers* desenhados através da ferramenta Primer-BLAST estão descritos e caracterizados na Tabela 4, sendo que os *primers* denominados Pcal01, Pcal02 e Pcal03 se mostraram gênero-específicos nas simulações realizadas pelo programa.

Tabela 4: Características dos *primers* desenhados com o Primer-BLAST.

Nome	Sequência 5' - 3'	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do primer (pb)	Conteúdo GC (%)	Tamanho do <i>amlicon</i> (pb)
Pcal01 F	CTGCCTTTATTGCCTCACGC	59,9	20	55	857
Pcal01 R	ACTCCTAGGGCTAGTGGTCG	60,11	20	60	
Pcal02 F	CTGCCTTTATTGCCTCACGC	59,9	20	55	462
Pcal02 R	GGGGAAGGTTAGTGCTACGG	59,82	20	60	
Pcal03 F	TGCTCTTCCCTCCCTACGAA	59,96	20	55	661
Pcal03 R	TAAGTGCGGTAGGCTCGTTG	60,11	20	55	
Pcal04 F	TCAGGGACAACACTATCGTGGGG	61,24	21	57,14	
Pcal04 R1	AAGTACGCTGGTTCGAGTCTT	58,75	20	50	485
Pcal04 R2	AAACATGAATTGTCCGGCGT	58,76	20	45	439

De acordo com as simulações realizadas, cada par de *primers* gênero-específicos funcionaria da seguinte maneira: o oligonucleotídeo *forward* (F) anelaria nas mesmas regiões nas três espécies de *Prochilodus*. O oligonucleotídeo *reverse* (R) também anelaria nas mesmas regiões para as três espécies. Dessa forma, em uma PCR, os *amplicons* produzidos para cada uma das espécies de *Prochilodus* seria do mesmo tamanho (e, portanto, gênero-específicos). A Figura 21 esquematiza a posição de anelamento de um par de *primers* gênero-específico.

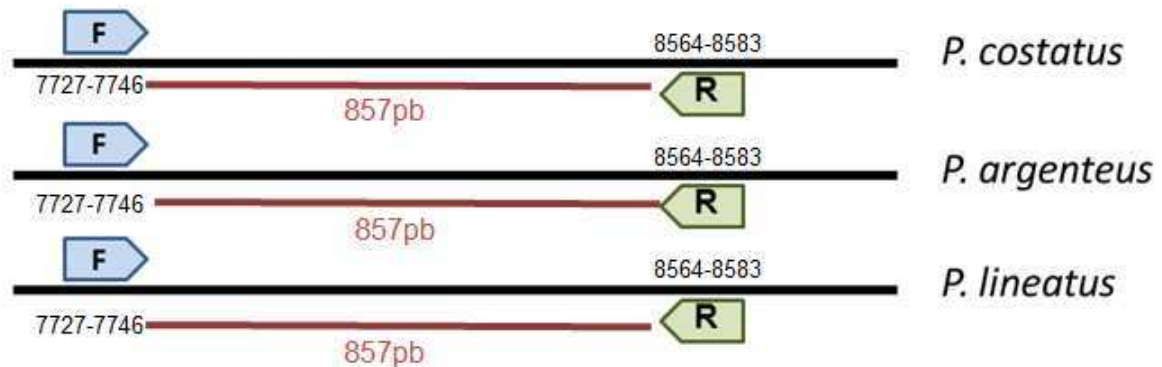


Figura 21: Esquema da posição de anelamento do par de primers Pcal01. As linhas sólidas pretas indicam a mesma região de alinhamento do DNA de *P. costatus*, *P. argenteus* e *P. lineatus*. Os números em preto indicam a posição de anelamento dos primers. As setas azuis representam a região de anelamento do primer forward Pcal01F (5'-CTGCCTTTATTGCCTCACGC-3') e os pentágonos verdes representam a região de anelamento do primer reverse Pcal01R (5'-ACTCCTAGGGCTAGTGGTCG-3'). A linha contínua vermelha indica o amplicon, que para o par de primers Pcal01 é de 857 pb. Os demais pares de primers gênero específicos foram idealizados para agir da mesma forma, porém com anelamento em locais diferentes e gerando amplicons de tamanhos diferentes.

O conjunto de primers Pcal04 foi idealizado para funcionar da seguinte forma, de acordo com as simulações realizadas no Primer-BLAST: os oligonucleotídeos *forward* (F) e *reverse 1* (R1) anelariam somente em *P. argenteus* e *P. costatus*; o oligonucleotídeo *reverse 2* (R2) anelaria somente em *P. costatus*; e nenhum oligonucleotídeo anelaria em *P. lineatus* (Figura 22). Dessa forma, em uma PCR, seriam esperados dois amplicons de tamanhos diferentes para *P. costatus*, um amplicon para *P. argenteus* e nenhum amplicon para *P. lineatus*.

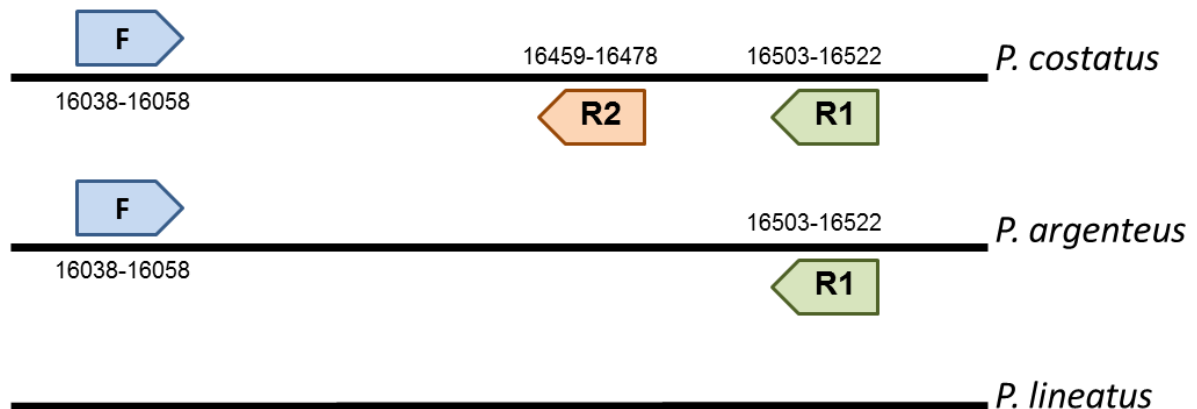


Figura 22: Esquema da Posição de anelamento do conjunto de primers Pcal04. As linhas sólidas pretas indicam a mesma região de alinhamento do DNA de *P. costatus*, *P. argenteus* e *P. lineatus*. Os números em preto indicam a posição de anelamento dos primers. As setas azuis representam a região de anelamento do primer forward Pcal04F (5'- TCAGGGACAACACTATCGTGGGG -3'), os pentágonos verdes representam a região de anelamento do primer reverse Pcal04R1 (5'- AAGTACGCTGGTCGAGTCTT -3') e o pentágono vermelho representa a região de anelamento do primer reverse Pcal04R2 (5'- AAACATGAATTGTCCGGCGT -3'). O tamanho esperado do amplicon resultante de Pcal04 F+R1 é 485 pb o tamanho esperado do amplicon resultante de Pcal04 F+R2 é 439 pb.

O desenho manual de primers levou em consideração as informações constantes na Tabela 3, que identifica a região D-loop como sendo aquela onde ocorre o menor grau de similaridade entre as sequências de mtDNA de *Prochilodus*.

O alinhamento da região D-loop realizado pelo software MEGA 6.0 identificou duas regiões com maior concentração de sítios variáveis entre as sequências (Figura 23), para as quais foram desenhados 11 primers. Como se tratava de regiões com elevado conteúdo AT, buscou-se sequências com maior conteúdo GC possível. O primer Pcal11 foi feito a partir de modificações em Pcal09 (que substituiu um AAA por GGT), de modo a aumentar o conteúdo GC do oligonucleotídeo.

Todos os primers desenhados eram do tipo forward, e poderiam, potencialmente, ser utilizados com os primers Pcal04R1 e Pcal04R2. A Tabela 5 mostra a caracterização dos primers desenhados manualmente. O conteúdo GC e a estimativa de temperatura de anelamento foram feitas no Primer-BLAST.

Tabela 5: Características dos *primers* desenhados manualmente.

Nome	Sequência 5' - 3'	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do primer (pb)	Conteúdo GC (%)	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb) com Pcal04R1	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb) com Pcal04R2
Pcal05 F	TTAAATTAAGGTACAC	35,8	16	25	679	633
Pcal06 F	TCAAACAAAACATAC	36,5	16	25	679	633
Pcal07 F	GGTACACATACCCATA	43,6	16	43,8	670	624
Pcal08 F	AACATACATACCCATA	39,4	16	31,2	670	624
Pcal09 F	CTTAGTACATACAAACCC	44	18	38,9	858	812
Pcal10 F	TTCAGTACATACAAATTC	41,1	18	27,8	858	812
Pcal11 F	CTTAGTACATACGGTCCC	48,6	18	50	858	812
Pcal12 F	CTCATTTACCAGTACTACC	46,5	19	42,1	709	663
Pcal13 F	CCCCTCATCAGTACTATC	48,8	19	47,4	709	663
Pcal14 F	GCAGGGACTCAACT	47,1	14	57,1	577	531
Pcal15 F	GCAAAGATCCAACCT	41,2	14	42,9	577	531

A Figura 24 esquematiza a posição de anelamento de todos os *primers* desenhados no presente trabalho, tanto os desenhados através do Primer-BLAST, como os aqueles desenhados manualmente.

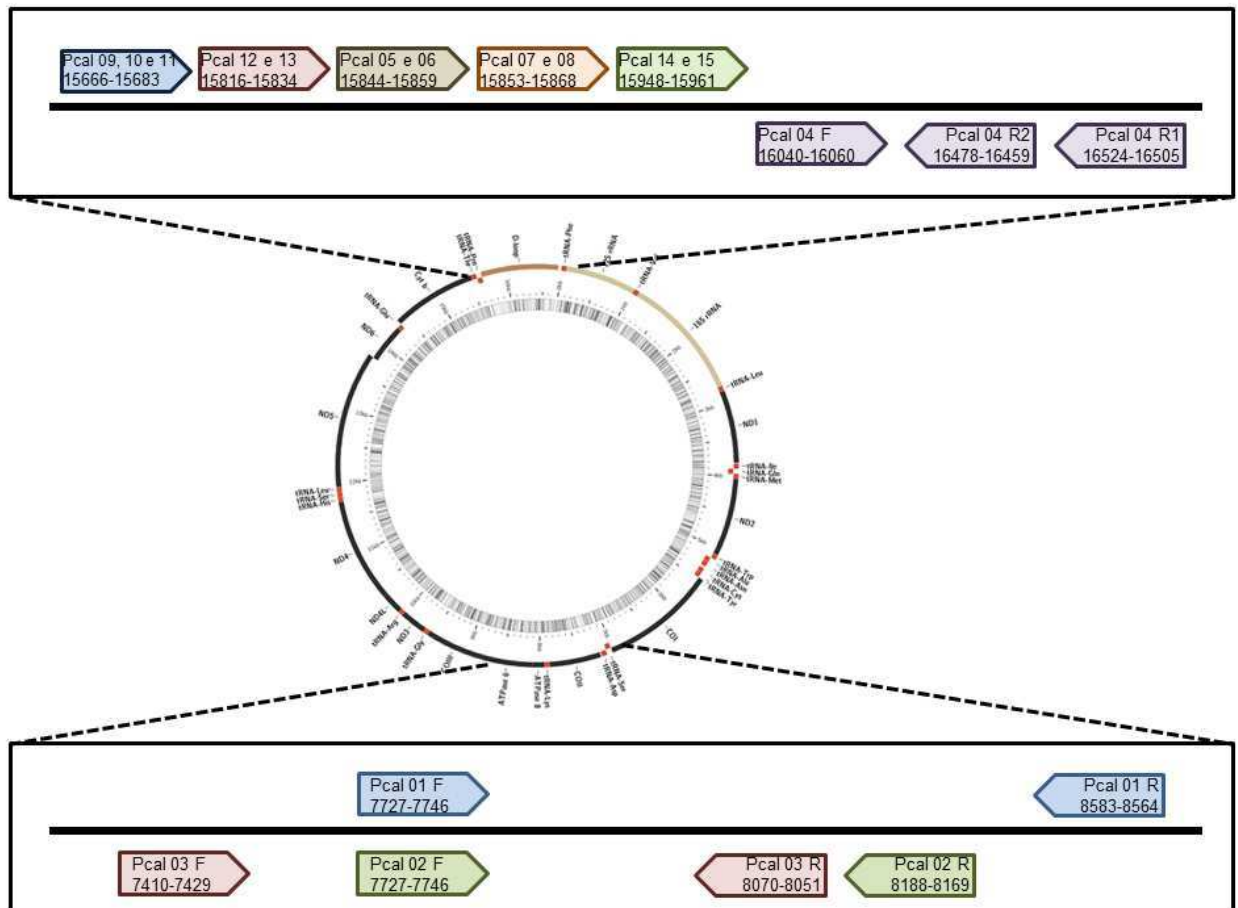


Figura 24: Posição de anelamento dos primers Pcal01 a Pcal15. A figura esquematiza a posição de anelamento dos *primers* desenvolvidos no presente trabalho em relação ao genoma mitocondrial de *Prochilodus*. As linhas sólidas pretas indicam a dupla fita de DNA. As setas coloridas representam os *primers*. Os números no interior das setas indicam a posição de anelamento dos *primers*.

