

DANIEL CARDOSO DE CARVALHO

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE INVASÕES BIOLÓGICAS: O CASO DO
TUCUNARÉ (*Cichla spp.*) EM MINAS GERAIS, BRASIL

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Zootecnia, área Melhoramento
Animal. Orientadora: Prof^a Denise
Aparecida Andrade de Oliveira

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2009

C331c Carvalho, Daniel Cardoso de, 1977-
Caracterização genética de invasões biológicas: o caso do Tucunaré (*Cichla* spp.) em Minas Gerais, Brasil / Daniel Cardoso de Carvalho. – 2009.
62 p. : il.

Orientadora: Denise Aparecida Andrade de Oliveira
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

I. Tucunaré (Peixe) – Genética – Teses. 2. Tucunaré (Peixe) – Migração – Teses.
3. Peixe – Controle biológico – Teses. I. Oliveira, Denise Aparecida Andrade de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 639.3

Tese defendida e aprovada em 05/03/2009, pela comissão examinadora constituída por:



Profa. Dra. Denise Aparecida Andrade de Oliveira



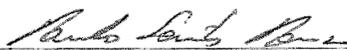
Profa. Dra. Maria Iracilda Sampaio



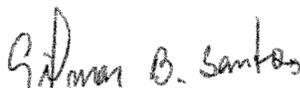
Profa. Dra. Angela Maria Quintão Lana



Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann



Prof. Dr. Paulo dos Santos Pompeu



Prof. Dr. Gilmar B. Santos

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Denise por todo o apoio e por acreditar neste projeto desde o início.

Aos professores Iracilda Sampaio e Luciano Beheregaray pela grande ajuda e colaboração.

À minha namorada Mariana pelo carinho, compreensão e pelas ótimas revisões.

A toda minha família, mãe, pai e Lucas pelo apoio e por me aturar esses anos todos...

A todos os alunos e funcionários dos laboratórios de genética da UFMG-VET, UFPA e MELMU (Macquarie University), onde partes deste trabalho foram executadas, pela amizade, ajudas e momentos divertidos.

Aos colegas Claudia Salviano, Peter Teske, Gabriel Yazbeck e Juliana Araripe pelas sugestões nos manuscritos da tese e artigos.

Ao Arno, Alexandre, Paulo Faria e Daniel Crepaldi pela ajuda nas coletas.

Aos Professores Iracilda Sampaio e Aldney Andrade por cederem amostras de tucunares.

Aos co-orientadores José Enemir dos Santos e Alexandre Benvindo por toda a ajuda nesses quatro anos.

Ao Mattias e à Anna por me proporcionarem momentos tão agradáveis em terras australianas.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

À Capes pela bolsa “sanduíche” concedida para realização de parte deste trabalho na Austrália.

À FEP-MVZ e à FAPEMIG (APQ3950-3) pelo apoio financeiro a este projeto.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	7
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO GERAL.....	8
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11

CAPÍTULOS

1-Análise filogenética das espécies do peixe tucunaré (*Cichla*): investigando populações introduzidas e nativas

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO.....	14
METODOLOGIA.....	16
Descrição da amostra.....	16
Sequenciamento do DNA.....	17
Análise das Sequências.....	17
RESULTADOS.....	18
Análise da região mitocondrial 16S.....	18
Análise da Região Controle (CR) mitocondrial.....	19
DISCUSSÃO.....	20
CONCLUSÕES.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
ANEXOS.....	28

2- Desenvolvimento e caracterização de marcadores nucleares microssatélites para a espécie de tucunaré *Cichla piquiti*

RESUMO.....	30
ABSTRACT.....	30
INTRODUÇÃO.....	30
Marcadores nucleares - microssatélites.....	31
METODOLOGIA.....	31
Descrição da amostra.....	31
Desenvolvimento de microssatélites.....	31
Genotipagem.....	32
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO.....	34
CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	40
Tabela 2.....	40

3- Caracterização genética de populações nativas e introduzidas do peixe tucunaré utilizando marcadores microssatélites e mitocondrial

RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	40
INTRODUÇÃO.....	41
METODOLOGIA.....	42
Descrição da amostra.....	42
Genotipagem.....	43
Análises com DNA mitocondrial (mtDNA).....	43
Análises em genética de populações.....	44

Análises de hibridação.....	44
RESULTADOS.....	44
<i>Cichla piquiti</i>	44
<i>Cichla kelberi</i>	47
Análises de Hibridação.....	49
DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXOS.....	61
Tabela 5.....	61
CONCLUSÕES GERAIS.....	62

Resumo geral

Este estudo buscou o entendimento do processo de colonização do peixe amazônico tucunaré no sudeste do Brasil por meio da caracterização genética de suas populações. Visto que essa é uma espécie invasora, a determinação inequívoca da população fonte e a rota de invasão são informações vitais na avaliação do seu sucesso adaptativo em áreas introduzidas e determinantes na elaboração de planos de manejo e controle. Foram propostas análises genéticas de populações introduzidas nas principais bacias hidrográficas do estado de Minas Gerais (São Francisco, Grande, Paranaíba e Doce). Sequências do DNA de duas regiões mitocondriais de indivíduos das populações introduzidas foram obtidas e comparadas com os estoques nativos da Amazônia para a identificação da origem dos estoques. Apenas haplótipos das espécies *Cichla piquiti* e *C. kelberi*, endêmicas da bacia do Araguaia-Tocantins, foram detectados nos sítios analisados. Posteriormente, dez (10) loci de microssatélites para a espécie invasora *C. piquiti* (testados com eficiência para *C. kelberi*) foram desenvolvidos para análise da estrutura e diversidade genética de suas populações. Os resultados indicam efeito fundador nas populações introduzidas, as quais apresentaram redução na riqueza alélica e heterozigose esperada quando comparada com a população nativa. A análise Bayesiana de atribuição detectou espécimes híbridos apenas na população nativa. Apesar de sua baixa diversidade genética, o tucunaré mostrou sinais evidentes de que se estabeleceu com sucesso no ambiente receptor, sendo ele um ambiente impactado ou não, demonstrando que o “efeito de propágulo” não é importante para o processo de invasão do tucunaré. Padrões genéticos e de distribuição geográfica sugerem, ainda, que *C. kelberi* e *C. piquiti* apresentam processos introdutórios distintos nas principais bacias no Estado de Minas Gerais.

Abstract

This study aimed to understand the colonization process of the Amazonian fish introduced in southeast Brazil using molecular markers. In the invasive biology studies, the unequivocal characterization of the source population and the invasive route, are vital information not only in the evaluation on its adaptative success in invaded areas but also in its management and control. Genetic analyses were carried out on the introduced populations at the major river basis in the Minas Gerais State (São Francisco, Grande, Paranaíba and Doce). DNA sequences of two mitochondrial regions from specimens of the introduced species were obtained and compared with the natives stocks from the Amazon basin in order to detect the source population. Only mtDNA haplotypes from the species *C. piquiti* and *C. kelberi*, endemic from the Araguaia-Tocantins, the eastern limit of the Amazon basin, were recovered in the introduced populations. Furthermore, ten (10) microsatellites loci were developed for the invasive species *C. piquiti* (successfully tested for *C. kelberi*) in order to analyze the genetic structure and diversity of the introduced populations. The results have shown a founder effect in the introduced populations, with reduction in the allelic richness and expected heterozygosity, when they were compared with the native population. The Bayesian analysis of attribution detected possible hybrids specimens only in the native population. The tucunaré, apart from its low genetic diversity, is well established in the invasive areas showing that the “propagule effect” is not an important matter in its

invasive process. Genetic and geographic distribution patterns suggest that *C. kelberi* and *C. piquiti* showed different introductory process in the major river basins in the Minas Gerais State.

Introdução Geral

Em 1998, o “Atlas da Biodiversidade do Estado de Minas Gerais” - primeira publicação com dados gerais sobre a biodiversidade do Estado - relatava 24 espécies exóticas de peixes encontradas nos rios de Minas Gerais (Costa et al., 1998). Sabe-se que hoje existem pelo menos 63 espécies introduzidas no Estado (Alves et al., 2007). A bacia com maior grau de contaminação é a do Paraíba do Sul (41 espécies exóticas), seguida pela do rio Doce (30) e a do Alto Paraná – Paranaíba e Grande (20). O motivo provável do alto grau de contaminação do rio Paraíba do Sul deve estar relacionado ao pólo de criação de peixes ornamentais (Vidal e Costa, 2000). A introdução de espécies exóticas no estado de Minas Gerais é uma ameaça real à diversidade de peixes, sendo comum em todas as drenagens no estado (Drummond et al., 2005).

Natural da bacia Amazônica (Kullander e Ferreira, 2006), o tucunaré

(*Cichla* sp) foi introduzido na região Nordeste do Brasil no final dos anos 40 por agências governamentais (Fontenele, 1948; Fontenele e Peixoto, 1979) e posteriormente transferido para o sudeste, onde se propagou rapidamente pelos reservatórios do Alto Paraná - local em que se encontra bem estabelecido (Agostinho e Júlio Jr, 1996). Por ser altamente prolífico e se adaptar muito bem a condições lênticas, suas populações se expandiram rapidamente em reservatórios, reproduzindo nos meses quentes, começando em outubro e novembro, com o surgimento dos alevinos no verão (Pelicice e Agostinho, 2008). Espécie apreciada na pesca esportiva e na culinária, o tucunaré (figura 1) continua a ser introduzido em diversas bacias do Brasil (Agostinho et al., 2007; Pelicice e Agostinho, 2008), embora sua introdução seja proibida por lei (art. 34 do Decreto-Lei 221/67 - Código de Pesca).

O tucunaré ocorre em todos os



Figura 1. Exemplar da espécie de tucunaré amarelo (*Cichla kelberi*) coletado na represa de Três Marias.

reservatórios da bacia do rio Paranaíba (triângulo mineiro), incluindo o reservatório da Usina Hidrelétrica (UHE) de Itumbiara, onde foi registrado pela primeira vez em 1980, quatro anos após o fechamento das comportas. Em Itumbiara, o tucunaré é a espécie mais pescada na pesca esportiva (Paulo Formágio, comunicação pessoal).

Na represa de Três Marias (rio São Francisco), o tucunaré foi encontrado pela primeira vez em 1984 (Sato e Godinho, 1988). Aparentemente, sua disseminação foi gradativa, em um período de cerca de quatro anos, no sentido montante para jusante. Uma vez que instituições que atuavam nas áreas de pesca e piscicultura na região não utilizavam essa espécie em seus programas de “peixamento”, a introdução do tucunaré no São Francisco teria ocorrido pelo escape (acidental ou não) de indivíduos dos viveiros, lagos e açudes localizados no próprio rio São Francisco e no rio Paraopeba (Sato e Godinho, 1988).

Entre os anos de 1981 e 1983 o monitoramento da ictiofauna da represa de Três Marias ainda não havia detectado o tucunaré. Em 1984, um único exemplar foi coletado. Entre julho de 1985 e junho de 1986, 63 exemplares foram capturados e entre julho de 1986 e junho de 1987 esse número subiu para 209 peixes, o que significa um aumento médio de 555% no número de peixes capturados por 100m² de rede em um período de seis anos (Sato e Godinho, 1988).

No reservatório de Volta Grande (rio Grande), duas espécies de tucunaré foram detectadas e identificadas como *Cichla monoculus* e *Cichla cf. ocellaris* (Gomiero e Braga, 2004 A). Nesse reservatório, a alimentação dos

tucunarés é predominantemente piscívora, com elevado índice de canibalismo (Gomiero e Braga, 2004 B).

Impacto ecológico e manejo do tucunaré

A análise de três lagoas marginais no São Francisco realizada por Pompeu e Godinho (2003) identificou a presença do tucunaré em apenas uma delas. Essa lagoa possuía grande parte da ictiofauna constituída de espécies de médio porte e uma menor abundância relativa quando comparada às outras duas lagoas (que não apresentavam o tucunaré). Pompeu e Godinho (2003) argumentam que as diferenças observadas na lagoa com tucunaré em relação às demais sugerem que sua presença pode ser a causa de profundas modificações na comunidade de peixes e que pode, ainda, refletir diretamente no recrutamento das espécies nativas, incluindo as de piracema.

Godinho et al. (1994), ao estudar lagoas do médio rio Doce (Parque Estadual do Rio Doce-MG) submetidas à introdução do tucunaré e da piranha (*Pygocentrus nattereri*), também demonstraram que as lagoas contaminadas possuíam menor riqueza e menor abundância de espécies e de indivíduos de pequeno porte quando, comparadas a lagoas sem ocorrência desses peixes exóticos.

Espécies invasoras, como o tucunaré, ameaçam as populações nativas, podendo levá-las à extinção completa. O efeito da “armadilha evolutiva” (*evolutionary trap*) cunhado por Schlaepfer et al. (2002) apresenta-se como uma explicação evolutiva ao fato de espécies nativas serem vulneráveis a

espécies invasoras. Segundo essa hipótese, a falta de resposta defensiva nas populações nativas seria uma “armadilha” que evoluiu em decorrência da ausência desse tipo de predador no ambiente. Assim, a população nativa não seria capaz de responder à predação em tempo hábil para resistir à predação e se manter. Schlaepfer (2002) indica, ainda, uma opção de manejo de longa duração por meio da evolução ou da aprendizagem, na qual espécies nativas poderiam evoluir uma resposta à predação por meio do manejo e aprendizagem e, assim, co-existir com a espécie exótica. Essa opção poderia ser aplicada nas populações invasoras cuja erradicação seja econômica ou biologicamente inviável, como no caso das populações do tucunaré introduzidas no sudeste do Brasil.

Uma das explicações para invasões biológicas é a da hipótese de nichos vagos, que propõe que comunidades de ilhas ou ambientes impactados (e.g represas hidroelétricas) cuja diversidade foi reduzida naturalmente ou devido à atividade antrópica não apresentariam resistência a espécies invasoras e/ou oportunistas. Assim, haveria nichos “vagos” que poderiam ser ocupados (Hutchinson, 1957; Elton, 1958). Outra hipótese, a da “pressão de propágulo” (Lockwood et al., 2005) ou esforço de introdução, sugere que o número de indivíduos introduzidos e o número de introduções influenciariam o sucesso de uma invasão.

Caracterização genética de populações exóticas - tucunaré

O estudo da invasão aos ecossistemas do sudeste pelo tucunaré, por meio da caracterização da estrutura

genética de suas populações, é uma importante etapa para o entendimento do processo de colonização dessa espécie. A determinação inequívoca da população fonte, do número de introduções e a rota de invasão são informações vitais na avaliação do sucesso ecológico em áreas introduzidas vs. nativas (Amsellem et al., 2000; Kang et al., 2007). Alguns estudos vêm sendo realizados na bacia do Paraná e já fornecem importantes informações sobre a genética das populações de tucunaré (Oliveira et al., 2006).

Oliveira et al. (2006) utilizaram análises do DNA mitocondrial para mostrar que as populações de tucunaré introduzidas na bacia do rio Paraná (UHE Itaipu, Capivari, Promissão e rio Paranapanema) eram originárias principalmente do rio Tocantins. Nesse trabalho, haplótipos do rio Amazonas também foram encontrados nessas populações, indicando a possibilidade de que tenham ocorrido múltiplas introduções de tucunaré na região.

As principais bacias hidrográficas em Minas Gerais (São Francisco, Grande, Paranaíba e Doce) já apresentam populações de tucunarés bem estabelecidas. A partir dessa constatação e da necessidade de estudo sobre os procedimentos introdutórios ocorridos no estado, surgem algumas perguntas em relação a essas populações: Seriam elas provenientes de apenas um ato introdutório? Qual a origem geográfica/genética desses peixes na bacia Amazônica? Temos apenas uma espécie em cada local de introdução? Houve redução da diversidade genética nas populações introduzidas?

No intuito de responder essas questões, algumas análises genéticas

foram propostas e são aqui apresentadas em três capítulos, organizados da seguinte forma:

Capítulo 1: Análise filogenética das espécies do tucunaré (*Cichla spp*): investigando populações introduzidas e nativas. Sequências do DNA de dois genes mitocondriais de indivíduos das populações introduzidas foram obtidas e comparadas com os estoques nativos da Amazônia para a identificação da origem dos estoques.

Capítulo 2: Desenvolvimento e caracterização de marcadores nucleares microssatélites para a espécie de tucunaré *Cichla piquiti*. Marcadores microssatélites para a espécie invasora *C. piquiti* (testados com eficiência para *C. kelberi*) foram desenvolvidos para análise da estrutura e diversidade genética de suas populações.

Capítulo 3: Caracterização genética das populações nativas e introduzidas do peixe tucunaré utilizando marcadores microssatélites e mitocondrial. A partir do desenvolvimento dos marcadores moleculares foi possível realizar uma análise refinada de diversidade genética, que forneceu dados sobre a estrutura genética da população nativa e das introduzidas.

Referências Bibliográficas

- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR. H.F. Peixes de outras águas. *Ciência Hoje*, v. 21, p. 36-44, 1996.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. Maringá: EDUEM, 2007. 501 p.
- ALVES, C.B.M.; VIEIRA, F.; MAGALHÃES, A.L.B; BRITO, M.F.G. Impacts of non-native fish species in Minas Gerais, Brazil: present situation and prospects. In: BERT, T.M. (ed). *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities*, Springer, 2007. p. 291-314.
- AMSELLEM, L.; NOYER, J.L.; LE BOURGEOIS, T.; HOSSAERT-MCKEY, M. Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius Poir (Rosaceae)* in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Mol Ecol*, v. 9, p. 443–455, 2000.
- COSTA, M.R.C.; HERMANN, G.; MARTINS, C.M.; LINS, L.V. & LAMAS, I.R. *Biodiversidade em MinasGerais: um Atlas para sua conservação*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1998. 94p.
- DRUMMOND, G.M.; MARTINS, C.S.; MACHADO, A.B.M.; SEBAIO, F.A.; ANTONINI, Y. *Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação*. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2005. 222p.
- ELTON, C.S. *The ecology of invasions by animals and plants*. London: Chapman and Hall, 1958. 181p.
- FONTENELE, O. Um caráter sexual secundário extragenital nos tucunarés (*Actinopteygii, Cichlidae*) *Rev. Bras. Biol*, v. 8, p. 185-188, 1948.

