



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Instituto de Biociências

***Cichlasoma amazonarum* (Kullander, 1983): análises moleculares confirmam mais um
acará amazônico introduzido na Região hidrográfica do Atlântico Sudeste**

Felipe de Souza Cruz Nóbrega

Rio de Janeiro

2018

Felipe de Souza Cruz Nóbrega

Cichlasoma amazonarum (Kullander, 1983): análises moleculares confirmam mais um acará amazônico introduzido na Região hidrográfica do Atlântico Sudeste

Monografia do Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Orientador: Fabiano Salgueiro

Coorientador: Luciano Neves dos Santos

Rio de Janeiro

2018

DE SOUZA CRUZ NÓBREGA, Felipe

Cichlasoma amazonarum (Kullander, 1983): análises moleculares confirmam mais um
acarú amazônico introduzido na Região hidrográfica do Atlântico Sudeste - 2018

X, 26f.

Monografia do Trabalho de Conclusão de Curso

Orientador: Fabiano Salgueiro

1 - *Cichlasoma amazonarum* 2 - espécies não-nativas 3 - identificação molecular

I. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

II. Bacharel em Ciências Ambientais

Felipe de Souza Cruz Nóbrega

Cichlasoma amazonarum (Kullander, 1983): análises moleculares confirmam mais um acará amazônico introduzido na Região hidrográfica do Atlântico Sudeste

Monografia do Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Aprovada em: ____/____/____

Dr. Fabiano Salgueiro, UNIRIO (orientador)

Dra. Jaqueline Gusmão, UERJ

Ma. Ana Clara Sampaio Franco, UNIRIO

Agradecimentos

Aos meus orientadores Dr. Fabiano Salgueiro e Dr. Luciano Neves dos Santos pela disponibilidade e paciência de estarem me instruindo, por todo suporte, e por muitas vezes servirem como inspiração.

A doutoranda Ana Clara Sampaio Franco pela ajuda e revisão de diversos trabalhos durante minha IC.

Aos amigos do Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular pelo companheirismo.

A minha família, em especial minhas avós Belina e Rose, e aos amigos mais próximos que eu pude fazer durante os anos de graduação.

Aos meus irmãos, Leonardo e Raphael, e aos meus pais, Martha e Marcello, por todos os incentivos e apoio.

Resumo

Nas recentes décadas, o fenômeno de introdução de espécies não-nativas em ambientes de água doce tem se intensificado. Com o aumento do número e frequência de introduções, também aumenta a necessidade de estudos documentando-as. Por meio do estudo da genética de espécies invasoras em seus territórios nativos e invadidos pode-se compreender a história das invasões, entender a dinâmica na população na nova área invadida e, conseqüentemente, propor estratégias para minimizar os efeitos e conseqüências das invasões. Neste trabalho, ferramentas moleculares foram utilizadas para identificar a ocorrência do acará amazônico *Cichlasoma amazonarum* na bacia do Rio Guandu, Rio de Janeiro. Foram coletados 37 peixes, todos identificados morfologicamente como *Cichlasoma amazonarum*. Destes, 27 foram selecionados para as análises genéticas. O sequenciamento do loco CYTB obteve êxito para 22 indivíduos. O resultado do sequenciamento de cada indivíduo foi comparado com a base de dados do GenBank utilizando a ferramenta *Blast*. O *Blast* revelou que sete indivíduos apresentaram sequências CYTB referentes à *Cichlasoma amazonarum*, seis indivíduos apresentaram sequências CYTB referente à *Cichla piquiti*, e nove indivíduos um genótipo “misto”, onde a fita F foi similar a *Cichlasoma amazonarum* e a fita R foi similar a *Cichla piquiti*. As análises prosseguiram apenas com os indivíduos identificados geneticamente como *Cichlasoma amazonarum* “puros”. Análises filogenéticas de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana agruparam as sequências destes sete indivíduos identificados como *Cichlasoma amazonarum* com outras duas sequências desta espécie disponíveis no GenBank, confirmando sua identificação taxonômica como tal. Além da caracterização genética da espécie, a capacidade de invasão de *Cichlasoma amazonarum* é discutida, assim como os potenciais impactos dessa espécie em comunidades nativas. A detecção do mtDNA referente à *Cichla piquiti* para alguns indivíduos foi associada como uma possível contaminação das amostras em laboratório, a amplificação de um pseudogene ou a possíveis eventos de hibridização.

Abstract

In recent decades, the rate of introduction of non-native species in freshwater environments has intensified. As the number and frequency of introductions increases, so does the need for studies recording them. By studying the genetics of invasive species in their native and invaded territories we can understand the history of invasions, the population dynamics in the new invaded area and, consequently, propose strategies to minimize the effects and consequences of invasions. In this study, molecular tools were used to identify the occurrence of the Amazonian Acará *Cichlasoma amazonarum* in the Rio Guandu Basin, Rio de Janeiro. We collected 37 fish, all identified morphologically as *Cichlasoma amazonarum*. Of these, 27 were selected for genetic analysis. The sequencing of the CYTB locus was successful for 22 individuals. The result of the sequencing of each individual was compared to the GenBank database using the Blast tool. Blast revealed that seven individuals presented CYTB sequences related to *Cichlasoma amazonarum*, six individuals had CYTB sequences related to *Cichla piquiti*, and nine individuals had a "mixed" genotype, where F sequence was similar to *Cichlasoma amazonarum* and R sequence was similar to *Cichla piquiti*. The analysis proceeded only with individuals identified genetically as "pure" *Cichlasoma amazonarum*. Phylogenetic analysis of Maximum Likelihood and Bayesian Inference clustered the sequences of these seven individuals identified as *Cichlasoma amazonarum* with two other sequences of this species available in GenBank, confirming their taxonomic identification as such. In addition to the genetic characterization of the species, the invasion capacity of *Cichlasoma amazonarum* is discussed, as well as the potential impacts of this species on native communities. The detection of mtDNA relative to *Cichla piquiti* in some individuals was associated with possible contamination of the samples in the laboratory, amplification of a pseudogene or possible hybridization events.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Foto de um espécime adulto de *Cichlasoma amazonarum* (comprimento padrão = 10,7 cm) coletado na Lagoa do Guandu, Rio Guandu, sudeste do Brasil, e mapa da distribuição de *Cichlasoma amazonarum* no Brasil.

Figura 2. Lagoa do Guandu, localizada no Rio de Janeiro, criada para captação de água para Região Metropolitana do Rio de Janeiro. As coletas foram feitas mais especificamente no braço leste da lagoa. Fonte: Google, CNES / Airbus, DigitalGlobe.

Figura 3. Foto de um espécime adulto de (comprimento padrão = 10,7cm) *Cichlasoma amazonarum* coletado na Lagoa do Guandu, Rio Guandú, sudeste do Brasil.

Figura 4. Gráfico da distribuição das frequências do Comprimento Padrão (CP) de todos os 37 espécimes coletados na Lagoa do Guandu. Comprimento padrão = medida do focinho até o final da última vértebra.

Figura 5. Detalhe de gel de agarose 1% da extração de DNA de oito indivíduos de *Cichlasoma amazonarum* coletados na Lagoa do Guandu. Os números acima de cada amostra representam o código de identificação dos peixes.

Figura 6. Foto de gel de agarose 1% confirmando a amplificação do loco CYTB de 25 indivíduos de *Cichlasoma amazonarum*. Os números acima de cada amostra representam o código de identificação dos peixes.

Figura 7. Eletroferogramas do sequenciamento do CYTB de dois indivíduos de *Cichlasoma amazonarum* coletados na Lagoa do Guandu. (A) eletroferograma de um sequenciamento de baixa qualidade, pois possui diversos picos sobrepostos e uma baixa confiabilidade. (B) eletroferograma de um sequenciamento de boa qualidade, com picos sem sobreposições e uma alta confiabilidade.

Figura 8. Árvore filogenética com modelo de Máxima Verossimilhança baseada no CYTB com as sequências dos indivíduos coletados na Lagoa do Guandu cujas sequencias são referentes

apenas à *Cichlasoma amazonarum*, e com todos os haplótipos de espécies do gênero *Cichlasoma* disponíveis no GenBank. Os números nos ramos representam o resultado do teste de bootstrap com 1000 replicações.

Figura 9. Árvore filogenética com modelo de Inferência Bayesiana baseada no CYTB com as sequências dos indivíduos coletados na Lagoa do Guandu cujas sequências são referentes apenas à *Cichlasoma amazonarum*, e com todos os haplótipos de espécies do gênero *Cichlasoma* disponíveis no GenBank. Os números nos ramos representam os valores de probabilidade posterior obtidos na análise bayesiana.

Figura 10. Foto de gel de agarose 1% com o resultado da PCR dos seis indivíduos selecionados para amplificação do loco RC. Os números abaixo de cada amostra representam o código de identificação dos peixes. Mais abaixo está a identificação de cada indivíduo com o resultado do sequenciamento do loco CYTB.

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivo geral.....	6
2.1 Objetivos específicos.....	6
3. Material e Métodos.....	7
3.1 Área de estudo e coleta das amostras.....	7
3.2 Extração do DNA genômico total.....	8
3.3 Amplificação e sequenciamento do DNA.....	8
3.4 Análise das sequencias.....	9
4. Resultados.....	11
4.1 Coleta das amostras.....	11
4.2 Extrações de DNA.....	12
4.3 PCR e sequenciamento do loco CYTB.....	13
4.4 Reconstruções filogenéticas utilizando sequencias do loco CYTB.....	15
4.5 PCR e sequenciamento do loco RC.....	17
5. Discussão.....	19
6. Conclusões.....	25
7. Referências.....	26

1. Introdução

Seres humanos tem transportado espécies para além de suas áreas nativas há milênios (Hulme, 2009). Com o fim da Idade Média, a redescoberta das Américas pelos europeus, a exploração global e colonização de diferentes territórios por volta de 1500 a.c., houve o primeiro evento significativo de introdução de espécies não nativas pelo mundo (Preston et al., 2004). Mais recentemente, especialmente após a Revolução Industrial e com a aceleração do processo de globalização e a facilidade dos meios de transporte atuais, o fenômeno das invasões biológicas tem escalonado (Perrings et al. 2005; Meyerson & Mooney, 2007) ao ponto de que hoje, as espécies introduzidas representem uma das principais ameaças a biodiversidade mundial (Clavero & García-Berthou, 2005). Além de promoverem diretamente a introdução de espécies não-nativas, por meio de comércio de animais, agricultura, controle biológico, recreação e introduções acidentais, os seres humanos também promovem introduções de forma indireta, devido às mudanças ambientais que causam nos ecossistemas, tornando-os mais vulneráveis às invasões biológicas (Vitousek et al., 1997; Pimentel et al., 2004, Havel et al., 2005).

Ainda que efeitos positivos tenham sido registrados em alguns casos de introduções de espécies não-nativas, estas estão muito mais associadas com impactos ecológicos negativos, principalmente quando as introduções são feitas de forma involuntária, ou são feitas deliberadamente sem avaliação de risco prévia (Gozlan, 2008; Vitule et al., 2009). Após introduzidas, as populações podem se tornar invasoras (i.e. se dispersarem para novos ambientes e causarem impactos sem intervenção humana), impactando negativamente os ambientes invadidos por meio de competição, predação, introdução de patógenos e parasitas, hibridização com espécies nativas, e outras alterações ecológicas, como mudanças na teia trófica e no funcionamento do ecossistema (Mooney & Cleland, 2001). Espécies invasoras são, em geral, ainda mais preocupantes quando introduzidas em ambientes aquáticos, uma vez que são de difícil erradicação ou mesmo controle populacional satisfatório (Britton et al., 2010).