4.4.6. Identificação de microssatélites

O *software* SciRoKo identificou 42.627 regiões de microssatélites para *P. argenteus*, entre mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexanucleotídeos, conforme mostra a Tabela 6. Para *P. costatus*, foram identificados 17.361 microssatélites, conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 6: Microssatélites identificados pelo *software* SciRoKo para *P. argenteus*.

Motivo	Quantidade	Tamanho médio (pb)
Mononucleotídeo	9.226	20,64
Dinucleotídeo	24.633	25,25
Trinucleotídeo	4.563	28,24
Tetranucleotídeo	3.701	38,62
Pentanucleotídeo	460	51,39
Hexanucleotídeo	44	52,23
TOTAL	42.627	

Tabela 7: Microssatélites identificados pelo *software* SciRoKo para *P. costatus*.

Motivo	Quantidade	Tamanho médio (pb)
Mononucleotídeo	2.605	17,89
Dinucleotídeo	11.136	22,15
Trinucleotídeo	1.668	25,88
Tetranucleotídeo	1.744	40,54
Pentanucleotídeo	190	49,49
Hexanucleotídeo	18	50,11
TOTAL	17.361	

A ferramenta MSATCOMMANDER identificou 25.979 regiões de microssatélites para *P. argenteus* (Tabela 8), sendo que foi possível fazer desenho de *primers* para 11.979 microssatélites (46,11%).

Tabela 8: Microssatélites identificados pelo software MSATCOMMANDER para *P. argenteus*.

Motivo	Quantidade
Dinucleotídeo	19.789
Trinucleotídeo	2.337
Tetranucleotídeo	3.385
Pentanucleotídeo	428
Hexanucleotídeo	40
TOTAL	25.979

Para *P. costatus*, foram identificados 10.999 regiões de microssatélites (Tabela 9), sendo que foi possível fazer desenho de *primers* para 4.371 microssatélites (39,73%).

Tabela 9: Microssatélites identificados pelo software MSATCOMMANDER para *P. costatus*.

Motivo	Quantidade
Dinucleotídeo	8.561
Trinucleotídeo	656
Tetranucleotídeo	1.592
Pentanucleotídeo	173
Hexanucleotídeo	17
TOTAL	10.999

4.5. Padronização da PCR para identificação de gênero e espécie

4.5.1. *Primers* desenhados com o Primer-BLAST

As PCRs utilizando os pares de *primers* Pcal01, Pcal02, Pcal03, Pcal04F + R1 e Pcal04F + R2 apresentaram resultados satisfatórios nas diferentes temperaturas de anelamento avaliadas (Figuras 25 e 26).

As bandas visualizadas nas colunas referentes ao controle negativo se devem a erro de manipulação durante a montagem da reação, o que pôde ser confirmado em testes posteriores, em que não houve a amplificação para controles negativos. Em altas temperaturas de anelamento, o par de *primers* Pcal03 apresentou bandas inespecíficas. O conjunto de *primers* Pcal04 apresentou amplificação positiva para todas as espécies de *Prochilodus* avaliadas, mesmo em condições de maior estringência da reação: concentrações maiores de DMSO e maiores temperaturas de anelamento.

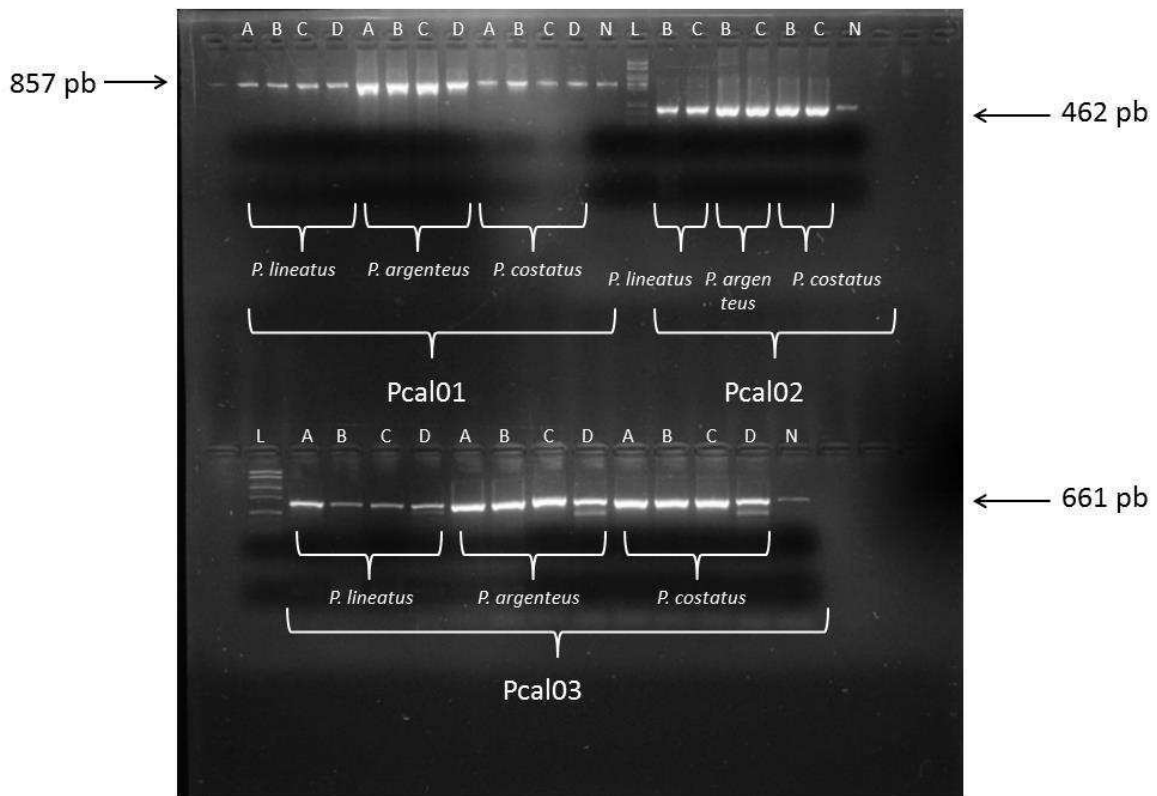


Figura 25: Amplicons produzidos em PCR utilizando os pares de *primers* Pcal01, Pcal02 e Pcal03 em diferentes temperaturas de anelamento. L: padrão de massa molecular, A: temperatura de anelamento = 53 °C, B: temperatura de anelamento = 56 °C, C: temperatura de anelamento = 60 °C, D: temperatura de anelamento = 65 °C, N = controle negativo. As reações foram conduzidas utilizando o tampão IC.

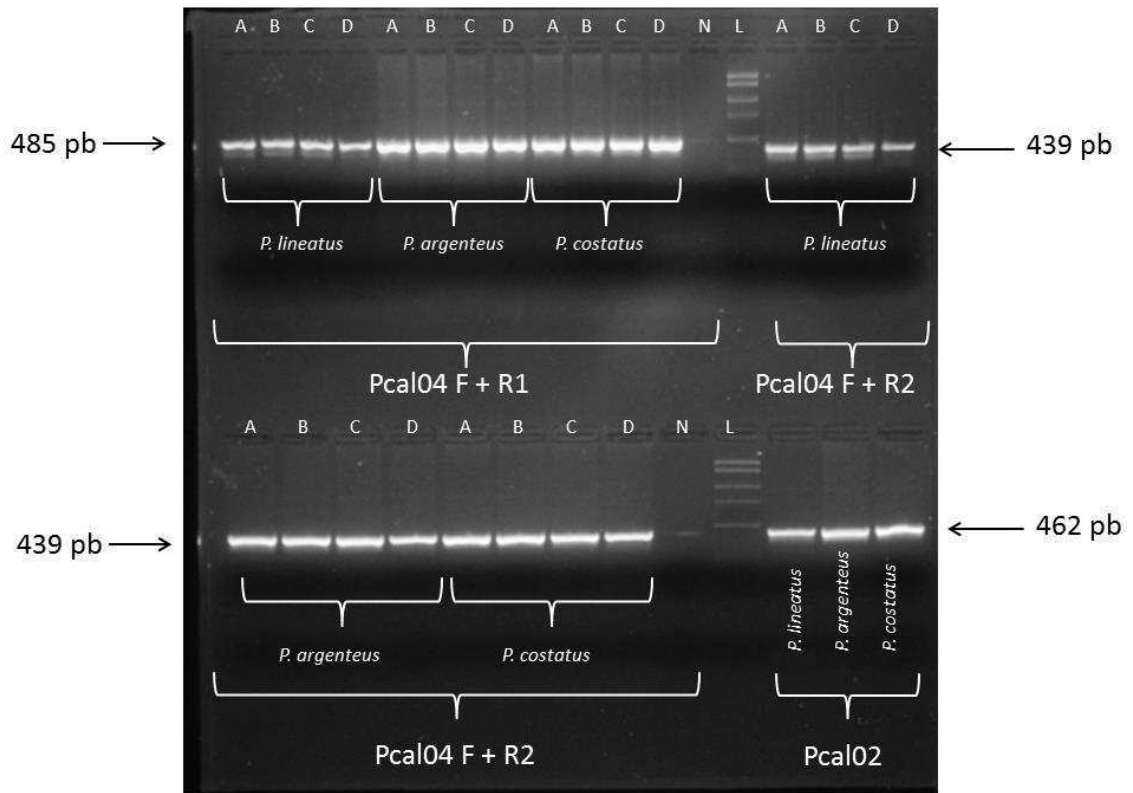


Figura 26: Amplicons produzidos em PCR utilizando o conjunto de *primers* Pcal04 em diferentes temperaturas de anelamento. L: padrão de massa molecular, A: temperatura de anelamento = 53 °C, B: temperatura de anelamento = 56 °C, C: temperatura de anelamento = 60 °C, D: temperatura de anelamento = 65 °C, N = controle negativo. As reações foram conduzidas utilizando o tampão IC.

Os testes de sensibilidade mostraram que a detecção da presença de produtos de PCR pôde ser visualizada em gel de eletroforese até a diluição de 1:10.000 para os *primers* Pcal01, Pcal02, Pcal03 e Pcal04 + F1 e 1:100.000 para Pcal04 + R2 (Figuras 27 e 28).

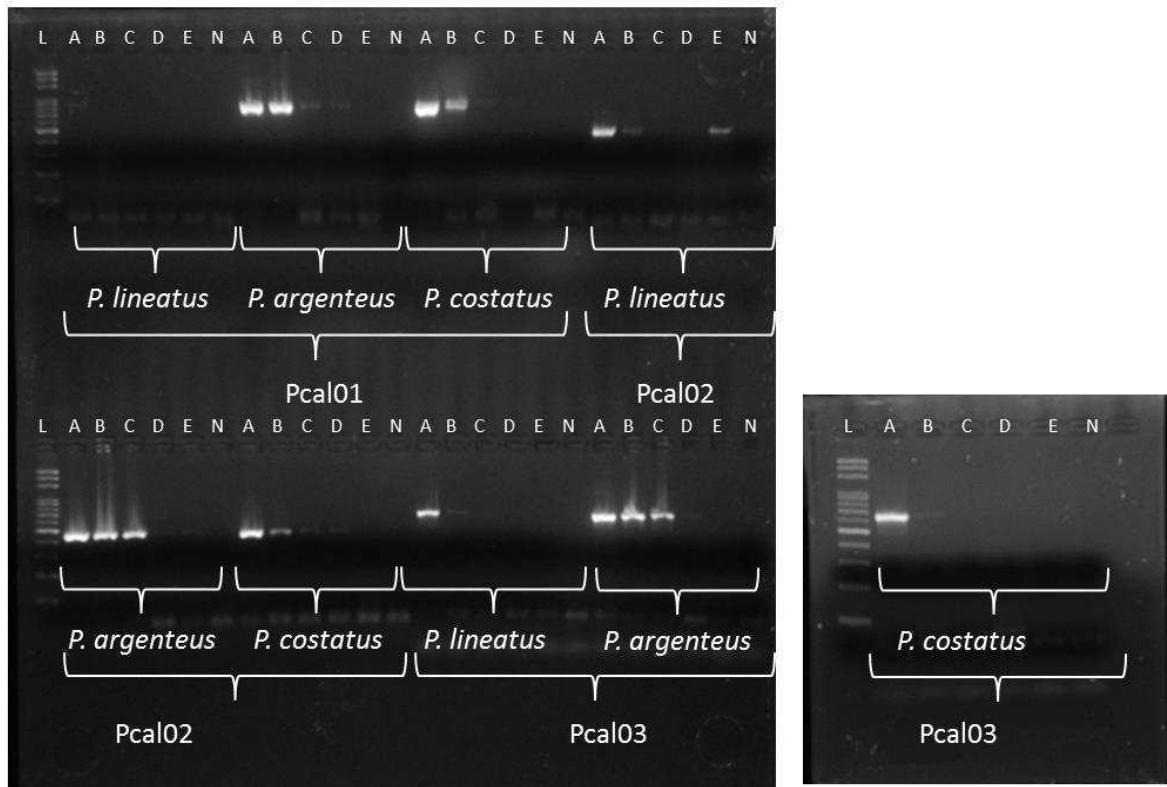


Figura 27: Teste de sensibilidade dos primers Pcal01, Pcal02 e Pcal03. L: padrão de massa molecular, A: diluição 1:10, B: diluição 1:100, C: diluição 1:1.000, D: diluição 1:10.000, E: diluição 1:100.000, N: controle negativo. As concentrações iniciais de DNA utilizadas foram: 2,5 ng para *P. lineatus* e 50 ng para *P. argenteus* e *P. costatus*.