- FONTENELE, O.; PEIXOTO, J.T.
Apreciação sobre os resultados da introdução do tucunaré comum *Cichla ocellaris* (Bloch and Schneider, 1801), nos açudes do nordeste brasileiro, através da pesca comercial. *B.Tec. DNOCS.*, v. 37, p. 109-134, 1979.
- GODINHO, A.L.; FONSECA, M.T.; ARAÚJO, L.M. The ecology of predator fish introductions: the case of Rio Doce valley lakes. In: PINTO-COELHO, R.; GIANI, A.; SPERLING, von E. (eds). *Ecology and human impacts on lakes and reservoirs in Minas Gerais with special reference to future development and management strategies*. Belo Horizonte: Segrac, 1994. p. 77-83.
- GOMIERO, L.M. e BRAGA, F.M. Feeding of introduced species of *Cichla* (Perciformes, Cichlidae) in Volta Grande reservoir, river Grande (MG/SP). *Braz. J. Biol.*, v. 64, n. 4, p. 787-795, 2004 A.
- GOMIERO, L.M. e BRAGA, F.M. Cannibalism as the main feeding behaviour of tucunaré introduced in southeast Brazil. *Braz. J. Biol.*, v. 64, n. 38, p. 625-632, 2004 B.
- HUTCHINSON, G. E. *Concluding remarks*. In: COLD SPRING HARBOR SYMPOSIUM ON QUANTITATIVE BIOLOGY v. 22, 1957. p. 415-427.
- KANG, M.; BUCKLEY, Y.M.; LOWE, A.J. Testing the role of genetic factors across multiple independent invasions of the shrub Scotch broom (*Cytisus scoparius*). *Mol. Ecol.*, v. 16, p. 4662-4673, 2007.
- KULLANDER, S.O.; FERREIRA, E.J.G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyol. Explor. Freshwat.*, v. 17, p. 289-398, 2006.
- LOCKWOOD J.L.; CASSEY, P.; BLACKBURN, T. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends Ecol. Evol.*, v. 20, n. 5, p. 223-228, 2005.
- OLIVEIRA, A.V.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; BIGNOTTO, T.S.; JÚLIO, H.F.; CARRER, H.; AGOSTINHO, C.S.; PRIOLI, L.M. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. *J. Fish Biol.*, v. 69 B, p. 260-270, 2006.
- PELICICE, F.M.; AGOSTINHO, A.A. Fish Fauna destruction after the introduction of a non-native predator (*Cichla kelberi*) in a Neotropical reservoir. *Biol. Invasions*, p. 1387-3547, 2008.
- POMPEU, P.S; GODINHO, H.P. Ictiofauna de três lagoas marginais do médio São Francisco,. In: GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. (org.) *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p.167-181.

- SATO, Y.; GODINHO, A.L. Tucunaré – um peixe exótico na represa de Três Marias, MG. In: ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE AQUICULTURA. *Coletânea de resumos dos encontros da associação mineira de aquíicultura*. Brasília: CODEVASF, 1988. p. 92.
- SCHLAEPFER, M.A.; RUNGE, M.C.; SHERMAN, P.W. Ecological and evolutionary traps. *Trends Ecol. Evol.*, v.17, p. 474–480, 2002.
- VIDAL, JR. M.V. COSTA, S.M. A produção de peixes ornamentais em Minas Gerais. *Informe Agropecuário*, v. 21, p. 44-47, 2000.
- ZARET, T.M. Life history and growth relationships of *Cichla ocellaris*, a predatory South American cichlid. *Biotropica*, v. 12, p. 144-157, 198

Capítulo 1 – Análise filogenética das espécies de tucunaré (*Cichla*) em populações introduzidas e nativas

Resumo

Para a caracterização da introdução das espécies de *Cichla* (tucunaré ou *peacock bass*) no Brasil, foram realizadas análises filogenéticas em populações nativas e introduzidas utilizando-se como base as regiões mitocondriais 16S ribossomal (rDNA) e Controle (CR). Os haplótipos do DNA mitocondrial detectados nas populações introduzidas no estado de Minas Gerais (sudeste do Brasil) foram agrupados exclusivamente com os haplótipos das espécies nativas do rio Tocantins (*Cichla piquiti* e *C. kelberi*), sugerindo um único ou poucos atos introdutórios nessa região, realizados com peixes de uma mesma população fonte (rio Tocantins). Este estudo contribui para o entendimento da introdução de *Cichla* em regiões do Brasil fora da bacia Amazônica e fornece novos dados filogenéticos para as duas espécies de tucunarés recentemente descritas e endêmicas da bacia do Tocantins-Araguaia.

Palavras-chave: mtDNA, *Cichla*, espécies invasoras, filogenia

Abstract

To characterize the introduction of *Cichla* (peacock bass or tucunaré) species in Brazil, a molecular phylogenetic analysis based on mitochondrial 16S ribosomal DNA and Control Region sequences from native and introduced populations was performed. Mitochondrial DNA haplotypes found in introduced fish from Minas Gerais state (southeast Brazil) clustered only with those from native species of the Tocantins River (*Cichla piquiti* and *C. kelberi*), suggesting a single or few translocation acts into this area, despite with fish from the same source population. Our study contributes to the understanding of the introduction of *Cichla* in regions of Brazil outside the Amazon basin and adds phylogenetic data to the recently described *Cichla* species endemic to the Tocantins-Araguaia basin.

Keywords: mtDNA, *Cichla*, invasive species, phylogeny

Introdução

Espécies exóticas invasoras são organismos introduzidos fora da sua área de distribuição natural e são consideradas a segunda maior ameaça à biodiversidade, perdendo apenas para a destruição de habitat (Simberloff, 2003; Clavero e García-Berthou, 2005; UNEP, 2005). Elas ameaçam ecossistemas e outras espécies nos ambientes em que são inseridas, provocando grande impacto ambiental e

financeiro (Wilcove et al., 1998; Pimentel et al., 2005).

A introdução de espécies exóticas pode trazer consequências indesejáveis, tais como alteração genética, introdução de patógenos, extinção local de espécies nativas, entre outros (Welcomme, 1988). Comunidades nativas podem ser diretamente alteradas pela competição com essas espécies (Godinho et al., 1994; Molina et al., 1996; Pelicice e

Agostinho, 2008). No canal do Panamá, por exemplo, a introdução do tucunaré (*Cichla*) causou acentuada queda na ocorrência de quase todas as espécies de peixes (Zaret e Paine, 1973). Consequências econômicas também podem ser citadas. Nos Estados Unidos estima-se que houve introdução de pelo menos 50.000 espécies exóticas, provocando perda econômica anual de até 120 bilhões de dólares (Pimentel et al., 2005).

O tucunaré, peixe natural da bacia Amazônica, apresenta pelo menos nove espécies descritas. *Cichla kelberi* e *C. piquiti* são duas espécies consideradas endêmicas à sub-bacia do Araguaia-Tocantins e são também as espécies introduzidas em diversos reservatórios no sudeste do Brasil (Kullander e Ferreira, 2006).

O tucunaré foi introduzido na região Nordeste do Brasil no final dos anos 40 por agências governamentais (Fontenele, 1948; Fontenele e Peixoto, 1979) e posteriormente transferido para o sudeste, onde se propagou rapidamente pelos reservatórios do Alto Paraná (Agostinho e Júlio Jr, 1996), rio Grande (Gomiero e Braga, 2004), rio Doce (Godinho et al., 1994) e rio São Francisco (Pompeu e Godinho 2003). Por ser altamente prolífico e se adaptar muito bem a condições lênticas, suas populações se expandem rapidamente em reservatórios, reproduzindo principalmente na época das chuvas (Zaret, 1980). Espécie apreciada na pesca esportiva e na culinária, o tucunaré continua a ser introduzido em diversas bacias do Brasil por pescadores amadores (Agostinho et al., 2007; Pelicice e Agostinho, 2008), embora sua introdução seja proibida por lei.

Apesar da grande preocupação em evitar a introdução de espécies exóticas em todo o mundo (Simberloff, 2003), algumas introduções de peixes feitas no passado (sejam elas intencionais ou não) não podem ser corrigidas. A obtenção de dados que esclareçam esses eventos introdutórios e que definam, por exemplo, rotas introdutórias, quais foram as espécies introduzidas e número de introduções ocorridas, são informações que podem ser aplicadas no direcionamento de políticas públicas para o controle de espécies invasoras nas bacias hidrográficas brasileiras e para o melhor entendimento dos fatores biológicos para o sucesso de uma invasão.

No sudeste do Brasil, as principais bacias hidrográficas em Minas Gerais (São Francisco, Grande, Paranaíba e Doce) já apresentam populações de tucunarés bem estabelecidas (Godinho et al., 1994; Pompeu e Godinho, 2003; Gomiero e Braga, 2004). A partir dessa constatação e da necessidade de estudo sobre os procedimentos introdutórios ocorridos no estado, surgem algumas perguntas em relação a essas populações: Seriam elas provenientes de apenas um ato introdutório? Qual a origem geográfica/genética desses peixes na bacia Amazônica? Temos apenas uma espécie em cada local de introdução?

No intuito de responder essas questões, sequências do DNA de duas regiões mitocondriais (ribossomal 16S e Controle) de indivíduos das populações introduzidas nas principais bacias hidrográficas em Minas Gerais foram analisadas e comparadas com os estoques nativos da Amazônia. Os resultados aqui apresentados acrescentam novas informações

filogenéticas ao grupo *Cichla* e podem, ainda, servir de subsídio para o desenvolvimento de políticas públicas para controle de espécies invasoras nas bacias hidrográficas no sudeste brasileiro.

Metodologia

Descrição da amostra

de Morada Nova n=10 e Felixlândia n=10), Lagoa Marginal próxima ao Município de São Francisco (rio São Francisco, n=12), represa de Itumbiara (rio Paranaíba, n=37), represa de Furnas (rio Grande, n=17) e Lago Dom Helvécio (rio Doce, n=10). Sequências de DNA disponíveis no GenBank (Tabela 2, ANEXO) foram incluídas na

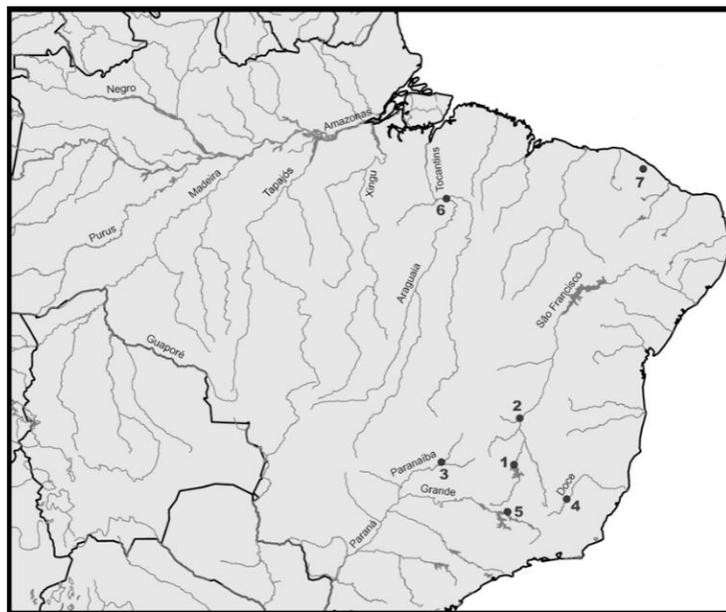


Figura 1. Mapa mostrando os principais rios onde foram coletadas as amostras de peixes para o presente trabalho: (1) Morada Nova e Felixlândia na represa de Três Marias (Bacia do São Francisco); (2) Lago marginal do rio São Francisco (perto da cidade de São Francisco, Minas Gerais); (3) Represa de Itumbiara, rio Paranaíba (Minas Gerais); (4) Lago Dom Helvécio no Parque Estadual do Rio Doce (Minas Gerais); (5) Reservatório de Furnas (Bacia do rio Grande, Minas Gerais); (6) Reservatório de Tucuruí, rio Tocantins (Pará); (7) Lago Catu, Aquiraz (Ceará).

Amostras de tecido de tucunarés (gênero *Cichla*) foram coletadas e fixadas em etanol 90%. Foram coletadas amostras provenientes de cinco populações estabelecidas nas principais bacias hidrográficas em Minas Gerais, sendo elas: represa de Três Marias (rio São Francisco, cidade

análise para comparar os dados obtidos nesse trabalho com outros previamente realizados. As amostras da bacia do Tocantins (Reservatório de Tucuruí, n=40) e do rio Solimões (n=1) foram cedidas pela Profa. Iracilda Sampaio - UFPA (n=41). As amostras colhidas no Ceará (Lago Catu, Aquiraz; n=5), foram

cedidas pelo Prof. Aldeney Andrade (UECE). Todos os espécimes foram identificados segundo Kullander e Ferreira (2006). A figura 1 apresenta o mapa com a localização dos rios brasileiros onde foram coletadas as amostras.

Sequenciamento do DNA

O DNA total foi extraído de nadadeiras utilizando-se o método fenol-clorofórmio (Sambrook et al.,

sequenciamento. Utilizou-se o protocolo do Kit Big Dye Terminator Mix, seguido de análise das reações pelo sequenciador automático ABI 310 (Perkin Elmer™). As regiões foram sequenciadas nas direções 5'-3' e 3'-5'. As sequências obtidas neste trabalho para a região 16S e região CR foram depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) com os números de acesso: DQ779579-DQ779586, FJ904286-FJ904291 (16S)

Tabela 1. *Primers* utilizados nas ampliações das regiões mitocondriais 16S e CR e referências dos trabalhos em que foram publicados.

Região/Primer	Referência
16S-L1987 5'-GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC-3'	Palumbi et al., 1991
16S-H2909 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'	Palumbi et al., 1991
CR L 5'-AGAGCGTCGGTCTTGTAACC-3'	Cronin et al., 1993
CR H16498 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3'	Meyer et al., 1990

1989). Para isolar parte das regiões mitocondriais 16S ribossomal (rDNA) e Controle (CR) foi utilizada a técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com os iniciadores (*primers*) específicos para essas regiões (Tabela 1).

O produto da PCR obtido com o *primer* 16S apresentou aproximadamente 500 pares de bases (pb), enquanto o produto da Região Controle (CR) apresentou cerca de 460 pb. Após a reação da PCR (**16S** - 94°C, 3min, 30X, 94°C, 1min, 55°C 1min, 72°C 3min, extensão de 72°C por 7 min; **CR** - 94°C, 4 min, 50°C 30s, 72°C 2 min, 30 ciclos de 94°C por 15s, 56°C por 30 s, 72°C por 2 min e passo final de 72°C, 10 min) foram utilizados de 1 a 2 µL da reação de PCR total no

e FJ890799-FJ890816 (CR).

Análise das Sequências

Os cromatogramas foram conferidos e as sequências alinhadas no software ClustalW (Thompson et al., 1997) implementado no programa BioEdit (Hall, 1999). As árvores filogenéticas foram geradas no software MRBAYES (Huelsenbeck et al., 2001, 2002) utilizando análise Bayesiana. O grau de confiança em cada nó foi verificado pela probabilidade posterior Bayesiana (PP) no MRBAYES. Para a análise de parcimônia, o programa PAUP4* versão 4.0b10 para Unix também foi utilizado (Swofford, 2003). As regiões 16S e CR foram analisadas separadamente, no sentido de incorporar o máximo de informação de outros

estudos.

Os principais haplótipos descritos por Oliveira et al., (2006), Renno et al., (2006), Willis et al., (2007) e outros haplótipos obtidos no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) foram utilizados para determinar a origem genética e as espécies de cada população introduzida, como também a distinção da população de Tocantins, como sugerido por Kullander e Ferreira (2006) (Tabela 2). *Geophagus brasiliensis* foi utilizado como grupo externo em todas as análises.

Resultados

Cichla kelberi e *C. piquiti* foram coletados em simpatria nas represas de Tucuruí e Itumbiara (Fig. 1: local 3 e 6), enquanto apenas *C. kelberi* foi coletado em Três Marias (Fig. 1: local 1) e rio Doce (Fig. 1: local 4). *C. piquiti* foi a única espécie detectada na lagoa marginal (rio São Francisco, local 2) e

em Furnas (rio Grande, local 5). As espécies coletadas no lago Catu (local 7) não puderam ser identificadas inequivocamente por meio de caracteres morfológicos (Kullander, comunicação pessoal).

Após edição e alinhamento das seqüências de DNA, 410 pares de bases (pb) e 359 pb foram obtidos, respectivamente, para as regiões 16S e Controle. A Região Controle (CR) foi mais variável do que a 16S, com 157 sítios variáveis, dos quais 102 foram informativos na análise de parcimônia. Já para a região 16S, 17 sítios foram informativos. Como a topologia e a confiança nos ramos da parcimônia máxima foram muito similares à análise Bayesiana, apenas essa última será apresentada neste trabalho.

Apesar do menor número de espécies analisados para 16S em relação a CR, os cladogramas da análise Bayesiana para os dois marcadores apresentam congruência.

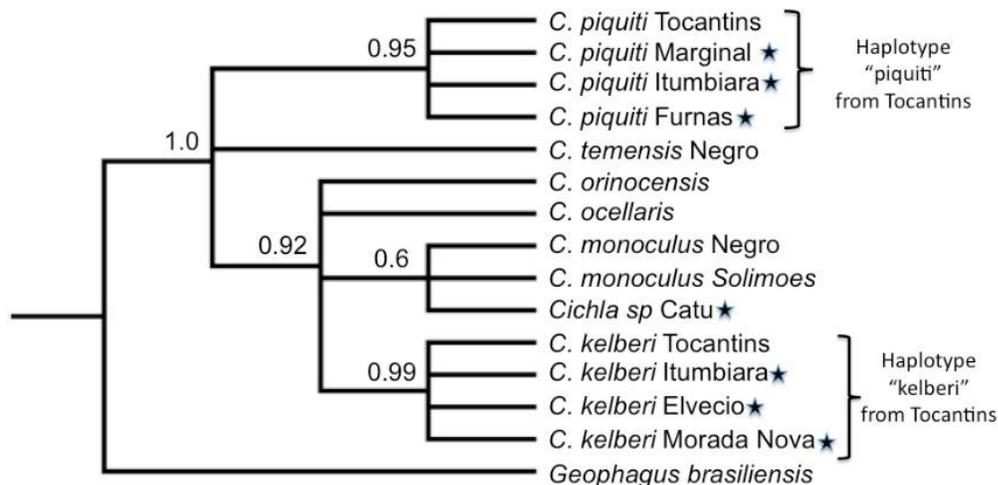


Figura 2. Árvore filogenética das seqüências mitocondriais 16S de *Cichla*, baseadas em haplótipos do rio Tocantins, populações introduzidas e haplótipos selecionados do GeneBank de diferentes espécies e locais da bacia Amazônica (Tabela 2). Os números acima dos ramos são probabilidades Bayesianas posteriores (PP). As estrelas indicam populações introduzidas (não-nativas).

Análise da região mitocondrial 16S

As espécies nativas do rio Tocantins formaram dois agrupamentos distintos: *C. piquiti* e *C. kelberi*, significativamente apoiados pela probabilidade posterior (PP) Bayesiana de 0,95 e 0,99, respectivamente. Todos os tucunarés da Lagoa Marginal do São Francisco e dos reservatórios e Furnas (Fig. 1, locais: 2, 3, 5) estão incluídos no clado de *C. piquiti*.

Os dados também indicam que os tucunarés de Itumbiara (*C. kelberi*), Dom Helvécio e represa de Três Marias (Fig. 1: locais: 1, 3 e 4, respectivamente) são fortemente associados (PP=0,92) a *C. kelberi* do rio Tocantins. Além disso, o grupo de *C. kelberi* é fortemente conectado às espécies nativas *Cichla* sp. do lago Catu (nordeste do Brasil) como também a algumas linhagens cujas relações filogenéticas não foram resolvidas, como *C. monoculus* do rio Negro e Solimões e *C. ocellaris* e *C. orinocensis* (PP=0,92). *C. temensis* do rio Negro não foi associado a nenhum grupo, aparecendo como uma linhagem nativa independente. A figura 2 apresenta a árvore filogenética resultante da análise da região 16S para as amostras de *Cichla*.

