

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

NATHÁLIA ALVES DIAMANTE

Variabilidade, Estrutura e Caracterização Genética de Populações de *Cichla* de
Diferentes Bacias Hidrográficas Brasileiras

Maringá
2019

NATHÁLIA ALVES DIAMANTE

Variabilidade, Estrutura e Caracterização Genética de Populações de *Cichla* de
Diferentes Bacias Hidrográficas Brasileiras

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli

Coorientadora: Profa. Dra. Alessandra Valéria de Oliveira

Maringá
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Diamante, Nathália Alves

D537v Variabilidade, estrutura e caracterização genética de populações de *Cichla* de diferentes bacias hidrográficas brasileiras/ Nathália Alves Diamante. -- Maringá, 2019.

72 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Prioli.

Coorientadora: Dra. Alessandra Veléria de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2019.

1. Tucunaré. 2. Híbridos. 3. Rio São João - RJ. 4. Variabilidade Genética. 5. Reservatório de Juturnaíba. I. Prioli, Alberto, orient. II. Oliveira, Alessandra Valéria, coorient. I. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. III. Título.

CDD 22. ED.597.74130981

Jane Lessa Monção CRB 1173/9

FOLHA DE APROVAÇÃO

NATHÁLIA ALVES DIAMANTE


Variabilidade, Estrutura e Caracterização Genética de Populações de *Cichla* de
Diferentes Bacias Hidrográficas Brasileiras

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de
Doutora em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

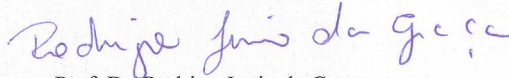
COMISSÃO JULGADORA



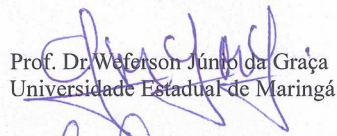
Prof. Dr. Alberto José Prioli
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)



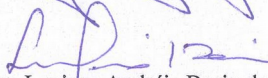
Prof. Dra. Thaís Souto Bignotto
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof. Dr. Rodrigo Junio da Graça
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Weferson Júnio da Graça
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dra. Luciana Andréia Borin de Carvalho
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 25 de fevereiro de 2019.

Local de defesa: Sala 09, Bloco G80, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para sua realização.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre esteve ao meu lado me iluminando, me protegendo e guiando meu caminho.

Aos meus pais Adelmo e Guilhermina, ao meu irmão Paulo Henrique e ao meu avô Guerino por todo amor, paciência, carinho, compreensão e incentivo aos estudos, desde os primeiros anos da minha vida. Obrigada por sempre me encorajarem e ajudarem em todos os momentos, alegres ou infelizes.

Ao meu primo e amigo Dennis por toda a amizade, conselhos e apoio.

As minhas amigas e companheiras de república, Ana maria, Aline, Ana Paula, Bárbara, Camila, Larissa, e Natália pelo convívio diário e alegrias compartilhadas.

Ao professor doutor Ricardo de Mello Germano pela amizade e incentivo à pesquisa desde o início da minha graduação.

À professora doutora Sônia Maria Alves Pinto Prioli, por todo o apoio, incentivo e acreditar no meu trabalho, sempre comprometida em oferecer o que possui de melhor.

Ao professor doutor Alberto José Prioli, pelo conhecimento compartilhado, incentivo, paciência e confiança, disposto a auxiliar em todas as horas.

À professora doutora Alessandra Valéria de Oliveira pela amizade, orientação e todo auxílio, fundamental na realização desse trabalho.

Aos colegas do laboratório de Genética do NUPÉLIA: Thatiana, Thomaz, João Paulo, Rodrigo, Thaís, Larissa, Bárbara, Flávia, Flávia e Bruno pelo convívio, amizade, ajuda e ensinamentos.

Aos queridos mestres do curso de Pós-Graduação em Biologia Comparada, pelos ensinamentos recebidos.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA) pelo apoio e qualidade dos serviços prestados.

Aos técnicos de laboratório, Mazé e Donizete por todo suporte e auxílio.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, cujo convívio e troca de experiência é sempre salutar.