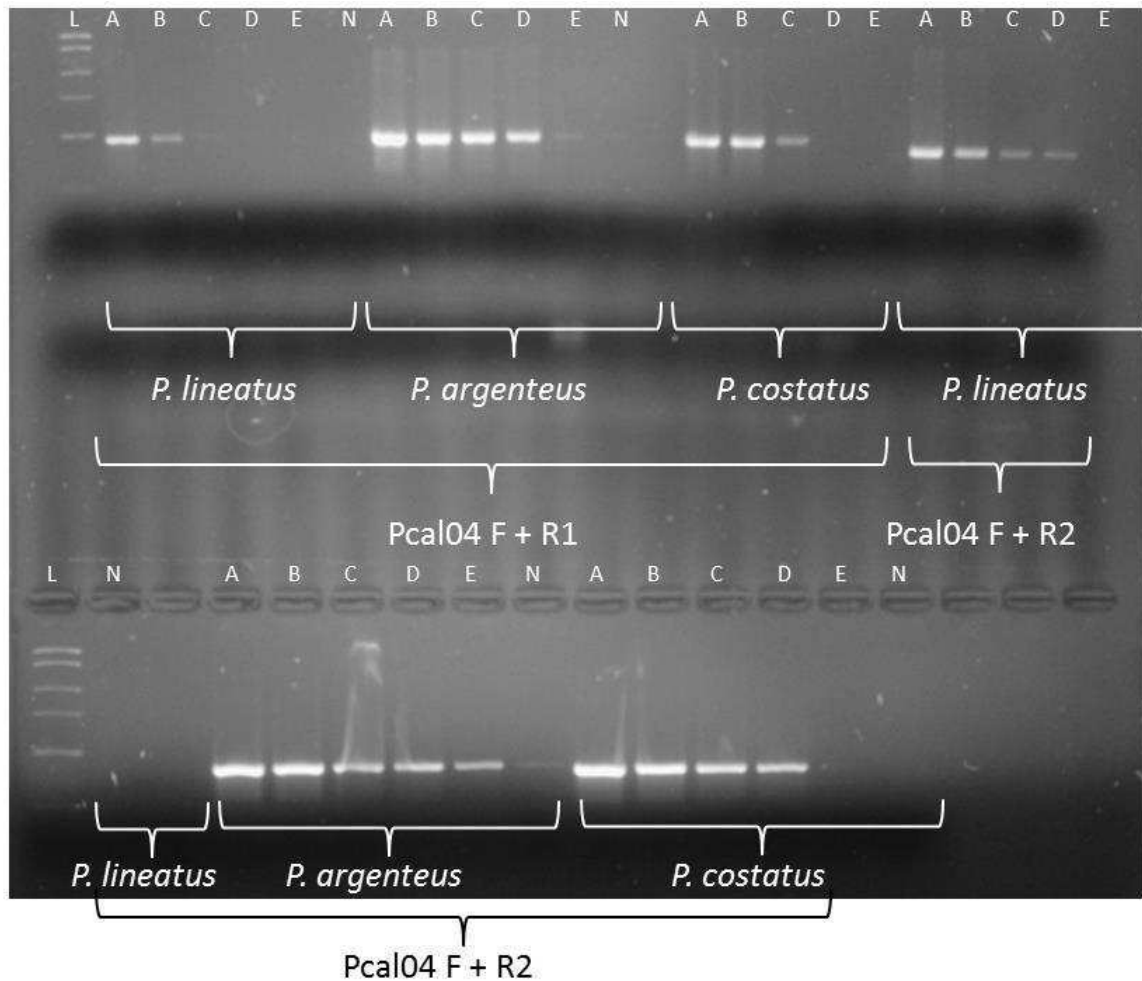


Figura 28: Teste de sensibilidade dos primers Pcal04F + R1 e Pcal04F + R2. L: padrão de massa molecular, A: diluição 1:10, B: diluição 1:100, C: diluição 1:1.000, D: diluição 1:10.000, E: diluição 1:100.000, N: controle negativo. As concentrações iniciais de DNA utilizadas foram: 2,5 ng para *P. lineatus* e 50 ng para *P. argenteus* e *P. costatus*.

Os testes de especificidade mostraram que todos os pares de primers apresentaram reação cruzada com *Leporinus* sp (Figura 29). Após tal resultado, os pares de primers Pcal04F + R1 e Pcal04F + R2 foram desconsiderados como possivelmente espécie-específicos e passou-se a trabalhar com condições de maior estringência para todos os primers, de modo a reduzir as reações cruzadas com o gênero *Leporinus*.

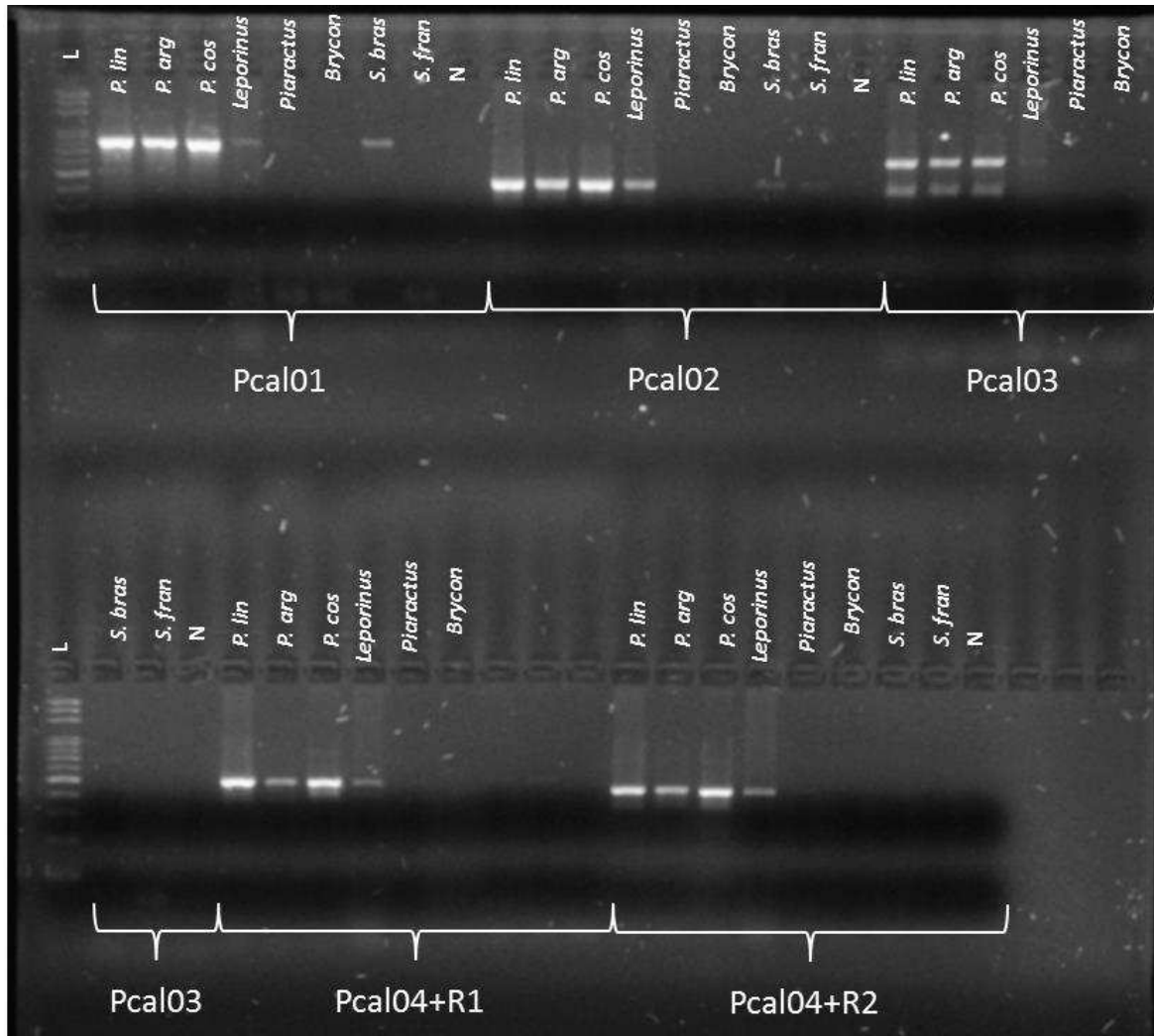


Figura 29: Amplicons produzidos em teste de especificidade dos primers Pcal01 a Pcal04. A figura mostra gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV referente a produtos de PCR com primers Pcal01 a Pcal04 com DNA de diferentes espécies: *Prochilodus* (curimbas), *Leporinus* (piauí), *Piaractus* (pacu), *Brycon* (piracanjuba) e *Salminus brasiliensis* e *Salminus franciscanus* (dourado). N: controle negativo. L: padrão de massa molecular, N = controle negativo. As reações foram conduzidas utilizando o tampão IC.

Após os testes efetuados em diferentes condições de estrigência, composição de tampão e concentração de DNA (Tabelas 10 e 11), observou-se que o par de primers Pcal03 apresentava maior potencial para padronização de reação gênero-específica. As bandas referentes à amplificação de *Leporinus*, quando apareciam, apresentavam-se muito fracas quando comparadas com as bandas referentes à amplicons de *Prochilodus*, para reações com quantidade de DNA inicial similares. A Figura 30 mostra alguns resultados para os primers Pcal 03.

Então, passou-se a trabalhar com maiores condições de estrigência para os primers Pcal03 e também foi avaliada a reação utilizando os primers Pcal03R com Pcal01F.

Tabela 10: Testes dos *primers* Pcal01 a Pcal04 com o tampão IC em diferentes condições de estringência.

Tampão IC e DMSO 3%																			
Pcal01				Pcal02				Pcal03				Pcal04F + R1				Pcal04F + R2			
<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tampão IC e DMSO 5%																			
Pcal01				Pcal02				Pcal03				Pcal04F + R1				Pcal04F + R2			
<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Tampão IC e DMSO 7%																			
Pcal01				Pcal02				Pcal03				Pcal04F + R1				Pcal04F + R2			
<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Tampão IC e DMSO 10%																			
Pcal01				Pcal02				Pcal03				Pcal04F + R1				Pcal04F + R2			
<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>Leporinus</i>
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Onde: (+) denota *amplicon* detectável em gel de agarose e (-) denota *amplicon* não detectável em gel de agarose.

Tabela 11: Testes dos primers Pcal 01 a Pcal 04 com o tampão IVB em diferentes condições de estringência e concentrações de DNA de *P. argenteus* e *Leporinus* sp.

Tampão IVB e DMSO 3%														
Pcal01			Pcal02			Pcal03			Pcal04F + R1			Pcal04F + R2		
Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tampão IVB e DMSO 5%														
Pcal01			Pcal02			Pcal03			Pcal04F + R1			Pcal04F + R2		
Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tampão IVB e DMSO 7%														
Pcal01			Pcal02			Pcal03			Pcal04F + R1			Pcal04F + R2		
Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Tampão IC e DMSO 7%														
Pcal01			Pcal02			Pcal03			Pcal04F + R1			Pcal04F + R2		
Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng
+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+

Onde: (+) denota *amplicon* detectável em gel de agarose; (-) denota *amplicon* não detectável em gel de agarose.