Análise da Região Controle (CR) mitocondrial

A análise da região controle do DNA mitocondrial também apresentou as espécies nativas do rio Tocantins separada em dois agrupamentos distintos - *C. piquiti* e *C. kelberi*, apoiados por altas probabilidades posteriores de 1.0 e 0.98, respectivamente. Espécies do clado de *C. piquiti* foram novamente agrupadas

em conjunto com tucunarés de Itumbiara, Furnas, lagoa marginal e do reservatório Lajeado (PP=1.0 – Oliveira et al., 2006). Curiosamente, *C. temensis* do rio Negro, que não foi agrupado pela análise da região 16S, apresentou-se como grupo irmão de *C. piquiti* (PP=0.97). Os dados da CR também sugerem uma relação estreita entre *C. intermedia* do Orinoco, *Cichla* sp. de Mamoré, um grupo formado por *Cichla* sp do Amazonas e Xingu (duas espécies não identificadas taxonomicamente) e *Cichla* sp. farm. Essa última espécie (*Cichla* sp. farm), que está fortemente conectada (PP=1.0) às espécies nativas de tucunarés do Xingu e Amazonas, foi denominada como *C. temensis* por Oliveira et al., (2006). A espécie não identificada do rio Mamoré é basal nesse grupo. *C. ocellares* e *C. orinocensis* aparecem como linhagens não resolvidas.

Os espécimes de *C. kelberi* são fortemente agrupados (PP=0.98), incluindo tucunarés não-nativos como os de Três Marias (Felixlândia e Morada Nova; Fig. 1: local 1), rio Doce (Lago Dom Helvécio) (Fig. 1: local 4) e Itumbiara (Fig. 1: local 3). Na maior parte das populações introduzidas foi detectado apenas um haplótipo. A única exceção foi a população de Itumbiara, em que três haplótipos distintos para a Região Controle de *C. kelberi* foram detectados (Fig. 3).

Os espécimes do Ceará (Lago Catu) agruparam com os haplótipos de *C. monoculus* do rio Madeira e Amazonas, com elevadas probabilidades posteriores (PP=0.96). A figura 3 apresenta a árvore filogenética resultante da análise da Região Controle para as amostras de *Cichla*.

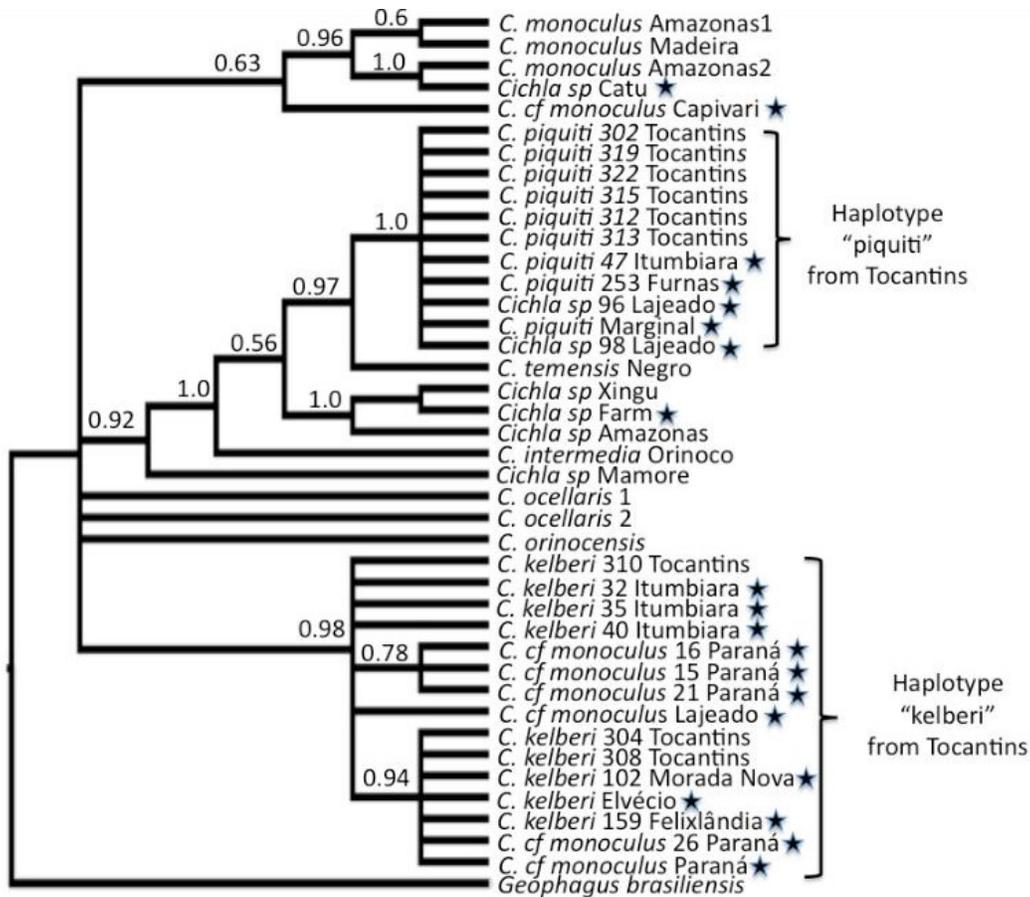


Figura 3. Árvore filogenética das seqüências mitocondriais da região Controle de *Cichla*, baseadas em haplótipos do rio Tocantins, populações introduzidas e haplótipos selecionados do GeneBank de diferentes espécies e locais da bacia Amazônica (Tabela 2). Os números acima dos ramos são probabilidades Bayesianas posteriores (PP). As estrelas indicam populações introduzidas (não-nativas).

Discussão

Os resultados filogenéticos desse estudo confirmam que as populações introduzidas nas principais bacias de Minas Gerais são originárias do rio Tocantins. Também foi confirmada a identificação morfo/taxonômica das duas espécies endêmicas do rio Tocantins (*C. piquiti* e *C. kelberi*), uma vez que foi detectada distinção genética em relação às outras espécies da bacia Amazônica.

Fontenele (1948) e Fontenele e Peixoto (1979) relataram que agências governamentais realizaram translocações de peixes amazônicos para o nordeste brasileiro no sentido de enriquecer a pobre ictiofauna dessa região e que esses estoques foram posteriormente transferidos para o alto rio Paraná (MG). Os dados genéticos presentes neste trabalho trazem informações complementares sobre os atos introdutórios ocorridos no nordeste do país, pois os haplótipos das

populações introduzidas no Lago Catu (Ceará) foram agrupados com amostras provenientes dos rios Amazonas e Madeira (Fig. 3) e não apresentaram correspondência com os haplótipos detectados em Minas Gerais. Além disso, Rocha et al., 2008 detectaram haplótipos de rRNA 16S da espécie *C. kelberi* (espécie originária do Tocantins) em três populações no estado do Piauí. Esses dados, associados aos do presente trabalho, indicam a ocorrência de pelo menos dois eventos introdutórios para o nordeste. Tomando-se como base os dados genéticos, a espécie do Ceará é provavelmente *Cichla monoculus* (Fig. 3).

Fontenele (1948) e Fontenele e Peixoto (1979) também citam o alto rio Paraná como local das primeiras introduções do tucunaré no sudeste. Os resultados genéticos demonstram concordância com esses dados, pois no reservatório de Itumbiara (alto rio Paraná) foi detectada a maior diversidade genética (3 haplótipos para *C. kelberi* - Fig. 3) e esse foi, ainda, o único local onde as espécies *C. kelberi* e *C. piquiti* ocorreram em simpatria (Tabela 2). Assim, é provável que o alto rio Paraná seja o local onde foi realizado o maior número de introduções ou onde foram introduzidos um grande número de espécimes no estado de Minas Gerais. Posteriormente, é possível que o alto rio Paraná tenha servido de fonte introdutória para outras bacias hidrográficas (onde foram encontrados apenas uma espécie/haplótipo por localidade).

Surpreendentemente, as espécies *C. kelberi* e *C. piquiti* foram detectadas no rio São Francisco, mas não em simpatria (*C. kelberi* – Três Marias, *C. piquiti* – Lagoa marginal). Isso sugere

que essas espécies não estão migrando intensamente na bacia do São Francisco e que as populações desses locais são provenientes de introduções distintas, realizadas com um pequeno número de indivíduos fundadores.

O sucesso das espécies invasoras tem sido geralmente atribuído à sua capacidade de adaptação a novos ambientes (Stockwell et al., 2003; Alcaraz et al., 2005). A invasão do tucunaré no lago natural Dom Helvécio na bacia do rio Doce é um exemplo de adaptação em ambientes não impactados. Atualmente, pescadores da região preferem utilizar iscas como o camarão em substituição à técnica tradicional com isca artificial, amplamente utilizada na captura dessa espécie em outros locais. A mudança na técnica de pesca pode ser explicada pela mudança de comportamento alimentar, decorrente da plasticidade fenotípica do tucunaré: após a extinção de pequenos peixes nativos devido à introdução do próprio tucunaré e da piranha na década de 60 (Godinho et al., 1994). Assim, pode ter ocorrido uma adaptação da alimentação a presas abundantes no lago, como o camarão de água doce. Tal mudança comportamental do tucunaré refletiu, portanto, na técnica de pesca utilizada na região. Experimentos em laboratório são necessários para checar se essa adaptação comportamental é mantida mesmo em situações em que sejam fornecidas várias opções de presa (camarões e pequenos peixes).

Apesar da baixa variabilidade genética detectada nas populações introduzidas (com exceção de Itumbiara), a plasticidade fenotípica encontrada no tucunaré (exemplo no rio Doce) pode explicar sua grande capacidade invasora. Invasões

biológicas bem sucedidas vêm sendo reportadas, mesmo com severa perda de diversidade genética (Zayed et al., 2007; Chandler et al., 2008), demonstrando que um pequeno número de indivíduos pode ser capaz de invadir e se estabelecer em um novo ambiente, independentemente de sua diversidade genética.

Com exceção do trabalho de Kullander e Ferreira (2006), no qual foram descritas as espécies endêmicas do Tocantins (*C. kelberi* e *C. piquiti*), o tucunaré introduzido em Minas Gerais tem sido comumente confundido com *C. temensis*, *C. ocellaris* e *C. monoculus* (e.g. Alves et al., 2007). No presente estudo, nenhuma dessas espécies foi detectada nos locais amostrados em Minas Gerais.

Os haplótipos das espécies de tucunaré nativas da Amazônia, previamente descritos por Willis et al. (2007) e Renno et al. (2006), não agruparam com os haplótipos do rio Tocantins ou com as populações introduzidas em Minas Gerais. Isso indica que a população do Tocantins representa um estoque isolado e reforça a distinção taxonômica das espécies endêmicas dessa bacia.

No presente estudo, a análise de dois marcadores mitocondriais mostra que as duas espécies de *Cichla* endêmicas do rio Tocantins (Kullander e Ferreira, 2006) foram extensivamente translocadas para diversas bacias no sudeste do Brasil. O estudo também revela novas informações filogenéticas - pois no trabalho de Willis et al. (2007) não foram analisadas as espécies do Tocantins - e ainda elucidada alguns aspectos da introdução do tucunaré nas principais bacias do estado de Minas Gerais.

Conclusões

Os haplótipos do DNA mitocondrial detectados nas populações introduzidas no estado de Minas Gerais (sudeste do Brasil) foram agrupados exclusivamente com os haplótipos das espécies nativas do rio Tocantins, sugerindo único ou poucos atos introdutórios nessa região.

Os dados filogenéticos apresentados contribuíram para o entendimento da introdução de *Cichla* em regiões do Brasil fora da bacia Amazônica.

Referências Bibliográficas

- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO, H.F. JR.; PETRERE, M.J.R. Itaipu Reservoir (Brazil): impacts of the impoundment on the fish fauna and fisheries. In: COX, I.G. (ed). *Rehabilitation of Freshwater Fisheries*. Oxford: Fishing News Books, Blackwell Scientific Publications, 1994. p. 171-184.
- AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR. H.F. Peixes de outras águas. *Ciência Hoje*, v. 21, p. 36-44, 1996.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. Maringá: EDUEM, 2007. 501 p.
- ALCARAZ, C.; VILA-GISPERT, A.; GARCÍA-BERTHOU, E. Profiling invasive fish species: the importance of phylogeny and human use. *Diversity and Distrib.*, v. 11, p. 289-298, 2005.
- AKAIKE, H. Information theory as an extension of the maximum

- likelihood principle. In: *Second International Symposium on Information Theory*. PETROV, B.N.; CSAKI, F. (eds). Budapest: Akademiai Kiado, 1973. p. 267–281.
- ANDRADE, F.; SCHNEIDER, H.; FARIAS, I.; FELDBERG, E.; SAMPAIO, I. Análise filogenética de duas espécies simpátricas de tucunaré *Cichla*, Perciformes., com registro de hibridização em diferentes pontos da bacia amazônica. *Rev. Virt. Inic. Acad. UFPA*, v. 1, p. 1-11, 2001.
- ALVES, C.B.M.; VIEIRA, F.; MAGALHÃES, A.L.B; BRITO, M.F.G. Impacts of non-native fish species in Minas Gerais, Brazil: present situation and prospects. In: BERT, T.M. (ed). *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities*, Springer, 2007. p. 291-314.
- BHAGAT, Y.; FOX, M.G.; FERREIRA, M.T. Morphological differentiation in introduced pumpkinseed *Lepomis gibbosus* (L.) occupying different habitat zones in Portuguese reservoirs. *J. Fish Biol.*, v. 69, p. 79-94, 2006.
- CARLTON, J.T. *Introduced Species in US Coastal Waters: Environmental Impacts and Management Priorities*. Arlington: Pew Oceans Commission. 2001. 28p.
- CHANDLER, E.A.; MCDOWELL, J.R.; GRAVES, J.E. Genetically monomorphic invasive populations of rapa whelk, *Rapana venosa*. *Mol. Ecol.*, v.17, n.18, p. 4079-4091, 2008.
- CLAVERO, M.; GÁRCIA-BERTHOUE, E. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends Ecol. Evol.*, v. 20, n. 3, p.110, 2005.
- CRONIN, M.A.; SPEARMAN, W.J.; WILMOT, R.L.; PATTON, J.C.; BICKHAM, J.W. Mitochondrial DNA variation in Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and Chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 50, p. 708–715, 1993.
- FARIAS, I.P.; ORTÍ, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; MEYER, A. Mitochondrial DNA Phylogeny of the Family *Cichlidae*: Monophyly and Fast Molecular Evolution of the Neotropical Assemblage. *J. Mol. Evo.*, v. 48, p. 703–711, 1999.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, v. 39, p. 783-791, 1985.
- FONTENELE, O. Um caráter sexual secundário extragenital nos tucunarés (Actinopterygii, Cichlidae) *Rev. Bras. Biol.*, v. 8, p. 185-188, 1948.
- FONTENELE, O.; PEIXOTO, J.T. Apreciação sobre os resultados da introdução do tucunaré comum *Cichla ocellaris* (Bloch and Schneider, 1801), nos açudes do nordeste brasileiro, através da pesca

- comercial. *B.Tec. DNOCS.*, v. 37, p. 109-134, 1979.
- GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.*, v. 52, p. 696-704, 2003.
- GODINHO, A.L.; FONSECA, M.T.; ARAÚJO, L.M. The ecology of predator fish introductions: the case of Rio Doce valley lakes. In: PINTO-COELHO, R.; GIANI, A.; SPERLING, von E. (eds). *Ecology and human impacts on lakes and reservoirs in Minas Gerais with special reference to future development and management strategies*. Belo Horizonte: Segrac, 1994. p. 77-83.
- GOMIERO, L.M.; BRAGA, F.M. Cannibalism as the main feeding behaviour of tucunaré introduced in southeast Brazil. *Braz. J. Biol.*, v. 64, n. 38, p. 625-632, 2004.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evo.*, v. 22, p. 160-174, 1985.
- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F.; NIELSEN, R. E.; BOLLBACK, J.P. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, v. 294, p 2310-2314, 2001.
- HUELSENBECK, J.P.H.; LARGET, B.; MILLER, R.E.; RONQUIST, F. Potential applications and pitfalls of Bayesian inference of phylogeny. *Syst. Biol.*, v. 51, p. 673-688, 2002.
- KULLANDER, S.O.; FERREIRA, E.J.G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: *Cichlidae*). *Ichthyol. Explor. Freshwat.*, v. 17, p. 289-398, 2006.
- MEYER, A.; KOCHER, T.D.; BASASIBWAKI, P.; WILSON, A.C. Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* v. 347, p. 550-553, 1990.
- MOLINA, W.F.; GURGEL, H.C.B.; VIEIRA, L.J.S.; CANAN, B. Ação de um predador exógeno sobre um ecossistema aquático equilibrado. I. Extinções locais e medidas de conservação genética. *Rev UNIMAR*, v. 18, p. 335-345, 1996.
- NYLANDER, J.A.A. *Mraic.pl. Programa distribuido pelo autor*. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.
- OLIVEIRA, A.V.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; BIGNOTTO, T.S.; JÚLIO, H.F.; CARRER, H.; AGOSTINHO, C.S.; PRIOLI, L.M. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence

- of interspecific hybridization. *J. Fish Biol.*, v. 69 B, p. 260–270, 2006.
- PALUMBI, S.R.; MARTIN, A.P.; ROMANO, S.; MCMILLAN, W.; STICE, L.; GRABOWSKI, G. *The simple fools guide to PCR*. Honolulu: Special Publ. Dept. Zoology, University of Hawaii. 1991. 43p.
- PELICICE, F.M.; AGOSTINHO, A.A. Fish Fauna destruction after the introduction of a non-native predator (*Cichla kelberi*) in a Neotropical reservoir. *Biol. Invasions*, p. 1387-3547, 2008.
- PIMENTEL, D.; ZUNIGA, R.; MORRISON, D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecol. Econ.*, v. 52, p. 273–288, 2005.
- POMPEU, P.S; GODINHO, H.P. Ictiofauna de três lagoas marginais do médio São Francisco,. In: GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. (org.) *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p.167-181.
- RENNO, J.F.; HUBERT, N.; TORRICO, J.P.; DUPONCHELLE, F.; NUNEZ- ROBRIGUEZ , J.; GARCIA-DAVILA, C.; WILLIS, S.C.; DESMARAIS, E. Phylogeography of peacock bass *Cichla monoculus* in the upper Madeira (Amazon, Bolivia): evidence of incipient speciation. *Mol. Phylog. Evo.*, v. 41, p. 503–510, 2006.
- ROCHA, R.R; SAMPAIO, I.; FRAGA, E.; BARROS, M.M. Origem do peixe amazônico tucunaré introduzido nos açudes do Piauí: uma abordagem genética. In: 54o Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador. *Resumos do 54o Congresso Brasileiro Genética*, Salvador, 2008. p.28.
- RODRIGUEZ, O.J.L.; MARIN, A.; MEDINA, R. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.*, v. 142, p. 485–501, 1990.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 253p.
- SANTOS, G.B.; MAIA-BARBOSA, P.M.; VIEIRA, F.; LOPEZ, C.M. Fish and zooplankton community structure in reservoirs of southeastern Brazil: effects of the introduction of exotic predatory fish. In: PINTO-COELHO, R.M.; A. GIANI, Y. E. von SPERLING (eds.) *Ecology and human impact on lakes and reservoirs in Minas Gerais with special reference to future development and management strategies*. Belo Horizonte: Segrac, 1994. p. 115-132.
- SATO, Y. Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões. 1999. 179p. Tese (Doutorado em Ecologia