Ao COMCAP e as técnicas Cíntia e Fabiana, pelo suporte prestado na realização do sequenciamento de DNA.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, à Universidade Estadual de Maringá,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Àqueles que, com apoio e amizade, compartilham suas vidas e são coadjuvantes da realização de sonhos.

EPÍGRAFE

“Para criaturas tão pequenas como nós, a vastidão só é suportável através do amor.”

(Carl Sagan)

Variabilidade, Estrutura e Caracterização Genética de Populações de *Cichla* de Diferentes Bacias Hidrográficas Brasileiras

RESUMO

Originários de sistemas Amazônicos, representantes de *Cichla* são predadores vorazes que costumam habitar principalmente ambientes lênticos. Diferentes espécies desse gênero têm obtido sucesso na colonização de reservatórios artificiais em todas as bacias hidrográficas do país, onde experimentam expressivos aumentos populacionais em curto prazo, estando presentes em pelo menos 35% dos 71 reservatórios brasileiros onde não são nativos do sistema. Estes predadores introduzidos podem interferir nas interações bióticas da ictiofauna local através da predação e competição. O reservatório de Juturnaíba, Estado do Rio de Janeiro, formado há mais de três décadas pelo barramento do rio São João, é responsável pelo abastecimento da Região dos Lagos e local de recreação e pesca. Juvenis de tucunarés foram inicialmente introduzidos no reservatório por pescadores amadores na década de 1990, porém reintroduções podem ter acontecido nos últimos vinte anos. Nos últimos cinco anos tem aumentado a frequência de tucunarés nas capturas dos pescadores a jusante de Juturnaíba, especialmente nos últimos 39 km do rio São João, trecho altamente modificado por intervenções antrópicas. No momento, não se sabe se as populações de tucunaré nesse sistema consistem em uma ou mais espécies, nem se a introdução envolveu diferentes populações de tucunaré. Nesse caso, a hibridização entre espécies de *Cichla* pode se suceder, alterando o pool gênico das populações. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi, através do uso de marcadores moleculares nucleares e mitocondriais, caracterizar as espécies de *Cichla* presentes na região do rio São João e reservatório de Juturnaíba, esclarecendo questões referentes à taxonomia, estruturação genética das populações e possíveis eventos de hibridização entre espécies do gênero. Os dados genéticos obtidos foram comparados com dados de *Cichla* de outras regiões do Brasil, com o intuito de elucidar a história das invasões desse gênero. A caracterização genética das populações, além de colaborar para compreensão do processo invasivo e a interação do tucunaré com a fauna nativa poderá ter reflexos no estabelecimento de procedimentos de manejo de populações de *Cichla* introduzidas.

Palavras-chaves: Híbridos. Marcador Molecular. Rio São João. Tucunaré. Variabilidade genética.

Variability, Structure and Genetic Characterization of *Cichla* Populations of Different Brazilian Hydrographic Basins

ABSTRACT

Originating from Amazonian systems, tucunarés are voracious predators that habitually inhabit mainly lentic environments. These species have been successful in the colonization of artificial reservoirs in all the hydrographic basins of the country, where they experience significant population increases in the short term, being present in at least 35% of the 71 Brazilian reservoirs where they are not native to the system. These introduced predators may interfere in the biotic interactions of the local ichthyofauna through predation and competition. The Juturnaíba reservoir, in the State of Rio de Janeiro, formed more than three decades ago by the São João river dam, is responsible for supplying the Lakes Region and recreation and fishing site. Juveniles of tucunarés were initially introduced into the reservoir by amateur fishermen in the 1990s, however reintroductions may have occurred in the last twenty years. In the last five years the frequency of tucunarés has increased in the catch of the fishermen downstream of Juturnaíba, especially in the last 39 km of the river São João, a stretch highly modified by anthropic interventions. At the moment, it is not known if the populations of tucunaré in this system consist of one or more species, nor if the introduction involved different populations of tucunaré. In this case, the hybridization between species of *Cichla* can happen, changing the gene pools of the populations. Thus, the objective of this work was to characterize the *Cichla* species present in the region of the São João river and the Juturnaíba reservoir, clarifying issues related to taxonomy, genetic structuring of populations and possible hybridization events through the use of nuclear and mitochondrial molecular markers among species of the genus. The genetic data obtained were compared with data of *Cichla* from other regions of Brazil, with the purpose of elucidating the history of the invasions of this genus. The genetic characterization of the populations, besides collaborating to understand the invasive process and the interaction of the tucunaré with the native fauna may have reflexes in the establishment of procedures of management of introduced populations of *Cichla*.