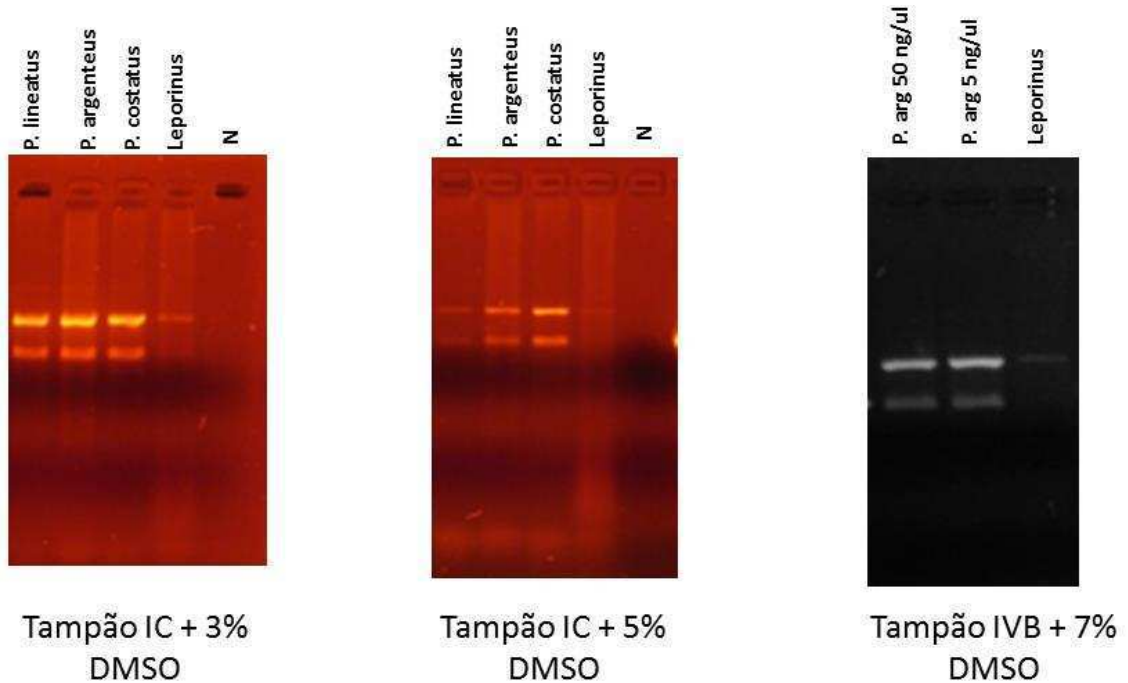


Figura 30: Primers Pcal03 em diferentes condições de reação e estringência. A figura mostra gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV referente a produtos de PCR com *primers* Pcal03 submetidos a diferentes tipos de tampão e condições de estringência. N: controle negativo.

Em condições de maior estringência, os *primers* Pcal03 também apresentavam bandas inespecíficas (Figura 30). Os testes que se sucederam buscaram aumentar a especificidade da reação através da redução do número de ciclos e aumento da temperatura de anelamento, que até então estava fixada em 56 °C. A concentração de DMSO foi mantida em 7%.

Tabela 12: Testes dos *primers* Pcal 03F + R e Pcal03R + Pcal01F em diferentes tipos de tampão, número de ciclos e temperaturas de anelamento.

33 ciclos e temperatura de anelamento = 63 °C											
Pcal03 F + R e tampão IC			Pcal03R + Pcal01F e tampão IC			Pcal03 F + R e tampão IVB			Pcal03R + Pcal01F e tampão IVB		
Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng
+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
33 ciclos e temperatura de anelamento = 65 °C											
Pcal03 F + R e tampão IC			Pcal03R + Pcal01F e tampão IC			Pcal03 F + R e tampão IVB			Pcal03R + Pcal01F e tampão IVB		
Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng
+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
30 ciclos e temperatura de anelamento = 63 °C											
Pcal03 F + R e tampão IC			Pcal03R + Pcal01F e tampão IC			Pcal03 F + R e tampão IVB			Pcal03R + Pcal01F e tampão IVB		
Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng
+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30 ciclos e temperatura de anelamento = 65 °C											
Pcal03 F + R e tampão IC			Pcal03R + Pcal01F e tampão IC			Pcal03 F + R e tampão IVB			Pcal03R + Pcal01F e tampão IVB		
Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng
+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-

Onde: (+) denota *amplicon* detectável em gel de agarose; (-) denota *amplicon* não detectável em gel de agarose. O DNA utilizado era das espécies *P. argenteus* e *Leporinus* sp.

A Tabela 12 mostra que a redução do número de ciclos e aumento da temperatura de anelamento resultou em maior especificidade dos *primers* testados para o gênero *Prochilodus*. Para verificar o efeito da concentração de DNA na PCR, foram feitos testes com maiores quantidades de DNA de *Leporinus* sp. e foi avaliado a ocorrência de reações cruzadas. Essas condições foram avaliadas em diferentes temperaturas de anelamento. A PCR foi conduzida em 30 ciclos e 7% de DMSO. Os resultados são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13: Testes dos primers Pcal 03F + R e Pcal03R + Pcal01F em diferentes concentrações de DNA de *Leporinus* sp e temperaturas de anelamento.

Temperatura de anelamento = 65 °C											
Pcal03R + Pcal01F e tampão IC				Pcal03R + Pcal01F e tampão IVB				Pcal03 F+R e tampão IVB			
Prochilodus 5ng	Leporinus 5ng	Leporinus 12ng	Leporinus 20ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 5ng	Leporinus 12ng	Leporinus 20ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 5ng	Leporinus 12ng	Leporinus 20ng
-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Temperatura de anelamento = 67 °C											
Pcal03R + Pcal01F e tampão IC				Pcal03R + Pcal01F e tampão IVB				Pcal03 F+R e tampão IVB			
Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Leporinus 12ng	Leporinus 20ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Leporinus 12ng	Leporinus 20ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Leporinus 12ng	Leporinus 20ng
-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Temperatura de anelamento = 69 °C											
Pcal03R + Pcal01F e tampão IC				Pcal03R + Pcal01F e tampão IVB				Pcal03 F+R e tampão IVB			
Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Leporinus 12ng	Leporinus 20ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Leporinus 12ng	Leporinus 20ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Leporinus 12ng	Leporinus 20ng
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Temperatura de anelamento = 72 °C											
Pcal03R + Pcal01F e tampão IC				Pcal03R + Pcal01F e tampão IVB				Pcal03 F+R e tampão IVB			
Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Leporinus 12ng	Leporinus 20ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Leporinus 12ng	Leporinus 20ng	Prochilodus 5ng	Leporinus 3ng	Leporinus 12ng	Leporinus 20ng
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Onde: (+) denota *amplicon* detectável em gel de agarose; (-) denota *amplicon* não detectável em gel de agarose. O DNA utilizado era das espécies *P. argenteus* e *Leporinus* sp.

Os resultados mostraram que as reações feitas com o tampão IVB e *primers* Pcal03R + Pcal01F mostraram melhores resultados de especificidade. Apesar de ter apresentado bandas visíveis em reações com temperatura de anelamento 65°C, as mesmas apresentaram-se bastante fracas. A reação com temperatura de anelamento 67°C mostrou-se específica, porém com bandas pouco visíveis para DNA de *Prochilodus*, como mostra a Figura 31.

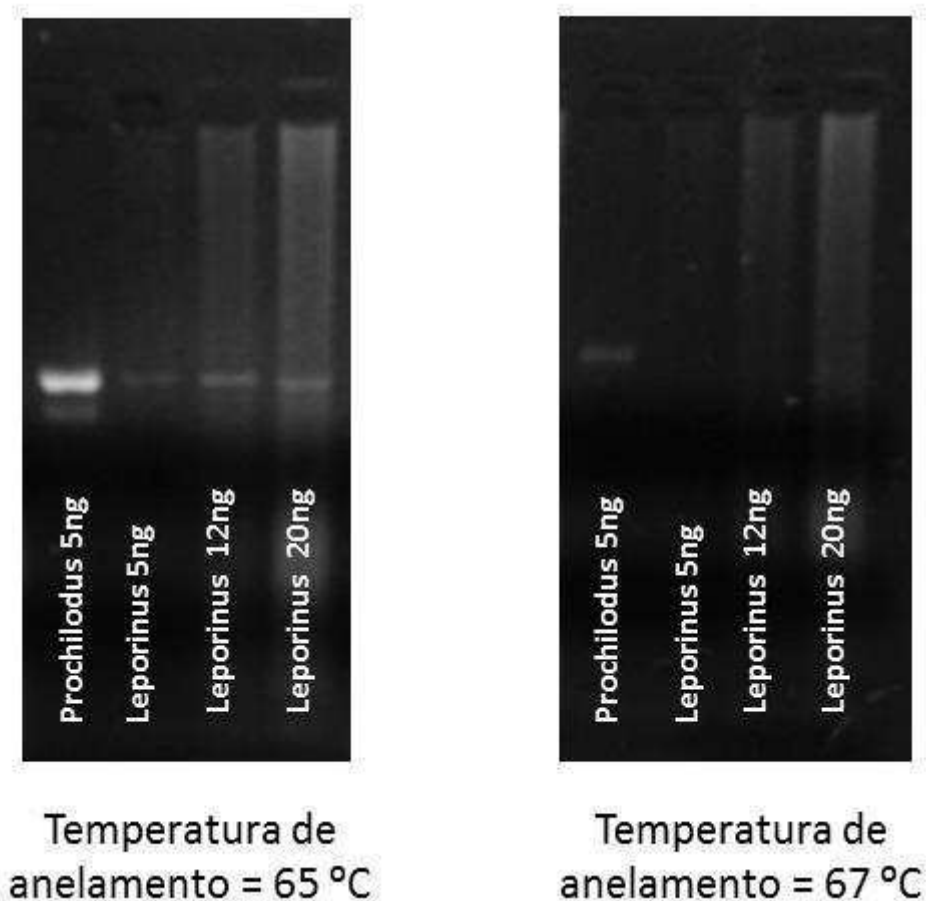


Figura 31: Primers Pcal03R + Pcal01F em diferentes temperaturas de anelamento e concentrações de DNA de *Leporinus* sp. A figura mostra gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV referente a produtos de PCR com *primers* Pcal03R + Pcal01F submetidos a diferentes temperaturas de anelamento e quantidades crescentes de DNA de *Leporinus*.

Na tentativa de eliminar as reações cruzadas, foram feitos novos testes com menos número de ciclos e concentrações diferentes de DNA de *Prochilodus* e *Leporinus*. As reações foram conduzidas com tampão IVB, *primers* Pcal03R + Pcal01F e 7% de DMSO. Os resultados são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14: Testes dos primers Pcal03R + Pcal01F em diferentes concentrações de DNA de *Leporinus* sp e *Prochilodus*, temperaturas de anelamento e quantidade de ciclos.

Temperatura de anelamento = 65 °C e 28 ciclos										
Prochilodus 200ng	Prochilodus 150ng	Prochilodus 100ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Prochilodus 0,5ng	Leporinus 20ng	Leporinus 12ng	Leporinus 3ng	Leporinus 0,3ng	Leporinus 0,03ng
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Temperatura de anelamento = 66 °C e 28 ciclos										
Prochilodus 200ng	Prochilodus 150ng	Prochilodus 100ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Prochilodus 0,5ng	Leporinus 20ng	Leporinus 12ng	Leporinus 3ng	Leporinus 0,3ng	Leporinus 0,03ng
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Temperatura de anelamento = 65 °C e 30 ciclos										
Prochilodus 200ng	Prochilodus 150ng	Prochilodus 100ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Prochilodus 0,5ng	Leporinus 20ng	Leporinus 12ng	Leporinus 3ng	Leporinus 0,3ng	Leporinus 0,03ng
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Temperatura de anelamento = 66 °C e 30 ciclos										
Prochilodus 200ng	Prochilodus 150ng	Prochilodus 100ng	Prochilodus 50ng	Prochilodus 5ng	Prochilodus 0,5ng	Leporinus 20ng	Leporinus 12ng	Leporinus 3ng	Leporinus 0,3ng	Leporinus 0,03ng
+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Onde: (+) denota *amplicon* detectável em gel de agarose; (-) denota *amplicon* não detectável em gel de agarose. O DNA utilizado era das espécies *P. argenteus* e *Leporinus* sp.

Nessas condições de PCR, os *primers* Pcal03R + Pcal01F mostraram-se específicos para o gênero *Prochilodus*. A reação foi repetida utilizando DNA de outros gêneros nas seguintes condições: 7% de DMSO, 28 ciclos e temperatura de anelamento 65°C. Os resultados são mostrados na Figura 32.