- e Recursos Naturais) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFSCar, São Carlos.
- concessão da CESP nos rio Tietê, Paraná, e Grande no período de 1986 a 1991. São Paulo: CESP, 73p.
- SIMBERLOFF, D. Confronting introduced species: a form of xenophobia? *Biol. Invasions*, v. 5, n. 3, p. 179-192, 2003.
- STOCKWELL, C.A.; HENDRY, A.P.; KINNISON, M.T. Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends Ecol Evol.*, v. 18, p 94–101, 2003.
- SCHLAEPFER, M.A.; RUNGE, M.C.; SHERMAN, P.W. Ecological and evolutionary traps. *Trends Ecol. Evol.*, v.17, p. 474–480, 2002.
- SPARKS, J.S. Molecular phylogeny and biogeography of the Malagasy and South Asian cichlids (Teleostei: Perciformes: *Cichlidae*). *Mol. Phylog. Evol.*, v. 30, p. 599-614, 2004.
- SWOFFORD, D.L. (2003) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. e HIGGINS D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for mutiple sequence alingment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* v. 24, p.4876-4882.
- TORLONI, C.E.C. (1993) *Produção pesqueira e composição das capturas em reservatórios sob concessão da CESP nos rio Tietê, Paraná, e Grande no período de 1986 a 1991*. São Paulo: CESP, 73p.
- UNEP (2005) *Convention on Biological Diversity: Invasive Alien Species*. United Nations Environmental Programme. Disponibilidade : <<http://www.biodiv.org/programmes/cross-cutting/alien/default.aspx#>> . Acesso em: 11 jan. 2009.
- VARI ,R.P.; MALABARBA, L.R. Neotropical Ichthyology: an overview. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. (eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*, Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 1–11.
- VERMEIJ, G.J. An agenda for invasion biology. *Biol. Conserv.*, v. 78, p. 3–9, 1996.
- WELCOMME, R. L. International introductions of inland aquatic species. *FAO Fisheries Technical Paper*, n. 294, p. 1-318, 1988.
- WILLIS, S.C.; NUNES, M.S.; MONTAÑA, C.G.; FARIAS, P.F.; LOVEJOY, N.R. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Mol. Phylog. Evol.*, v. 44, p. 291-307, 2007.
- WILCOVE, D.S.; ROTHSTEIN, D.; DUBOW, J.; PHILLIPS, A.; LOSOS, E. Quantifying threats to imperiled species in the United

- States. *Bioscience*, v. 48, p. 607–615, 1998.
- YANG, Z. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J. Mol. Evo.*, v. 39, p. 306–314, 1994.
- ZARET, T.M.; PAINE, R.T. Species introduction in a tropical lake. *Science*, v. 2, p. 445-449, 1973.
- ZARET, T.M. Life history and growth relationships of *Cichla ocellaris*, a predatory South American cichlid. *Biotropica*, v. 12, p. 144-157, 1980.
- ZAYED, A.; CONSTANTIN, S.A.; PACKER, L. Successful biological invasion despite a severe genetic load. *PloS ONE*, v. 2, n. 9, p. e868, 2007.

ANEXO

Tabela 2. Resumo das espécies e locais amostrados, incluindo informações sobre a espécie ser nativa (N) ou não (I) em uma região em particular e o número de haplótipos da região 16S rDNA e da região Controle (CR) detectadas em cada localidade. Referências dos haplótipos previamente publicadas obtidas no GenBank são fornecidas.

Espécie	Código	Local / Estado	I/N	16S/CR*	Referência – Genebank
<i>C. kelberi</i>	Tocantins	Reservatório de Tucuruí, Rio Tocantins (PA)	N	1/3 (20)	Este trabalho
<i>C. monoculus</i>	Amazonas1	Rio Amazonas (AM)	N	0/1	Oliveira <i>et al.</i> , 2006 (AY836748)
<i>C. monoculus</i>	Amazonas2	Rio Amazonas (AM)	N	0/1	Willis <i>et al.</i> , 2007 (DQ841899)
<i>C. monoculus</i>	Madeira	Rio Madeira (AM)	N	0/1	Renno <i>et al.</i> , 2006 (DQ778669)
<i>C. monoculus</i>	Solimões	Rio Solimões (AM)	N	1/0 (1)	Este trabalho
<i>C. monoculus</i>	Negro	Rio Negro (AM)	N	1/0	Farias <i>et al.</i> , 1999 (AF049017)
<i>C. piquiti</i>	Tocantins	Reservatório de Tucuruí, Rio Tocantins (PA)	N	1/6 (20)	Este trabalho
<i>C. temensis</i>	Negro	Rio Negro (AM)	N	1/1	Farias <i>et al.</i> , 1999 (AF049019) Willis <i>et al.</i> , 2007 (DQ841929)
<i>C. ocellaris</i>	-	?	N	1/2	Sparks 2004 (AY263831) Renno <i>et al.</i> , 2006 (DQ778665) Willis <i>et al.</i> , 2007 (DQ841871)
<i>C. orinocensis</i>	-	?	N	1/1	Willis <i>et al.</i> , 2007 (DQ841866) Farias <i>et al.</i> , 1999 (AF049018)
<i>C. intermedia</i>	Orinoco	Rio Orinoco, Venezuela	N	0/1	Willis <i>et al.</i> , 2007 (DQ841833)
<i>Cichla</i> sp.	Mamore	Rio Mamoré, Bacia Amazonica, Bolivia	N	0/1	Willis <i>et al.</i> , 2007 (DQ841908)

<i>Cichla</i> sp.	Xingu	Rio Xingú (PA)	N	0/1	Willis <i>et al.</i> , 2007 (DQ841946)
<i>Cichla</i> sp.	Amazonas	Rio Amazonas (AM)	N	0/1	Willis <i>et al.</i> , 2007 (DQ841937)
<i>Cichla</i> sp.	Lajeado	Reservatório Lajeado, Rio Tocantins (TO)	N	0/2	Oliveira <i>et al.</i> , 2006 (AY836743-44)
<i>C. kelberi</i>	Itumbiara	Reservatório de Itumbiara Rio Paranaíba (MG)	I	1/3 (18)	Este trabalho
<i>C. kelberi</i>	Morada Nova	Reservatório Três Marias, Distrito de Morada Nova, Rio São Francisco (MG)	I	1/1 (12)	Este trabalho
<i>C. kelberi</i>	Helvécio	Lago Dom Helvécio, Rio Doce (MG)	I	1/1 (10)	Este trabalho
<i>C. kelberi</i>	Felixlândia	Reservatório Três Marias, Cidade Felixlândia, Rio São Francisco (MG)	I	0/1 (10)	Este trabalho
<i>C. piquiti</i>	Itumbiara	Reservatório Itumbiara, Rio Paranaíba (MG)	I	1/1 (19)	Este trabalho
<i>C. piquiti</i>	Furnas	Reservatório Furnas, Rio Grande (MG)	I	1/1 (17)	Este trabalho
<i>C. cf. monoculus</i>	Paraná	Rio Paraná (PR)	I	0/4	Oliveira <i>et al.</i> , 2006 (AY836717-20)
<i>C. cf. monoculus</i>	Capivari	Reservatório Capivari, Rio Paranapanema (PR)	I	0/1	Oliveira <i>et al.</i> , 2006 (AY836730)
<i>C. cf. monoculus</i>	Itaipú	Reservatório Itaipú, Rio Paraná (PR)	I	0/1	Oliveira <i>et al.</i> , 2006 (AY836739)
<i>C. cf. monoculus</i>	Lajeado	Reservatório Lajeado, Rio Tocantins (TO)	I	0/1	Oliveira <i>et al.</i> , 2006 (AY836746)
<i>C. piquiti</i>	Marginal	Lago Marginal, Rio São Francisco (MG)	I	1/1 (12)	Este trabalho
<i>Cichla</i> sp.**	Farm	Estoque cultivado (MT)	I	0/1	Oliveira <i>et al.</i> , 2006 (AY836740)
<i>Cichla</i> sp.	Catu	Lago Catu (CE)	I	1/1 (5)	Este trabalho

* Números em parêntesis representam o número total de amostras analisadas para cada local;

** Identificado por Oliveira et al., (2006) como *C. temensis*.

Capítulo 2 – Desenvolvimento e caracterização de marcadores nucleares microssatélites para a espécie de tucunaré *Cichla piquiti*

Resumo

Um conjunto de *primers* foi desenvolvido para 10 loci de microssatélites para a espécie de peixe neotropical *Cichla piquiti*, um dos maiores ciclídeos amazônicos (tucunaré). Esses loci foram utilizados para genotipar indivíduos de duas populações: uma nativa do rio Tocantins e a outra introduzida no sudeste brasileiro (alto do rio Paraná). A amplificação cruzada foi realizada com sucesso para outra espécie simpátrica de tucunaré: *C. kelberi*. Uma média de 4.4 alelos por locus (2 a 9 alelos) foi detectada. Esses marcadores serão úteis na caracterização da estrutura genética de populações nativas e também no estudo de invasões biológicas, uma vez que espécies de *Cichla* têm sido introduzidas em diversas bacias hidrográficas fora de sua distribuição natural.

Palavras-chave: microssatélites, espécie invasora, *Cichla piquiti*, tucunaré.

Abstract

A set of 10 microsatellite loci was developed for the Neotropical fish *Cichla piquiti* one of the biggest cichlid in the Amazon Basin. These loci were tested on 34 individuals from two populations, one from the Tocantins River (n=20) and another from an introduced population in southeast Brazil, Upper Paraná River (n=14). Cross amplification were also successfully tested for the sympatric species *Cichla kelberi*. An average of 4.4 alleles per locus (2-9 alleles) was detected. These markers will be useful for the characterization of genetic structure of native populations, and also on invasive biology studies, since these fish are the most translocated species of *Cichla* in Brazil.

Keywords: microsatellites, invasive species, *Cichla piquiti*, peacock bass.

Introdução

O tucunaré é um dos maiores ciclídeos da bacia amazônica. É uma espécie de peixe agressiva, sendo muito apreciada na pesca esportiva e na culinária (Kullander e Ferreira, 2006). Dentro e fora do Brasil, o tucunaré foi introduzido em diversas bacias hidrográficas onde não ocorria naturalmente (Zaret e Paine, 1973; Oliveira et al., 2006). Nesses locais, ele frequentemente se torna uma ameaça às espécies nativas. No lago Gatun, por exemplo, (Panamá) foi descrita a extinção local de pelo menos nove espécies de peixes após sua introdução (Zaret e Paine, 1973). No Brasil, o

tucunaré provocou drástica redução da ictiofauna nos lagos do Parque Estadual do Rio Doce (Godinho, 1994) e de espécies de pequeno porte em lagoas marginais do rio São Francisco (Pompeu, 2003).

Cichla piquiti e *C. kelberi* são espécies de tucunaré endêmicas da bacia do Tocantins-Araguaia e são frequentemente encontradas em simpatria. Elas têm sido as espécies do gênero *Cichla* mais translocadas para o sudeste do Brasil (Kullander e Ferreira, 2006, Oliveira et al., 2006; Capítulo 1 deste trabalho). Apesar do grande impacto ambiental provocado por

espécies invasoras, introduções recentes podem fornecer dados importantes para estudos de evolução, ecologia e biogeografia na região Neotropical (Vellend et al., 2005).

Marcadores moleculares - microsatélites

Marcadores nucleares microsatélites são repetições de sequência simples (SSR), ou seja, repetições em tandem de pequenos motivos de nucleotídeos, que tipicamente apresentam entre 1 a 5 pares de bases (Tautz, 1989). A maior limitação para a utilização de microsatélites é o isolamento e a caracterização dos loci (Zane et al., 2002). Para cada espécie de interesse é necessário o desenvolvimento de novos *primers* específicos, sendo que, em alguns casos, esses *primers* podem ser utilizados em espécies próximas (*primers* heterólogos).

Microsatélites vêm sendo utilizados em muitos trabalhos desde sua descrição (Litt e Luty, 1989; Tautz, 1989) e têm sido úteis na caracterização de populações de peixes introduzidas e nativas para detecção de estrutura genética populacional, fluxo gênico, efeito gargalo, efeito fundador, populações fonte, entre outros (e.g. Brown et al., 2009). Sua elevada variabilidade os torna marcadores moleculares muito robustos (Zane et al., 2002).

Neste trabalho, foi realizado o isolamento e a caracterização de 10 novos marcadores microsatélites para a espécie de tucunaré *C. piquiti* e sua amplificação cruzada em *C. kelberi*.

Metodologia

Descrição da amostra

Amostras de tecido (músculo) de tucunarés (gênero *Cichla*) foram coletadas de espécies nativas do rio Tocantins (represa de Tucuruí (n=20)) e de espécies introduzidas (represa de Itumbiara, rio Paranaíba (n=12) e fixadas em etanol 90%.

Desenvolvimento de microsatélites

Os marcadores microsatélites foram isolados do genoma da espécie *Cichla piquiti* utilizando-se a abordagem de biblioteca genômica de DNA enriquecida para microsatélites (modificada como descrito em Beheregaray et al., 2004). O DNA total foi extraído de tecido muscular, utilizando-se o método Fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989). Posteriormente, o DNA genômico foi digerido com as enzimas de restrição *RsaI* e *HaeIII*, sendo os fragmentos ligados a oligonucleotídeos adaptadores (**A:** CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA; **B:** TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A). Duas sondas marcadas com biotina (dGA₁₀ e dCA₁₀ – dAGAT₈, dAACT₈, dACAT₈) foram hibridizadas no DNA digerido e seletivamente retidas utilizando partículas magnéticas de streptavidina (Promega). A PCR foi realizada no eluído enriquecido em microsatélites, utilizando-se um oligo-adaptador A como *primer*. A biblioteca enriquecida foi, então, purificada utilizando o kit “gene clean” (Qbiogene), ligada no vetor pcR 2.1 – TOPO (Invitrogen) e posteriormente transformada em células TOP 10. O plasmídeo foi amplificado diretamente das colônias bacterianas, utilizando *primers* M13 direto (-20) e reverso (-40), sendo os produtos de PCR analisados em gel de agarose e purificados do gel utilizando o kit

Qbiogene. As sequências de DNA foram obtidas por meio do sequenciamento do produto de PCR, realizado pela empresa Macrogen (Coréia).

Os *primers* foram desenhados utilizando-se o programa *on-line* PRIMER3 (Rozen & Skaletsky, 1997). Um apêndice com a sequência do *primer* M13 (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT) foi adicionado na terminação 5' de cada *primer* direto para facilitar a subsequente marcação fluorescente (Schuelke, 2000). Os loci desenvolvidos foram depositados no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) com os números de acesso fornecidos na tabela 2.

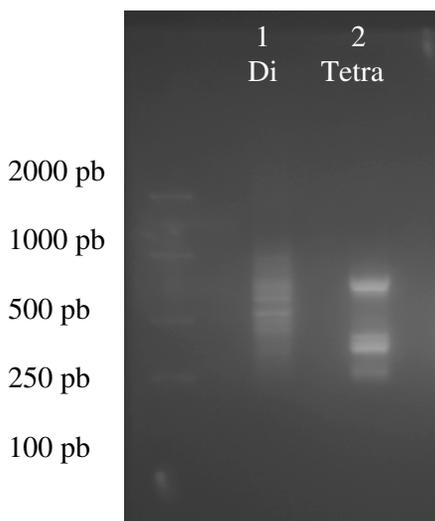


Figura 1. Gel de agarose mostrando o resultado da PCR realizada no eluído enriquecido em microssatélites, utilizando o oligo-adaptador A como *primer*. Na coluna 1 foram utilizadas sondas di-nucleotídicas, e na coluna 2 sondas tetra-nucleotídicas.

Genotipagem

As amplificações foram realizadas segundo o método descrito por Schuelke (2000), no qual o produto de PCR é marcado com fluorescência por meio da inclusão de um terceiro *primer* fluorescente (M13). As reações foram realizadas em um volume final de 10 µl contendo 1X Flexi Buffer GoTaq (Promega), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.2 U Go-Taq Flexi DNA polimerase (Promega), BSA (0.1%), 0.05 µM *primer* direto, 0.2 µM *primer* reverso e 0.2 µM *primer* M13 fluorescente (FAM, NED, VIC ou ROX). O programa de amplificação consistiu em um passo inicial de 94°C por 3 min, seguido por 32 ciclos *touchdown* (94 °C por 20 s; 63 °C a 55 °C até o quinto ciclo por 45 s; 72 °C por 60 s) e 72 °C por 4 min.

Os produtos de PCR foram detectados no aparelho ABI 3130 (Applied Biosystems) nas instalações da Universidade Macquarie (Sydney, Austrália). Os perfis dos microssatélites obtidos foram examinados no software GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems), sendo a genotipagem realizada manualmente. O software GENEPOP v3.3 (Raymond & Rousset 1995) foi utilizado para estimar as heterozigoses esperada (H_e) e observada (H_o), número de alelos (N_a), o desequilíbrio de ligação e as proporções de Hardy-Weinberg. Correções de Bonferroni foram aplicadas quando conduzidos testes estatísticos múltiplos (Rice 1989).

Resultados

O desenvolvimento de novos marcadores microssatélites foi executado com sucesso para a espécie *C. piquiti*. A técnica de biblioteca

Tabela 1 Sequência de *primers* de 10 loci de microssatélite isolados para *Cichla piquiti* e suas características. Número de alelos (N_A) e faixa de peso molecular observado são baseados em 34 indivíduos de 2 populações. Os valores de heterozigose observada (H_o) e esperada (H_E) foram calculados baseados em 20 amostras da população nativa.

