

ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DO MARCADOR MOLECULAR S7 NA DETECÇÃO DE HÍBRIDOS DE *CICHLA* NA PLANÍCIE DE INUNDAÇÃO DO ALTO RIO PARANÁ

Lara Darice Lima¹, Bruno Henrique Miotto Stabile², Nathália A. Diamante³, Alessandra Valéria de Oliveira⁴

¹Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, Campus Sede Maringá/PR, Universidade Estadual de Maringá - UEM. PIC - UEM. laradaricelima@gmail.com

²Doutorando pelo Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Laboratório de Genética Molecular, Universidade Estadual de Maringá (UEM). bhmstabile@gmail.com

³Doutora pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá (UEM). nathaliadiamante@gmail.com

⁴Orientadora, Doutora, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá (UEM). Pesquisadora do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura - Nupélia. avoliveira@uem.br

RESUMO

A ictiofauna de ambientes aquáticos pode ser constituída por organismos nativos e introduzidos que, por sua vez, modificam o ambiente e podem causar impactos como perda da biodiversidade local e alterações genéticas. A planície de inundação do alto rio Paraná se caracteriza por um ecossistema dinâmico que varia entre as fases terrestre e aquática. Dentre os animais não nativos presentes na planície, são documentadas espécies amazônicas de tucunaré, *Cichla* spp., introduzidas, possivelmente devido ao escape de lagoas de pesca recreativa e aumento no rendimento da pesca em curto prazo. Dados moleculares do gênero permitem a caracterização e diferenciação espécies, monitoramento em locais de introdução e informações sobre possíveis hibridizações que ocorrem entre as mesmas. O loci nuclear do intron S7 da proteína ribossomal em peixes se mostrou útil para investigar polimorfismos no DNA e diferenciar espécies, além de análises filogenéticas e detecção de hibridização. O presente estudo visa analisar a presença de híbridos de *Cichla* na planície de inundação do alto rio Paraná, por meio do marcador molecular S7. Após a extração do DNA, fragmentos do intron S7 foram amplificados pela técnica de PCR, purificados e sequenciados. Os programas BioEdit e MEGA 7.0 foram utilizados para edição e cálculos de distância genética das sequências. Os resultados obtidos permitiram a identificação de indivíduos heterozigotos, entretanto, não foi útil para identificação inequívoca de híbridos.

PALAVRAS-CHAVE: Ciclídeos; Espécie invasora; Hibridização; Marcador Genético.

1 INTRODUÇÃO

A ictiofauna de ambientes aquáticos pode ser constituída por organismos nativos e introduzidos, os quais se estabelecem e se sustentam após passarem por pressões no habitat receptor, assim modificando-o de alguma forma. Essas espécies transferidas afetam a fauna local uma vez que competem por recursos, realizam predação exacerbada, modificam o habitat e sistema, e introduzem patógenos e parasitas, dessa forma promovendo impactos ambientais como a perda de biodiversidade local e alterações genéticas. A planície de inundação do alto rio Paraná é um exemplo de habitat no qual são encontradas espécies não nativas, as quais promovem impactos significativos nesse ambiente, como algumas espécies amazônicas transferidas de tucunaré, *Cichla* spp., cujos indivíduos foram intensamente liberados (AGOSTINHO *et al.*, 2007).

Conforme Ota *et al.* (2018) são encontradas duas espécies do referente gênero na planície, *Cichla kelberi* e *C. piquiti*, ambas potencialmente oriundas do escape de lagoas de pesca recreativa. Estudos moleculares evidenciaram, além dessas, a presença de *C. monoculus* na região (GASQUES *et al.*, 2015). Populações de *Cichla* spp. sofreram diversas introduções na planície de inundação do alto rio Paraná, que resultaram em hibridização entre as mesmas devido à quebra no isolamento reprodutivo, a qual não acontece onde essas espécies são nativas (OLIVEIRA *et al.*, 2006, GASQUES *et al.*, 2015). Dados moleculares em *Cichla* spp. permitem a caracterização e diferenciação das espécies (GASQUES *et al.*, 2015), além do monitoramento em locais nos quais essas populações

não são nativas, que permite aprimorar o conhecimento sobre o sistema (AGOSTINHO *et al.*, 2008).