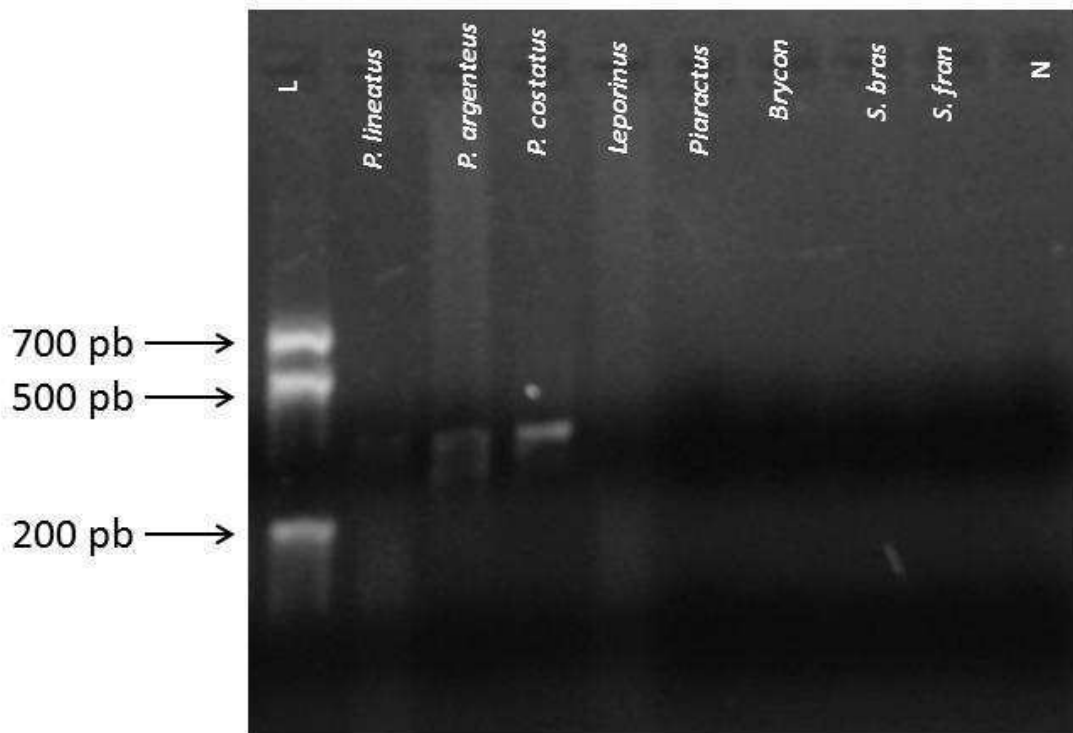


Figura 32: Teste de especificidade para os *primers* Pcal03R + Pcal01F. A figura mostra gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV referente a produtos de PCR com *primers* Pcal03R + Pcal01F utilizando DNA das três espécies de *Prochilodus* avaliadas nesse estudo e DNA de espécies pertencentes a outros gêneros: *Leporinus* (piauí), *Piaractus* (pacu), *Brycon* (piracanjuba) e *Salminus* (dourado). N: controle negativo, L: padrão de massa molecular.

Também foi feito teste de sensibilidade para os *primers* Pcal03R + Pcal01F em diferentes diluições de DNA de *Prochilodus*. Os resultados são mostrados na Figura 33.

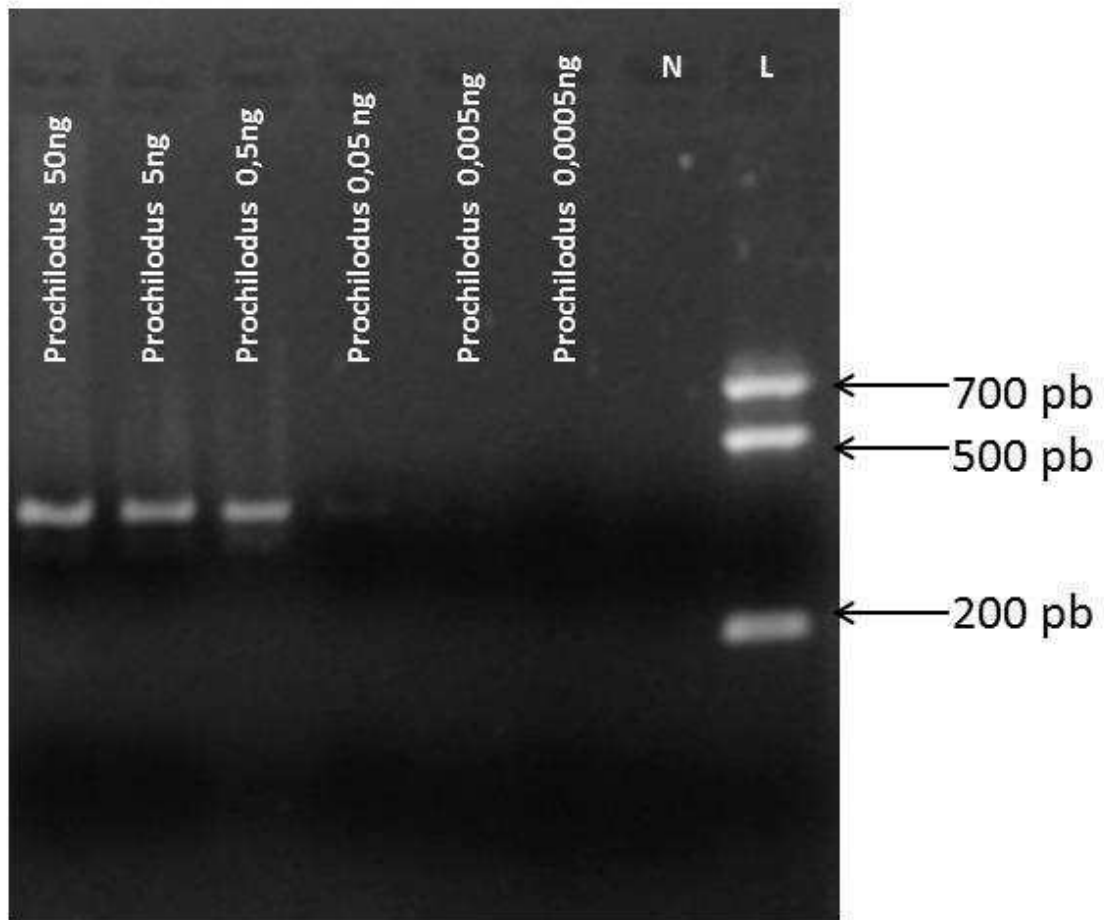


Figura 33: Teste de sensibilidade para os *primers* Pcal03R + Pcal01F. A figura mostra gel de agarose 0,7% corado com brometo de etídeo e revelado em luz UV referente a produtos de PCR com *primers* Pcal03R + Pcal01F utilizando quantidades decrescentes de DNA de *P. argenteus*. N: controle negativo, L: padrão de massa molecular.

4.5.2. *Primers* desenhados manualmente

Como foram desenhados manualmente apenas *primers* do tipo *forward*, os mesmos foram testados com os *primers* Pcal04R1 e Pcal04R2, que já haviam se mostrado eficientes em diferentes condições de PCR nos testes realizados anteriormente. Os primeiros testes foram conduzidos em reações de 35 ciclos, tampão IC, sem adição de DMSO e temperatura de anelamento igual a 53 °C. Os resultados são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15: Testes dos *primers* Pcal05 a Pcal15 com diferentes *primers* tipo *reverse*.

Pcal05F						Pcal06F					
+ Pcal04R1			+ Pcal04R2			+ Pcal04R1			+ Pcal04R2		
<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pcal07F						Pcal08F					
+ Pcal04R1			+ Pcal04R2			+ Pcal04R1			+ Pcal04R2		
<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>
-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Pcal09F						Pcal10F					
+ Pcal04R1			+ Pcal04R2			+ Pcal04R1			+ Pcal04R2		
<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>
-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Pcal11F						Pcal12F					
+ Pcal04R1			+ Pcal04R2			+ Pcal04R1			+ Pcal04R2		
<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>
-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Pcal13F						Pcal14F					
+ Pcal04R1			+ Pcal04R2			+ Pcal04R1			+ Pcal04R2		
<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>
-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
Pcal15F											
+ Pcal04R1			+ Pcal04R2								
<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>						
-	-	-	-	-	-						

Onde: (+) denota *amplicon* detectável em gel de eletroforese e (-) denota *amplicon* não detectável em gel de eletroforese.

Os *primers* Pcal05, Pcal06, Pcal08, Pcal10, Pcal11 e Pcal14 foram desconsiderados por não terem apresentado *amplicons* detectáveis em gel de eletroforese. Os *primers* Pcal07, Pcal09, Pcal12, Pcal13 e Pcal14, por sua vez, apresentaram *amplicons* detectáveis. Esses *primers* foram, então, novamente testados em diferentes condições de estrigência, de modo a verificar o possível comportamento espécie-específico para alguma das espécies avaliadas. Os testes que se seguiram foram realizados com reações de 35 ciclos, temperaturas de anelamento igual a 53 °C, 3% de DMSO e tampão IC e IVB. Os resultados são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16: Testes dos *primers* Pcal07, Pcal09, Pcal12, Pcal13 e Pcal14 em diferentes tipos de tampão.

Tampão IC														
Pcal07F			Pcal09F			Pcal12F			Pcal13F			Pcal14F		
<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>
-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Tampão IVB														
Pcal07F			Pcal09F			Pcal12F			Pcal13F			Pcal14F		
<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>	<i>P. lineatus</i>	<i>P. argenteus</i>	<i>P. costatus</i>
-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Onde: (+) denota *amplicon* detectável em gel de eletroforese;

(-) denota *amplicon* não detectável em gel de eletroforese.

4.6. Exames em petrechos de pesca

Foi possível extrair DNA com sucesso através da utilização do kit GTS (Phoneutria) tanto dos petrechos de pesca avaliados (tarrafa e rede) como dos suportes utilizados como controles (barbante e plástico). O DNA extraído foi submetido a PCR nas seguintes condições: *primers* Pcal03R + Pcal01F, Pro5 e COI, 35 ciclos, tampão IC e temperatura de anelamento igual a 56 °C, sem adição de DMSO. A reação produziu *amplicons* detectáveis em gel de eletroforese para os *primers* Pcal e Pro5, conforme mostra a Figura 34.

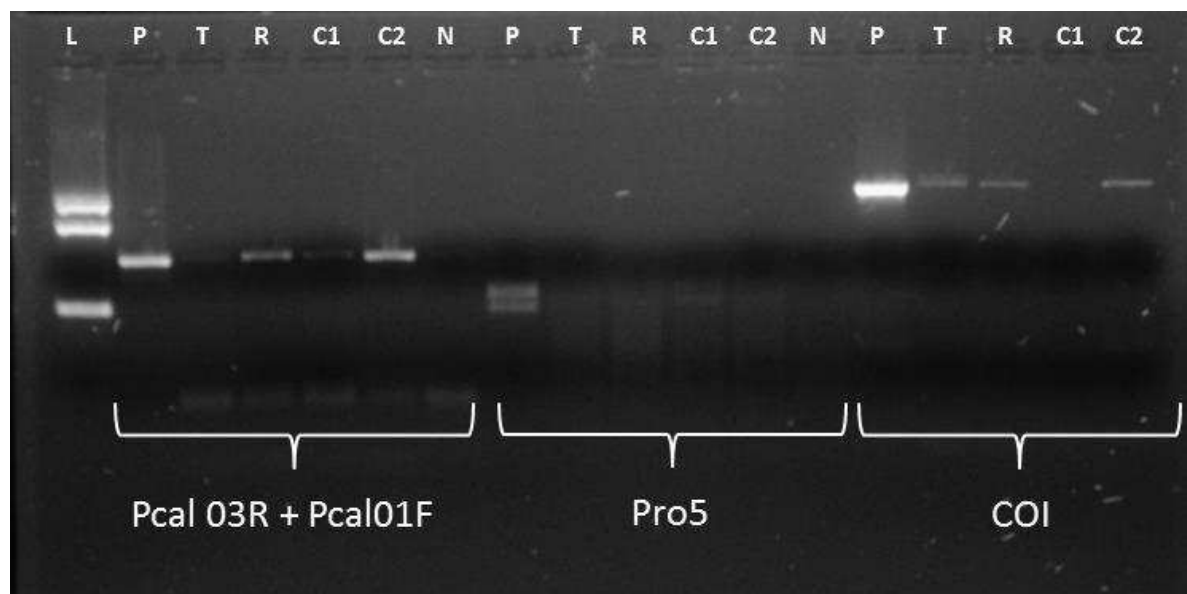


Figura 34: Gel de eletroforese de produtos de PCR onde foi utilizado como molde DNA extraído de petrechos de pesca. L: padrão de massa molecular, P: controle positivo da técnica, T: tarrafa, R: rede, C1: controle 1, C2: controle 2, N: negativo. O controle positivo da técnica foi feito com 50 ng DNA de *P. argenteus*. O controle 1 se refere ao barbante que foi atritado contra um exemplar de *P. lineatus* e o controle 2 se refere a um fragmento de plástico utilizado para acondicionar um exemplar de *P. lineatus*. Os *primers* utilizados estão indicados na parte inferior da figura.