Keywords: Genetic variability. Hybrids. Molecular Marker. São João River. Tucunaré.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	20
Figura 1. São João River basin, illustrating the Juturnaíba reservoir and the stretches meandering natural and rectilinear downstream of the dam.	26
Figura 2. Phylogenetic trees constructed from D-loop sequences of <i>Cichla kelberi</i> and <i>Cichla monoculus</i> , in different Brazilian hydrographic basins, by maximum likelihood (left), with 1,000 bootstrap re-sampling, and neighbor-joining (right), with 10,000 bootstrap re-sampling. <i>Cichla piquiti</i> appear as external group.	32
Figura 3. Network of <i>Cichla kelberi</i> , <i>Cichla monoculus</i> and <i>Cichla piquiti</i> in different Brazilian hydrographic basins, haplotypes based on sequences mitochondrial D-loop.	33
CAPÍTULO 2	41
Figura 1. Bacia hidrográfica do rio São João, ilustrando o reservatório de Juturnaíba e os trechos naturais meandantes e retelinizados a jusante da represa.	47
Figura 2. Árvore gênica <i>LWS</i> gerada a partir de sequências de <i>Cichla</i> pelo método estatístico de máxima verossimilhança com valores de suporte de bootstrap. Populações de <i>C. monoculus</i> (Amarelo), populações de <i>C. kelberi</i> (Azul), populações de <i>C. piquiti</i> (Vermelho) <i>O. niloticus</i> (Verde).	53
Figura 3. Árvore gênica <i>dlx2</i> gerada a partir de sequências de <i>Cichla</i> , pelo método estatístico de máxima verossimilhança com valores de suporte de bootstrap. Populações de <i>C. monoculus</i> (Amarelo), populações de <i>C. kelberi</i> (Azul), populações de <i>C. piquiti</i> (Vermelho) e <i>O. tanganyicae</i> (Verde).	54

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	20
Tabela 1. Collection sites and number of species of <i>Cichla</i> collected in Southamerican river basins.	26
Tabela 2. Distribution of six haplotypes of <i>Cichla</i> in the differents Brazilian hydrographic basins analyzed.	30
Tabela 3. Haplotype and nucleotide diversity index for populations of the <i>Cichla</i> from São João River and Juturnaíba Reservoir.	30
Tabela 4. Genetic distance (P) between native populations of <i>Cichla monoculus</i> , <i>Cichla kelberi</i> , <i>Cichla piquiti</i> , and introduced populations of <i>Cichla</i> from São João River and Juturnaíba reservoir.	31
CAPÍTULO 2	41
Tabela 1. Localidade, número de acesso ao <i>GenBank</i> e referências para todas amostras <i>Cichla</i> nativas (N) e introduzidas (I) estudadas com os marcadores nucleares <i>LWS</i> e <i>dlx2</i>	49
Tabela 2. Valores de distância- <i>p</i> das populações de <i>C. kelberi</i> , <i>C. monoculus</i> e <i>C. piquiti</i> estudadas a partir do gene <i>LWS</i> .	51
Tabela 3. Valores de distância- <i>p</i> das populações de <i>C. kelberi</i> , <i>C. monoculus</i> e <i>C. piquiti</i> estudadas a partir da região <i>Dlx2</i> .	51
Tabela 4. Sítios polimórficos interespecíficos de sequências de <i>LWS</i> e <i>dlx2</i> de <i>Cichla</i>	56