Em ambientes de água doce, a introdução de espécies de peixes não-nativos é um problema que tem se intensificado nas recentes décadas, principalmente pelas ações da pesca esportiva, da piscicultura e do comércio de espécies ornamentais (Gozlan et al., 2010). Esses ecossistemas figuram entre os mais vulneráveis à introdução de espécies, e uns dos mais invadidos em todo o mundo (Moyle, 1999; Ricciardi & MacIsaac, 2000; Perry et al., 2002). Alterações ambientais, tais como represamentos e rotinas de operação das barragens, modificam drasticamente e homogeneízam os habitats aquáticos, tornando-os mais adequados à colonização por espécies

generalistas e pré-adaptadas a ambientes lênticos, do que à peixes nativos de hábitos migratórios. Neste sentido, os represamentos são reconhecidos como facilitadores de invasões biológicas e a principal porta de entrada de espécies invasoras para os demais ecossistemas conectados e que fazem parte da bacia hidrográfica onde estão inseridos (Ricciardi & MacIsaac, 2010).

Esforços vêm sendo dirigidos para identificar os fatores que determinam o sucesso de invasões biológicas, de forma a fornecer informações úteis para a previsão de futuras invasões e mitigação dos impactos de invasões recentes (García-Berthou, 2007). Apesar destes fatores variarem com o ambiente invadido e a espécie introduzida em questão, pode-se afirmar que, para ambientes de água doce, o interesse humano, tolerância fisiológica e uma maior diversidade nos atributos de história de vida de espécies invasoras do que espécies nativas, são características que favorecem o sucesso de invasão (Olden et al., 2006; García-Berthou, 2007). Entre as etapas iniciais, de elevada importância para a avaliação do processo de invasão, destaca-se a identificação da espécie introduzida, cuja precisão influencia diretamente na implementação de medidas de controle adequadas ou mesmo de iniciativas de erradicação antes do sucesso de estabelecimento da espécie não-nativa (European Environment Agency, 2010). Além do uso de técnicas convencionais para a identificação de espécies, baseadas em atributos morfológicos, a utilização crescente de ferramentas moleculares, tais como marcadores genéticos tem auxiliado bastante na detecção precoce e precisa de espécies de peixes invasores (Schwartz et al., 2007).

Estudos moleculares aplicados as invasões biológicas vão muito além da identificação precisa das espécies introduzidas. Por meio do estudo da genética de espécies invasoras, tanto de populações em seus territórios nativos quanto invadidos, pode-se, por exemplo, coletar dados sobre a extensão e a história das invasões nos ecossistemas, fazer a identificação da fonte geográfica dessas populações, detectar eventos de efeito gargalo e identificar casos de hibridização entre espécies invasoras e nativas (Fitzpatrick et al., 2012). Além disso, pode-se inferir sobre a ocorrência de uma única ou de múltiplas introduções, assim como avaliar o potencial da espécie estudada para colonizar novos ambientes (Zhao et al., 2013).

Além dos danos econômicos e ecológicos, as espécies invasoras também causam impactos evolutivos. Tais espécies podem hibridizar interespecificamente, e, por meio de repetidos eventos de introgressão, espécies nativas podem ser extintas, o que se torna ainda mais preocupante quando essas são endêmicas ou raras (Echelle & Connor, 1989; Rhymer & Simberloff, 1996). No caso de múltiplos eventos de introdução, novos indivíduos introduzidos podem hibridizar intraintraespecificamente com indivíduos já presentes no ecossistema invadido,

podendo ocasionar a homogeneização das características genéticas únicas de cada população, causando então uma possível perda de caracteres adaptativos relacionados ao ambiente invadido (Daehler & Carino, 2001). Por outro lado, repetidas introduções podem levar ao aumento da diversidade genética da população invasora, por meio da introdução de diferentes genótipos no pool genético, o que pode intensificar os impactos negativos da espécie introduzida.

Na maior parte dos casos, populações invasoras se estabelecem a partir de pequeno número inicial de indivíduos (Lockwood et al., 2005), caracterizando um efeito fundador, que faz com que essas populações tenham uma diversidade genética reduzida quando comparadas as populações nativas (Frankham et al., 2002). Essa baixa diversidade genética deveria dificultar o sucesso das populações invasoras na colonização de novos ambientes, ainda mais quando se é levado em conta que o pequeno número inicial de indivíduos acentua a deriva genética e a depressão por endocruzamento (Nei et al., 1975; Frankham et al., 2002; Allendorf & Lundquist, 2003). Entretanto, nota-se que diversas populações invasoras tem obtido sucesso em colonizar novos ambientes, o que representa o paradoxo da genética da invasão (Frankham, 2004). Existem diversos fatores que podem explicar o sucesso das populações invasoras, contornando os prováveis obstáculos gerados pela baixa diversidade genética inicial. Por exemplo, múltiplos eventos de introdução de diferentes áreas fontes, que podem não só aliviar o efeito fundador, mas também podem introduzir naquela população alelos não antes encontrados, fazendo com que áreas invadidas tenham até mesmo uma diversidade genética maior do que áreas nativas singulares (Kolbe et al., 2004). Esse fator é especialmente importante para espécies de elevado interesse humano, fazendo com que haja uma maior pressão de propágulos, o que equivale ao “esforço de introdução”, resultando no aumento do número de introduções e de indivíduos introduzidos (Lockwood et al., 2005). Características da espécie também são fatores que contribuem para o sucesso de populações invasoras, como por exemplo, taxas elevadas de crescimento e proliferação, hábitos alimentares oportunistas, cuidado parental com a prole e ampla tolerância fisiológica. Além disso, características ambientais também podem facilitar o estabelecimento de populações invasoras. Por exemplo, ambientes de água doce que sofreram represamento tendem a ser mais vulneráveis ao estabelecimento de populações invasoras, pois a drástica alteração ambiental acarretada elimina espécies nativas, atenuando as interações ecológicas destas com as espécies invasoras, que se aproveitam dos novos nichos relacionados à ampliação dos ambientes lênticos (Marchetti et al., 2004; Havel et al. 2005).

Cichlidae é uma das famílias de peixes teleósteos de água-doce mais diversificadas, possuindo cerca de 250 gêneros que agrupam 1700 espécies. São amplamente distribuídos,

sendo encontrados nas Américas, África, Ásia e Oceania (Kullander, 2003). Dentro da família Cichlidae, o gênero *Cichlasoma* é um dos mais problemáticos no que se diz respeito a sua composição de espécies. No passado esse gênero foi utilizado para agrupar espécies que não pertenciam a nenhum outro gênero, mas que não tinham necessariamente uma ligação filogenética comprovada entre si. Esse gênero passou por uma revisão em 1983 por Kullander, onde diversas espécies foram bem definidas, mas ainda assim muitas outras continuaram com a denominação genérica de '*Cichlasoma*' (Kullander, 2003).

Cichlasoma amazonarum Kullander 1983, conhecido popularmente como Acará (Brasil) e Bujurqui (Peru), é um ciclídeo nativo do sistema Ucayali-Solimões-Amazonas (Brasil, Colômbia e Peru) (Figura 1). É um peixe de pequeno porte, podendo chegar a até 15 cm de comprimento total. Possui coloração opaca, manchas negras na região do pré-opérculo, na lateral do corpo e na cauda (Kullander, 1983). Em geral, possui quatro espinhos na nadadeira anal (apesar de alguns indivíduos possuírem cinco ou até seis), e pode ser diferenciado de todas as outras espécies de *Cichlasoma* devido a presença de quatro espinhos pelas nadadeiras dorsal e a nadadeira anal extensamente escamosa nos adultos (Kullander, 1983). Essa espécie tem hábito onívoro, se alimentando de plantas, sementes, insetos, detritos, e pequenos invertebrados, como moluscos e microcrustáceos (Soares et al., 2011; Cavalcante et al., 2014; Carvalho & Tavares-Dias, 2017).

Cichlasoma amazonarum é amplamente utilizado como espécie ornamental e como espécie forrageira no cultivo de outras espécies de alto valor comercial, como o pirarucu (Bocanegra, 2003; Vélez et al. 2005; Guarido, 2014). Em sua área nativa, essa espécie está presente de forma abundante em lagos densamente colonizados por macrófitas aquáticas (Cavalcante et al., 2014). A espécie possui adaptações respiratórias que lhe permitem sobreviver em ambientes eutrofizados e com pouco oxigênio (Guarido, 2014). Com respeito ao comportamento reprodutivo, apresenta cuidado prolongado à prole, fecundação externa e desova parcelada. Apresenta comportamento territorialista agressivo e hábitos alimentares oportunistas, características que promovem maior vantagem sobre interações ecológicas à espécie, além de possuir um rápido crescimento e proliferação, características que poderiam favorecer seu sucesso como espécie invasora (Sánchez-Botero and Araújo-lima 2001; Bocanegra, 2012; Silvano, 2012; Guarido, 2014). Existem poucas informações sobre invasões de peixes do gênero *Cichlasoma* em sua atual classificação taxonômica, porém há diversos relatos de invasões de espécies que já pertenceram a esse gênero, e de espécies muito similares, de gêneros próximos. Alguns exemplos são *Mayaheros urophthalmus* (sinonímia = *Cichlasoma urophthalmus*), *Amatitlania nigrofasciata* (sinonímia = *Cichlasoma*

nigrofasciatum) e *Amphilophus trimaculatum* (sinonímia = *Cichlasoma trimaculatum*) (Mito & Uesugi, 2004; Nico et al., 2007; Knight, 2010).



Figura 1. Foto de um espécime adulto de *Cichlasoma amazonarum* (comprimento padrão = 10,7 cm) coletado na Lagoa do Guandu, Rio Guandu, sudeste do Brasil, e mapa da distribuição de *Cichlasoma amazonarum* no Brasil (retirado da base de dados SpeciesLink: <http://splink.cria.org.br>).

Análises de marcadores moleculares são ferramentas muito utilizadas em estudos sobre a genética de populações invasoras. Diversos marcadores moleculares já foram utilizados em análises filogenéticas e populacionais da família Cichlidae e de espécies do gênero *Cichlasoma* (Kocher et al., 1989; Farias et al., 2001), dos quais Cytochrome b (CYTB) e Região Controle (RC) do DNA mitocondrial (mtDNA) foram utilizados no presente trabalho. O CYTB e a RC estão localizados no mtDNA, que possui uma elevada taxa de mutação. Além disso, a RC é considerada hipervariável, possuindo uma taxa de mutação 5x maior do que outras regiões do mtDNA (Bickham et al., 1996; Pakendorf & Stoneking, 2005) Logo, o CYTB e a RC são ideais para avaliar variabilidade genética ao nível populacional. O CYTB já foi empregado em trabalhos com várias espécies do gênero *Cichlasoma*, de forma que ele é indicado para separar *Cichlasoma amazonarum* de outras espécies do gênero (Rican & Kullander, 2006). Embora menos utilizada como marcador em estudos de espécies do gênero *Cichlasoma*, a RC vem sendo amplamente aplicada em trabalhos filogenéticos e populacionais com ciclídeos em geral (Meyer et al., 1990; Verheyen et al., 2003; Willis et al., 2006; Marques et al., 2016).

2. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal validar, por meio de técnicas moleculares, a identificação de uma população do acará amazônico *Cichlasoma amazonarum* em um ecossistema lântico pertencente à Região hidrográfica do Atlântico Sudeste.

2.1 Objetivos específicos

- Confirmar a identidade dos espécimes coletados, considerando *Cichlasoma amazonarum* como espécie putativa, por meio de marcadores moleculares.
- Determinar a diversidade genética da população de *Cichlasoma amazonarum* na Bacia do Rio Guandu, com base em sequências do loco CYTB do mtDNA.
- Discutir o significado ecológico do primeiro registro de *Cichlasoma amazonarum* na Bacia Hidrográfica do Sudeste, com ênfase na sua capacidade de invasão e os potenciais impactos.

3. Material e Métodos

3.1 Área de estudo e coleta das amostras

Ao todo, 37 espécimes com características morfológicas similares a *Cichlasoma* sp., foram coletados em um ecossistema semi-lótico localizado no Rio Guandu (Figura 2), inserido na Província hidrográfica do Atlântico Sudeste. Represada aproximadamente em 1950, a Lagoa do Guandu, como é localmente conhecida, é utilizada primariamente para a captação de água para a Região Metropolitana do Rio de Janeiro. As coletas ocorreram mais especificamente no braço leste desta lagoa ($22^{\circ}48'10.93''S$ - $43^{\circ}37'26.30''O$), com aproximadamente 1,0 km² e situada à 12m acima do nível do mar, onde deságuam os rios Guandu e outros tributários de pequeno porte (Poços/Queimados e Cabuçu/Ipiranga). Esta área sofre grande influência da urbanização em seu entorno, funcionando como receptor de fontes difusas de esgoto doméstico e resíduos industriais.

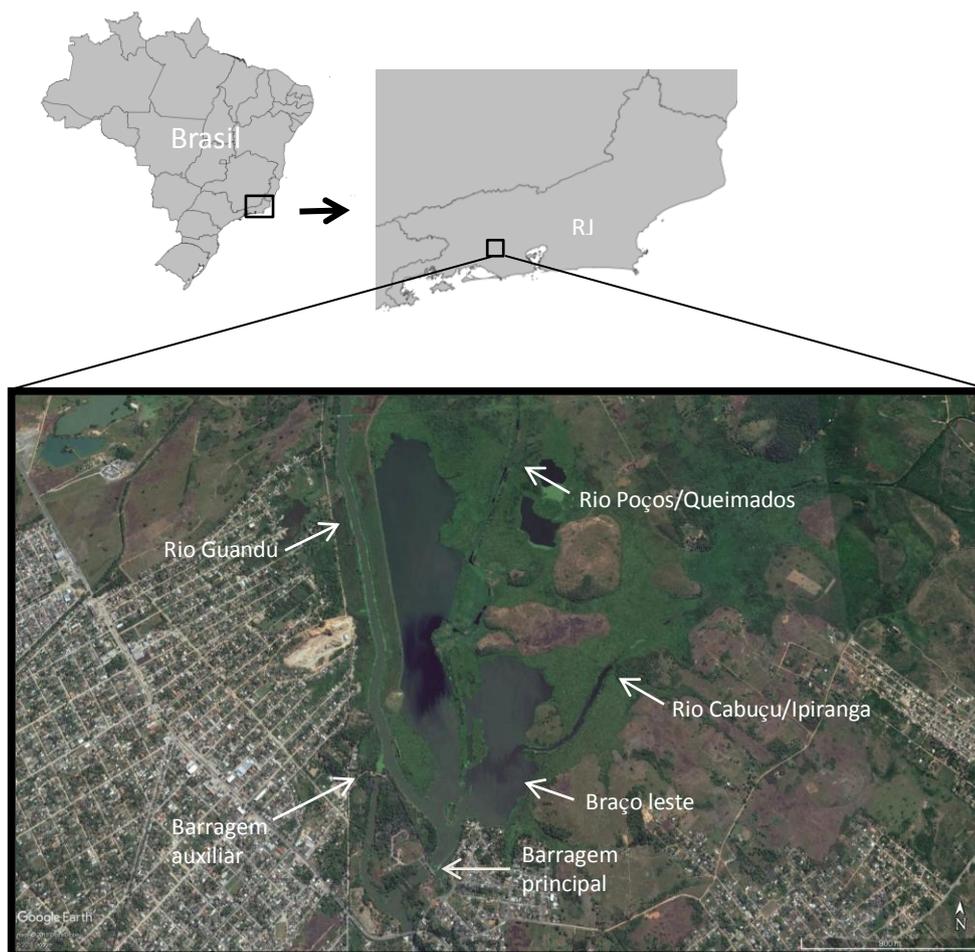


Figura 2. Lagoa do Guandu, localizada no Rio de Janeiro, criada para captação de água para Região Metropolitana do Rio de Janeiro. As coletas foram feitas mais especificamente no braço leste da lagoa. Fonte: Google, CNES / Airbus, DigitalGlobe.

A captura dos espécimes foi feita com baterias de rede (60m x 1,5m) com 20m de malhas variadas (15, 30 e 45mm entre nós adjacentes e atadas em sequencia). Os peixes foram eutanasiados em gelo, onde ficaram armazenados até que fossem transferidos para um freezer -20 °C no Laboratório de Ictiologia Teórica e Aplicada, UNIRIO (LICTA). A identificação dos indivíduos coletados foi feita com base em atributos morfométricos e merísticos, de acordo com Kullander (1983), e por análises de alguns espécimes pelo Prof. Dr. Weferson Júnio da Graça, da Universidade Estadual de Maringá. Foram feitas análises morfométricas, os peixes foram dissecados e gônadas e estômagos foram inspecionados macroscopicamente com auxílio de estereoscópico binocular.

3.2. Extração do DNA genômico total

Os espécimes coletados foram dissecados e mantidos congelados à -20 °C até o momento da extração do DNA. Este foi extraído a partir de 25 mg de tecido muscular utilizando o kit de extração NucleoSpin Tissue (Macherey-Nigel GmbH & Co. KG) seguindo as especificações do fabricante. Após a extração, o DNA foi analisado em gel de agarose 1% em tampão TAE 0,5X (TRIS base, ácido acético, EDTA, água destilada) para a confirmação da presença e quantificação do DNA. O produto da extração foi então mantido à -20 °C até o momento da amplificação dos fragmentos de interesse.

3.3 Amplificação e sequenciamento do DNA

O marcador molecular Cytochrome b (CYTB) foi utilizado para fazer a identificação dos espécimes coletados de forma comparativa com a base de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), e para inferir a variabilidade genética entre os indivíduos. Para amplificar a região do CYTB foi utilizado o par de primer GLUDG-5' (5'-CGAAGCTTGACTTGAARAACCA YCGTTG-3') e Cytb3-3' (3'-GCCAAATAGGAARTATCATTC-5') (Lee et al. 1995; Palumbi 1996). As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25 uL contendo 1 unidade (U) de Taq DNA polimerase (ThermoScientific Inc., USA), 1× tampão de PCR com NH₄SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 0.16 mM dNTPs (ThermoScientific Inc., USA), 8 pmol de cada primer e 5 ng de DNA genômico. As condições de PCR foram definidas em uma etapa inicial de 5 min à 94 °C, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 15 s, e uma etapa de extensão final à 72 °C por 5 min. Para confirmar a amplificação dos fragmentos do DNA de interesse, os produtos finais da PCR foram aplicados em um gel de agarose 1%. Os produtos amplificados

foram então purificados e sequenciados pela MacroGen Inc (Seul, Coréia do Sul), nos sentidos 5'-3' (fita F) e 3'-5' (fita R), utilizando os mesmos *primers* utilizados na etapa de amplificação.

Durante as análises genéticas (*Blast* - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), alguns espécimes inicialmente identificados (morfologia) como *Cichlasoma amazonarum* apresentaram seqüências CYTB F ou R similares à *Cichla piquiti*, espécie esta também pertencente a família Cichlidae. Para confirmar estes resultados, foi realizada uma nova rodada de extrações de DNA, ampliações via PCR e seqüenciamento do loco CYTB, utilizando três dos peixes que haviam apresentado seqüências CYTB F ou R de *Cichla piquiti*. Entretanto, o resultado permaneceu inalterado, sugerindo uma possível hibridização entre *Cichlasoma amazonarum* e *Cichla piquiti*. Por outro lado, uma possível contaminação do material no laboratório também não pode ser totalmente descartada, em especial dos *primers*, uma vez que todos os demais reagentes foram trocados neste segundo teste.

Sendo assim, para explorar melhor essa questão, utilizamos o marcador Região Controle (RC) para confirmar a identificação de alguns destes espécimes e para testar as hipóteses de que alguns indivíduos seriam fruto de hibridização entre *Cichlasoma amazonarum* e *Cichla piquiti*, ou se teria acontecido contaminação das amostras que resultaram na amplificação de DNA referente a *Cichla piquiti*. Seis indivíduos foram selecionados para essa etapa, dois peixes que apresentaram sequencias CYTB F e R referentes à *Cichlasoma amazonarum*; dois peixes que apresentaram seqüências CYTB F e R referentes à *Cichla piquiti*; e dois peixes que apresentaram seqüências CYTB “mistas” (fita F = *Cichlasoma amazonarum* e fita R = *Cichla piquiti*). Para testar a hipótese de contaminação em algum dos reagentes utilizados, adicionamos também duas amostras como controles negativos, nas quais o DNA molde foi substituído por água ultrapura (água “MilliQ”).

Para amplificar a RC foi utilizado o par de *primers* tPro2-5 (5'-ACCCTAACTCCCAAAGC-3') e HN-20-3 (5'-GTGTTATGCTTTAGTTAAGC-3') (Lee et al., 1995; Palumbi, 1996). Nas reações de PCR para amplificação da RC foram utilizados as mesmas condições empregadas para o CYTB, modificando apenas o programa do termociclador, que ocorreu com uma etapa inicial de 5 min à 94° C, seguido de 40 ciclos de 94° C por 30 s, 45° C por 30 s, 72° C por 1 min e uma etapa de extensão final à 72° C for 5 min.

3.4 Análise das sequencias

As sequencias obtidas foram editadas e alinhadas no programa MEGA7 (Kumar et al., 2016) com outras sequencias da espécie alvo e de espécies do mesmo gênero retiradas do GenBank. Primeiramente, todas as seqüências obtidas foram submetidas à ferramenta *Blast*

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), que as compara com uma base de dados e identifica outras sequências semelhantes, dessa forma pode-se fazer a identificação da espécie de forma comparativa. Também no programa MEGA7, foi realizada uma reconstrução filogenética utilizando-se o método de Máxima Verossimilhança com um *bootstrap* de 1000 replicações para testar a confiabilidade dos ramos, utilizando o modelo Tamura-Nei (1993). Uma Inferência Bayesiana foi feita no programa MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003) utilizando o modelo GTR e o algoritmo MCMC com os seguintes parâmetros: 150000 gerações, amostradas em intervalos de 10 gerações com 4 cadeias. Em ambas as análises foram utilizadas sequências de *Aequidens tetramerus* como grupo externo, já que esta é a espécie tipo do gênero *Aequidens*, o qual é descrito como um dos mais similares ao gênero *Cichlasoma*.