Locus	* Sequencia do primer (5'-3')	Estrutura repetitiva	N_A	Faixa de Peso Molecular (bp) ‡	H_o / H_E	No acesso GenBank
Tuc3	TTTCATGCGGAAAAATAGCAC CCCTCCAGACTTCAGCTTTC	(GT) ₂₁ impereita	5	264-300	0.650 / 0.473	EU551726
Tuc4	ATACCCATCTCCCTCTGCAT CCCCCAGTTTGGGTTAGAAA	(TG) ₂₃ impereita	2	194-196	-	EU551727
Tuc5	GCTTGTTGTGCTGGTGAGTG AACACTCTAAGTAGCCTTTGTTTTG	(CA) ₉	9	232-261	0.555 / 0.668	EU551728
Tuc9	TCGCTGTTGCAGCTTATCAC GACTGAAAGGGGGTGGAGAG	(CA) ₁₀ impereita	3	206-218	0.250 / 0.333	EU551729
Tuc10	TCTCCCTGACCTTCAACCAG TGCTTAGATGAGCTGCAAGG	(GT) ₅	2	186-188	0.000 / 0.105	EU551730
Tuc11	AAGAGGCAAAAACGGGAAAG CCATGCTCCTGCTTGTGTAG	(GT) ₁₃	2	163-165	0.000 / 0.100	EU551731
Tuc12	CCTGCGCTAGATCATCATT TCCTTCGATCTCCCAAATG	(GT) ₇ (GA) ₁	2	238-240	0.005 / 0.005	EU551732
Tuc13	CGAAAAGACAGCATGTCAGC CCCATATTGACCCACTGATTC	(CA) ₁₇	5	235-257	0.312 / 0.521	EU551733
Tuc16	AGATCTTCTGTGGGAGGAG AAAAACAACACCATGGCAAG	(AC) ₇	4	171-183	0.389 / 0.559	EU551734
Tuc18	ATTCGTGACGGAGAGATAGA TCAATAATACTGCCCAAAA	(TC) ₂₃ impereita	9	96-142	0.526 / 0.863†	EU551735

†Desvio significativo do equilíbrio de Hardy–Weinberg, $P < 0.05$.

*Primers *forward* foram marcados com a sequência 5'M13 universal (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3').

‡O peso molecular exclui a sequência 5'M13.

genômica enriquecida para microssatélites foi eficaz, pois foi possível obter um grande número de loci de microssatélites do genoma da espécie alvo. Nessa etapa, crucial para o sucesso da técnica, espera-se observar no gel de agarose da amplificação do eluído enriquecido, um rastro de DNA (sem bandas evidentes). Com a sonda de biotina com di-nucleotídeos, esse

resultado foi positivo (figura 1 – canaleta 1). Entretanto, para sonda com tetra-nucleotídeos, não se obteve o resultado esperado (figura 1 – canaleta 2), visto que foram observadas bandas intensas ao invés do rastro homogêneo esperado.

Dos 120 clones positivos sequenciados, 20 apresentaram sequências de microssatélites com

regiões flanqueadoras suficientes para o desenho de *primers* (Tabela 2, ANEXO). Dos 20 pares de *primers* testados, 10 amplificaram consistentemente e foram selecionados para serem utilizados na genotipagem dos peixes (Tabela 1). Para os loci que apresentaram mais de uma região repetitiva, foram desenhados diferentes conjuntos de *primers* (Tuc 4 e 5 – Tabela 1). Nas análises genéticas não foram utilizados, entretanto, locus em uma mesma sequência, devido ao desequilíbrio de ligação.

Todos os loci foram polimórficos para *C. piquiti*, apresentando média de 4.4 alelos por locus (entre 2 e 9 alelos por locus). Apesar de alguns loci apresentarem baixa variação na amostragem de 34 indivíduos (e.g Tuc4, Tuc10, Tuc11 e Tuc12, todos com 2 alelos por locus), aparentemente, alguns apresentaram alelos espécie-específicos, que podem ser úteis para estudos de hibridação em *Cichla*. É interessante notar que Tuc 4 foi monomórfico para as populações nativas, mas um alelo distinto foi detectado nas populações introduzidas. A maior parte dos loci estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações nativas, exceto Tuc18, que apresentou excesso de homozigotos mesmo após aplicação do ajuste de Bonferroni, provavelmente devido a alelos nulos. Nenhuma evidência de desequilíbrio de ligação foi detectada na comparação par a par entre locus e populações. Todos os pares de *primers* amplificaram com sucesso amostras de *C. kelberi*, sugerindo que esses marcadores também podem ser úteis na caracterização genética de suas populações.

Discussão

A utilização dos marcadores nucleares microssatélites é limitada pela necessidade de desenvolvimento *de novo* desses marcadores para cada espécie objeto de estudo (Zane et al., 2002).

A clonagem de microssatélites pela técnica por biblioteca enriquecida foi eficiente, apesar de apenas 50% dos marcadores desenvolvidos apresentarem bons resultados na PCR e, assim, serem úteis na genotipagem dos espécimes.

A clonagem dos microssatélites apresentou maior eficiência para a espécie quando foram utilizadas sondas dinucleotídeas na hibridação (figura 1). Isso pode estar relacionado à abundância de sequências dinucleotídeas no genoma do peixe ou a algum artifício da técnica, como, por exemplo, maior especificidade e força de ligação das sondas di-nucleotídicas quando comparadas com as sondas com tetra-nucleotídeos.

Os microssatélites aqui desenvolvidos para a caracterização genética das populações nativas de *C. piquiti* também amplificaram amostras de *C. kelberi*. Essas duas espécies endêmicas do rio Tocantins e recentemente descritas por Kullander e Ferreira (2006) são as principais espécies introduzidas no sudeste brasileiro. Assim, esses marcadores poderão servir como ferramentas importantes na melhor compreensão do processo de colonização dessas espécies no sudeste brasileiro.

Conclusões

Foram identificados vinte loci de microssatélites para a espécie de peixe tucunaré (*C. piquiti*). Desses, dez marcadores tiveram sua PCR otimizada

com sucesso, sendo todos os loci polimórficos, apresentando média de 4.4 alelos por locus (entre 2 e 9 alelos por locus). Entre os loci identificados, apenas Tuc 18 não estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os pares de *primers* desenvolvidos para *C. piquiti* também amplificaram com sucesso nas amostras de *C. kelberi*. Se utilizados em conjunto com marcadores mitocondriais (Cap. 1), esses marcadores nucleares microssatélites poderão ser aplicados em estudos que visem uma melhor compreensão do processo de colonização dessas espécies no sudeste brasileiro, contribuindo com novas informações sobre o processo que permitiu sua bem sucedida invasão biológica em novos habitats.

Referências Bibliográficas

- BEHEREGARAY, L.B.; MÖLLER, L.M.; SCHWARTZ, T.S.; CHAO, N.L.; CACCONE, A. Microsatellite markers for the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*, a commercially important fish from central Amazonia. *Mol. Ecol. Notes*, v. 4, p. 330-332, 2004.
- BROWN, J.E.; STEPIEN, A.C. Invasion genetics of the Eurasian round goby in North America: tracing sources and spread patterns. *Mol. Ecol.*, v. 18, p. 64-79. 2009.
- FISCHER, D.; BACHMANN, K. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). *Biotechniques*, v. 24, p. 796-802, 1998.
- KULLANDER, S.O.; FERREIRA, E.J.G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: *Cichlidae*). *Ichthyol. Explor. Freshwat.*, v. 17, p. 289-398, 2006.
- LITT, M.; LUTTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 44, p. 397-401, 1989.
- OLIVEIRA, A.V.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; BIGNOTTO, T.S.; JÚLIO, H.F.; CARRER, H.; AGOSTINHO, C.S.; PRIOLI, L.M. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. *J. Fish Biol.*, v. 69 B, p. 260-270, 2006.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, v. 86, p. 248-249, 1995.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press, 2000. p.365-386.
- RICE, W.A. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, v. 43, p. 223-225, 1989.

- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnol.*, v. 18, p. 233–234, 2000.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid. Res.*, v. 17, p. 6463-6471, 1989.
- VELLEND, M.; HUGHES, A.R.; GROSBERG, R.K.; HOLT, R.D. Insights into Evolution. In: SAX, D.F.; STACHOWICZ, J.J.; GAINES, S.D. (eds.) *Species Invasions: Insights into Ecology, Evolution and Biogeography*. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. p.135-137.
- ZANE, L.; BARCELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.*, v. 11, p. 1-16, 2002.
- ZARET, T.M.; PAINE, R.T. Species introduction in a tropical lake. *Science*, v. 2, p. 445-449, 1973.

	ACAAGGTGCGTGCTTGCATTTTCAAATGACTTCTCAAATAAGTTGCACCTCTCAC TCAAACGTGGAATCTATTCTCACACAAACACATACACACATAATGCATTTATGTA TGGGTATAACTATGAGGTTATTCACATATATAATCCATTACTAGCCACTTACCTTGA ACTCAGCCATCAACTAA	TA ₁			
TUC7	TGGGCAACACGGGAGTTAATCATTCTGAGGGAGCTGTAGTGTAACACCAGTA GTCCAGTCATTACGCAGGAGGAGTGTGGGCTGTTTCATATGTGTGTCTGAGTGAG TCGGTGTGTGTGTGTATTTTCATTCACTCATCCATAAACGTGAGAACATATTTAG CTTTAGTGTAAACAGTAGGAGTACACACACAGGATTTCCAGC	GT ₁₃ imper	A= 155 pb B= 213 pb	A F TGTA AACACGACGGCCAGT CAACACGGGAGTTAATCATTTC R TCACGTTTATGGATGAGTGAATG B F TGTA AACACGACGGCCAGT TCTGAGGGGAGCTGTAGTG R GCTGAAATCCCTGTTGTGTG	Falha na PCR
TUC8	AGAGAGAGGAAAGAGAGAGAGGGTGTGTTGGAAGAGGGCAAAACGGGAAAGAA AACAAAAGAAATACATACGTTAGAGGACATCCGAGGAGCAGTGCACAACATCCTT GTGTGTACACAATAACAATATCATATCATCAGTAGCAAGCAAGCAGCAGTCTG ACACAAGTACTACACAAGCAGGAGCATTGGTCTACTGGAGCTACTAGCTAACAAGC ATTCATATGTTTATTATATTGGACTGTAGCTCTGTACTATTAAGGCTGGCTAAATG CAACATAAGCAAGCATTAACTATTAACAACAATAAGGCTGCTAACTGTGGTGAACA GGTAAGAAGCACAGAGAAAAGGAGGCTGCACCTGCTAGCTCCATGATAAATCTGTGA AGCATGTTAAGTGATGGTTCACTCGCAGACAAATGTCAAAAAATGGT	GT ₃ CAA ₃ CAT ₃	165 pb	F TGTA AACACGACGGCCAGT AAGAGGCCAAAACGGGAAAG R CCATGCTCCTGCTTGTGTAG	Monomórfico
TUC9	TAGGTTTCTGAGTCTTCTCTGTCTGTCTGAGGCTCTGAGGCTCGCTGTTGCAGCT TATCACCTCATTATCAAGTACATCTCATGACAAACACACACAGACAATCACACACA CACATCGCACACAAAAGTAACAGAATAAGGAAGTGATTTGTTGGTGTCTCGTTAG TTTTTTTTTCTGTGTGTATCTTCTGTACAGATGCAGCAGTCGGGTGANACCCCC CACCCCCCTTCTCCACCCCCCTTCACTCCCTTCCACCTGTCACTCCGGTACTG T	CA ₁₀ GA ₁ CAAT ₁	215 pb	F TGTA AACACGACGGCCAGT TCTGCTGTTGCAGCTTATCAC R GACTGAAAGGGGGTGGAGAG	Polimórfico
TUC10	CAATGCCACTGTGTTTACTGTTTACTGCTGAGTGAAGTAAATGGATTTCTCCCTT GTCATAGCTCCATGTGGTGGGAACCTGACAGGTCCTAGTGGGCTGATTCCTGCTCCA GACTATCCTGAACCGTATCCTCATGGAAGAGAGTGCAGCTGGACAGTACTGTCA CAGGACTATGTCATCTCCCTGACCTTCAACCAAGTAAAGTTCAGTAGTTAAAAAGAAA AAAAAATGGCTACTGGGGGTGGGTGTGTGGTGGGCTATGGATTAAGTTGATCTT TGATCATTATCCTTTTTCAGAATTTAATTTCTAAATATGCTAGCAAACTTTCTCTG TTGTTACCTTGCAGCTCATCTAAGCAGCAGTATATGATTACTTTTTAATGTCATTT TCTGTAACCAAGTTTCAAGTTGGAGCCAAGTTATGACTTCTGCATATCTATGACGGA CCGGACTCCCTTAGTCCCTTGTGGGTAGTTTTATGGCAGATGTCCAGATCGC ATTGAGAGCAGCTCCAACACGCTCTTCTTGGCTTCCGACGCGATGCCCTCCCTCANC AGCAATGGATTTGTGCTGAGTCCATTTCTCTCCATTTCT	CA ₃ Gt ₄	184 pb	F TGTA AACACGACGGCCAGT TCTCCCTGACCTTCAACCAG R TGCTTAGATGAGTGAAGG	Polimórfico
TUC11	CTGAATCTTAAAGTCTGCAAGCAAAAACACAGAGGCAATGAGAGGATTGAAAGAG ACAGAGGACTTATGTACCAGTGTAGCAGATGACAGCAGTGGGATGTGTGACC AAAGCTCTCAAGCCTCGGGTATCAACACAATGGGACAGACTCTCATCCCCCT GGCTATTAATATTACATTACTGCCACTTCAGACCAATCTCCCAAGTAAAGAGTCTTA TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGGGAGCGTGGTGTATGAGTGAAGTGA ATACTCAAATCTACGGCTAAACCCAGAATTTCTTTGATCCATATGCAAGAAAGGTA GGAGCCAG	GT ₁₃	165 pb	F TGTA AACACGACGGCCAGT AAGAGGCCAAAACGGGAAAG R CCATGCTCCTGCTTGTGTAG	Polimórfico
TUC12	TAGCTTGAACGACCTGCGTAGATCATCTTCTACACACAACATGCACACTAA CACACATGGTGAATGAAGACAGACAATGAAGCTCATTGTTAGCTGATGAATAA AGAGAAGTTGCCCAATTGCTGACTGTAAACCATGGAATGGACTTTGTATTGCTC TGTGTGAGTGTGTGTCATCACTATCCACACAGCTCATTAAAGCTACACTGCTG TAATTCATTTGGGAGATCGAAAGGACAGTCAAGCAGGCAAACTAACCATATTTTTT TTGTTGTTTTTTCTCTGTGTGTGCTGTAACCTTCCGTTGCTCTTCTAGCTG TCACAGTATCTTTCTTCAACAAGAAGGCTGTATGTATGTTTCTATGCACCGGA AACAAATGCAGAACTCACTCAAACCATGAAAGTCTCTGTACAGGTTATGAGG GTGACATATGGCATGACGAATT	GT ₇	239 pb	F TGTA AACACGACGGCCAGT CCTGCGCTAGATCATCTTC R TCCTTTCGATCTCCCAAGT	Polimórfico
TUC13	CATACTGAGTGAACGATTGGGTTAGAAGGCCAAAGAGTAATTTGATCACCACATA TGTGCAATAAACCTCATAACGAAAAGACAGCATGTCAGCTGTGTGTCAGTGGAAAAA CTCCTGTTACACATGTAAGTTGAGAAAAGGAGCACTGATAGCTGAATAGCGTATGG CTACATGATCAGGACTATAACGACAGCCTTTAATGTTTGTGAGACACTCACACAGA CACACACACACACACACACACACACACACGAGCCAAAATAATGAGCGTATCAGTGTG	CA ₁₇ GA ₁	235 pb	F TGTA AACACGACGGCCAGT CGAAAAGACAGCATGTGACG R CCATATTGACCCACTGATT	Polimórfico

Capítulo 3 – Caracterização genética de populações nativas e introduzidas do peixe tucunaré utilizando marcadores microssatélites e mitocondrial

Resumo

Espécies exóticas invasoras são uma grande ameaça à biodiversidade, à economia e à saúde humana. Conhecer o número de atos introdutórios, o número de espécies introduzidas e a rota introdutória desses organismos é de grande importância para a caracterização de invasões biológicas. Neste trabalho, foram utilizados nove marcadores genéticos (microssatélites) para a caracterização da estrutura populacional de espécies do peixe Neotropical tucunaré (*Cichla spp*) introduzidas nas principais bacias do estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. Os dados genéticos indicam que o alto rio Paraná foi o local que recebeu o maior número de espécimes de tucunaré, sendo possivelmente a fonte das demais introduções no estado de Minas Gerais. O elevado índice de diferenciação genética (F_{st}) entre as populações introduzidas sugere baixo fluxo gênico, mostrando que novos atos introdutórios não têm sido realizados continuamente. Baixos valores para riqueza alélica (N_a) e heterozigose esperada (H_e) nas populações do rio São Francisco e Doce indicaram que essas populações foram fundadas com número reduzido de espécimes. Espécies híbridas foram detectadas apenas na população nativa. Esses resultados genéticos são úteis no entendimento do processo de invasão biológica e no desenvolvimento de estratégias de manejo e controle de espécies invasoras.

Palavras-chave: microssatélites, caracterização genética, populações introduzidas, tucunaré, Minas Gerais

Abstract

Invasive exotic species are a great threat to biodiversity, economy and human health. Inferring the number of introduction acts, the number of introduced species and the introduction route of these organisms is an important step into the characterization of a biology invasion. In this work, we apply nine molecular markers (microsatellites) for the genetic structure characterization of the Neotropical fish tucunaré (*Cichla*) introduced in Minas Gerais State (Brazil) major river basins. The genetic data showed that the Upper Paraná River has received a greater number of tucunaré's specimens, and it was the possible source for other introductions in Minas Gerais. The high R_{st} values among the introduced populations suggest a low genetic flow, leading to the conclusion that new introduced acts have not been conducted continually at these sites. Reduced genetic richness (N_a) and expected heterozygosity (H_e) values in most introduced populations showed that these populations have been founded by a small number of specimens. Hybrids were detected only in the native populations. These genetic results are useful not only in invasive biology studies but also in the development of strategies for invasive species control and management.

Keywords: microsatellites, genetic characterization, introduced populations, peacock bass, Minas Gerais

Introdução

A introdução de espécies, seja casual ou intencional, tem produzido desde consequências muito pequenas a mudanças catastróficas no ambiente receptor (Welcomme, 1988). Espécies invasoras são organismos que, introduzidos fora da sua área de distribuição natural, ameaçam ecossistemas, habitats ou outras espécies e são considerados a segunda maior causa de extinção de espécies no planeta, afetando diretamente a biodiversidade, a economia e a saúde humana (Fuller et al., 1999; Simberloff, 2003; IMARNR-MMA, 2006). Nos Estados Unidos, por exemplo, estima-se que houve introdução de pelo menos 50.000 espécies exóticas, provocando perda econômica anual de até 120 bilhões de dólares (Pimentel et al., 2005). No Brasil, ainda não existem estimativas de perdas econômicas provocadas pelo impacto de espécies invasoras.

Invasões biológicas são iniciadas quando ocorre uma ou mais introduções de uma espécie em uma nova área e podem suceder com muitos ou apenas alguns indivíduos (Sakai et al., 2001; Gaskin et al., 2005). Os números de introduções e de indivíduos introduzidos durante cada evento exercem amplo efeito no sucesso de determinada espécie em se tornar invasora (Dlugosh e Parker, 2008; Marrs et al., 2008). O entendimento sobre a conexão entre fatores como múltiplas introduções, número de indivíduos e efeitos genéticos (gargalo, fundador, seleção e deriva) no resultado de invasões biológicas é aspecto importante a ser considerado nas estratégias de manejo e controle de

espécies invasoras (Dlugosh e Parker, 2008).