SUMÁRIO

Introdução	13
Referências	17
CAPÍTULO 1	20
MOLECULAR ANALYSIS OF INVASIVE <i>Cichla</i> (CICHLIFORMES, CICHLIDAE) POPULATIONS IN NEOTROPICAL REGIONS	
Resumo	21
Abstract	22
Introdução	23
Metodologia	24
2.1. Amostras e Extração de DNA	24
2.2. Amplificação do DNA e análises moleculares	28
Resultados	29
Discussão	33
Referências	37
CAPÍTULO 2	41
INVESTIGAÇÃO DE EVENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO ENTRE POPULAÇÕES DE <i>Cichla kelberi</i> E <i>Cichla monoculus</i> (CICHLIFORMES, CICHLIDAE) INTRODUZIDAS NO RIO SÃO JOÃO, RIO DE JANEIRO, BRASIL,	
Resumo	42
Abstract	43
Introdução	44
Metodologia	45
2.1. Área de amostragem e extração de DNA	45
2.2. Marcadores moleculares	47
2.3. Análises Genéticas	48
Resultados	50
Discussão	56
Referências	61
Anexo 1	65

1. INTRODUÇÃO

A distribuição natural das espécies nos ecossistemas é influenciada por diversos fatores bióticos e abióticos, e as barreiras físicas operam como filtros para a dispersão (MCNEELY, 2001; ESPÍNOLA; JÚLIO JR, 2007). Há pelo menos 100 mil anos, os processos de migração e colonização de humanos nos diferentes continentes, além da recente tendência de globalização da economia e produtos, têm sido os principais responsáveis pela transposição das barreiras geográficas e introdução de espécies em regiões fora de sua distribuição original (ELTON, 1958). Considerada a segunda maior ameaça à diversidade global (a primeira é a eliminação de habitats), a invasão biológica representa a inserção de um elemento novo na biota de uma região (MACK et al., 2000; SIMBERLOFF, 2003). O processo pode acarretar problemas sociais, econômicos e ambientais, comprometendo o funcionamento dos ecossistemas, especialmente quando a espécie invasora modifica as características da comunidade local (SALA et al., 2000; PELICICE; AGOSTINHO, 2009).

Os impactos decorrentes da introdução de espécies são inúmeros, destacando-se entre eles os diretos, quando a introdução de um novo organismo promove a exclusão das espécies nativas pela competição ou predação; ou indiretos, quando a espécie introduzida afeta as interações interespecíficas da comunidade, com alteração da abundância relativa das outras espécies, nas vias e na intensidade do fluxo de energia do sistema (FULLER et al., 1999; PELICICE; AGOSTINHO, 2009). Estes impactos se tornam ainda mais relevantes em ecossistemas aquáticos continentais, que apesar de representarem uma ínfima porção do volume da água do planeta, detêm proporcionalmente elevada biodiversidade, com complexos padrões de endemismo (ABELL et al., 2008).

Em ambientes aquáticos, os peixes são o grupo com o maior número de espécies introduzidas no mundo (~624 espécies; GOZLAN, 2008), porém é também um dos mais ameaçados (~3.350 espécies ameaçadas em 2010; IUCN, 2010). Espécies de peixes invasoras não-nativas são cada vez mais reconhecidas como ameaça de extinção em ambientes de água doce, juntamente com a perda e fragmentação do habitat, alterações hidrológicas e climáticas, exploração excessiva e poluição (DUDGEON et al., 2006). O aumento no número de introduções de peixes de água doce nativos é um problema

particularmente preocupante em todo o mundo, pois impactos severos têm sido relatados (MOYLE, 1995; DUDGEON et al., 2006; CHANDRA; GERHARDT, 2008; PELICICE; AGOSTINHO, 2009). Além disso, eliminar uma espécie introduzida, uma vez estabelecida, é uma tarefa quase impossível (ROGOWSKI; STOCKWELL, 2006). Este problema é mais grave em regiões onde a fauna nativa é pouco conhecida, o endemismo é alto, e as espécies introduzidas são comuns (PASCUAL et al., 2002).