4. Resultados

4.1 Coleta das amostras

Um total de 37 indivíduos foram capturados durante o período amostral. Na identificação morfológica realizada pelo LICTA e por Weferson Júnio da Graça, da Universidade Estadual de Maringá, todos os peixes apresentaram características compatíveis com *Cichlasoma amazonarum* (Figura 3). As análises morfométricas realizadas pelo LICTA revelaram peixes de diversas classes de tamanho (Figura 4).



Figura 3. Foto de um espécime adulto de *Cichlasoma amazonarum* (comprimento padrão = 10,7cm) coletado na Lagoa do Guandu, Rio Guandu, sudeste do Brasil.

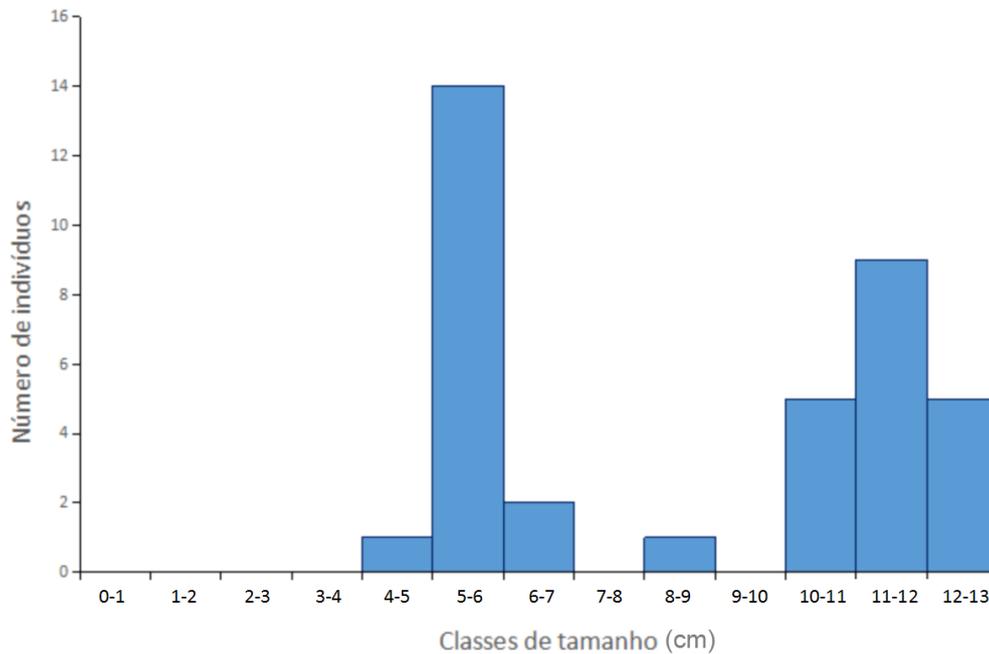


Figura 4. Gráfico da distribuição das classes de tamanho do comprimento padrão de todos os 37 espécimes coletados na Lagoa do Guandu. Comprimento padrão = medida do focinho até o final da última vértebra.

4.2 Extrações de DNA

Dos 37 peixes coletados, 27 foram selecionados para os procedimentos de extração de DNA e amplificação dos fragmentos de interesse. A escolha desses indivíduos foi feita baseado no tamanho (peixes de diversas classes de tamanho) e na integridade física dos espécimes, o que facilitaria as análises morfológicas.

Não foi possível observar bandas nos géis de agarose com o produto das extrações de DNA (Figura 5). Isso pode ser resultado de uma baixa concentração de DNA extraído ou pela pequena quantidade do produto da extração utilizado nas amostras aplicadas no gel (5 μ l do produto da extração). Este resultado já havia sido observado em amostras de outras extrações de DNA feitas utilizando o mesmo kit comercial para trabalhos similares realizados no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular - UNIRIO, com sucesso na amplificação e no posterior sequenciamento dessas amostras. Neste sentido, decidiu-se pelo prosseguimento das análises de todas as amostras de DNA de *Cichlasoma amazonarum* extraídos, ainda que sem a comprovação da presença desse DNA pelo gel de agarose.

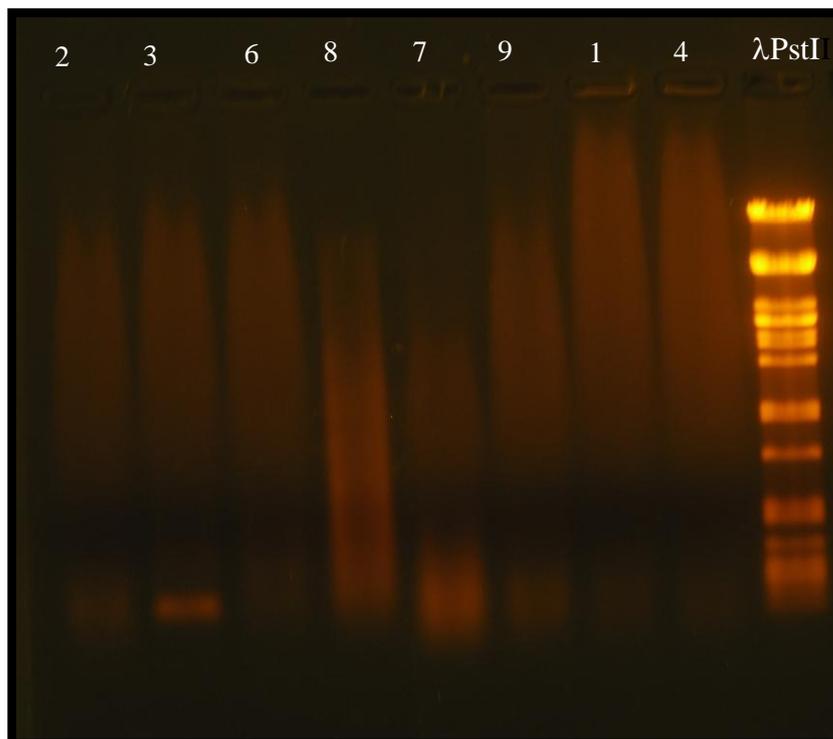


Figura 5. Detalhe de gel de agarose 1% da extração de DNA de oito indivíduos de *Cichlasoma amazonarum* coletados na Lagoa do Guandu. Os números acima de cada amostra representam o código de identificação dos peixes.

4.3. PCR e sequenciamento do loco CYTB

Foi possível realizar a amplificação do loco CYTB de todas as 27 amostras, de forma que bandas únicas e bem demarcadas foram obtidas para todos os espécimes. A confirmação da amplificação foi feita em gel de agarose 1%, onde também pode-se verificar que os fragmentos amplificados tinham o tamanho esperado, com cerca de 1100 pb (Figura 6). Das 27 amostras amplificadas, o sequenciamento apresentou êxito apenas para 22 indivíduos. As outras cinco amostras apresentaram sequenciamento de baixa qualidade, com muitos picos sobrepostos e uma baixa confiabilidade (Figura 7).

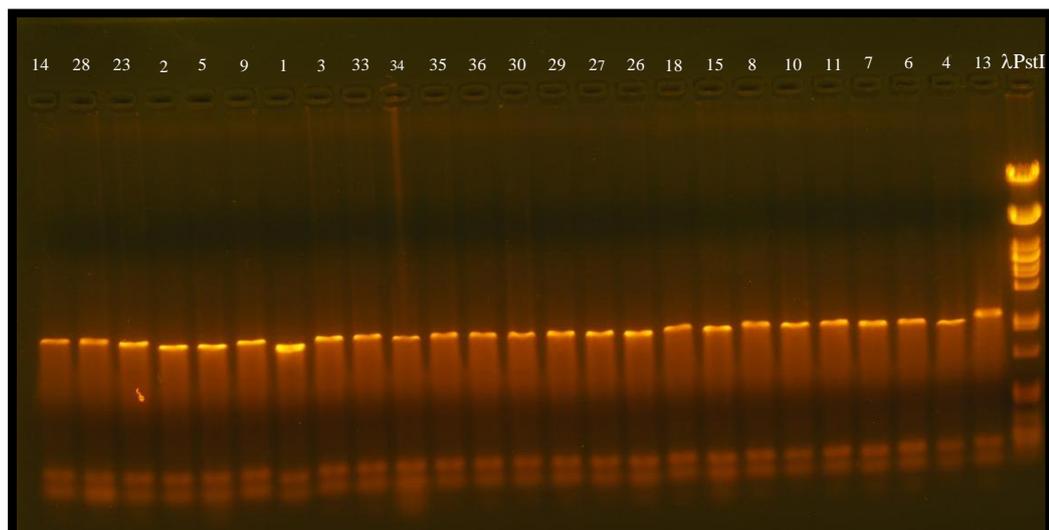


Figura 6. Foto de gel de agarose 1% confirmando a amplificação do loco CYTB de 25 indivíduos de *Cichlasoma amazonarum*. Os números acima de cada amostra representam o código de identificação dos peixes.

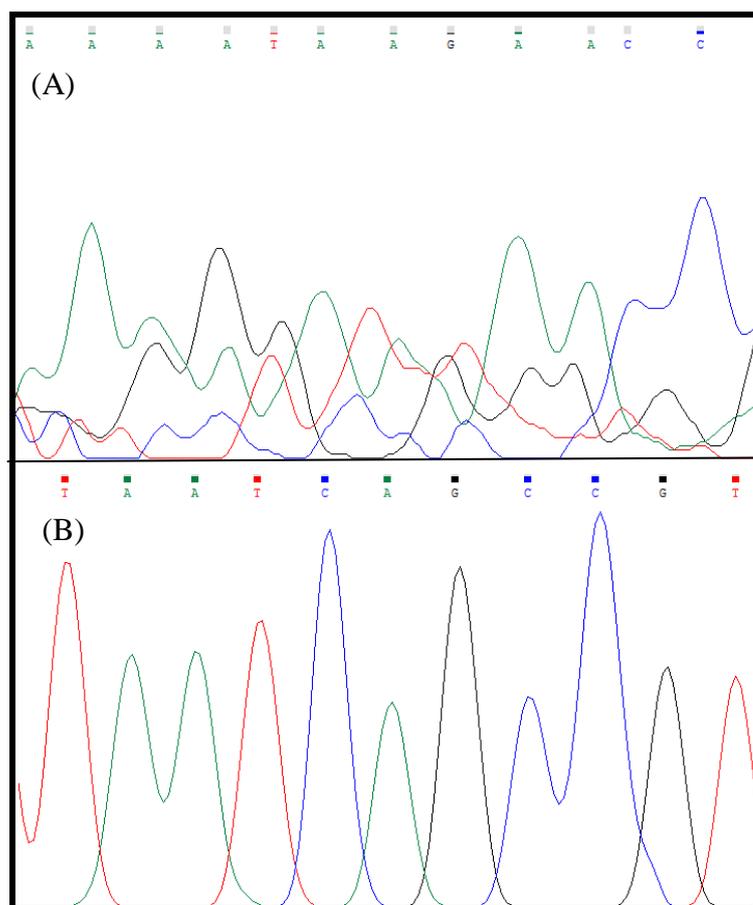


Figura 7. Eletroferogramas do sequenciamento do CYTB de dois indivíduos de *Cichlasoma amazonarum* coletados na Lagoa do Guandu. (A) eletroferograma de um sequenciamento de baixa qualidade. (B) eletroferograma de um sequenciamento de boa qualidade.