Em geral, quando uma espécie é introduzida, apenas uma pequena amostra de indivíduos da população original chega ao local receptor (Sakai et al., 2001). Esses indivíduos não devem, portanto, representar toda a variabilidade genética mantida na população fonte. Esse fenômeno é denominado “efeito fundador” (Hartl e Clark, 1997). Caso uma nova amostra desses indivíduos introduzidos seja transportada para outro local receptor, deverá ocorrer redução secundária da diversidade genética na nova população introduzida. O decréscimo nessa variação genética pode ser acompanhado em conjunto com a assinatura genética de cada população. Podemos, então, deduzir o caminho percorrido na invasão biológica (Muirhead et al., 2008) e, assim, inferir possíveis modos de colonização (Sved et al., 2008).

Uma vez que a diversidade genética é elemento básico necessário para a evolução adaptativa, tem sido proposto que múltiplas introduções de espécies exóticas sejam responsáveis pela transformação dessas em espécies invasoras especialmente problemáticas, capazes de acelerar a resposta evolutiva à pressão de seleção (Kolar e Lodge, 2001; Dlugosch e Parker, 2008). Nesse sentido, a hipótese da “pressão de propágulo” (Lockwood et al., 2005) ou esforço de introdução sugere que o número de indivíduos introduzidos e o número de introduções influenciariam o sucesso da invasão. Outras hipóteses poderiam explicar a vulnerabilidade de determinado local à invasão, como a do nicho vago em ambientes impactados (e.g represas de usinas hidrelétricas) e a

de ambientes com diversidade de espécies reduzida (Hutchinson, 1957; Elton, 1958).

O conhecimento sobre a biologia de potenciais invasores, especialmente em relação à capacidade de dispersão, é fator importante para que sejam desenvolvidas medidas para prevenir sua disseminação – normalmente mais viável do que o controle de grandes populações invasoras já estabelecidas (Goodell et al., 2000). Características genéticas e evolutivas podem ser decisivas na determinação de quando e quais espécies se tornam invasoras (Sakai et al., 2001). Desse modo, o entendimento dos fatores que influenciam o sucesso de invasões biológicas danosas ecológica e economicamente é de importância primordial para obtermos sucesso no seu controle.

Resultados genéticos obtidos a partir da análise do mtDNA mostraram que as espécies de tucunaré introduzidas em Minas Gerais são provenientes do rio Tocantins (Cap. 1). Assim, marcadores de alta resolução, os microssatélites, foram desenvolvidos para a espécie endêmica do Tocantins, *C. piquiti*, e testados com sucesso para *C. kelberi* (Carvalho et al., 2009). Os microssatélites são marcadores moleculares úteis na caracterização genética da estrutura populacional, inclusive em espécies invasoras (Lindholm et al., 2005; Therriault et al., 2005; Zayed et al., 2007; Marrs et al., 2008), sendo utilizados também na detecção de hibridações entre espécies de peixes simpátricas (e.g. Schwartz e Beheregaray, 2008).

No presente trabalho, foram utilizados marcadores microssatélites (Carvalho et al., 2009) e mitocondrial

para acessar a diversidade genética e a estruturação de populações nativas e introduzidas do peixe neotropical tucunaré nas seguintes bacias do sudeste: eco-regiões dos rios São Francisco, alto Paraná, Doce e Grande.

Metodologia

Descrição da amostra

Amostras de tecido (nadadeira) de tucunarés (gênero *Cichla*) foram coletadas de espécies nativas (provenientes da bacia Amazônica, n=38) e introduzidas (não Amazônicas, n=80) e fixadas em etanol 90%. As amostras eram provenientes de cinco populações introduzidas nas principais bacias hidrográficas em Minas Gerais, sendo elas: represa de Três Marias (rio São Francisco, n=16), Lagoa Marginal próxima ao Município de São Francisco (rio São Francisco, n=11), represa de Itumbiara (rio Paranaíba, n=38), represa de Furnas (rio Grande, n=10) e Lago Dom Helvécio (rio Doce, n=15). Os peixes da bacia Amazônica foram coletados no reservatório de Tucuruí, rio Tocantins– fronteira leste da distribuição nativa de *Cichla* (amostras cedidas pela Profa. Iracilda Sampaio - UFPA). O DNA total foi extraído de nadadeiras por meio do método Fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989). Todos os espécimes foram identificados segundo Kullander e Ferreira (2006). Entretanto, alguns espécimes na população nativa apresentaram padrão morfológico duvidoso, o que dificultou sua identificação utilizando apenas caracteres morfológicos. Identificados como *C. kelberi*, esses indivíduos (espécimes 59, 63, 71, 130, 131, 132, 133, 144, 146, 147, 148, 150) foram mantidos na amostra para posterior análise de hibridação.

Genotipagem

As genotipagens foram realizadas com os *primers* desenvolvidos para *Cichla piquiti* (Carvalho et al., 2009) utilizando-se o método descrito por Schuelke (2000), no qual o produto de PCR é marcado com fluorescência por meio da inclusão de um terceiro *primer* fluorescente (M13). As reações foram realizadas em um volume final de 10 µl contendo 1X Flexi Buffer GoTaq (Promega), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.2 U Go-Taq Flexi DNA polimerase (Promega), BSA (0.1%), 0.05 µM *primer* direto, 0.2 µM *primer* reverso e 0.2 µM *primer* M13 fluorescente. O programa de amplificação consistiu em um passo inicial de 94°C por 3 min, seguido por 32 ciclos *touchdown* (94 °C por 20 s; 63 °C a 55 °C até o quinto ciclo por 45 s; 72 °C por 60 s) e 72 °C por 4 min.

Os produtos da PCR foram detectados no aparelho ABI 3130 (Applied Biosystems), nas instalações da Universidade Macquarie (Sydney, Austrália). Os perfis dos microssatélites obtidos foram examinados no software GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems), sendo o resultado da genotipagem conferido manualmente. O programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al., 2004) foi utilizado para detectar déficit de heterozigotos, erros de *scoring* e alelos nulos nos microssatélites.

Análises com DNA mitocondrial (mtDNA)

No sentido de complementar a análise com os marcadores microssatélites, os espécimes que apresentaram morfologia duvidosa, excluídos da análise filogenética (Cap.

1) por serem considerados possíveis híbridos, tiveram seus haplótipos comparados e alinhados com as espécies de tucunaré referência para *C. kelberi* e *C. piquiti*. Sequências de DNA mitocondrial são marcadores utilizados para identificação molecular de espécies (*Barcode* genético), mas não são ideais para detecção de híbridos devido à herança dominante (sem heterozigose) e por serem uni-parentais (herança materna). Podem ser aplicadas, entretanto, em conjunto com marcadores nucleares, como os microssatélites, no sentido de complementar a análise genética de hibridação.

Para isolar parte da região mitocondrial Controle (CR) foi utilizada a técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com os iniciadores (*primers*) específicos para essa região (**CR L** 5'-AGA GCG TCG GTC TTG TAA ACC-3' - Cronin et al., 1993; **CR H16498** 5'-CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG-3' - Meyer et al., 1990). O produto da PCR obtido apresentou aproximadamente 460 pares de bases (pb). Após a reação da PCR (**CR** - 94°C por 4 min, 50°C por 30s, 72°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 15s, 56°C por 30 s, 72°C por 2 min e passo final de 72°C por 10 min) foram utilizados de 1 a 2 µL da reação de PCR total no sequenciamento. Utilizou-se o protocolo do Kit Big Dye Terminator Mix, seguido de análise das reações pelo sequenciador automático ABI 310 (Perkin Elmer™). As regiões foram sequenciadas nas direções 5'-3' e 3'-5'. Os cromatogramas foram conferidos e as sequências alinhadas no software ClustalW (Thompson et al., 1997) implementado no programa BioEdit

(Hall, 1999) utilizando os parâmetros *default*.

Análises em genética de populações

Para quantificar a diversidade genética foram utilizadas as médias da heterozigosidade esperada (H_e), além do número alélico efetivo ($N_e = 1/(1-H_e)$), número de alelos exclusivos e riqueza alélica (N_a). Os índices genéticos (H_e , N_a , N_e e alelos exclusivos), as frequências alélicas e os índices de endogamia F_{is} e R_{st} foram estimados utilizando-se o programa GENALEX (Peakall e Smouse, 2006). A estruturação populacional foi estimada utilizando-se a análise molecular de variância (AMOVA) (Excoffier, 1995) e o R_{st} (Slatkin, 1995). O R_{st} é um índice análogo ao F_{st} (Wright, 1921). Enquanto F_{st} leva em conta o modelo de alelos infinitos (IAM), o R_{st} assume o modelo de mutação *stepwise* (SMM), que caracteriza muitos loci de microssatélites. Sua significância foi testada por 10000 permutações. O número de migrantes histórico (N_m) foi estimado utilizando-se a fórmula: $N_m = [1/R_{st} - 1]/4$.

A significância estatística dos índices genéticos intrapopulacionais H_e , N_a , N_e e alelos exclusivos foi testada utilizando o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$) com posterior teste múltiplo de comparações de Dunn, e a análise pareada de Wilcoxon ($\alpha=0.05$, unimodal), implementados no programa Instat® v.3.06.

Análises de hibridação

Para a detecção de hibridação foi utilizada a análise Bayesiana de agrupamento e atribuição implementada no programa STRUCTURE (Pritchard et

al., 2000), que estima qual proporção do genótipo de um indivíduo se origina potencialmente de hibridação. Os peixes genotipados foram designados a dois grupos de espécies ($k=2$; i.e. *C. kelberi* e *C. piquiti*) utilizando cinco corridas independentes para cada K , com 1.000.000 de repetições de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) após *burn-in* de 500.000. A análise resulta em um valor q para cada indivíduo que varia de 0 a 1 e representa a média da probabilidade posterior de ancestralidade (i.e. a proporção do genoma do peixe que apresenta ancestralidade de *C. piquiti* ou *C. kelberi*). Neste estudo considerou-se um ponto de corte (*threshold*) de 0.05 nas duas bordas (i.e. $q \geq 0.95$ como *C. piquiti* puro e ≤ 0.05 como *C. kelberi* puro) como descrito em Schwartz e Beheregaray (2008).

Resultados

Cichla piquiti

Os loci de microssatélites apresentaram entre 3 e 10 alelos por locus. O locus Tuc4, apesar de fixado na população nativa, apresentou polimorfismo nas populações introduzidas, sendo assim mantido na análise. Os loci que apresentaram maior variação foram Tuc13 e Tuc18, com 10 alelos distintos cada. O locus Tuc11 foi descartado da análise devido ao excesso de falhas na genotipagem, provavelmente provocado por alelos nulos.

A espécie de tucunaré *Cichla piquiti* (tucunaré azul) foi detectada em Minas Gerais na Represa de Itumbiara, em uma lagoa marginal do rio São Francisco e na Represa de Furnas. Todos os índices genéticos estimados -

riqueza alélica (Na), número de alelos exclusivos, número alélico efetivo (Ne) e heteroziguidade esperada (He) - foram maiores para a população nativa do rio Tocantins (Represa de Tucuruí). A heteroziguidade média esperada (índice também chamado de diversidade gênica) foi expressivamente menor nas populações introduzidas quando comparadas com a população nativa de Tocantins (He Tocantins= 0.429; He Itumbiara= 0.063, He São Francisco=

0.027 e He Furnas= 0.209), assim como a riqueza alélica (Na), o número efetivo de alelos (Ne) e alelos exclusivos (Fig. 1 e Tab. 1).

Na população de Furnas foi detectado o maior valor de He entre as populações introduzidas. A análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) dos índices genéticos detectou diferença significativa apenas entre Tocantins e Itumbiara ($P < 0.05$) e entre Tocantins e Lagoa Marginal rio São Francisco

Figura 1. – Índices genéticos analisados nas populações de *Cichla piquiti*. Foram analisados riqueza alélica (Na), número alélico efetivo (Ne), número de alelos exclusivos e heterozigose esperada (He).

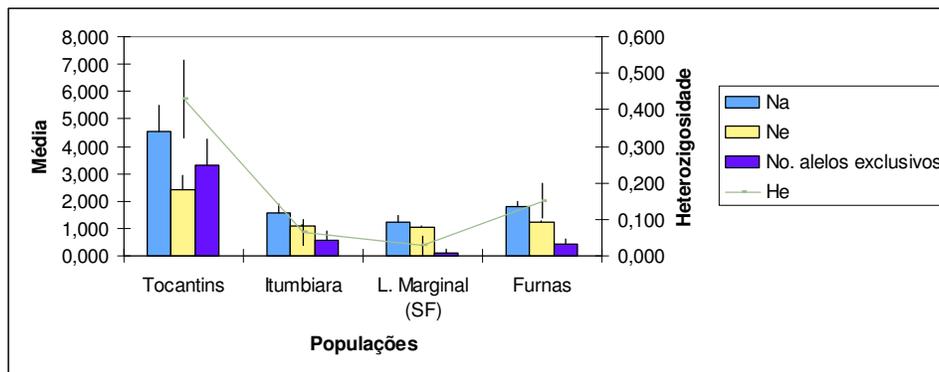


Tabela 1. Valores médios e erros padrão dos índices genéticos analisados nas populações de *Cichla piquiti*: riqueza alélica (Na), número alélico efetivo (Ne), número de alelos exclusivos e heterozigose esperada (He).

Populações	Local (localização no mapa)			
	Tucuruí	Itumbiara	São Francisco	Furnas
Na	4,556 ^a	1,556 ^b	1,222 ^b	1,778 ^{ab}
Ne	2,425 ^a	1,083 ^b	1,036 ^b	1,209 ^{ab}
Número de alelos exclusivos	3,333 ^a	0,556 ^b	0,111 ^b	0,444 ^{ab}
He	0,429 ^a	0,063 ^b	0,027 ^b	0,150 ^{ab}
Valores do erro padrão				
Populações	Tucuruí	Itumbiara	São Francisco	Furnas
Na	0,944	0,338	0,222	0,222
Ne	0,522	0,049	0,036	0,073
Número de alelos exclusivos	0,943	0,338	0,111	0,176
He	0,105	0,036	0,027	0,047

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

($P < 0.01$), não detectando diferença significativa entre Tocantins e Furnas (Tabela 1).

Quando comparadas a heterozigosidade esperada de todas populações introduzidas agrupadas ($H_e = 0.180$), com a população nativa ($H_e = 0.429$), foi detectada diferença estatisticamente significativa (Teste de Wilcoxon, $P = 0.0273$), indicando que as populações introduzidas apresentam redução de diversidade genética.

A análise de variância molecular (AMOVA) estimou que 49% da

significativos ($P < 0.05$). Entre Tocantins e Itumbiara foi observado o maior valor de R_{st} (0.524) e entre Itumbiara e Furnas o menor valor (0.086) (Tabela 2). Dessa maneira, foi detectada estruturação genética entre as populações de *C. piquiti*, considerando que valores acima de 0.05 já indicaria estruturação genética entre as populações (Hartl e Clark, 1997). O índice de fixação F_{st} também foi estimado, mas não houve diferença em relação ao R_{st} quando foram realizadas comparações entre populações nativas e

Tabela 2. Comparação par a par do índice de diferenciação genética R_{st} e número de migrantes (N_m) entre as populações de *C. piquiti*. Os valores de P foram estimados por 10000 permutações.

Populações		R_{st}	N_m	P	
Tocantins	vs	Itumbiara	0,524	0,227	0,000
Tocantins	vs	Lagoa Marginal S. F.*	0,484	0,267	0,000
Tocantins	vs	Furnas	0,506	0,244	0,000
Itumbiara	vs	Lagoa Marginal S. F.*	0,091	2,493	0,003
Itumbiara	vs	Furnas	0,086	2,652	0,006
Lagoa Marginal S. F.*	vs	Furnas	0,103	2,172	0,001

*Lagoa Marginal do rio São Francisco

variação ocorre entre populações e 51% dentro das populações, mostrando uma forte estruturação populacional quando as populações foram comparadas entre si. Entretanto, quando a população nativa foi excluída, a AMOVA estimou que 9 % da variação é encontrada entre as populações introduzidas e 91% dentro dessas populações.

A diferenciação genética par a par entre as populações, detectada pelo R_{st} , foi elevada apenas na correlação entre populações nativas e introduzidas (0.504 em média) e foi moderada entre as populações introduzidas (0.093 em média), sendo todos os valores

introduzidas. O F_{st} , entretanto, superestimou a diferenciação genética entre as populações nativas (dado não apresentado).

Para uma parte dos loci analisados, o déficit de heterozigotos (F_{is}) foi elevado nas populações nativas (Tabela 5 - ANEXO). Os valores de F_{is} variam de -1 a +1, sendo que valores positivos indicam que há déficit de heterozigotos e valores negativos indicam excesso de heterozigotos. Os loci *Tuc5*, *Tuc13*, *Tuc16* e *Tuc18* apresentaram valores acima de 0.2. Valores de F_{is} em populações naturais são tipicamente próximos de zero (Hartl

e Clark, 1997). Dentro de populações muito pequenas, onde podem ocorrer cruzamentos entre parentes, o Fis pode aumentar devido à endogamia.

O fluxo gênico histórico (N_m), medido a partir do R_{st} , foi maior entre as populações introduzidas (média de 2.43) e menor quando comparadas populações nativa e introduzidas (média de 0.246) (Tabela 2).

Analisando apenas as populações nativas, o programa MICRO-CHECKER identificou que o déficit de heterozigotos nos loci Tuc13 e Tuc18 ocorre, possivelmente, devido à presença de alelos nulos. Apenas o locus Tuc18 apresentou desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção sequencial de Bonferroni (Tabela 5 - ANEXO).

Cichla kelberi

Os loci de microssatélites apresentaram entre 1 e 12 alelos por locus. O locus Tuc10, apesar de monomórfico nas populações nativas e introduzidas de *C. kelberi* com apenas o

alelo de 204pb, apresentou alelo distinto nas populações de *C.piquiti* (206pb). Entretanto, em apenas um indivíduo (espécime 152) das populações de *C.piquiti* foi detectado o alelo de 204pb em homozigose, indicando que esse indivíduo pode ser híbrido ou um *C. kelberi* identificado erroneamente. Assim, Tuc10 pode ser considerado um locus espécie-específico (alelo 204 específico para *C. kelberi* e alelo 206 específico para *C. piquiti*), sendo útil na identificação de híbridos.

A espécie de tucunaré *Cichla kelberi* (tucunaré amarelo) foi detectada em Minas Gerais nas Represas de Itumbiara e Três Marias e na Lagoa Dom Helvécio no rio Doce. Todos os índices genéticos estimados (N_a , N_e , H_e e alelos exclusivos) para as populações foram maiores na população nativa do rio Tocantins (Represa de Tucuruí) (Fig. 2). Entretanto, o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis não detectou diferenças significativas entre os índices genéticos analisados (Tabela 3). O gráfico da figura 2 mostra queda

Figura 2 – Índices genéticos analisados nas populações de *Cichla kelberi*. Foram analisados riqueza alélica (N_a), número alélico efetivo (N_e), número de alelos exclusivos e heterozigose esperada (H_e). Valores numéricos e estatística descritos na tabela 4 (ANEXO).