A introdução de espécies de *Cichla* “tucunarés” em ambientes modificados consiste em um exemplo emblemático. Originários de sistemas amazônicos, os tucunarés são predadores vorazes que costumam habitar principalmente ambientes lênticos estruturados por plantas e troncos submersos (WINEMILLER, 1991), locais que favorecem o cuidado parental e aquisição de presas (ZARET; PAINE, 1993; WINEMILLER et al., 1997). Tais espécies têm obtido sucesso na colonização de reservatórios artificiais em todas as bacias hidrográficas do país, onde experimentam expressivos aumentos populacionais em curto prazo (PELICICE; AGOSTINHO, 2009; ESPÍNOLA et al., 2010).

Na atualidade, espécies de *Cichla* estão presentes em pelo menos 35% dos 71 reservatórios brasileiros onde não são nativos do sistema, estando entre as espécies dominantes em 10% destes (AGOSTINHO et al., 2007). Além do corpo principal do reservatório, os trechos lóticos de montante e jusante podem ser colonizados por tucunarés e, dependendo do grau de estruturação das comunidades e dos filtros ambientais desses sistemas (e.g., temperatura e salinidade da água), estes predadores introduzidos podem interferir nas interações bióticas da ictiofauna nativa através da predação e competição. Reduções drásticas na diversidade de peixes nativos têm sido atribuídas à ocorrência dos tucunarés em sistemas onde estes foram introduzidos (LATINI; PETRERE JUNIOR, 2004; PELICICE; AGOSTINHO, 2009; BRITTON; ORSI, 2012).

O reservatório de Juturnaíba no Estado do Rio de Janeiro, formado há mais de três décadas pelo barramento do rio São João, é responsável pelo abastecimento da Região dos Lagos e local de recreação e pesca. Juvenis de tucunarés foram inicialmente introduzidos no reservatório por pescadores amadores na década de 1990, porém reintroduções podem ter acontecido nos últimos vinte anos. No momento, não se sabe se as populações de tucunarés nesse sistema consistem em uma ou mais espécies e o único

estudo que registra o tucunaré em Juturnaíba faz referência a *Cichla* sp. (MENDONÇA, 2004). Da mesma forma, nada se sabe sobre a interação desse predador não-nativo com a ictiofauna local.

Nos últimos cinco anos tem aumentado a frequência de tucunarés nas capturas dos pescadores a jusante de Juturnaíba, especialmente nos últimos 39 km do rio São João, trecho altamente modificado por intervenções antrópicas. Diferentes morfotipos já foram encontrados durante coletas na região (Ana Cristina Petry, comunicação pessoal).

Além de serem escassos e antigos os estudos científicos sobre a ictiofauna do rio São João (BIZERRIL, 1996), a estrutura populacional do invasor ainda não foi investigada. Não se tem confirmação também sobre qual espécie de *Cichla* foi introduzida nesse sistema, nem se a introdução envolveu diferentes populações ou espécies de tucunaré; nesse caso, além da presença das espécies invasoras, a hibridização entre espécies de *Cichla* pode se suceder, alterando o pool gênico dos invasores (MANLY et al., 1993; BRINN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

A resolução dessas questões pode ser obtida com auxílio de técnicas moleculares que são ferramentas valiosas para a genética de populações, biologia da conservação e estudos de evolução (LIU; CORDES, 2004). Entre as metodologias de análise molecular, aquelas baseadas em fragmentos de DNA nuclear ou mitocondrial tornaram possíveis estudos genético-moleculares envolvendo um grande número de indivíduos.

As sequências mitocondriais têm sido bastante utilizadas em investigações que requerem reconstrução filogenética ou identificação de espécies (AVISE et al., 1987; NEI, 2000; AVISE, 2000, 2004). O *displacement loop* (*D-loop*), por exemplo, tem sido útil em estudos de variabilidade genética e diferenciação de espécies de peixes (WILLIS et al., 2007; BROWN, 2008; AVISE, 2009; BIGNOTTO et al., 2009; PANARARI-ANTUNES et al., 2011; DEPRÁ et al., 2014), incluindo representantes de *Cichla* (OLIVEIRA et al., 2006; BRIÑEZ et al., 2013).