Primeiramente, as sequencias destes 22 indivíduos foram submetidas a um *Blast* para que houvesse uma primeira confirmação da identidade dos peixes coletados. Curiosamente, o *Blast* indicou que apenas 7/22 peixes apresentavam sequencias F e R similares à *Cichlasoma amazonarum*. Outros seis peixes apresentaram sequencias F e R similares a espécie *Cichla piquiti* (também pertencente à família Cichlidae). Outros nove peixes apresentaram um genótipo “misto”, onde a fita F foi similar a *Cichlasoma amazonarum* e a fita R foi similar a *Cichla piquiti*. Sendo assim, as sequencias destes 15 indivíduos foram desconsideradas nas análises seguintes (nove indivíduos “mistos” que possuem a fita F referente à *Cichlasoma amazonarum* e a fita R referente à *Cichla piquiti* + seis indivíduos que apresentaram ambas as fitas F e R de *Cichla piquiti*).

4.4. Reconstruções filogenéticas utilizando sequencias do loco CYTB

O alinhamento e edição das sete sequencias obtidas para o loco CYTB de *Cichlasoma amazonarum* “puros” resultou em 681 nucleotídeos. Apenas um haplótipo foi detectado entre todos os sete indivíduos sequenciados da população invasora do Rio Guandu. As sequencias dos indivíduos coletados no Rio Guandu agruparam em uma análise filogenética de Máxima Verossimilhança com as outras duas sequencias de *Cichlasoma amazonarum* disponíveis no GenBank, com um valor de *bootstrap* de 100 (Figura 8). Esse resultado se repetiu para árvore filogenética com o modelo de Inferência Bayesiana, onde todas as sequencias de *Cichlasoma amazonarum* se agruparam com um valor de probabilidade posterior de 1 (Figura 9).

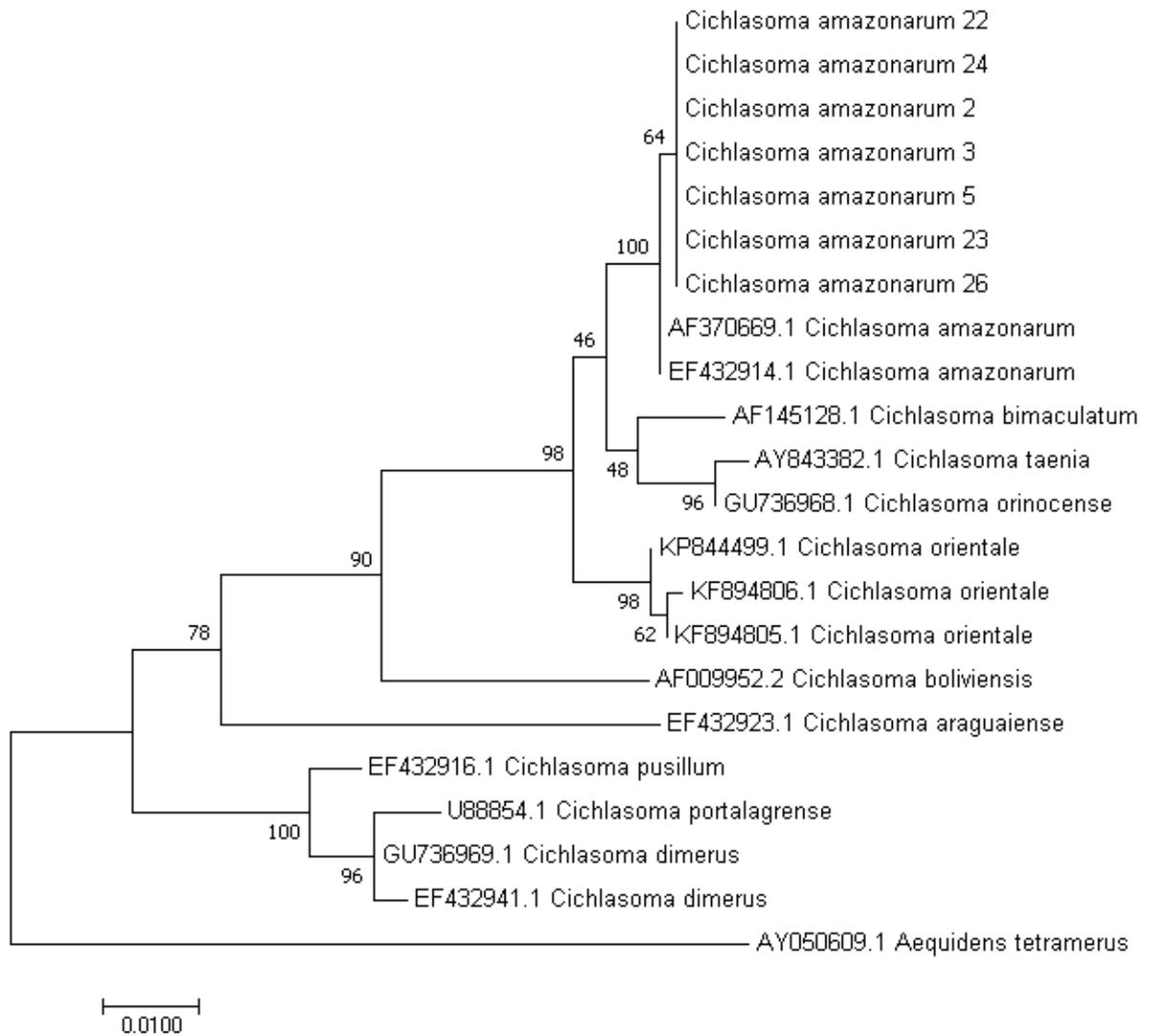


Figura 8. Árvore filogenética com modelo de Máxima Verossimilhança baseada no CYTB com as sequências dos indivíduos coletados na Lagoa do Guandu cujas sequencias são referentes apenas à *Cichlasoma amazonarum*, e com todos os haplótipos de espécies do gênero *Cichlasoma* disponíveis no GenBank. Os números nos ramos representam o resultado do teste de bootstrap com 1000 replicações.

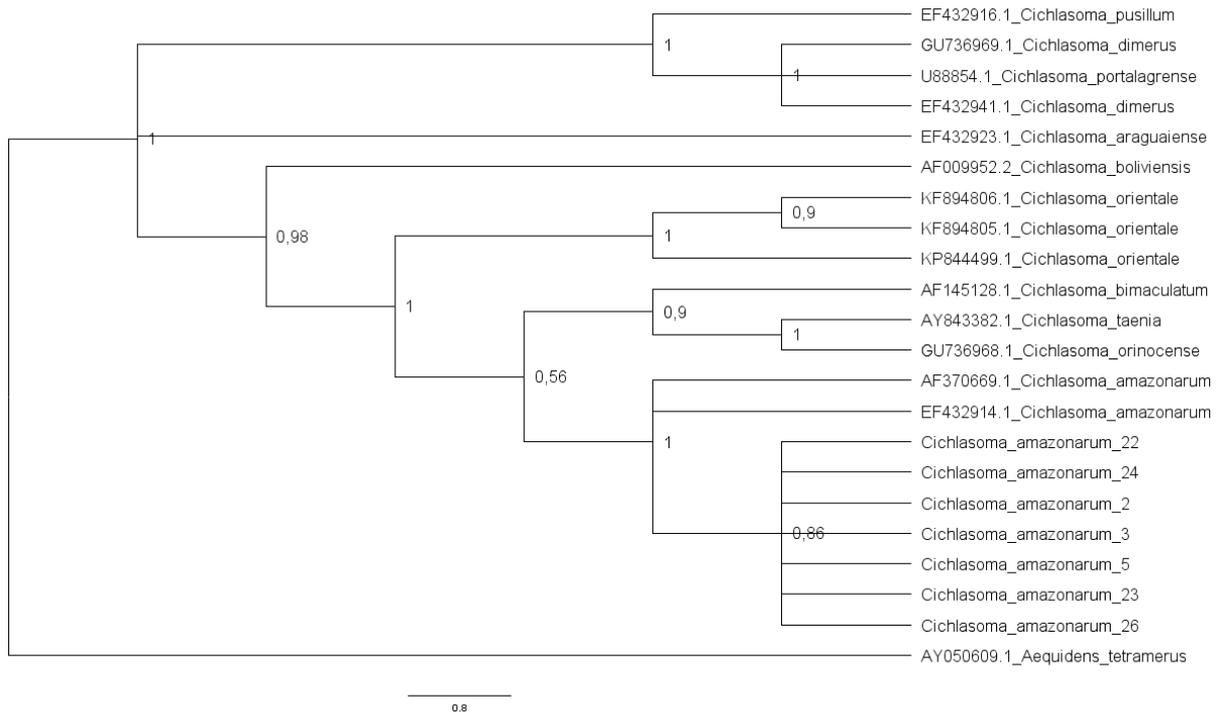


Figura 9. Árvore filogenética com modelo de Inferência Bayesiana baseada no CYTB com as sequências dos indivíduos coletados na Lagoa do Guandu cujas sequencias são referentes apenas à *Cichlasoma amazonarum*, e com todos os haplótipos de espécies do gênero *Cichlasoma* disponíveis no GenBank. Os números nos ramos representam os valores de probabilidade posterior obtidos na análise bayesiana.

4.5. PCR e sequenciamento do loco RC

Todas as seis amostras empregadas neste teste amplificaram bem, apresentando bandas únicas. Curiosamente, as duas amostras (23 e 24) que previamente haviam apresentado sequências CYTB F e R de *Cichlasoma amazonarum* apresentaram amplificação intensa do loco RC (banda bem forte); as duas amostras (6 e 11) que haviam apresentado sequencias CYTB F e R de *Cichla piquiti* apresentaram amplificação pouco intensa do loco RC (banda fraca); e as duas amostras (33 e 34) que haviam apresentado sequencias CYTB F e R “mistas” (fita CYTB F = *Cichlasoma amazonarum* e fita CYTB R = *Cichla piquiti*) apresentaram bandas com intensidade de fluorescência intermediária para o loco RC (Figura 10). De acordo com o *Blast*, todas as sequências F e R derivadas do sequenciamento da RC dessas seis amostras resultaram em sequencias de *Cichlasoma amazonarum*, não havendo sequencias F ou R do loco RC similares a *Cichla piquiti*.