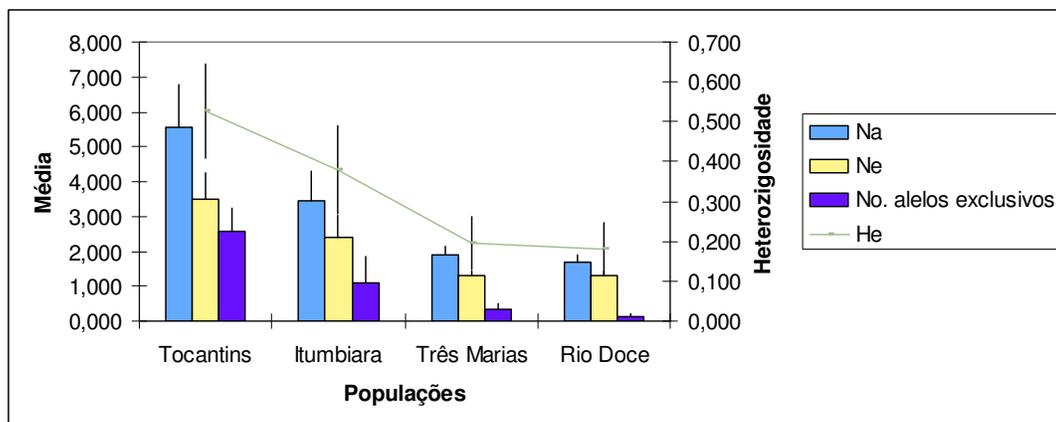


Tabela 3. Valores médios e erros padrão dos índices genéticos analisados nas populações – *Cichla kelberi*: riqueza alélica (Na), número alélico efetivo (Ne), número de alelos exclusivos e heterozigose esperada (He).

Populações	Local (localização no mapa)			
	Tucuruí	Itumbiara	Três-Marias	Rio Doce
Na	5,556 ^a	3,444 ^a	1,889 ^a	1,667 ^a
Ne	3,480 ^a	2,412 ^a	1,326 ^a	1,294 ^a
Número de alelos exclusivos	2,556 ^a	1,111 ^a	0,333 ^a	0,111 ^a
He	0,527 ^a	0,379 ^a	0,197 ^a	0,179 ^a
Valores do erro padrão				
Populações	Tucuruí	Itumbiara	Três-Marias	Rio Doce
Na	1,215	0,868	0,261	0,236
Ne	0,781	0,637	0,124	0,116
Número de alelos exclusivos	0,669	0,754	0,167	0,111
He	0,119	0,112	0,067	0,067

Médias seguidas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste Kruskal-Wallis (P<0,05).

progressiva dos valores médios da riqueza alélica (Na), heterozigose (He) e número alélico efetivo (Ne) da população nativa (Tocantins) em direção às populações introduzidas.

Quando comparadas a heterozigosidade esperada de todas as populações introduzidas agrupadas (He=0.48) com a população nativa (He=0.527), não detectamos diferenças estatísticas significativas (Teste de

Wilcoxon, P=0.0977). Indicando que não houve perda de diversidade genética na introdução dessa espécie.

A análise de variância molecular (AMOVA) estimou que 46% da variação ocorre entre populações e 54% dentro das populações, mostrando uma forte estruturação populacional. Entretanto, quando a população nativa foi excluída, a AMOVA estimou que 41% da variação é encontrada entre as

Tabela 4. Comparação par a par do índice de diferenciação genética Rst e número de migrantes (Nm) entre as populações de *C.kelberi*. Os valores de P foram estimados por 10000 permutações.

Populações		Rst	Nm	P
Tocantins	vs Itumbiara	0,348	0,468	0,000
Tocantins	vs Três Marias	0,646	0,137	0,000
Tocantins	vs Rio Doce	0,466	0,286	0,000
Itumbiara	vs Três Marias	0,483	0,268	0,000
Itumbiara	vs Rio Doce	0,369	0,427	0,000
Três Marias	vs Rio Doce	0,234	0,818	0,000

populações introduzidas e 59% está dentro dessas populações.

Quando estimado o índice R_{st} , a diferenciação genética entre as populações foi elevada não apenas entre a população nativa e as introduzidas (0.486% em média), mas também entre as populações introduzidas (0.362% em média). Entre as populações do Tocantins e de Três Marias foi detectada a maior diferença ($R_{st} = 0.646\%$) e entre a de Três Marias e do rio Doce, a menor ($R_{st} = 0.234\%$). Dessa maneira, observamos uma forte estrutura genética entre as populações de *C. kelberi* (Tabela 4).

O fluxo gênico histórico (N_m), estimado pelo R_{st} , foi pequeno entre populações introduzidas (média de 0.297) e também entre nativa e introduzidas (média de 0.362) (Tabela 4).

A maioria dos loci apresentou déficit de heterozigotos na população nativa, sendo a única exceção o locus Tuc12. Os loci Tuc3, Tuc13 e Tuc16 apresentaram valores acima de 0.4 (Tabela 5 - ANEXO).

Analisando apenas a população nativa, o programa MICRO-CHECKER identificou a presença de alelos nulos como motivo provável para o déficit de heterozigotos (F_{is}) nos loci Tuc3, Tuc9, Tuc13, Tuc16 e Tuc18. Para o locus Tuc3, o MICRO-CHECKER também identificou possíveis erros no *scoring*, provavelmente devido ao *stuttering*. Os *stutters* são produtos de “deslizes” durante a amplificação da região microssatélite, sendo comuns em loci dinucleotídeos, como o locus Tuc3.

A maior parte dos loci apresentou desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, mesmo após o ajuste para comparações sequenciais de

Bonferroni. A única exceção foi o locus Tuc12 (Tabela 5 - ANEXO).

Análises de Híbridação

A análise de designação realizada no programa STRUCTURE foi eficiente na separação entre as espécies *C. piquiti* (Fig. 3, cor verde) e *C. kelberi* (figura 3, cor vermelha), sendo possível a detecção de dois híbridos entre as espécies na população nativa (*C. piquiti* indivíduo 152 e *C. kelberi* indivíduo 63). Nas populações introduzidas não foram detectados valores significativos de q (valor $q \geq 0.95$ para *C. piquiti* e $q \leq 0.05$ para *C. kelberi*), indicando a ausência de híbridos nessas populações.

Na população nativa de *C. piquiti* o indivíduo 152 (Fig. 3) apresentou moderado grau de hibridação ($q=0.80$), já que um valor de q maior ou igual a 0.95 significaria um indivíduo *C. piquiti* puro. O haplótipo mitocondrial desse indivíduo foi congruente a um haplótipo dessa espécie.

Alguns indivíduos de *C. kelberi* apresentaram padrões morfológicos intermediários (entre *C. piquiti* e *C. kelberi*), indicando possível hibridação nas populações nativas. Entre esses possíveis híbridos, apenas o indivíduo 63 de *C. kelberi* apresentou elevado valor de q ($q=0.70$, pois $q \leq 0.05$ significaria *C. kelberi*), indicando elevado grau de hibridação. Esse indivíduo foi também o único entre os possíveis híbridos que não apresentou haplótipo mitocondrial congruente para *C. kelberi*, e sim para *C. piquiti*, o que pode explicar o elevado índice q detectado para ele ao utilizar os dados de microssatélites (Fig. 3). Não se pode excluir a possibilidade de erro na identificação taxonômica, já que esse

espécime apresentou padrão morfológico duvidoso.

Discussão

No presente trabalho, marcadores moleculares microssatélites desenvolvidos por Carvalho et al (2009) foram utilizados com sucesso na caracterização da estrutura intra e interpopulacional das espécies de tucunaré (*C. piquiti* e *C. kelberi*) introduzidas em Minas Gerais e de sua população fonte (rio Tocantins).

As populações introduzidas de *C. piquiti* apresentaram reduzida diversidade genética quando comparadas com a população nativa do rio Tocantins, para todos os índices genéticos estimados (Fig. 1) com valores estatisticamente significativos (Tabela 1). Esse resultado foi congruente com os dados obtidos com o mtDNA, já que nas populações introduzidas de *C. piquiti* também foi detectada menor diversidade de haplótipos mitocondriais (1 haplótipo,

n=48) quando comparada com a população nativa (6 haplótipos, n=20) (Cap. 1). Fica evidente, assim, um forte efeito fundador nas populações introduzidas dessa espécie.

Nas populações de *Cichla kelberi* foi detectada redução nos valores dos índices genéticos (H_e , N_a , N_e e alelos exclusivos – Fig. 2) nas populações introduzidas. Entretanto, os valores não foram significativos quando testados pela estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis (Tabela 3), mesmo quando foi observado redução de até 70% no valor de H_e (Tocantins com rio Doce e Três Marias). Entre Tocantins e Itumbiara a redução na H_e foi menor, apenas 36%, resultado congruente com a análise do DNA mitocondrial da espécie *C. kelberi* nas populações introduzidas (Cap. 1), que também indicou maior diversidade haplotípica em Itumbiara (3 haplótipos, n=18) quando comparada com a de outras populações introduzidas dessa mesma espécie (1 haplótipo, n=32).

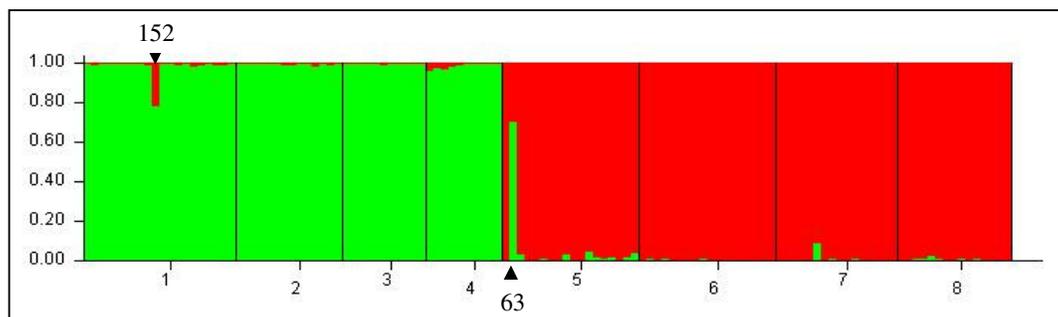


Figura 3. Gráfico de barras gerado no programa STRUCTURE, representando a atribuição dos genótipos (q) para cada espécie em suas respectivas populações. As populações analisadas foram numeradas de 1 a 8, sendo: 1 a 4 populações da espécie *C. piquiti* (1- Tocantins, 2- Itumbiara, 3- Lagoa Marginal São Francisco, 4 - Furnas) e 5 a 8 populações da espécie *C. kelberi* (5- Tocantins, 6- Itumbiara, 7- Três Marias, 8- Rio Doce). Os valores de $q \geq 0.95$ (verde) indicam indivíduos com genótipos atribuídos a *C. piquiti* e de $q \leq 0.05$ a *C. kelberi* (vermelho). Os híbridos 152 e 63 foram destacados no gráfico.

A comparação da heterozigosidade esperada (H_e) entre a população nativa e todas as populações introduzidas agrupadas foi significativa apenas para a espécie *C. piquiti*, indicando maior efeito fundador para esta espécie do que para *C. kelberi*.

A análise de variância molecular (AMOVA) identificou maior similaridade genética entre as populações introduzidas de *C. piquiti* quando a população nativa foi excluída da análise (91% dentro e 9% entre populações). Já para a espécie *C. kelberi*, foi detectada maior diferenciação genética entre as populações introduzidas (59% dentro e 41% entre populações). Entre as populações introduzidas, *Cichla kelberi* apresentou maior riqueza alélica (Média = 2.41 ± 0.94) em comparação com *C. piquiti* (Média = 1.48 ± 0.28). Esses resultados evidenciam maior efeito gargalo e deriva genética para as populações de *C. piquiti*, provavelmente devido a um forte efeito fundador.

Lindholm et al. (2005) analisaram populações introduzidas do peixe *guppy* (*Poecilia reticulata*) na Austrália e mostraram severa redução na diversidade genética. A diversidade alélica em dez loci de microssatélites foi reduzida em 63% nas populações introduzidas e a heterozigose em 28%. O número de haplótipos mitocondriais (região controle) também foi reduzido nas populações introduzidas quando comparado ao número da população fonte. Os autores sugerem que os dados moleculares indicam efeito fundador e/ou efeito gargalo nas populações introduzidas e que a identificação da diversidade genética com marcadores moleculares neutros pode não ser a

ferramenta ideal para se deduzir a capacidade invasora de uma espécie.

Para uma parte dos loci analisados, o déficit de heterozigotos (F_{is}) foi elevado nas populações nativas (Tabela 5 - ANEXO) do tucunaré. Diversos fatores podem levar as populações à deficiência de heterozigotos, incluindo: endogamia, seleção contra heterozigotos, presença de alelos nulos, erro na genotipagem e/ou efeito Wahlund. Alelos nulos são alelos que não são amplificados - usualmente devido à mutação na região de ligação do *primer*, comumente descrita em estudos de microssatélites para explicar déficits de heterozigotos (Pemberton et al., 1995). O programa MICRO-CHEKER detectou a presença de alelos nulos para alguns loci analisados neste trabalho, o que pode ter levado ao desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg na população nativa de *C. kelberi* (seis entre os oito loci polimórficos). O fato dos microssatélites terem sido desenvolvidos para a espécie *C. piquiti* e serem utilizados como *primers* heterólogos em *C. kelberi* pode ser a explicação para esse déficit.

Segundo Hartl e Clark (1997), valores de F_{st} (índice análogo ao R_{st}) entre 0 e 0.05 indicam baixa estruturação genética; valores entre 0.05 e 0.15 indicam estruturação genética moderada; valores entre 0.15 e 0.25 indicam estruturação alta e valores acima de 0.25 indicam uma forte estruturação genética. Os valores de F_{st} são geralmente inversamente relacionados à habilidade de dispersão. Baixas taxas de fluxo gênico entre fragmentos, fazem com que as populações se diferenciem, tornando-se endogâmicas e fazendo com que o R_{st} aumente. O índice de

diferenciação genética entre populações (Rst) indicou forte estruturação populacional para *C. piquiti* (Rst médio de 0.299) e para *C. kelberi* (Rst médio de 0.424). O número de migrantes por geração (Nm), calculado utilizando-se os valores de Rst, indica que a migração de tucunarés entre as populações introduzidas dentro das bacias de Minas Gerais é baixa para *C. kelberi* (Nm= 0.362) e moderada para *Cichla piquiti* (Nm= 2.43).

Também é interessante notar o fato de que as espécies *C. kelberi* e *C. piquiti* ocorrem em simpatria no rio Tocantins, onde já foram descritas hibridações entre essas espécies (Andrade et al., 2001). Entre os indivíduos da população nativa de *C. kelberi* com padrões morfológicos duvidosos, apenas o indivíduo 63 não apresentou congruência entre o haplótipo mitocondrial e o morfotipo. Esse resultado foi também detectado na análise com microssatélites (Fig. 3) e reforça o poder da análise Bayesiana de atribuição (STRUCTURE) na detecção de híbridos e/ou erro taxonômico utilizando marcadores microssatélites. Não podemos descartar erro de identificação morfológica dos tucunarés na população de Tocantins, visto a dificuldade de identificação baseada apenas na morfologia e a identificação de apenas um indivíduo considerado híbrido nessa espécie. Análises morfométricas detalhadas desse indivíduo podem elucidar essa questão.

Oliveira et al., (2006) utilizaram marcadores mitocondriais (região controle) e nucleares (RAPD) e analisaram populações introduzidas de tucunaré nos rios Paranapanema, Tietê e Paraná, no sul do Brasil. O mtDNA dessas espécies correspondem a *C.*

kelberi, *C. piquiti* e uma outra espécie de tucunaré não identificada (Cap. 1). Os autores detectaram introduções múltiplas (bacia do Tocantins e Amazonas), com elevada diversidade haplotípica (pelo menos 8 haplótipos para tucunaré amarelo e 6 para tucunaré azul) e também híbridos entre os tucunarés introduzidos. Em contraste, nas bacias hidrográficas de Minas Gerais, foram detectados haplótipos de tucunarés provenientes apenas da bacia do rio Tocantins (Cap. 1) e ainda não foram identificados híbridos nas populações introduzidas, sugerindo que o número de atos introdutórios em Minas Gerais é inferior ao encontrado para a bacia do Paraná, no sul do Brasil.

Nas populações em Minas Gerais, foi detectado *C. kelberi* e *C. piquiti* em simpatria apenas em Itumbiara, sem indícios de ocorrência de hibridação (Fig. 3). No rio São Francisco as duas espécies foram detectadas, mas não em simpatria (*C. kelberi* na represa de Três Marias e *C. piquiti* em uma lagoa marginal no médio São Francisco – distantes pelo menos 500 km). A detecção de simpatria apenas em Itumbiara é mais um indício de que esse local recebeu maior número de peixes na formação de sua população ou ocorreram múltiplas introduções com peixes provenientes exclusivamente do rio Tocantins, reforçando os resultados genéticos obtidos (mtDNA e microssatélites) que mostram maior variabilidade genética em Itumbiara na espécie *C. kelberi*.

Gomiero e Braga (2004) também detectaram duas espécies de tucunaré no reservatório de Volta Grande (rio Grande, alto rio Paraná). No presente trabalho, não se analisou essa população, mas fatores como as

espécies presentes em simpatria em Volta Grande e a maior diversidade genética das populações introduzidas de Itumbiara (rio Paranaíba) e Furnas (rio Grande) (todas localizadas no alto rio Paraná) são fortes indícios de que o alto rio Paraná foi alvo de atos introdutórios mais intensos e possivelmente serviu de fonte intermediária para outras introduções em Minas Gerais.

Populações invasoras podem ser fundadas múltiplas vezes com um grande número de indivíduos. Nesse caso, a diversidade genética pode ser apenas levemente reduzida na área invadida, como observado para a árvore *Schinus terebinthifolius* introduzida nos Estados Unidos (Williams et al., 2005) e para o mexilhão *Dreissena rostriformis bugensis* (Therriault et al., 2005), ou até mesmo ser maior do que nas áreas nativas (e.g. Allendorf e Lundquist, 2003; Walker et al., 2003). Entretanto, populações invasoras depauperadas geneticamente devido a uma única introdução com número reduzido de propágulos, também foram observadas em espécies como o besouro da batata (*Leptinotarsa decemlineata*, Grapputo et al., 2005), o arbusto *Cledemia hirta* (DeWalt e Hamrick, 2004), a abelha solitária *Lasioglossum leucozonium* (Zayed et al., 2007) e o molusco marinho *Rapana venosa* (Chandler et al., 2008).