5. DISCUSSÃO

A metodologia aqui descrita para extração de DNA de boa qualidade para sequenciamento mostrou-se eficaz para os objetivos propostos. Apesar de o tecido muscular de peixes ter-se mostrado sensível ao nível de oxidação do fenol (o tratamento com lotes de fenol mais antigos e, portanto, mais oxidados, resultaram em degradação do DNA), o protocolo de purificação utilizando fenol e clorofórmio foi capaz de entregar DNA pouco degradado, o que pôde ser visualizado através das bandas íntegras e de alto peso molecular (que foi observado na Figura 7), com qualidade para serem utilizadas no sequenciamento.

A enorme quantidade de dados gerados por NGS, aliado às ferramentas de bioinformática, tem uma grande aplicabilidade no desenvolvimento de marcadores moleculares. Abdelkrim et al (2009) e Cai et al (2013) reportaram a descoberta de dezenas de milhares de marcadores do tipo microssatélite em uma única rodada de sequenciamento. A técnica também permite realizar facilmente a identificação da sequência de DNA mitocondrial, sua anotação e o desenvolvimento de marcadores mitocondriais.

A etapa de sequenciamento realizada nesse trabalho, apesar dos problemas ocorridos durante o sequenciamento da fita *reverse* de *P. costatus* (Figura 13), gerou uma boa quantidade de dados, que se traduziu em uma elevada cobertura de sequenciamento para os genomas mitocondriais: 378 vezes para *P. argenteus* e 345 vezes para *P. costatus*. O bom rendimento do sequenciamento também pôde ser observado através da grande quantidade de marcadores microssatélites identificados pelas ferramentas SciRoKo (Tabelas 6 e 7) e MSATCOMMANDER (Tabelas 8 e 9).

A anotação dos genomas mitocondriais revelou-se muito similar entre as espécies de *Prochilodus* aqui avaliadas (Tabela 2), sendo que as maiores diferenças puderam ser avaliadas apenas através da análise em nível de sequência.

Por sua vez, os elevados níveis de identidade encontrados entre as sequências de DNA mitocondrial de *P. argenteus*, *P. costatus* e *P. lineatus* reflete o grande nível de similaridade entre as espécies que já foi relatado na literatura em relação aos achados morfológicos. Castro e Vari (2003) reportaram a pouca variabilidade morfológica entre as espécies do gênero *Prochilodus*, o que dificultava os processos de identificação e estabelecimento de relações filogenéticas dentro do grupo. O mesmo estudo discute a dificuldade de distinção morfológica de *P. lineatus* quando comparado com *P. argenteus* e *P. costatus*, uma vez que a primeira espécie, por vezes, apresenta número de fileiras

transversais de escamas entre a linha lateral e nadadeira dorsal em igual quantidade ao fixado para *P. argenteus* (10 a 11 fileiras transversais) e *P. costatus* (8 a 9 fileiras transversais). Apesar de tal similaridade, as espécies foram consideradas como sendo diferentes em virtude de diferenças apresentadas na contagem modal para esses valores (ou seja, estatisticamente, a moda indicava que já haviam sido descritos mais indivíduos de *P. lineatus* que não apresentavam valores sobrepostos a *P. argenteus* e *P. costatus*), além do fato de serem espécies alopátricas.

A semelhança morfológica entre as espécies, principalmente entre *P. costatus* e *P. lineatus*, também pode ser avaliada pelas chaves de identificação propostas por Britsky et al (1988) para peixes da bacia do rio São Francisco e através do estudo de Graça et al (2007) sobre os peixes da bacia do rio Paraná. O primeiro estudo descreve a espécie *P. costatus* como apresentando entre 8 e 8,5 fileiras transversais de escamas entre a linha lateral e nadadeira dorsal e a espécie *P. argenteus* como possuindo entre 10,5 e 11,5 fileiras transversais. O segundo estudo descreve a espécie *P. lineatus* como apresentando entre 7 e 10 fileiras transversais de escamas entre a linha lateral e nadadeira dorsal. A sobreposição de caracteres morfológicos distintivos das espécies, mais uma vez aparece para as espécies *P. costatus* e *P. lineatus*, que foram as duas espécies com maior similaridade de sequências de DNA mitocondrial. Tal similaridade pode indicar uma diversificação recente das espécies, que ainda precisa ser mais bem avaliado por estudos de filogenia e biogeografia.

A baixa divergência de sequências de DNA mitocondrial dentro do gênero *Prochilodus* também foi reportada por De Carvalho et al (2011), em estudo que utilizou *barcoding* de COI como marcador para análise de diversidade em espécies de peixes do rio São Francisco. O referido estudo encontrou 1,7% de divergência entre sequências de *P. argenteus* e *P. costatus*, sendo que a medida de distância genética foi medida por K2P. A média de divergência entre espécies do mesmo gênero avaliadas pelo grupo foi de 10,61%, sendo as menores divergências encontradas para espécies do gênero *Astyanax* (entre 0 e 0,93%). Os autores também realizaram análise de distribuição por NND (*nearest neighbor distance*), que avalia a distância genética mínima para uma dada espécie e a espécie mais próxima dentro do mesmo gênero. O valor de NND encontrado para *P. argenteus* e *P. costatus* ficou abaixo de 2,7, enquanto que 89% das espécies avaliadas mostraram valor de NND superior a 2,7.

O elevado nível identidade de sequências entre as espécies também impacta outros sistemas de identificação, como a sequência de COI adotada como marcador pelo BOLD. Como mostrado, as sequências obtidas no presente estudo, ao serem submetidas ao BOLD,

foram insuficientes para resolver a identificação em nível de espécie (Figuras 14 e 15). A Tabela 3 mostra que as sequências de COI apresentam entre 98 e 99% de identidade entre as espécies de *Prochilodus* aqui avaliadas e, portanto, não seriam marcadores ideais para identificação de espécies.

Carew e Hoffmann (2015) também relataram as dificuldades em se obter resolução em nível de espécie utilizando *barcoding* tradicional para a identificação de espécies próximas. Os autores utilizaram sequências mitocondriais de COI e citocromo b e sequências nucleares dos genes CAD1 (carbamoil-fosfatase sintase 1) e ZMP (zinco metaloproteinase) para delimitamento de espécies pertencentes a seis gêneros de Chironomidae, uma família de insetos pertencente à ordem Diptera. Os resultados mostraram que dados de sequências mitocondriais, combinados com dados de sequências nucleares, podem auxiliar na identificação de espécies próximas.

O uso de outras sequências, em complementação ao *barcoding* de COI, também foi sugerido por Kjer et al (2014) em estudos realizados com o gênero *Chimarra*, que é composto por insetos pertencentes à ordem Trichoptera. Os autores obtiveram reconstruções filogenéticas mais fidedignas quando analisaram sequências de COI em conjunto com sequências de rRNA nuclear.

Para as espécies de *Prochilodus* aqui avaliadas, também existem sequências depositadas referentes a segmentos dos genes *Atp6/Atp8* e *tRNA^{P_{ro}}/D-loop*. As referidas regiões, como também demonstrado na Tabela 3, também apresentam elevado nível de identidade de sequências.

Sivasundar et al (2001) utilizaram sequências do gene *Atp6* e *Atp8* em estudo de diversidade de populações de *Prochilodus* e encontraram níveis de divergência entre as sequências variando de 0 a 5% dentro do gênero. O estudo também avaliou o nível de divergência de sequências da região D-loop, que mostraram maior grau de diferenciação quando comparadas com sequências de *Atp6* e *Atp8*.

Dupuis et al (2012) avaliaram a eficácia de diferentes marcadores utilizados para *barcoding* na delimitação de espécies próximas pertencentes a diferentes grupos de animais e fungos. Nos 101 estudos avaliados, que empregaram tanto marcadores mitocondriais como nucleares, foi observada uma correlação positiva entre o número de *loci* utilizados e sucesso na identificação em nível de espécie.

A análise da Tabela 3 mostra que região D-loop é a que mais apresenta divergência de sequência entre as espécies de *Prochilodus* e, portanto, seria um alvo interessante para identificação das espécies. Fumagalli et al (2009) relataram sucesso na identificação de

espécies de mamíferos em amostras forenses utilizando como marcador uma sequência de D-loop. Entretanto, para o sucesso de abordagens como essa, é necessário um conhecimento prévio da sequência de DNA mitocondrial da espécie analisada. Os casos de sucesso reportados pela equipe se referem a espécies cujas sequências de genoma mitocondrial são conhecidas e estão depositadas em bancos de dados públicos.

A similaridade entre as sequências de DNA mitocondrial de *Prochilodus* também refletiu no desenho de *primers* espécie-específicos. O conjunto de *primers* Pcal04, que se comportou como sendo espécie-específico nas simulações realizadas pela ferramenta Primer-BLAST, não mostrou o mesmo comportamento na prática, apresentando amplificação para todas as espécies de *Prochilodus* aqui avaliadas.

Todos *primers* desenhados a partir do Primer-BLAST mostraram-se eficientes para a detecção de DNA de *Prochilodus* em diferentes condições de reação, como mostram as Figuras 25 e 26 e Tabelas 10 e 11. Os referidos *primers* também mostraram bons resultados nos testes de sensibilidade, como demonstrado nas Figuras 27 e 28. Em contrapartida, os testes de especificidade obtiveram menor sucesso, uma vez que foi observada a ocorrência de reações cruzadas com o gênero *Leporinus* para todos os pares testados.

Em pesquisa ao banco de dados GenBank, foram encontradas duas sequências completas de mtDNA de espécies pertencentes ao gênero *Leporinus*: *Leporinus affinis* (número de acesso AP011994) e *Leporinus piavussu* (número de acesso KM886569). As sequências dessas espécies apresentam, respectivamente, 85% e 84% de identidade com as sequências de *Prochilodus*. Nas regiões correspondentes àquelas para as quais foram desenhados os *primers* através da ferramenta Primer-BLAST, verificou-se que a maior concentração de sítios variáveis se encontrava na região do *primer* Pcal03R, justamente o que apresentou o melhor desempenho em relação à especificidade.

Em relação às reações cruzadas com o gênero *Leporinus*, as mesmas foram satisfatoriamente eliminadas para o par de *primers* Pcal03R + Pcal01F após redução do número de ciclos e aumento das condições de estringência da reação.

Ao final dos testes de padronização de *primers* gênero-específicos para o gênero *Prochilodus*, o par de *primers* Pcal03R e Pcal01F apresentaram resultados satisfatórios para a identificação do gênero *Prochilodus*. Como mostrado na Tabela 14, a reação não foi inibida por elevadas concentrações de DNA e não houve reações cruzadas com gêneros próximos, como *Leporinus*. Além disso, nas condições aqui descritas, foi possível detectar facilmente a presença de DNA de *Prochilodus*, mesmo em concentrações reduzidas de DNA (até 0,5 ng), como mostrado na Figura 33. Tal sensibilidade da técnica é um fator

importante, principalmente quando se trata de amostras escassas e degradadas, condições em que frequentemente se encontram os materiais referentes a análises forenses.

Entretanto, para análises em que a especificidade para *Prochilodus* não seja um fator importante, ou seja, em que podem ser utilizadas condições mais brandas de estrigência, pode-se conseguir detectar a presença de *amplicon* em gel de eletroforese em diluições de até de 1:10.000 para os *primers* Pcal01, Pcal02, Pcal03 e Pcal04 + F1 e 1:100.000 para Pcal04 + R2, como mostrado nas Figuras 26 e 27.

O desenho manual de *primers* também encontrou alguns obstáculos, sendo o principal deles o baixo conteúdo GC das regiões que apresentavam algum nível de diferenciação entre as sequências de *Prochilodus*, como mostrado na Figura 23. Os *primers* desenhados manualmente também apresentaram, em sua maioria, baixa temperatura de anelamento, como mostrado na Tabela 5.

Os testes realizados com os *primers* Pcal05 a Pcal15 mostraram que os oligonucleotídeos que apresentavam baixos conteúdo GC e temperatura de anelamento foram aqueles que não obtiveram sucesso na reação de amplificação: Pcal05, Pcal06, Pcal08, Pcal10 e Pcal15. Quanto a Pcal11, apesar de o mesmo ter sido desenhado a partir de uma modificação em Pcal09 (que substituiu um AAA por GGT), a ausência de amplificação também foi percebida, possivelmente devido à redução na complementaridade de bases na região 3' do *primer*.

Quanto aos *primers* Pcal07, Pcal09, Pcal12, Pcal13 e Pcal14, mostrados na Tabela 16, também foram obtidos resultados interessantes. O *primer* Pcal07, de maneira especial, amplificou somente o DNA de *P. argenteus* em condições de baixa estrigência. Os outros *primers* ainda precisam ter a reação melhor calibrada e avaliada quanto à possibilidade de amplificação espécie-específica.