Mutações no DNA geram polimorfismos que podem ser detectados e explorados por marcadores moleculares, que fornecem inúmeras informações ao longo de todo o genoma (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2017). Pode também servir de apoio em estudos ecológicos que visam o manejo de populações híbridas. O loci nuclear do intron S7 da proteína ribossomal em peixes foi amplificado e universalizado (CHOW; HAZAMA, 1998), sendo útil para investigar polimorfismos no material genético. Em ciclídeos, o marcador se mostrou eficaz para análise de hipóteses filogenéticas entre os grupos (PIÁLEK *et al.*, 2012). A investigação e monitoramento da ocorrência de hibridização se faz necessária uma vez que estudos anteriores evidenciaram a presença de ciclídeos híbridos na região da bacia do rio Paraná, os quais podem exercer vantagens competitivas sobre as espécies nativas (OLIVEIRA *et al.*, 2006; ALMEIDA-FERREIRA *et al.*, 2011; GASQUES *et al.*, 2015). A hibridização interespecífica entre ciclídeos pode ocorrer de maneira difundida (SMITH *et al.*, 2003). Assim, o presente trabalho visa analisar a eficiência do marcador molecular s7 na identificação e monitoramento de híbridos de *Cichla* na planície de inundação do alto rio Paraná.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes de *Cichla* sp. foram coletados na planície de inundação do alto rio Paraná, durante os períodos de atividades do Programa Ecológico de Longa Duração (PELD) sítio 6, em março de 2020, com autorização para coleta de material biológico fornecido pelo Ibama (SisBio), número 52596-4 e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) e CONCEA número 1420221018 (ID 001974), nas localidades do Rio Baía, Lagoa dos Patos e Ressaco do Pau Véio. Posteriormente os animais foram sacrificados e identificados por profissionais da Coleção Ictiológica do Nupélia/UEM. Em seguida, porções do tecido muscular foram retiradas e armazenadas em tubos falcon contendo álcool etílico comercial para preservação e extração do material genético. O acesso ao patrimônio genético dos espécimes foi autorizado de acordo com cadastro AED1C39 – SISGEN.

A extração de DNA do tecido muscular foi executada com o kit de extração de DNA Wizard Genomic DNA Purification da Promega, fundamentada de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação do método de reação em cadeia da polimerase (PCR) ocorreu utilizando os *primers* S7i1F e S7i1R, específicos de amplificação das regiões de interesse do intron S7 da proteína ribossomal. Em seguida, os fragmentos amplificados foram purificados com polietilenoglicol (PEG) e sequenciados. As sequências obtidas foram editadas com o uso do programa BioEdit e alinhadas utilizando o MEGA 7.0. Clustal W foi o algoritmo empregado para o alinhamento. O número de haplótipos obtidos foi realizado com o software DNASP6. Sequências de *C. kelberi*, *C. piquiti* e *C. monoculus*, de regiões onde as espécies são nativas foram adicionadas às análises.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram obtidas sequências de DNA de 11 espécimes de *Cichla* sp., coletados entre os dias 03 e 06 de março de 2020 na planície de inundação do alto rio Paraná. Desses, dez foram identificados morfologicamente como *Cichla kelberi* e apenas um (TL10) como *Cichla piquiti*. As sequências obtidas, após edição e alinhamento, resultaram em fragmentos de 255 pares de bases. Foram identificados três sítios polimórficos nas sequências, nas posições 81, 148 e 235, que estão representados na Tabela 1, resultando em quatro

haplótipos (que aqui chamaremos de alelos). Três indivíduos apresentaram dois alelos cada, sendo heterozigotos para a região estudada.

Tabela 1: Local de coleta das amostras, haplótipos e sítios variáveis da região do marcador molecular S7 para as amostras de *Cichla* analisadas neste estudo (TL1 à TL11), e outras sete da região da bacia amazônica (Rio Solimões e Rio Tocantins).

Amostras	Sítios Variáveis			Marcador e Haplótipos	Local de Coleta
	81	148	235	S7	
TL1	G	G	G	H1	Lagoa dos Patos
TL2	G	G	G	H1	Lagoa dos Patos
TL3	G	G	G	H1	Rio Baía
TL4	G	T	G	H2	Rio Baía
TL5	S	G	G	H1/H3	Rio Baía
TL6	G	T	G	H2	Rio Baía
TL7	G	T	G	H2	Rio Baía
TL8	G	K	G	H1/H2	Rio Baía
TL9	S	T	G	H2/H4	Rio Baía
TL10	G	G	G	H1	Ressaco do Pau Véio
TL11	G	T	G	H2	Ressaco do Pau Véio
114 SO_ <i>C. monoculus</i>	G	K	G	H1/H2	Rio Solimões
118 SO_ <i>C. monoculus</i>	G	G	G	H1	Rio Solimões
119 SO_ <i>C. monoculus</i>	G	G	G	H1	Rio Solimões
96 TO_ <i>C. piquiti</i>	G	G	C	H5	Rio Tocantins
99 TO_ <i>C. piquiti</i>	G	G	C	H5	Rio Tocantins
109 TO_ <i>C. kelberi</i>	G	G	G	H1	Rio Tocantins
112 TO_ <i>C. kelberi</i>	G	G	G	H1	Rio Tocantins