Já os marcadores de DNA nuclear podem ser usados para detectar eventos de hibridização entre espécies (FREELAND, 2005). O sequenciamento do *locus* nuclear *dlx2* possibilitou a diferenciação molecular e identificou eventos de hibridização em espécies de *Cichla* (GASQUES, 2013). E o gene nuclear *LWS* (Long Wavelength Sensitive) que faz parte da família de genes opsins, que codificam proteínas relacionadas ao sistema visual e são amplamente expressas por membros da Cichlidae,

foram utilizados por Fabrin et al (2015) na filogenia de oito espécies de ciclídeos neotropicais e forneceu um bom suporte até o nível do gênero, distinguindo as espécies estudadas.

Estas ferramentas moleculares utilizadas na rotina do Laboratório de Genética do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA) da Universidade Estadual de Maringá contribuíram para a identificação de espécies de *Cichla* do rio São João e reservatório de Juturnaíba. Além disso, as técnicas utilizadas foram úteis para verificação de possíveis eventos de hibridização e avaliação da variabilidade genética dentro de *Cichla* comparativamente com populações de outras bacias hidrográficas brasileiras.

2. REFERÊNCIAS

ABELL, R. et al. Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. **BioScience**, v. 58, n. 5, p. 403 – 414, 2008.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatório**. EDUEM, Maringá. 502p. 2007.

AVISE J. C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 18, n. 1, p. 489-522, 1987.

AVISE, J.C. **Phylogeography: the History and Formation of Species**. Cambridge: Harvard University Press, 2000, 445p.

AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. London: Champman e Hall, 2004.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v.36, p.315, 2009.

BIGNOTTO, T. S. et al. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. **Braz. J. Biol.**, v. 69, n. 2, p. 681-689, 2009

BIZERRIL, C.R.S.F. Trophic structure of fish assemblages of Rio Sao Joao basin, RJ, Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n.3, 1996.

BRINÑEZ, B. et al. Molecular identification of *Cichla* (Perciformes: Cichlidae) introduced in reservoirs in Southern Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 233-239, 2013.

BRINN, M.N.A.; PORTO, J.I.R.; FELDBERG, E. Karyological evidence for interspecific hybridization between *Cichla monoculus* and *C. temensis* (Perciformes, Cichlidae) in the Amazon. **Hereditas**, v. 141, p. 252 – 257, 2004.

BRITTON, J.R.; ORSI, M.L. Non-native fish in aquaculture and sport fishing in Brazil: Economic benefits versus risks to fish diversity in the upper River Paraná Basin. Reviews in **Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 1 – 11, 2012.

BROWN, K. H. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance, and functional variation. **Journal of fish biology**, v.72, p.355-374, 2008.

CHANDRA, S.; GERHARDT, A. Invasive species in aquatic ecosystems: issue of global concern. **Aquatic Invasions**, v. 3, n. 1 p. 1 – 2, 2008.

DEPRÁ, I. C. et al. Molecular study of *Astyanax altiparanae* (Osteichthyes, Characidae) as a probable species complex. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 6015-6026, 2014.

DUDGEON, D. et al. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and

conservation challenges. **Biological Reviews**, v. 81, p. 163 – 182, 2006.

ELTON, C.S.. **The Ecology of Invasions by Animals and Plants**. Methuen. London, 81 p, 1958.

ESPÍNOLA, L.A.; MINTE-VERA, C.V.; JÚLIO JR., H.F. Invasibility of reservoirs in the Parana basin, Brazil, to *Cichla kelberi* Kullander and Ferreira, 2006. **Biological Invasions**, v. 12, n. 6, p. 1873 – 1888, 2010.

ESPÍNOLA, L.A.; JÚLIO JR., H.F. Espécies invasoras: conceitos, modelos e atributos. **Interciência**, v. 32, n. 9, p. 580 – 585, 2007.

FABRIN, T.M.C.; GASQUES, L.S.; PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J. A novel molecular marker for the study of Neotropical cichlid phylogeny. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 18131-18139, 2015.

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.

FULLER, P.L.; NICO, L.G; WILLIAMS, J.D. **Nonindigenous Fishes Introduced into Inland Waters of the United States**. Special Publication 27. American Fisheries Society, Bethesda, MD, EEUU. 613 p. 1999.