De qualquer forma, o resultado obtido até o presente momento já tem aplicação prática, uma vez que pode ser aliado a outros dados, como local de coleta. Em outras palavras, como na bacia do rio São Francisco ocorrem apenas as espécies *P. argenteus* e *P. costatus*, a identificação em nível de espécie seria possível através de duas PCRs: primeiramente uma reação utilizando o par de *primers* Pcal03R + Pcal01F, que identificaria o gênero *Prochilodus*, e posteriormente uma reação utilizando o par de *primers* Pcal07, que apresentaria bandas visíveis para *P. argenteus* e ausência de bandas visíveis para *P. costatus*.

Por outro lado, a identificação em nível de gênero, por si só, já é muito informativa para os órgãos de fiscalização e controle, uma vez que as espécies de *Prochilodus* são

tratadas basicamente da mesma forma pela legislação vigente. Um aspecto importante da diferenciação em nível de espécie seria em relação ao tamanho mínimo de captura, fixado pela Portaria 111 de 16 de outubro de 2013 do IEF de Minas Gerais em 40 centímetros para *P. argenteus* e 30 centímetros para *P. costatus* e *P. lineatus* (Minas Gerais 2003).

As condições de reação aqui propostas possuem, ainda, potencial para serem aplicadas em diferentes tipos de estudos além da aplicação na área forense. Por exemplo, em estudos de ecologia molecular, as metodologias aqui desenvolvidas podem ser utilizadas para a identificação de ovos de larvas de *Prochilodus*, identificação de locais de reprodução e desova e avaliação do impacto da construção de barreiras artificiais, como barragens de usinas hidrelétricas, na biologia e reprodução dessas espécies. Estudos dessa natureza já vêm sendo realizados pelo LBMM utilizando marcadores microssatélites e os marcadores mitocondriais aqui descritos podem ser utilizados nesse estudo de forma complementar. A Figura 35 ilustra parte do estudo desenvolvido no LBMM com identificação de ovos e larvas de *Prochilodus*, que apresentam poucas características distintivas de espécie nessa fase do desenvolvimento.



Figura 35: Ovos e larvas de *Prochilodus* coletados na bacia do rio São Francisco. A: Ovos e larvas durante processo de triagem. B: Larva de *Prochilodus*. C: Ovo de *Prochilodus*. Imagens: Camila Marani Abreu Lopes e Gustavo Ribeiro Rosa.

Ainda sobre as aplicações na área de ecologia molecular, o presente trabalho indicou a presença de dezenas de milhares de marcadores microssatélites para *P. argenteus* e *P. costatus*. Tais marcadores ainda precisam ser avaliados quanto a parâmetros importantes, como número de alelos e amplificação cruzada com outras espécies, mas de antemão já se apresentam como ferramentas promissoras para estudos de diversidade.

Uma característica importante apresentada pela metodologia descrita no presente trabalho é a possibilidade de detecção de DNA de *Prochilodus* em petrechos de pesca. Em linhas gerais, o aporte de tais objetos é muito mais frequente nas delegacias de Polícia Civil que a apreensão de pescado propriamente dita. Por não se tratar de material perecível e

que demande refrigeração, os petrechos de pesca são facilmente armazenados e geralmente acompanham o inquérito até seu envio à Justiça.

Os petrechos de pesca são frequentemente enviados para exame pericial, porém os mesmos se atêm basicamente à constatação do objeto, sua prestabilidade (ou seja, destina-se à prática de pesca) e determinação das medidas da malha, para os casos que envolvem redes e tarrafas. A detecção de DNA de peixe na superfície de tais objetos possibilitaria, portanto, a realização de exames mais informativos, que permitiriam afirmar se o petrecho apreendido foi utilizado, de fato, para captura de espécie cuja pesca não é permitida.

Um achado interessante a respeito dos exames realizados em petrechos de pesca é a ausência de amplificação detectável em gel de agarose quando a PCR foi feita utilizando marcador microssatélite (par de *primers* Pro5). O contrário pôde ser observado para os marcadores mitocondriais (*primers* Pcal03R + Pcal01F e COI), que apresentaram bandas visíveis. Tal resultado se justifica pelo fato de o DNA mitocondrial se encontrar em maior quantidade tanto nas células vivas como nos suportes avaliados. Por se tratar de amostras com baixa quantidade de DNA, que também encontrava-se possivelmente bastante degradado em virtude do tempo e condições de armazenamento anteriores à coleta, a chance de se obter amplificação positiva em uma PCR é maior para marcadores mitocondriais.

O uso de marcadores nucleares pode, entretanto, ser considerado para casos em que a elevada semelhança de sequências mitocondriais não permitir uma resolução em nível de espécie. Nesse aspecto, pode ser feita uma procura por marcadores nucleares que não apresentem reação cruzada entre espécies próximas ou que produzam *amplicons* com tamanhos diferentes para espécies diferentes (Ferguson et al 1995).

Em termos operacionais, estratégias para identificação de espécies apreendidas, para serem implementadas na rotina dos órgãos de fiscalização, devem preferencialmente ser de baixo custo para o governo. Nesse aspecto, abordagens baseadas em sequenciamento, como o *barcoding* tradicional seriam desvantajosas, pois necessitam de equipamentos mais caros e pessoal treinado para lidar, principalmente, com a análise das sequências geradas. A metodologia de identificação aqui proposta, em contrapartida, permite a identificação do material apreendido através de uma metodologia simples, que necessita apenas de equipamentos para realização de PCR e visualização dos *amplicons* gerados.

De modo geral, as técnicas aqui descritas possuem grande potencial de serem aplicadas na rotina de laboratórios forenses. As informações possíveis de serem extraídas

de abordagens dessa natureza podem ser utilizadas como meio de fortalecimento da prova pericial no meio jurídico, através do estabelecimento de materialidade.

5.1. Perspectivas

Os resultados aqui apresentados abrem precedentes para uma grande gama de trabalhos a serem realizados posteriormente, entre os quais se destacam:

1. Padronização de *primers* espécie-específicos para *P. costatus* e *P. lineatus*;
2. Avaliação da possibilidade de estabelecimento de reações tipo multiplex, que permitam a detecção de mais de uma espécie em uma única reação;
3. Avaliação dos marcadores microssatélites aqui identificados. Existe o interesse em se identificar marcadores polimórficos dentro da espécie, que possam ser aplicados em estudos de diversidade, e também em marcadores que possam ser utilizados para a identificação de gênero e espécie, que possam atuar de forma complementar aos marcadores mitocondriais;
4. Os marcadores mitocondriais aqui descritos ainda serão avaliados para a detecção de DNA extraído de ovos e larvas de *Prochilodus*, de modo a auxiliar estudos desenvolvidos no LBMM referente a localização de locais de reprodução e desova de *Prochilodus*, em que estão sendo utilizados atualmente marcadores nucleares tipo microssatélites;
5. Pretende-se ampliar o estudo para outras espécies de interesse forense identificadas no levantamento feito por Chagas e Kalapothakis (2014), que identificou as espécies de peixes mais apreendidas pela Polícia Militar do Meio Ambiente em ocorrências de pesca ilegal;
6. Identificar marcadores mitocondriais gênero-específicos e espécie-específicos para as espécies que possuem genoma mitocondrial descrito, em especial para as espécies cujos mitogenomas foram caracterizados pela equipe do LBMM, que são espécies que possuem importância tanto econômica quanto ecológica;
7. Avaliar a aplicabilidade das técnicas de extração de DNA e PCR em petrechos de pesca apreendidos em ocorrências de crime ambiental;
8. Avaliar a aplicabilidade das técnicas aqui descritas para identificação de espécimes apreendidos pela Polícia Militar do Meio Ambiente. Para tanto, foram distribuídos kits de coleta para as equipes de policiamento que atuam no âmbito da 1ª Companhia de Polícia Militar do Meio Ambiente de Minas Gerais, que compreende as regiões de Belo Horizonte, Contagem, Betim, Nova Lima, Lagoa Santa, Caeté e Mariana. As amostras coletadas serão armazenadas em tubos contendo álcool 70%, que

compõem o kit de coleta. Pretende-se, inclusive, expandir a parceria com os comandos de Polícia Militar de outras regiões do Estado.

6. CONCLUSÃO

A metodologia utilizada no presente trabalho permitiu a obtenção de sequências de DNA mitocondrial de boa qualidade para as espécies *P. argenteus* e *P. costatus*.

A análise comparativa das sequências de *P. argenteus*, *P. costatus* e *P. lineatus* mostrou uma grande similaridade entre as sequências de DNA mitocondrial das espécies, principalmente entre *P. costatus* e *P. lineatus*. A similaridade encontrada em nível molecular reflete os achados morfológicos previamente descritos na literatura.

O elevado nível de identidade entre as sequências de DNA mitocondrial entre as espécies de *Prochilodus* avaliadas no presente estudo impacta os sistemas de identificação molecular de espécies disponíveis. O *barcoding* de COI, utilizado como marcador pelo consórcio *Barcode of Life*, não possui resolução suficiente para realizar a identificação em nível de espécie, sendo necessária a utilização de outros marcadores para delimitação da espécie.

Os *primers* avaliados no presente estudo permitiram a detecção de DNA das três espécies de *Prochilodus* analisadas através da visualização, em gel de agarose, dos *amplicons* gerados durante a PCR. O par de *primers* Pcal03R + Pcal01F apresentou-se específico para o gênero *Prochilodus* nas condições de reação aqui padronizadas, tendo apresentado também boa sensibilidade.

Os *primers* espécie-específicos, apesar de ainda precisarem ter a reação mais bem calibrada, já apresentaram bons resultados para a detecção de DNA de *P. argenteus* sem a ocorrência de reações cruzadas com *P. costatus* e *P. lineatus*.

A metodologia utilizada para extração de DNA de petrechos de pesca também se mostrou eficiente. Os *primers* gênero-específicos também permitiram a detecção de DNA de *Prochilodus* nos petrechos avaliados, constituindo, assim, uma importante ferramenta para análises forenses.

As ferramentas aqui descritas possuem grande potencial para serem aplicadas na rotina de órgãos de fiscalização e controle, uma vez que são técnicas de fácil execução e que demandam poucos equipamentos: um termociclador, aparato para corrida eletroforética e revelação de géis.

Após ser expandido para outras espécies, a abordagem aqui descrita pode auxiliar sobremaneira a realização de exames periciais tanto em espécimes de peixes apreendidos como em petrechos de pesca. Uma vez estabelecidas, as técnicas desenvolvidas têm

grande potencial para auxiliar no estabelecimento de materialidade em delitos cometidos contra o meio ambiente, auxiliando a Justiça na aplicação de sanções e proteção aos recursos ambientais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelkrim J, Robertson B, Stanton JA e Gemmell N (2009) Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* 46(3): 185–92.
- Alves CBM et al (2007) Impacts of non-native fish species in Minas Gerais, Brazil: present situation and prospects. In: BERT, T. M. *Ecological and genetic implications of aquaculture activities*. Florida: Springer. p. 291-314.
- Agnew DJ et al. (2009) Estimating the worldwide extent of illegal fishing. *PLoS ONE* 4(2).
- Anne C (2006) Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: From molecular evolution to practical aspects. *Genetica* 127(1-3): 101–120.
- Arantes FP, Sato Y, Sampaio EV, Rizzo E e Bazzoli N (2013) Spawning induction and fecundity of commercial native fish species from the São Francisco River basin, Brazil, under hatchery conditions. *Agricultural Sciences* 4(8): 382–388.
- Ardura A, Horreo JL, Hernandez E, Jardon A, Pola IG, Martinez JL e Garcia-Vazquez E (2012) Forensic DNA analysis reveals use of high trophic level marine fish in commercial aquaculture fish meals. *Fisheries Research* 115–120.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA e Saunders NC (1987) Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18(1): 489–522.
- Baker CS (2008) A truer measure of the market: The molecular ecology of fisheries and wildlife trade. *Molecular Ecology* 17: 3985–3998.
- Barbosa ACDR, Galzerani F, Correa TC, Galetti Jr PM e Hatanaka T (2008) Description of novel microsatellite *loci* in the neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. *Genetics and Molecular Biology* 1: 357–360.
- Barbieiri CB, Geiser GC (2012) Perícia Ambiental. In Velho JÁ, Geiser GC, Espindula A (2012) *Ciências Forenses: Uma Introdução às Principais Áreas da Criminalística Moderna*. Campinas: Millenium. p. 235-258.
- Barroca TM (2009) *Isolamento e caracterização de marcadores moleculares para análise genética de população de Prochilodus costatus (Pisces, Characiformes) do rio Pará*. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Barroca TM (2012) *Análise da variabilidade genética de Prochilodus spp. (Prochilodontidae) das bacias dos rios Paraopeba, Pará e Grande, utilizando marcador de complexas repetições hipervariáveis*. 150 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Brandão-Dias PFP, Carmo AO, Martins APV, Pimenta RJG, Alves CBM e Kalapothakis E (2014) Complete mitochondrial genome of *Salminus brasiliensis* (Characiformes, Characidae). *Mitochondrial DNA* 1736: 1–2.