Os alelos encontrados não foram exclusivos de cada espécie, sendo assim não foi possível identificá-los nos supostos híbridos. No entanto, nenhum indivíduo coletado apresentou uma deleção nas posições 202 a 204, característica de *C. piquiti*, confirmando que os indivíduos identificados morfologicamente como *C. piquiti* não pertencem a essa espécie. Eventos de hibridização podem dar origem a indivíduos que apresentam características morfológicas intermediárias ou com combinações de caracteres parentais, o que pode dificultar a identificação morfológica de parentais e híbridos. Estudos recentes realizados com espécies de *Cichla* de outras localidades do Brasil revelaram eventos de hibridização desses animais em locais onde ocorreu a introdução, com a presença de indivíduos parentais e híbridos indistinguíveis morfologicamente (DIAMANTE *et al.*, 2020). Em nosso caso, exemplares identificados como *C. piquiti*, podem estar apresentando DNA nuclear de *C. monoculus* ou *C. kelberi* em função de evento de hibridização, conforme já relatado por Oliveira *et al.* (2006), Almeida-Ferreira *et al.* (2011) e Gasques *et al.* (2015). A combinação de marcadores nucleares e mitocondriais, poderá ajudar nesta questão.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A região parcial do marcador molecular S7 estudada não se mostrou eficiente para a detecção de híbridos entre a amostra de peixes analisada, apesar de ter possibilitado a identificação de indivíduos heterozigotos. A amplificação de um marcador mitocondrial para confirmação da presença ou não de híbridos dentre os espécimes coletados se faz necessária, assim como relatado em trabalhos já publicados. A identificação baseada apenas em caracteres morfológicos desses animais pode não ser adequada em alguns

casos, uma vez que híbridos podem apresentar uma combinação de caracteres das diferentes espécies envolvidas.

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: Eduem, 2007.

AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F.M.; GOMES, L.C. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p.1119-1132, 2008.

ALMEIDA-FERREIRA, G.C.; OLIVEIRA, A.V.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S.M.A.P. Spar genetic analysis of two invasive species of Cichla (Tucunaré) (Perciformes: Cichlidae) in the Paraná river basin. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 33, n. 1, p. 79-85, 2011.

CHOW, S.; HAZAMA, K. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 9, p. 1247-1263, 1998.

DIAMANTE, N. A.; OLIVEIRA, A. V.; PETRY, A. C.; CATELANI, P. A.; PELICICE, F. M.; MUELLER, L. P.; PRIOLI, S. M. A. P. PRIOLI, A. J. Genomic markers confirm introgressive hybridization in Cichla (Teleostei) in an invaded coastal system. **Hydrobiology**, p. 1-10, 2020.

FABRIN, T. M. C.; SIMONE, I.; PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; GASQUES, L. S. A utilização de marcadores na filogenia dos ciclídeos (Teleostei:Perciformes): uma análise cienciométrica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 3118-3128, 2014.

GASQUES, L. S.; FABRIN, T. M. C.; GONÇALVES, D. D.; PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J. Prospecting molecular markers to distinguish Cichla kelberi, C. monoculus and C. piquiti. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 37, n. 4, p. 455-462, 2015.

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. **Journal of Fish Biology**, v. 69 (Supplement B), p. 260–277, 2006.

OTA, R.R.; DEPRÁ, G.C.; GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C.S. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: revised, annotated and updated. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 2, p. 1-111, 2018.

PIALEK, L.; RICAN, O.; CASCIOTTA, J.; ZRZAVY, J. Multilocus phylogeny of *Crenicichla* (Teleostei: Cichlidae), with biogeography of the *C. lacustris* group: Species flocks as a model for sympatric speciation in rivers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 1, p. 46-61, 2012.

Turchetto-Zolet A. C.; Turchetto C.; Zanella C. M.; Passaia, G. **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.

SMITH, P.S.; KONINGS, A.D., KORNFIELD, I. Hybrid origin of a cichlid population in lake Malawi: implications for genetic variation and species diversity. **Molecular Ecology**, v.12, p. 2497-2504, 2003.