GASQUES, L. S. **O gênero *Cichla* (Teleostei: Cichlidae) na planície de inundação do alto rio Paraná: Uma análise de sequências de DNA de regiões nucleares e mitocondriais**. Maringá: UEM, 2013. 104 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

GOZLAN, R.E. Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad? **Fish and Fisheries**, v. 9, p. 106 – 115, 2008.

IUCN. Numbers of Threatened Species by Major Groups of Organisms (1996 – 2013). 2010. Disponível em: http://www.iucnredlist.org/about/summary-statistics#Tables_1_2. (Acessado em 04/02/2019).

LATINI, A.O.; PETRERE JUNIOR, M. Reduction of a native fish fauna by alien species: an example from Brazilian freshwater tropical lakes. **Fisheries Management and Ecology**, v. 11, n. 2, p. 71 – 79, 2004.

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture** v. 238, p. 1–37, 2004.

MACK, R. N.; D. et al. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. **Ecological Applications**, v. 10, n. 3, p. 689 – 710, 2000.

MANLY, B.F.J.; MCDONALD, L.L.; THOMAS, D.L. **Resource selection by animals: Statistical design and analysis for field studies**. Chapman & Hall, NY, 177 p. 1993.

MCNEELY, J. Invasive species: a costly catastrophe for native biodiversity. **Landuse and Water Resources Research**, v. 1, p. 1 – 10, 2001.

MENDONÇA, H. S. **Caracterização e afinidades da ictiofauna do Reservatório de**

- Juturnaíba, em Silva Jardim**, Estado do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zoologia. Museu Nacional/UFRJ, 108p. 2004
- MOYLE, P.B. Conservation of native freshwater fishes in the Mediterranean type climate of California, USA: a review. **Biological Conservation**, v. 72, p. 271 – 279, 1995.
- NEI, M.; KUMAR, S. Molecular Evolution and Phylogenetics. New York: Oxford University Press, 2000.
- OLIVEIRA, A.V. et al. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 260 – 277, 2006.
- PANARARI-ANTUNES, R. S. Genetic Variability of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Characidae) in Cultivated and Natural Populations of the Upper Paraná River, and Implications for the Conservation of the Species. **Brazilian archives of Biology and technology**, v. 54, n. 4, p. 839-848, 2011.
- PASCUAL, M. et al Evaluating potential effects of exotic freshwater fish from incomplete species presence-absence data. **Biological Invasions**, v. 4, p. 101 – 113, 2002.
- PELICICE, F. M.; AGOSTINHO, A. A. Fish fauna destruction after the introduction of a non-native predator (*Cichla kelberi*) in a Neotropical reservoir. **Biological Invasions**, v.11, p. 1789 – 1801, 2009.
- ROGOWSKI, D.L.; STOCKWELL, C.A Assessment of potential impacts of exotic species on populations of a threatened species, White Sands pupfish, *Cyprinodon tularosa*. **Biological Invasions**, v. 8, p. 79 – 87, 2006.
- SALA, O.E. et al. Global biodiversity scenarios for the year 2100. **Science**, v. 287, p. 1770 – 1777, 2000.
- SIMBERLOFF, D. Confronting introduced species: a form of xenophobia? **Biological Invasions**, v. 5, n. 3, p. 179 – 192, 2003.
- WILLIS, S. C. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 291–307, 2007.
- WINEMILLER, K. O. Comparative ecology of *Serranochromis* species (Teleostei: Cichlidae) in the Upper Zambezi River floodplain. **Journal Fish Biology**, v. 39, p. 617 – 639, 1991.
- WINEMILLER, K.O.; TAPHORN, D.C; BARBARINO-DUQUE, A. Ecology of *Cichla* (Cichlidae) in two blackwater rivers of Southern Venezuela. **Copeia**, n. 4, p. 690 – 696, 1997. ZARET, T.M.; PAINE, R.T. Species introduction in a tropical lake. **Science**, v. 182, n. 4111, p. 449 – 455, 1993.

CAPÍTULO 1

MOLECULAR ANALYSIS OF INVASIVE *Cichla* (CICHLIFORMES, CICHLIDAE) POPULATIONS IN NEOTROPICAL REGIONS

Artigo publicado conforme as normas para
publicação científica no periódico
Biochemical Systematic and Ecology.