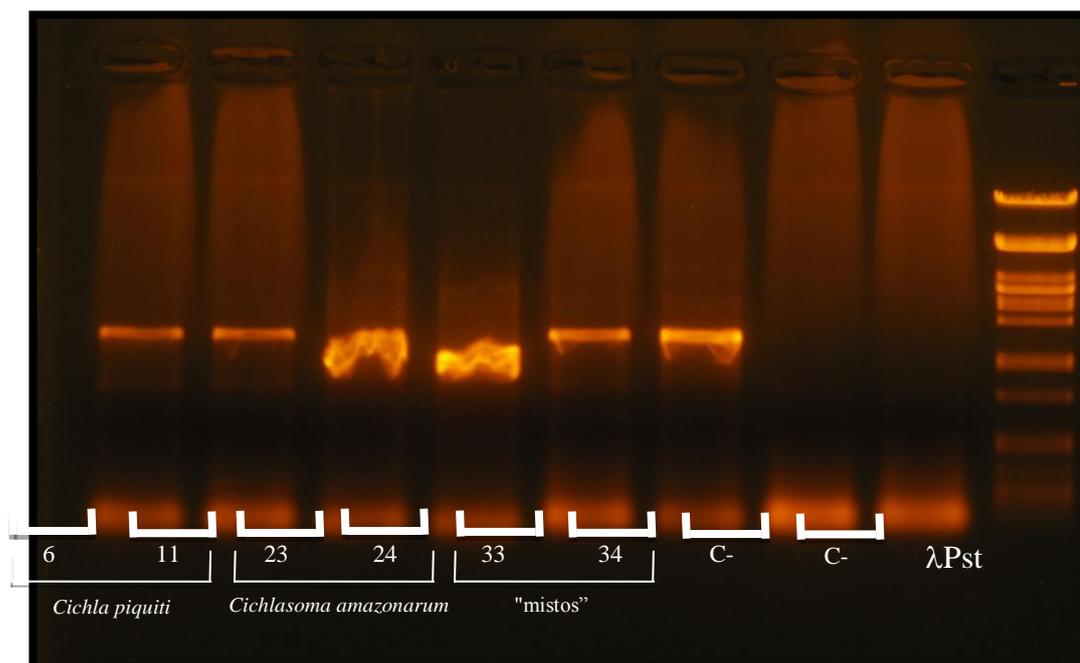


Figura 10. Foto de gel de agarose 1% com o resultado da PCR dos seis indivíduos selecionados para amplificação do loco RC. Os números abaixo de cada amostra representam o código de identificação dos peixes. Mais abaixo está a identificação de cada indivíduo com o resultado do sequenciamento do loco CYTB. C- = controle negativo (o DNA foi substituído por água ultrapura).

5. Discussão

As análises moleculares identificaram 7/22 espécimes analisados como sendo da espécie *Cichlasoma amazonarum*, concordando com sua identificação convencional, baseada em atributos morfológicos. A diversidade genética observada para o marcador CYTB dessa população de *Cichlasoma amazonarum* foi nula, uma vez que encontramos apenas um haplótipo nos sete indivíduos analisados, o que indica um provável efeito fundador ocorrido na introdução desta espécie no Rio Guandu. Não foi possível indicar uma possível fonte nativa dessa população invasora, pois o haplótipo encontrado no Rio Guandu não está presente nos registros do GenBank. Atualmente há um pequeno número de sequências da espécie *Cichlasoma amazonarum* disponíveis no GenBank o que dificulta esta análise, e aponta para a necessidade de se investir em coletas (e seqüenciamento) de indivíduos da sua área nativa.

As análises morfométricas dos 37 indivíduos coletados, baseadas em Kullander (1983), revelaram a existência de peixes de diferentes classes de tamanhos (o comprimento padrão variou entre 46-130 mm). Considerando que o tamanho na primeira maturação é de 82 mm para machos e 65 mm para fêmeas (Silva et al., 2005), mais de 50% dos indivíduos coletados estariam aptos para reproduzir. Além disso, pode-se observar gônadas maduras e desovadas, indicando que a invasão pode estar estabelecida. Apesar de diversidade genética ser um fator importante para que espécies invasoras se adaptem e colonizem novos ambientes, mesmo não apresentando diversidade genética para o loco CYTB, esta população de *Cichlasoma amazonarum* está aparentemente estabelecida no Rio Guandu, concordando com a teoria do paradoxo da genética da invasão (Frankham, 2004). Alguns fatores que explicam o sucesso de invasões, mesmo na ausência de diversidade genética, estão relacionados à características da espécie que aumentem sua resistência à fatores bióticos e abióticos, e características do ambiente invadido que diminuam sua resistência à invasões. *Cichlasoma amazonarum* possui rápido crescimento e alta prolificidade (Silvano, 2012), e adaptações bioquímicas à hipoxia (Almeida-Val et al., 1995), fatores que podem favorecer seu sucesso de invasão. Além disso, a Lagoa do Guandu é um ambiente muito impactado, eutrofizado, com baixos valores de oxigênio dissolvido e que sofreu represamento, fatores que tornam este ecossistema potencialmente mais vulnerável à invasões biológicas (Vitousek et al., 1997; Pimentel et al., 2004, Havel et al., 2005).

Apesar dos indícios do êxito no estabelecimento de *Cichlasoma amazonarum* na bacia do Rio Guandu, ainda não existem registros e informações formais sobre quando, onde e de que maneira a espécie foi introduzida, o que indica que o processo de invasão é recente e ainda

poderia estar acontecendo. Porém, sabe-se que *Cichlasoma amazonarum* é muito utilizado como espécie ornamental, e também como alimento para criação de outras espécies de peixe de alto valor comercial devido ao seu baixo custo de produção, e rápido crescimento e proliferação (Bocanegra, 2003; Vélez et al. 2005; Guarido, 2014). Isso pode estar relacionado com sua introdução, seja ela deliberada ou acidental, uma vez que até antes do funcionamento da Pequena Central Hidrelétrica Paracambi, sob concessão da LIGHT SESA, existia uma piscicultura ornamental na região de Paracambi que poderia ser a fonte dos *Cichlasoma amazonarum* presente na Lagoa do Guandu. Neste sentido, trabalhos voltados para a detecção da espécie nesta área poderiam ser de grande importância para identificar os vetores e vias de invasão da espécie, assim como para acompanhar sua possível expansão.

Possíveis impactos da invasão de *Cichlasoma amazonarum* ainda não foram registrados. Porém, sabe-se que nesta região existe uma espécie nativa similar, o acará-comum *Geophagus brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1824 (Da Costa et al., 2014) que poderia ser impactado devido à uma possível competição com o acará invasor. Como *Cichlasoma amazonarum* não é uma espécie piscívora, é improvável que ela cause a extinção de espécies de peixes nativas, já que este é um efeito quase sempre ligado à predação (Mooney & Cleland, 2001). Porém, espécies ornamentais podem impactar indiretamente a comunidade nativa por meio do deslocamento de espécies nativas, alterações de habitats e por efeito cascata (Corfield et al., 2008). Além disso, toda invasão biológica possui os riscos envolvidos com o transporte e transmissão de parasitas e vetores de doenças. Um exemplo marcante com peixes ornamentais é a propagação da herpevirose da carpa koi (KHV) do Japão para a Europa e América do Norte (Hedrick et al., 2000). Lo et al. (2004) identificaram uma alta concentração de ectoparasitas em *Cichlasoma amazonarum* criados em tanques, com $78.4 \pm 6.0\%$ dos 227 peixes analisados estando infectados, com uma predominância de parasitas da família Dactylogyridae, demonstrando que a presença de parasitas monogênicos é comum nesta espécie, e que o número de peixes parasitados é elevado quando comparado com outros ciclídeos. Chambrier et al. (2017) recentemente descreveram uma nova espécie de tênia encontrada em três *Cichlasoma amazonarum* de um exportador de peixes ornamentais em Iquito, Peru. Mendoza-Franco et al. (2010) e Bittencourt et al. (2014) relataram diversas espécies de parasitas de *Cichlasoma amazonarum* de populações nativas de Iquitos (Peru) e Fortaleza (Brasil) respectivamente. Neste sentido, as populações invasoras de *Cichlasoma amazonarum* precisam ser monitoradas, assim como a ictiofauna local para averiguar possíveis impactos desta natureza.

Espécies invasoras não são apenas a causa de impactos ambientais, elas também são a consequência da degradação ambiental (MacDougall & Turkington, 2005). A presença de

Cichlasoma amazonarum na Lagoa do Guandu pode ser um reflexo da degradação deste ambiente. Os rios Guandu, Poços/Queimados e Cabuçu/Ipiranga que deságuam na Lagoa do Guandu são altamente poluídos pelo polo industrial de Queimados, além de receberem esgoto doméstico (Castro & Ferreirinha, 2012; Agência Nacional de Águas, 2015). Weinberg (2013) registrou níveis de oxigênio dissolvido (OD) tão baixos quanto 0,0 mg/L em pontos no rio Poços/Queimados (OD médio em 112 amostras = 0,8 mg/L) e 0,1 mg/L no rio Ipiranga/Cabuçu (OD médio em 106 amostras = 0,8 mg/L), e níveis de fósforo tão altos quanto 6,60 mg/L (fósforo total médio em 114 amostras = 2,0 mg/L) e 3,50 mg/L (fósforo total médio em 105 amostras = 1,50 mg/L) respectivamente. Beltrão (2007) registrou a presença de *Cichlasoma amazonarum* em diversos igarapés da região urbana de Manaus, nos quais essa é uma espécie exótica. Das 41 espécies de peixes registradas em igarapés conservados e alterados da zona urbana de Manaus, *Cichlasoma amazonarum* foi a única espécie encontrada mais frequentemente nos ambientes alterados. Beltrão et al. (2018) analisaram a composição de espécies de igarapés íntegros e poluídos do fragmento florestal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). *Cichlasoma amazonarum* foi uma das três espécies que estavam presentes nos igarapés poluídos, e não foi encontrado nos igarapés íntegros. Esses estudos ressaltam a grande capacidade de *Cichlasoma amazonarum* de tolerar ambientes com elevados níveis de amônia e nitrito, e baixos níveis de oxigênio, e sugerem que *Cichlasoma amazonarum* seja classificada como uma espécie indicadora biológica de igarapés poluídos.

Com os crescentes impactos antropogênicos que poluem e modificam a dinâmica dos corpos d'água deixando-os mais vulneráveis ao estabelecimento de espécies não-nativas, e com a facilidade no comércio e transporte de espécies de peixes ornamentais, pode-se esperar que vejamos um aumento nos relatos de populações exóticas de *Cichlasoma amazonarum*. Ao que tudo indica, este é o primeiro registro da presença dessa espécie na Região hidrográfica do Atlântico Sudeste, o que resalta a grande necessidade de documentar a presença de espécies exóticas em ambientes de água doce, assim como de acompanhar essas populações para detectar possíveis impactos.