Mesmo que a população fundadora seja pequena, a diversidade genética pode ser mantida se o tamanho populacional se recuperar rapidamente após a introdução, como observado para o coelho europeu *Oryctolagus cuniculus* (Zenger et al., 2003). Se introduções múltiplas ocorrerem com linhagens da população nativa geneticamente diferente, cruzamentos interespecíficos

poderão levar a um aumento na heterozigose ou a novas combinações alélicas na população da nova área ocupada (Ellstrand e Schierenbeck, 2000; Oliveira et al., 2006). Isso poderia aumentar a diversidade genética nas populações das áreas invadidas, um padrão observado para o lagarto marrom *Anolis sagrei* (Kolbe et al., 2004), os moluscos *Melanoides tuberculata* (Falcon et al., 2008), o capim *Ambrosia artemisiifolia* (Genton et al., 2005) e para o próprio tucunaré (Oliveira et al., 2006).

Quando um pequeno número de indivíduos é introduzido e se estabelece em uma nova região, a diversidade genética da espécie nas áreas invadidas pode ser drasticamente reduzida em comparação com a diversidade nas áreas nativas. Esse fenômeno é conhecido como efeito fundador (Hartl e Clark, 1997). O efeito gargalo e a deriva genética em pequenas populações são fenômenos que também contribuem para a redução da variação genética (Nei et al., 1975; Husband e Barret, 1991).

Se for considerado que as populações de tucunaré foram introduzidas nas bacias hidrográficas de Minas Gerais por meio de pequenos eventos fundadores adicionais, que por sua vez originaram diversos efeitos gargalo em série, espera-se detectar uma forte assinatura de deriva genética. Tal assinatura seria evidenciada por estrutura populacional significativa, isolamento por distância e redução gradativa da diversidade genética do local de introdução inicial até o local de colonização (Hutchison e Templeton 1999; Ramachandran et al., 2005).

Os dados genéticos das populações introduzidas nas bacias

hidrográficas em Minas Gerais mostraram forte estruturação genética (Rst), redução gradativa de diversidade (He e outros - Fig. 1 e 2) e forte efeito fundador. Sugere-se, assim, um efeito gargalo em série (devido ao efeito fundador), com as introduções realizadas do alto rio Paranaíba (Itumbiara) e rio Grande (Furnas) (locais que apresentaram maior diversidade genética) em direção ao interior de Minas Gerais, na bacia do São Francisco e rio Doce (locais com menor diversidade genética). Entretanto, para a espécie *C. kelberi*, a redução da diversidade genética (He) não foi estatisticamente significativa quando comparamos populações nativas vs. introduzidas, possivelmente indicando a introdução de maior número de propágulos, com efeito fundador moderado.

Dessa forma, foram observados diferentes padrões genéticos e de distribuição geográfica para cada espécie de tucunaré, sugerindo que *C. kelberi* e *C. piquiti* apresentam processos introdutórios distintos, mas sem indícios de hibridação nas áreas invadidas.

A perda da variação genética por deriva e a endogamia em pequenas populações são fatores que podem contribuir para a extinção de populações pequenas, como ocorre com algumas espécies em risco de extinção (Frankham e Ralls, 1998). Entretanto, o sucesso de espécies à invasão de um novo ambiente promove um paradoxo: como essas populações fundadoras - com diversidade genética reduzida e, conseqüentemente adaptabilidade também reduzida - apresentam a capacidade de colonizar e dominar uma grande área em um novo habitat e se

tornarem invasoras (Allendorf e Lundquist, 2003; Frankham, 2005)? Estudos teóricos e empíricos sugerem que o número de introduções é frequentemente correlacionado positivamente com o sucesso de invasão (Allendorf e Lundquist, 2003; Colautti et al., 2006), um conceito conhecido como “pressão de propágulo”.

Apesar de sua baixa diversidade genética, principalmente na espécie *C. piquiti*, o tucunaré mostrou sinais evidentes de que se estabeleceu com sucesso no ambiente receptor, sendo ele um ambiente impactado, como represas hidroelétricas (e.g. Itumbiara, Três Marias e Furnas) ou lago natural (e.g. rio Doce). Esse dado contradiz a hipótese de que uma elevada diversidade genética ou introduções múltiplas com forte pressão de propágulo sejam necessárias para o sucesso de uma invasão biológica. Tal constatação deve dificultar a fiscalização e o controle eficaz do tucunaré, visto que um pequeno número de espécimes pode ser capaz de colonizar e se tornar invasor em um novo habitat.

Conclusões

Os microsatélites desenvolvidos foram úteis para o estudo genético populacional das espécies de tucunaré introduzidas nas principais bacias hidrográficas de Minas Gerais.

Foi detectada uma forte redução de diversidade genética para a espécie *C. piquiti* nas áreas invadidas em relação à população nativa.

Há indícios de redução de diversidade nas populações de *C. kelberi*.

A redução na diversidade genética e a forte estruturação populacional (Rst) entre populações nativas e introduzidas indicam que houve efeito fundador para as duas espécies. Para a espécie *C. kelberi*, parece ter ocorrido uma introdução com maior número de propágulos.

A forte estruturação genética (Rst) na maioria das populações introduzidas indica que o fluxo gênico deve ser restrito ou inexistente, sendo o efeito fundador e a deriva genética os principais fatores responsáveis por essa estruturação.

A análise de designação detectou híbridos apenas nas populações nativas.

Os resultados mostram assinatura genética de introduções do tucunaré no sudeste brasileiro, com maior intensidade na bacia do alto rio Paraná (Paranaíba e Furnas). O tucunaré teria depois propagado para outras bacias (São Francisco, Doce e Grande) por meio de pequenos eventos fundadores adicionais.

As espécies *C. piquiti* e *C. kelberi* apresentam processo introdutório distinto, não sendo introduzidas concomitantemente nos locais analisados dentro do estado de

Minas Gerais. Isso é um indício de que foram realizadas translocações em pequena escala e com poucos indivíduos, típica translocação feita por pescadores amadores.

A plasticidade adaptativa do tucunaré não foi afetada pela reduzida variabilidade genética, mesmo quando comparamos populações de ambientes impactados (represas) com populações de lagos naturais.

Referências Bibliográficas

- ANDRADE, F.; SCHNEIDER, H.; FARIAS, I.; FELDBERG, E.; SAMPAIO, I. Análise filogenética de duas espécies simpátricas de tucunaré *Cichla*, Perciformes., com registro de hibridização em diferentes pontos da bacia amazônica. *Rev. Virt. Inic. Acad. UFPA*, v. 1, p. 1-11, 2001.
- ALLENDORF, F.W.; LUNDQUIST, L.L. Introduction: Population biology, evolution, and control of invasive species. *Conserv. Biol.*, v. 17, p. 24–30, 2003.
- CARVALHO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; SAMPAIO, I.; BEHEREGARAY, L.B. Microsatellite markers for the Amazon peacock bass (*Cichla piquiti*). *Mol. Ecol. Resour.*, v. 9, p. 239-241, 2009.
- CHANDLER, E.A.; MCDOWELL, J.R.; GRAVES, J.E. Genetically monomorphic invasive populations of rapa whelk, *Rapana venosa*. *Mol. Ecol.*, v.17, n.18, p. 4079-4091, 2008.

- CRONIN, M.A.; SPEARMAN, W.J.; WILMOT, R.L.; PATTON, J.C.; BICKHAM, J.W. Mitochondrial DNA variation in Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and Chumsalmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 50, p. 708–715, 1993.
- COLAUTTI, R.I.; GRIGOROVICH, I.A.; MACISAAC, H.J. Propagule pressure: A null model for biological invasions. *Biol. Invasions*, v. 8, p. 1023–1037, 2006.
- DEWALT, S.J.; HAMRICK, J.L. Genetic variation of introduced Hawaiian and native Costa Rican populations of an invasive tropical shrub, *Clidemia hirta* (Melastomataceae). *Am. J. Bot.*, v. 91, p. 1155–1162, 2004.
- DLUGOSCH, K.M.; PARKER, I.M. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol. Ecol.*, v. 17, p. 431–449, 2008.
- ELLSTRAND, N.C.; SCHIERENBECK, K.A. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 7043–7050, 2000.
- EXCOFFIER, L. (1995). AMOVA 1.55 (Analysis of Molecular Variance). University of Geneva, Geneva.
- ELTON, C.S. *The ecology of invasions by animals and plants*. London: Chapman and Hall, 1958. 181p.
- FACON, B., POINTIER, J.P.; JARNE, P.; SARDA, V.; DAVID, P. High genetic variance in life-history strategies within invasive populations by way of multiple introductions. *Curr. Biol.*, v. 18, p. 363–367, 2008.
- FRANKHAM, R.E.; RALLS, K. Conservation biology: inbreeding leads to extinction. *Nature*, v. 392, p. 441–442, 1998.
- FRANKHAM, R. Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity*, v. 94, p. 385, 2005.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. *A primer of conservation genetics* London: Cambridge University Press, 2008. 220p.
- FULLER, P.L.; NICO, L.G.; WILLIAMS, J.D. *Non-indigenous fishes introduced into inland waters of the United States*. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 1999. 622p.
- GASKIN, J.F.; ZHANG, D.Y.; BON, M.C. Invasion of *Lepidium draba* (Brassicaceae) in the Western United States: distributions and origins of chloroplast haplotypes. *Mol. Ecol.*, v. 14, p. 2331–2341, 2005.
- GENTON, B.J.; SHYKOFF, J.A.; GIRAUD, T. High genetic diversity in French invasive populations of

- common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Mol. Ecol.*, v. 14, p. 4275–4285, 2005.
- GOMIERO, L.M. e BRAGA, F.M. Feeding of introduced species of *Cichla* (Perciformes, Cichlidae) in Volta Grande reservoir, river Grande (MG/SP). *Braz. J. Biol.*, v. 64, n. 4, p. 787-795, 2004.
- GOODELL, K.; PARKER, I.M.; GILBERT, G.S. Biological impacts of species invasions: implications for policy makers. In: NATL. RES. COUNC. US. (ed) *Incorporating Science, Economics, and Sociology in Developing Sanitary and Phytosanitary Standards in International Trade*, Washington, DC: Natl. Acad. Sci. Press. 2000. p. 87-117.
- GRAPPUTO, A.; BOMAN, S.; LINDSTROM, L.; LYYTINEN, A.; MAPPE, J. The voyage of an invasive species across continents: Genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Mol. Ecol.*, v. 14, p. 4207–4219, 2005.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARTL, D.L.; CLARK, A.G. *Principles of population genetics*. 3 ed. Canada: Sinauer, 1997. 542p.
- HUSBAND, B.C.; BARRETT, S.C.H. Colonization history and population genetic structure of *Eichornia paniculata* in Jamaica. *Heredity*, v. 66, p. 287–296, 1991.
- HUTCHINSON, G. E. *Concluding remarks*. In: COLD SPRING HARBOR SYMPOSIUM ON QUANTITATIVE BIOLOGY v. 22, 1957. p. 415-427.
- HUTCHISON, D.W.; TEMPLETON, A.R. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: Inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*, v. 53, p. 1898–1914, 1999.
- IMARNR (INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS). *Espécies invasoras: situação brasileira*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2006. 24p.
- KOLAR, C.S.; LODGE, D.M. Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends Ecol. Evol.*, v. 16, p. 199–204, 2001.
- KOLBE, J.J.; GLOR, R.E.; SCHETTINO, L.R.G.; LARA, A.C.; LARSON, A.; LOSOS, J.B. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*, v. 431, p. 177–181, 2004.
- KULLANDER, S.O.; FERREIRA, E.J.G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyol.*

- Explor. Freshwat.*, v. 17, p. 289-398, 2006.
- LOCKWOOD J.L.; CASSEY, P.; BLACKBURN, T. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends Ecol. Evol.*, v. 20, n. 5, p. 223-228, 2005.
- LINDHOLM, A.K.; BREEDEN, F.; ALEXANDER, H.J.; CHAN, W.K.; THAKURTA, S.G.; BROOKS, R. Invasion success and genetic diversity of introduced populations of guppies *Poecilia reticulata* in Australia. *Mol. Ecol.*, v. 14, p. 3671-3682, 2005.
- MARRS, R. A., SFORZA, R., & HUFBAUER, R. A. Evidence for multiple introductions of *Centaurea stoebe micranthos* (spotted knapweed, Asteraceae) to North America. *Mol. Ecol.*, v. 17, p. 4197-4208, 2008.
- MEYER, A.; KOCHER, T.D.; BASASIBWAKI, P.; WILSON, A.C. Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* v. 347, p. 550-553, 1990.
- MUIRHEAD, J.R.; GRAY, D.K.; KELLY, D.W.; ELLIS, S.M.; HEATH, D.D.; MACISAAC, H.J. Identifying the source of species invasions: sampling intensity vs. genetic diversity. *Mol. Ecol.*, v. 17, p. 1020-1035, 2008.
- NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, v. 29, p. 1-10, 1975.
- OLIVEIRA, A.V.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; BIGNOTTO, T.S.; JÚLIO, H.F.; CARRER, H.; AGOSTINHO, C.S.; PRIOLI, L.M. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. *J. Fish Biol.*, v. 69 B, p. 260-270, 2006.
- PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*, v. 6, p. 288-295.
- PEMBERTON, J.M.; SLATE, J.; BANCROFT, D.R.; BARRET, J.A. Non amplifying alleles at microsatellite loci: A caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.*, v. 4, p. 249-52, 1995.
- PIMENTEL, D.; ZUNIGA, R.; MORRISON, D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecol. Econ.*, v. 52, p. 273-288, 2005.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M. & DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v.155, p. 945-959, 2000.
- RAMACHANDRAN, S.; DESHPANDE, O.; ROSEMAN, C.C.; ROSENBERG, N.A.; FELDMAN, M.W.; CAVALLI-SFORZ, L.L.. Support from the

- relationship of genetic and geographic distance in human populations for a serial founder effect originating in Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 102, p. 15942–15947, 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 253p.
- SAKAI, A.K.; ALLENDORF, F.W.; HOLT, J.S.; et al. The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v. 32, p. 305–332 2001.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnol.*, v. 18, p. 233–234, 2000.
- SCHWARTZ, T. S. E BEHEREGARAY, L. B. Using genotype simulations and Bayesian analyses to identify individuals of hybrid origin in Australian bass: lessons for fisheries management. *J. Fish Biol.*, v. 72, p. 435–450, 2008.
- SIMBERLOFF, D. Confronting introduced species: a form of xenophobia? *Biol. Invasions*, v. 5, p. 179–192, 2003.
- SLATKIN M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v. 139, p.457-462, 1995
- SVED, J.A.; YU, H.; DOMINIAK, B.; GILCHRIST, A.S. Inferring modes of colonization for pest species using heterozygosity comparisons and a shared-allele test. *Genetics*, v. 63, p. 823-831, 2008.
- TERRIAULT, T.W.; ORLOVA, M.I.; DOCKER, M.F.; MACISAAC, H.J.; HEATH, D.D. Invasion genetics of a freshwater mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in eastern Europe: high gene flow and multiple introductions. *Heredity*, v. 95, p. 16–23, 2005.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON T.J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F. e HIGGINS D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for mutiple sequence alingnment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* v. 24, p.4876-4882.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correction genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes*, v. 4, p. 55-538, 2004.
- WALKER, N.F.; HULME, P.E.; HOELZEL, A.R. Population genetics ofan invasive species, *Heracleum mantegazzianum*: implications for the role of life history, demographics and independent introductions. *Mol. Ecol.*, v. 12, p. 1747–1756, 2003.
- WELCOMME, R. L. International introductions of inland aquatic species. *FAO Fisheries Technical Paper*, n. 294, p. 1-318, 1988.
- WRIGHT, S. Systems of mating. *Genetics*, v.6, p. 111-178, 1921.

- WILLIAMS, D.A.; OVERHOLT, W.A.; CUDA, J.P.; HUGHES, C.R. Chloroplast and microsatellite DNA diversities reveal the introduction history of Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius*) in Florida. *Mol. Ecol.*, v. 14, p. 3643–3656, 2005.
- ZAYED, A.; CONSTANTIN, S.A.; PACKER, L. Successful biological invasion despite a severe genetic load. *PloS ONE*, v. 2, n. 9, p. e868, 2007.
- ZENGER, K.R.; RICHARDSON, B.J.; VACHOT-GRIFFIN, A.M. A rapid population expansion retains genetic diversity within European rabbits in Australia. *Mol. Ecol.*, v. 12, p. 789–794, 2003.

ANEXOS

Tabela 5. Loci de microssatélites analisados e seus índices: Fis (índice de endogamia), Ho (heterozigose observada) e He (heterozigose esperada) para as populações nativas de *C. kelberi* e *C. piquiti*.

Loci de Microssatélites/ Espécie	<i>C. kelberi</i> (n=18)			<i>C. piquiti</i> (n=20)		
	Fis	Ho	He	Fis	Ho	He
Tuc12	-0.091	0.833	0.764	-0.026	0.050	0.049
Tuc10	n/a	0.000	0.000	1.0	0.000	0.095
Tuc9	1.0	0.000*	0.215	0.22	0.250	0.320
Tuc3	0.497	0.389*	0.773	-0.03	0.650	0.631
Tuc13	0.772	0.176*	0.773	0.325	0.450	0.666
Tuc4	n/a	0.000	0.000	n/a	0.000	0.000
Tuc5	0.176	0.667*	0.809	0.263	0.500	0.679
Tuc16	0.427	0.333*	0.582	0.242	0.450	0.594
Tuc18	0.194	0.706*	0.875	0.36	0.526*	0.831

* indica os loci fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg

Conclusões gerais

Os haplótipos do DNA mitocondrial detectados nas populações introduzidas no estado de Minas Gerais (Sudeste do Brasil) foram agrupados exclusivamente com os haplótipos das espécies nativas do rio Tocantins, sugerindo a ocorrência de um único ou de poucos atos introdutórios nessa região, realizados com peixes de uma mesma população fonte (rio Tocantins).

Dos dez loci de microssatélites desenvolvidos para a espécie invasora *C. piquiti* (testados com eficiência para *C. kelberi*), nove foram aplicados na caracterização genética das populações introduzidas e da população nativa do rio Tocantins.

Os dados genéticos indicaram que o alto rio Paraná foi o local que recebeu o maior número de espécimes de tucunaré, sendo possivelmente a fonte das demais introduções no estado de Minas Gerais.

Os baixos valores de riqueza alélica (N_a) e heterozigose esperada (H_e) nas populações do rio São Francisco e Doce indicaram que essas populações foram fundadas com número reduzido de espécimes.

A plasticidade adaptativa do tucunaré não foi afetada pela reduzida variabilidade genética, mesmo quando comparamos populações de ambientes impactados (represas) com populações de lagos naturais.

Diversas evidências genéticas sugerem que novos atos introdutórios antrópicos não têm sido realizados continuamente dentro do estado de Minas Gerais.

Os resultados genéticos indicam que introduções com tucunaré proveniente da bacia do rio Tocantins-

Araguaia foram realizadas com maior intensidade na bacia do Paraná. Poucos espécimes de tucunaré foram translocados para outras bacias no estado de Minas Gerais.

Novas invasões do tucunaré podem ocorrer mesmo quando introduzido um pequeno número de espécimes, evidenciando-se uma necessidade extrema de fiscalização e controle para se evitar a propagação desta espécie nas bacias do sudeste brasileiro.