Brasil (1941) Decreto-Lei 3.689 de 03 de outubro de 1941. Código de Processo Penal. *Diário Oficial da União*, Rio de Janeiro.

Brasil (1988) Constituição. *Constituição da República Federativa do Brasil*. Brasília: Senado Federal.

Brasil (1998) Lei 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília.

Brasil (2009) Lei 11.959, de 29 de junho de 2009. Dispõe sobre a Política Nacional de Desenvolvimento Sustentável da Aquicultura e da Pesca, regula as atividades pesqueiras, revoga a Lei nº 7.679, de 23 de novembro de 1988, e dispositivos do Decreto-Lei n 221, de 28 de fevereiro de 1967, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília.

Britsky HA et al. (1988) *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias*. 3. ed. Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações. 116 p.

Cai G, Leadbetter CW, Muehlbauer MF, Molnar TJ e Hillman BI (2013) Genome-wide microsatellite identification in the fungus *Anisogramma anomala* using illumina sequencing and genome assembly. *PLoS ONE* 8(11): 1–11.

Carew ME e Hoffmann A (2015) Delineating closely related species with DNA barcodes for routine biological monitoring. *Freshwater Biology*: 1-16.

Carmo AO, Brandão-Dias PFP, Martins APV, Bedore AG e Kalapothakis E (2014) Complete mitochondrial genome sequence of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Mitochondrial DNA* 1736: 1–2.

Castro RMC, Vari RP (2003) Prochilodontidae (Fannel mouth characiforms). In: Reis RE, Kullander SO e Ferraris CJJr. *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs. p. 65-70.

Chagas ATA, Kalapothakis E (2014) Survey of animal species of interest for forensic genetics in Minas Gerais State, Brazil. In: Encontro de Genética de Minas Gerais 5, Belo Horizonte. *Anais....* Belo Horizonte.

De Carvalho DC, Oliveira DAA, Pompeu PS, Leal CG, Oliveira C e Hanner R (2011) Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin. *Mitochondrial DNA* 22(October): 80–86.

Drummond GM et al. (2005) *Biodiversidade em Minas Gerais*. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.

Dupuis JR, Roe AD, Sperling FAH (2012) Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi : one marker is not enough. *Molecular Ecology* 21: 4422–4436.

Eklblom R, Galindo J (2011) Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* 107(1): 1–15.

Faircloth BC (2008) MSATCOMMANDER: Detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources* 8: 92–94.

FAO (2002) Fish passes: design, dimensions and monitoring. Disponível em: <www.fao.org/docrep/010/y4454e/y4454e00.HTM>. Acesso em 04 jun. 2015.

FAO (2014) The State of World Fisheries and Aquaculture. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/sofia/en>>. Acesso em 25 out. 2015.

Ferguson A et al (1995) The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*: 47: 103-126.

Ferreira PB, Torres RA, Garcia JE (2011) Single nucleotide polymorphisms from cytochrome b gene as a useful protocol in forensic genetics against the illegal hunting of manatees: *Trichechus manatus*, *Trichechus inunguis*, *Trichechus senegalensis*, and *Dugong dugon* (Eutheria: Sirenia). *Zoologia (Curitiba, Impresso)* 28(1): 133–138.

Ferreira ME, Grattaglia D (1988) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220 p.

Filonzi L, Chiesa S, Vaghi M e Nonnis Marzano F (2010) Molecular barcoding reveals mislabelling of commercial fish products in Italy. *Food Research International* 43(5): 1383–1388.

Flecker AS (1996) Ecosystem Engineering by a Dominant Detritivore in a Diverse Tropical Stream. *Ecology* 77(6): 1845–1854.

Fumagalli L et al (2009) Simultaneous identification of multiple mammalian species from mixed forensic samples based on mtDNA control region length polymorphism. *Forensic Science International* 2 (1): 302-303.

Galetti M, Giacomini HC, Bueno RS, Bernardo CSS, Marques RM, Bovendorp RS, Steffler CE, Rubim P, Gobbo SK, Donatti CI, Begotti RA, Meirelles F, Nobre RDA., Chiarello AG e Peres CA (2009) Priority areas for the conservation of Atlantic forest large mammals. *Biological Conservation* 142(6): 1229–1241.

Gil LA (2007) PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science and Technology* 18: 558–566.

Gjerde KM, Currie D, Wowk K e Sack K (2013) Ocean in peril: Reforming the management of global ocean living resources in areas beyond national jurisdiction. *Marine Pollution Bulletin*. Elsevier Ltd 74(2): 540–551.

Glover K (2010) Forensic identification of fish farm escapees: the Norwegian experience. *Aquaculture Environment Interactions* 1: 1–10.

Graça WJ et al (2007) *Peixes da planície de inundação do Alto Rio Paraná e áreas adjacentes*. Maringá: EDUEM. 241 p.

Grant JR, Arantes AS, Stothard P (2012) Comparing thousands of circular genomes using the CGView Comparison Tool. *BMC Genomics* 13: 202.

Gross M (2012) Barcoding biodiversity. *Current Biology* 22(3): R73–R76.

Hanner R, Desalle R, Ward RD e Kolokotronis S-O (2011) The Fish Barcode of Life (FISH-BOL) special issue. *Mitochondrial DNA* 22(October): 1–2.

Hatanaka T, Henrique-Silva F e Galetti PM (2002) A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenetic and Genome Research* 98(2002): 308–310.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL e Waard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of The Royal Society Biological sciences* 270: 313–321.

Ivanova NV, Zemlak TS, Hanner RH e Hebert PDN (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes* 7(January 2006): 544–548.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. 2014. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em 24 out. 2014.

Iwasaki W, Fukunaga T, Isagozawa R, Yamada K, Maeda Y, Satoh TP, Sado T, Mabuchi K, Takeshima H, Miya M e Nishida M (2013) Mitofish and mitoannotator: A mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Molecular Biology and Evolution* 30(11): 2531–2540.

Keskin E, Atar HH (2012) Molecular identification of fish species from surimi-based products labeled as Alaskan pollock. *Journal of Applied Ichthyology* 28: 811–814.

Kjer KM, Zhou X, Frandsen PB, Thomas JA e Blahnik RJ (2014) Moving toward species-level phylogeny using ribosomal DNA and COI barcodes: an example from the diverse caddisfly genus *Chimarra* (Trichoptera: Philopotamidae). *Arthropod Systematics and Phylogeny* 72(3): 345–354.

Ko HL, Wang YT, Chiu TS, Lee MA, Leu MY, Chang KZ, Chen WY e Shao KT (2013) Evaluating the Accuracy of Morphological Identification of Larval Fishes by Applying DNA Barcoding. *PLoS ONE* 8(1): 3–9.

Kofler R, Schlötterer C, Lelley T (2007) SciRoKo: A new tool for whole genome microsatellite search and investigation. *Bioinformatics* 23(13): 1683–1685.

Kyle CJ, Wilson CC (2007) Mitochondrial DNA identification of game and harvested freshwater fish species. *Forensic Science International* 166: 68–76.

Ladeira FD (2007) *Isolamento e caracterização de regiões de marcadores moleculares de Prochilodus lineatus e Salminus brasiliensis para análise genética de populações*. 68 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Machado ABM et al (2008) *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. 1. ed. Brasília: MMA. 1420 p.

Martinsohn JT, Ogden R (2009) FishPopTrace-Developing SNP-based population genetic assignment methods to investigate illegal fishing. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2: 294–296.

Melo BF (2011) *Genética de populações de Prochilodus argenteus e P . costatus do médio São Francisco*. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Marília.

Minas Gerais (2003) Instituto Estadual de Florestas. Portaria IEF nº 111, de 16 de Outubro de 2003. Estabelece tamanhos mínimos para captura e transporte de espécies nativas de peixes das bacias hidrográficas de Minas Gerais. *Minas Gerais*, Belo Horizonte.

Minas Gerais (2008) Decreto nº 44.844, de 25 de Junho de 2008. Estabelece normas para licenciamento ambiental e autorização ambiental de funcionamento, tipifica e classifica infrações às normas de proteção ao meio ambiente e aos recursos hídricos e estabelece procedimentos administrativos de fiscalização e aplicação das penalidades. *Minas Gerais*, Belo Horizonte.

Minas Gerais (2015) Instituto Estadual de Florestas. Cobertura vegetal de Minas Gerais. 2015. Disponível em: <<http://www.ief.mg.gov.br/florestas>>. Acesso em 19 jan. 15.

Morelli KA, Revaldaves E, Oliveira C e Foresti F (2007) Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* 7: 32–34.

Neufeld P, Scheck B (2010) Making forensic science more scientific. *Nature* 464(7287): 351.

Ogden R (2008) Fisheries forensics: The use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries* 9: 462–472.

Ojala D, Montoya J, Attardi G (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290:470–4.

Olivatti AM, Boni TA, Silva-Júnior NJ, Resende LV, Gouveia FO e Telles MPC (2011) Heterologous amplification and characterization of microsatellite markers in the Neotropical fish *Leporinus friderici*. *Genetics and Molecular Research* 10(3): 1403–1408.

Paiva ALB (2007) *Isolamento e caracterização de microssatélites de Pimelodus maculatus (Pisces, Siluriformes)*. 75 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H e Föger M (2000) Species identification by means of the cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine* 114: 23–28.

Pereira LHG, Hanner R, Foresti F e Oliveira C (2013) Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC genetics* 14(1): 20.

Pimentel JD, Carmo AO, Maciel DDCL, Siqueira FDF e Kalapothakis E (2014) Complete mitochondrial genome sequence of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Mitochondrial DNA* 1736: 1–2.

Rastogi G, Dharne MS, Walujkar S, Kumar A, Patole MS e Shouche YS (2007) Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science* 76: 666–674.

Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) The Barcode of Life Data System BOLD: *Molecular Ecology*: 1-10.

Reis RE, Kullander SO, Ferraris C Jr (2003) *Checklist of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS. 742 p.

Ribeiro AO, Caires RA, Mariguela TC, Pereira LHG, Hanner R e Oliveira C (2012) DNA barcodes identify marine fishes of São Paulo State, Brazil. *Molecular Ecology Resources* 12: 1012–1020.

Rueda EC, Carriquirborde P, Monzón AM, Somoza GM e Ortí G (2013) Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River. *Genetica* 141: 401–407.

Sambrook J et al (2001) *Molecular Cloning*. 3. ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanches A, Perez WAM, Figueiredo MG, Rossini BC, Cervini M, Galetti PM e Galetti M (2011) Wildlife forensic DNA and lowland tapir (*Tapirus terrestris*) poaching. *Conservation Genetics Resources* 3(1): 189–193.

Sanches A, Tokumoto PM, Peres WA, Nunes FL, Gotardi MS, Carvalho CS, Pelizzon C, Godoi TG e Galetti M (2012) Illegal hunting cases detected with molecular forensics in Brazil. *Investigative Genetics*. *Investigative Genetics* 3(1): 17.

Sato H, Godinho HP (2003) Migratory fishes of the São Francisco River. In: Carolsfeld J et al. *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. Ottawa: IDRC World Bank. p. 195-231.

Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK e Lane R (2005) Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 360: 1805–1811.

Sevilla RG, Diez A, Norén M, Mouchel O, Jérôme M, Verrez-Bagnis V, Van Pelt H, Favre-Krey L, Krey G e Bautista JM (2007) Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes* 7: 730–734.

Siqueira FDF, Carmo AO, Pimentel JDSM e Kalapothakis E (2014) Complete mitochondrial genome sequence of *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Bryconidae). *Mitochondrial DNA* 1736: 1–2.

Sivasundar A, Bermingham E, Orti G (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10: 407–417.

Stein ED, Martinez MC, Stiles S, Miller PE e Zakharov E V. (2014) Is DNA barcoding actually cheaper and faster than traditional morphological methods: Results from a survey of freshwater bioassessment efforts in the United States? *PLoS ONE* 9(4).

Tabarelli M, Pinto LLP, Silva JMC, Hirota M e Bedê L (2005) Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. *Conservation Biology* 19(3): 695–700.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A e Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–2729.

Teletchea F (2009) Molecular identification methods of fish species: Reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 19: 265–293.

Tobe SS, Linacre A (2010) DNA typing in wildlife crime: Recent developments in species identification. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* 6: 195–206.

Tzika AC, D'Amico E, Alfaro-Shigueto J, Mangel JC, van Waerebeek K e Milinkovitch MC (2010) Molecular identification of small cetacean samples from Peruvian fish markets. *Conservation Genetics* 11: 2207–2218.

Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 110–117.

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR e Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the Royal Society* 360: 1847–1857.

Yazbeck GM (2007) *Microssatélites em estudos populacionais de peixes migratórios*. 139p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S e Madden TL (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.