No presente estudo, seis indivíduos coletados apresentaram seqüências CYTB F e R similares à uma outra espécie da mesma família, *Cichla piquiti*, enquanto outros nove indivíduos demonstraram possuir seqüências CYTB F e R tanto de *Cichlasoma amazonarum* quanto de *Cichla piquiti*. Uma primeira hipótese para explicar este resultado seria uma possível contaminação em algum momento do processamento do material no laboratório, desde sua dissecação, passando pela extração de DNA, até a realização das PCRs e sequenciamento. A outra hipótese, menos provável, seria uma possível hibridização entre *Cichlasoma*

amazonarum e *Cichla piquiti*. Considerando que a herança do mtDNA em animais se dá majoritariamente de forma matrilinear (Giles et al., 1980), os indivíduos que apresentaram seqüências do loco CYTB referentes à *Cichla piquiti* seriam provenientes de um cruzamento entre um macho de *Cichlasoma amazonarum* e uma fêmea de *Cichla piquiti*. Porém, isto não explicaria a presença de indivíduos que possuem sequencias CYTB de ambas as espécies (fita CYTB F = *Cichlasoma amazonarum* e fita CYTB R = *Cichla piquiti*). Logo, para a hipótese de hibridização ser verdadeira, é preciso considerar também que teria ocorrido, por exemplo, um caso de heteroplasmia, que seria a presença de DNA mitocondrial de ambos os parentais nos descendentes. Apesar de casos de heteroplasmia serem relativamente raros, sabe-se que esse evento acontece com mais frequência em indivíduos híbridos (Radojicic et al., 2015). Notou-se que todos os indivíduos que possuíam sequencias CYTB das duas espécies ao mesmo tempo, apresentaram sempre a fita F referente à *Cichlasoma amazonarum* e a fita R referente à *Cichla piquiti*. Isso pode indicar que há uma maior facilidade do *primer* F em se ligar com o DNA molde da espécie *Cichlasoma amazonarum*, enquanto o *primer* R teria uma maior facilidade em se ligar com a região CYTB da espécie *Cichla piquiti*. Vale ressaltar que a seqüência CYTB (compatível com *Cichla piquiti*) observada nestes 15 peixes “híbridos” no presente trabalho é idêntica a seqüência CYTB previamente encontrada pelo nosso grupo de trabalho para espécimes de *Cichla piquiti* invasores da Bacia do Rio Paraíba do Sul (Santos et al., 2016). Este fato poderia sugerir uma possível contaminação das amostras, reagentes ou do material do laboratório, devido à possível presença deste DNA de *Cichla piquiti* no laboratório. Por outro lado, este foi o único haplótipo encontrado por Santos et al (2016) para *Cichla piquiti* ao longo de toda a Bacia do Rio Paraíba do Sul. Logo, em caso de hibridização, seria esperado que fosse este mesmo o haplótipo encontrado nos indivíduos híbridos.

Outra hipótese que pode ser levada em conta é a presença de um pseudogene Citocromo b. Isto é, uma cópia do gene mitocondrial que foi translocada para o genoma nuclear em algum momento da história evolutiva da família. Como os *primers* utilizados no presente trabalho para amplificação do CYTB de *Cichlasoma amazonarum* são “universais”, de forma que podem ser utilizados para amplificar o CYTB de diversas espécies da família Cichlidae (amplificação heteróloga), é possível que eles tenham amplificado uma cópia paráloga do gene CYTB alvo. Pelo fato de *Cichla* ser um gênero basal desta família, poderia se esperar que o gene parálogo amplificado fosse semelhante ao de uma espécie desse gênero. Porém, o fato de termos detectado o mesmo haplótipo de *Cichla piquiti* da bacia do Rio Paraíba do Sul seria algo inesperado, pois mesmo que esse gene parálogo tenha surgido nessa espécie, seria esperado que

este tivesse uma sequência diferente do gene mitocondrial encontrado atualmente, pois ambos teriam evoluído independentemente.

A morfologia de todos os indivíduos sequenciados foi analisada por fotos para verificar se os peixes pertencentes à cada haplótipo encontrado (*Cichla piquiti* e “mistos”) possuíam características que os agrupassem ou se diferenciavam de *Cichlasoma amazonarum*. Verificamos que não há diferenças morfológicas significativas entre todos os espécimes coletados, de forma que eles apresentam variação apenas no tamanho e peso, com ambas as medidas dentro do esperado para a espécie *Cichlasoma amazonarum*, levando em conta seu ciclo de vida.

O sequenciamento do loco RC dos seis indivíduos selecionados não detectou mtDNA referente a *Cichla piquiti*, o que sugere que houve contaminação no *primer* CYTB utilizado, e não estaria havendo hibridização entre as duas espécies. Porém, não é possível afirmar com absoluta certeza que a contaminação ocorreu no *primer* CYTB, pois, assim como o *primer* F utilizado para amplificação do CYTB aparenta possuir uma maior afinidade com a espécie *Cichlasoma amazonarum*, enquanto o *primer* R aparenta possuir uma maior afinidade com o DNA molde de *Cichla piquiti*, é possível que ambos os *primers* (F e R) utilizados para amplificação da RC tenham uma maior afinidade com *Cichlasoma amazonarum*. Neste caso, mesmo havendo contaminação ou hibridização (ou seja, mesmo havendo DNA molde de ambas as espécies numa mesma amostra), seria esperado que apenas o DNA de *Cichlasoma amazonarum* fosse amplificado e seqüenciado.

Peixes são um dos grupos que possuem os maiores níveis de hibridização entre os vertebrados (Verspoor & Hammar, 1991). Porém, ainda sim, existem diversos mecanismos que previnem a hibridização entre diferentes espécies de peixes, e quanto mais distante a relação evolutiva entre elas, menores são as chances de ocorrer hibridização ou do híbrido ser viável (Corfield et al., 2008). *Cichla piquiti* é um ciclídeo de grande porte e é um piscívoro voraz, que preda espécies menores como *Cichlasoma amazonarum*. Este fato faz com que um possível evento de hibridização entre essas duas espécies seja muito improvável, enquanto a distância evolutiva entre elas faz com que a viabilidade e desenvolvimento de um eventual híbrido F1 seja difícil, pois maiores são as chances de haverem incompatibilidades gaméticas que impossibilitem o desenvolvimento do zigoto. Porém, híbridos entre peixes pertencentes à gêneros diferentes (híbridos intergenéricos) já foram produzidos artificialmente (Kim et al., 1996; Reddy, 2011). Sendo assim, não se pode concluir de fato se a presença de mtDNA da espécie *Cichla piquiti* em 15 das amostras analisadas foi devido à uma contaminação dessas amostras, à um evento de hibridização com *Cichlasoma amazonarum*, ou um possível

pseudogene, deixando como perspectiva a realização de novos testes que possam elucidar essa questão.

6. Conclusões

- Identificamos a presença da espécie invasora *Cichlasoma amazonarum* no Rio Guandu, o que foi confirmado pela análise genética de 7 dos 27 indivíduos sequenciados. Ao que tudo indica, este é o primeiro registro dessa espécie na Região hidrográfica do Atlântico Sudeste.
- A população analisada não possui diversidade genética para os marcadores CYTB e RC do mtDNA, o que pode ser devido a um efeito fundador acarretado pela introdução de poucos indivíduos.
- A fonte desta invasão não pôde ser inferida devido ao pequeno número de sequencias CYTB de espécimes provenientes de áreas nativas disponíveis no Genbank.
- Devido à capacidade de *Cichlasoma amazonarum* sobreviver em ambientes com baixos níveis de oxigênio e à suas características ecológicas, esta espécie parece possuir uma alta capacidade de invasão, principalmente em ambientes impactados.
- O fato da espécie nativa *Geophagus brasiliensis* de características ecológicas equivalentes estar presente em áreas próximas ao ambiente onde *Cichlasoma amazonarum* foi encontrado causa preocupações.
- A presença de *Cichlasoma amazonarum* na Lagoa do Guandu pode ser um indicativo da qualidade ambiental de suas águas.
- Até o momento não há informações sobre os possíveis impactos causados pela introdução de *Cichlasoma amazonarum* em ambientes invadidos.

7. Referências

- Agência Nacional de Águas. **Panorama Da Qualidade das Águas Superficiais no Brasil**. ANA, 2015.
- ALLENDORF, L. W.; LUNDQUIST, L. L. Introduction: Population Biology, Evolution, and Control of Invasive Species. **Special Section: Population Biology of Invasive Species**. [s.l.], v. 17, n. 1, p. 24-30, fev. 2003.
- ALMEIDA-VAL, V. M. et al. Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon cichlids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. [s.l.], v. 28, p. 1257-1263, nov. 1995.
- BELTRÃO, H. **Efeitos Da Fragmentação Florestal Sobre As Assembléias De Peixes De Igarapés Da Zona Urbana De Manaus, Amazonas**. 101f. Tese (Mestrado) - Instituto Nacional De Pesquisas Da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, 2007.
- BELTRÃO, H. et al. Ictiofauna do maior fragmento florestal urbano da Amazônia: sobrevivendo ao concreto e à poluição. **Neotropical Biology and Conservation**. [s.l.], v. 13, n. 2, p. 124-137, jun. 2018.
- BICKHAM et al. High Variability for Control-Region Sequences in a Marine Mammal: Implications for Conservation and Biogeography of Steller Sea Lions (*Eumetopias jubatus*). **Journal of Mammalogy**. [s.l.], v. 77, n. 1, p. 95-108, fev. 1996.
- BITTENCOURT, L. S. et al. Parasites of native Cichlidae populations and invasive *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in tributary of Amazonas River (Brazil). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. [s.l.], v. 23, n. 1, p. 44-54, mar. 2014.
- BOCANEGRA, F. A. et al. **Cultivo de paiche, *Arapaima gigas* en estanque de productores de la carretera Iquitos**. Disponível em: <https://guzlop-editoras.com/web_des/agri01/amazonica%20paiche/pld1829.pdf>. Acesso em: 4 de Novembro de 2018.
- CARVALHO, A. A.; TAVARES-DIAS, M. Diversity of parasites in *Cichlasoma amazonarum* Kullander, 1983 during rainy and dry seasons in eastern Amazon (Brazil). **Journal of Applied Ichthyology**. [s.l.], v. 33, n. 6, p. 1178-1183, dez. 2017.
- CASTRO, M. C; FERREIRINHA, M. M. A Problemática Ambiental na Bacia Hidrográfica do Rio Guandu: Desafios para a Gestão dos Recursos Hídricos. **Anuário do Instituto de Geociências - UFRJ**. Rio de Janeiro, v. 35, p. 71-77, fev. 2012.
- CAVALCANTE, D. P. Feeding ecology of *Cichlasoma amazonarum* (Teleostei, Cichlidae) in Central Amazon Lakes, Brazil. **UAKARI**. [s.l.], v. 10, n. 1, 2014.
- CHAMBRIER, A. D. et al. A New Genus and Two New Species of Proteocephalidean Tapeworms (Cestoda) from Cichlid Fish (Perciformes: Cichlidae) in the Neotropics. **Journal of Parasitology**. [s.l.], v. 103, n. 1, p. 83-94, fev. 2017.

CLAVERO, M.; GARCÍA-BERTHOU, E. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. **Trends in Ecology & Evolution**. [s.l.], v. 20, n. 3, p. 110, mar. 2005.

CORFIELD, J. et al. **Review of the impacts of introduced ornamental fish species that have established wild populations in Australia**. Australian Government Department of the Environment, Water, Heritage and the Arts, 2008.

COSTA, M. R. et al. Length-weight relationships of 20 fish species in the Guandu River, Rio de Janeiro State, Southeastern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**. [s.l.], v. 30, n. 1, p. 200–201, ago. 2014.

DAEHLER, C.; CARINO, D. A. Hybridization between native and alien plants and its consequences. **Biotic Homogenization**. [s.l.], p. 81-102, jan. 2001.

EHELLE, A. A.; CONNOR, P. J. Rapid, geographically extensive genetic introgression after secondary contact between two pupfish species (Cyprinodon, cyprinodontidae). **EVOLUTION**. [s.l.], v. 43, n. 4, p. 717-727, fev. 1989.

FARIAS, I. P. et al. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. **Journal of Molecular Evolution**. [s.l.], v. 53, n. 2, p. 89-103, ago. 2001.

FITZPATRICK, B. M. et al. What can DNA tell us about biological invasions? **Biological Invasions**. [s.l.], v. 14, n. 2, p. 245–253, fev. 2012.

FRANKHAM, R. Resolving the genetic paradox in invasive species. **Heredity**. [s.l.], v. 94, p. 385, dez. 2004.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. 2. ed. Crambridge: Cambridge University Press, 2012.

GARCÍA-BERTHOU, E. The characteristics of invasive fishes: what has been learned so far? **Journal of Fish Biology**. [s.l.], v. 71, p. 33–55, dez. 2007.

GILES, R. E. et al. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. **PNAS**. [s.l.], v. 77, n. 11, p. 6715-6719, nov. 1980.

GOZLAN, R. E. et al. Current knowledge on non-native freshwater introductions. **Journal of Fish Biology**. [s.l.], v. 76, n. 4, p. 751-786, mar. 2010.

GOZLAN, R. E. Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad? **FISH and FISHERIES**. [s.l.], v. 9, p. 106–115, fev. 2008.

GUARIDO, P. **Degradação ambiental e presença de espécies de peixes não nativas em pequenos igarapés de terra firme de Manaus, Amazonas**. Tese (Mestrado) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2014.

HAVEL, J. E.; LEE, C. E.; ZANDEN, J. M. Do Reservoirs Facilitate Invasions into Landscapes? **BioScience**. [s.l.], v. 55, n. 6, jun. 2005.

HAVEL, J. E.; SHURIN, J. B.; JONES, J. R. Environmental limits to a rapidly spreading exotic cladoceran. **EcoScience**. [s.l.], v. 12, p. 376–385, mai. 2015.

HEDRICK, R. P. et al. Initial Isolation and Characterization of a Herpes-like Virus (KHV) from Koi and Common Carp. **Bulletin of Fisheries Research Agency**. [s.l.], v. 2, p. 1-7, 2005.

KIM, K. et al. Early Survival and Chromosomes of Intergeneric Hybrids between Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* and Spotted Halibut *Verasper variegatus*. **Fisheries Science**. [s.l.], v. 62, n. 3, p. 490-491, 1996.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**. [s.l.], v. 17, n. 8, p. 754-755, ago. 2001.

HULME, P. E. Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. **Journal of Applied Ecology**. [s.l.], v. 46, p. 110-118, jan. 2009.

KNIGHT, M. Invasive ornamental fish: a potential threat to aquatic biodiversity in peninsular India. **Journal of Threatened Taxa**. [s.l.], v. 2, n. 2, p. 700-704, fev. 2010.

KOCHER, T. D. et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **PNAS**. [s.l.], v. 86, n. 16, p. 6196-6200, ago. 1989.

KOLBE, J.J. et al. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. **Nature**. [s.l.], v. 431, n. 7005, p. 177-181, set. 2004.

KULLANDER, S. O. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America: Family Cichlidae (Cichlids). **EDIPUCRS**. Porto Alegre, p. 605-654, 2003.

KULLANDER, S. O. **Taxonomic studies on the percoid freshwater fish family cichlidae in South America**. Tese (Doutorado) - Departamento de Zoologia, Universidade de Estocolmo, 1983.

KUMAR, S. et al. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**. [s.l.], v. 33, n. 7, p. 1870-1874, mar. 2016.

LEE, W. et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. **Journal of Molecular Evolution**. [s.l.], v. 41, n. 1, p. 54-66, jul. 2005.

LO, J. P. et al. Ectoparásitos En Bujurqui (*Cichlasoma amazonarum*; Pisces: Cichlidae) Criados En Estanques Artificiales. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**. [s.l.], v. 22, n. 4, p. 351-359, 2011.

LOCKWOOD, J. L.; CASSEY, P.; BLACKBURN, T. The role of propagule pressure in explaining species invasions. **Trends in Ecology & Evolution**. [s.l.], v. 20, n. 5, p. 223–228, mai. 2005.

MACDOUGALL, A. S.; TURKINGTON, R. Are Invasive Species The Drivers Or Passengers Of Change In Degraded Ecosystems? **Ecology**. [s.l.], v. 86, n. 1, p. 42-55, jan. 2005.

MARCHETTI, M. P. et al. Fish invasions in California watersheds: Testing hypotheses using landscape patterns. **Ecological Applications**. [s.l.], v. 14, n. 5, p. 1507-1525, jan. 2004.

MARQUES, A. C. et al. Genetic divergence among invasive and native populations of the yellow peacock cichlid *Cichla kelberi*. **Journal of Fish Biology**. [s.l.], v. 89, n. 6, p. 2595-2606, dez. 2016.

MENDOZA-FRANCO, E. F. et al. Tucunarella n. gen. and Other Dactylogyrids (Monogenoidea) From Cichlid Fish (Perciformes) From Peruvian Amazonia. **American Society of Parasitologists**. [s.l.], v. 96, n. 3. p. 491-498, jun. 2010.

MEYER, A. et al. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature**. [s.l.], v. 347, n. 6293, p. 550-553, out. 1990.

MEYERSON, L. A.; MOONEY, A. H. Invasive Alien Species in an Era of Globalization. **Frontiers in Ecology and the Environment**. [s.l.], v. 5, n. 4, p. 199-208, mai. 2007.

MITO, T.; UESUGI, T. Invasive Alien Species in Japan: The Status Quo and the New Regulation for Prevention of their Adverse Effects. **Global Environmental Research**. [s.l.], v. 8, n. 2, p. 171-191, 2004.

MOONEY, H. A.; CLELAND, E. E. The evolutionary impact of invasive species. **PNAS**. [s.l.], v. 98, n. 10, mai. 2001

MOYLE, P. B.; MARCHETTI, M. P. Predicting Invasion Success: Freshwater Fishes in California as a Model. **BioScience**. [s.l.], v. 56, n. 6, p.515-524, jun. 2006.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **EVOLUTION**. [s.l.], v. 29, n. 1, p. 1-10, mar. 1975.

OLDEN, J. D.; POFF, N. L.; BESTGEN, K. R. Life-history strategies predict fish invasions and extirpations in the colorado river basin. **Ecological Monographs**. [s.l.], v. 76, n. 1, p. 25-40, fev. 2006.

PAKENDORF, B.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and human evolution. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**. [s.l.], v. 2005, n. 6, p. 165-183, mai. 2005.

PALUMBI, S. R. Nucleic acid II: the polymerase chain reaction. In: HILLIS, D. M. et al. **Molecular Systematics**. pp. 205-247. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

PERRINGS, C. et al. How to manage biological invasions under globalization. **TRENDS in Ecology and Evolution**. [s.l.], v. 20, n. 5, p. 212-215, mai. 2005.

PIMENTEL, D. et al. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. **Ecological Economics**. [s.l.], v. 52, n. 3, p. 273-288, fev. 2005.

PRESTON, C. D.; PEARMAN, D. A.; HALL, A. R. Archaeophytes in Britain. **Botanical Journal of the Linnean Society**. [s.l.], v. 145, n. 3, p. 257-294, jul 2004.

RADOJICIC, J. M. et al. Extensive mitochondrial heteroplasmy in hybrid water frog (*Pelophylax* spp.) populations from Southeast Europe. **Ecology and Evolution**. [s.l.], v. 5, n. 20, p. 4529-4541, ago. 2015.

RHYMER, M. J.; SIMBERLOFF, D. Extinction by hybridization and introgression. **Annual Review of Ecology and Systematics**. [s.l.], v. 27, p. 83-109, nov. 1996.

RICAN, O.; KULLANDER, S. Character- and tree-based delimitation of species in the 'Cichlasoma' facetum group (Teleostei, Cichlidae) with the description of a new genus. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**. [s.l.], v. 44, n. 2, p. 136-152, mar. 2006.

RICCIARDI, A.; MACISAAC, H. J. Impacts of Biological Invasions on Freshwater Ecosystems. **Fifty Years of Invasion Ecology**. [s.l.], p. 211–224, nov. 2010.

RICCIARDI, A.; MACISAAC, H. J. Recent mass invasion of the North American Great Lakes by Ponto–Caspian species. **Trends in Ecology & Evolution**. [s.l.] v.15, n. 2, p. 62-65, fev. 2000.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**. [s.l.], v. 19, n. 12, p. 1572-1574, ago. 2003.

SÁNCHEZ-BOTERO, J. I.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. As macrófitas aquáticas como berçário para a ictiofauna da várzea do rio Amazonas. **Acta Amaz.** [s.l.], v. 31, n. 3, p. 437-437, 2001.

SANTOS, L. N. et al. First record of the invasive blue peacock cichlid *Cichla piquiti* Kullander and Ferreira 2006 (Cichliformes: Cichlidae) in the Paraíba do Sul river basin, south eastern Brazil. **BioInvasions Records**. [s.l.], v. 5, n. 4, p. 267-275, nov. 2016.

SILVA, M. et al. Biología reproductiva del Bujurqui *Cichlasoma amazonarum* (Kullander, 1983) en ambientes controlados. In: RENNO, J. F. et al. **Biología de Las Poblaciones de Peces de La Amazonía Y Piscicultura**. pp 24–35

SILVANO, E. V. **Influencia de la densidad de siembra en la producción de *Cichlasoma amazonarum*, Kullander (1983), “bujurqui” en jaulas en un estanque del Centro de Enseñanza e Investigación - Piscigranja Quistococha - UNAP**. Tese - Escuela Profesional de Acuicultura - FCB, 2012.

VÉLEZ, C. et al. Colecta y adaptación de peces ornamentales amazónicos. In: Renno JF, García C, Duponchelle F, Nuñez J, **Biología de Las Poblaciones de Peces de La Amazonía Y Piscicultura**. pp 209–214.

VERSPOOR, E.; HAMMAR, J. Introgressive hybridization in fishes: the biochemical evidence. **Journal of Fish Biology**. [s.l.], v. 39, p. 309-334, jan. 1991.

VERHEYEN, E. et al. Origin of the superflock of cichlid fishes from Lake Victoria, East Africa. **Science**. [s.l.], v. 300, n. 5617, p. 325-329, abr. 2003.

VITOUSEK, P. M. et al. Introduced species: A significant component of human-caused global change. **New Zealand Journal of Ecology**. [s.l.], v. 21, n. 1, p. 1-16, 1997.

VITULE, J. R. S.; FREIRE, C. A.; SIMBERLOFF, D.; Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad. **FISH and FISHERIES**. [s.l.], v. 10, p. 98–108, fev. 2009.

WEINBERG, A. **Uso De Índices De Qualidade De Água Para A Caracterização Da Bacia Hidrográfica Do Rio Guandu**. 166f. Tese (Monografia) - Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.

WILLIS, S. C. et al. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. [s.l.], v. 44, n. 1, p. 291-307, ago. 2007.