Resumo

Populações de *Cichla* introduzidas na bacia do rio São João foram geneticamente analisadas e comparadas com populações de outras bacias hidrográficas neotropicais. Polimorfismos nas sequências da região *d-loop* do DNA mitocondrial confirmaram a hipótese de introduções distintas na região estudada. *Cichla kelberi* foi introduzida no reservatório de Juturnaíba e no trecho a jusante do rio São João e *Cichla monoculus* restrita apenas a porção a jusante do rio. Os resultados deste estudo serão úteis para o monitoramento de populações invasivas de *Cichla* na bacia costeira, já que unidades taxonômicas do reservatório e das áreas a jusante foram identificadas.

Palavras-chave: DNA Mitocondrial. *D-loop*. Reservatório de Juturnaíba. Rio São João. Tucunaré.

Abstract

Invasive *Cichla* populations in the São João River basin were genetically analysed and compared with *Cichla* populations from other neotropical hydrographic basins. Polymorphic sequences within the mitochondrial DNA D-loop region confirmed the introduction of different populations to the regions under analysis. *Cichla kelberi* was introduced to the Juturnaíba reservoir and a downstream area of the São João River, with *Cichla monoculus* restricted to downstream river areas. Results from this study will be useful for monitoring invasive *Cichla* populations in the coastal basin, as taxonomic units of both the reservoir and areas downstream were identified.

Keywords: D-loop. Juturnaíba reservoir. Mitochondrial DNA. São João River. Tucunaré.

1. Introduction

The introduction of exotic fish species have caused changes in the natural communities of fresh water ecosystems (Rahel, 2007; Cucherousset and Olden, 2011), primarily at the genetic, demographic and ecosystem levels (Drake et al., 1989; Spencer et al., 2001). The introduction of fish species to Brazilian rivers and reservoirs has been identified as the main cause of the loss of biodiversity (Pelicice et al., 2014), particularly in regions in which the native fauna is unknown, endemism is high and introduced species are a frequent occurrence (Pascual et al., 2002), as in South America.

Fish of the genus *Cichla* Bloch and Schneider (1801) which are popularly known as ‘tucunarés’ or ‘peacock bass’, were deliberately introduced to several hydrographic basins in Brazil (e.g. Agostinho et al., 2007; Pelicice et al., 2015). These fish are native to the Orinoco and Amazon basins and have successfully colonised artificial reservoirs, resulting in a significant population increase, within a short period of time (Pelicice and Agostinho, 2009; Espínola et al., 2010). *Cichla* spp. can be found in several hydroelectric reservoirs, especially in the southeastern and northeastern regions of Brazil (Agostinho et al., 2007), where they were covertly introduced by fishermen to yield greater fish harvests.

The Juturnaíba reservoir, located in the state of Rio de Janeiro, was constructed approximately 30 years ago by damming the São João River; it supplies water to nearly 400,000 people of the Região dos Lagos, which is a fishing and recreational area. Juvenile tucunarés were introduced to the reservoir by sport fishermen in the 1990s. During the last five years, sport fishermen have captured fish downstream of the Juturnaíba dam, specifically within the final 39 km of the São João River, a highly anthropically modified area. However, due to difficulties in the taxonomic identification of the specimens, it is not known whether the tucunaré populations from the reservoir and the river belong to the same species. A single study on tucunarés in the Juturnaíba reservoir mentions *Cichla* sp. (Mendonça, 2004), even though the origin of the population is unknown.

Although *Cichla* taxonomy is based on morphological characteristics, species identification is critical. Kullander and Ferreira (2006) registered 15 different species of *Cichla* in a morphology-based review of the genus, but a study by Willis et al. (2012) revealed genetic introgression between several species and suggested only eight valid

species.

Cichla piquiti, *C. monoculus* and *C. kelberi* (Kullander and Ferreira, 2006) are among the most frequent invasive species found in reservoirs and natural environments (Briñez et al., 2013; Marques et al., 2016; Santos et al., 2016), although the latter two are similar in morphology and colour pattern, known as ‘yellow peacock cichlids’ (Kullander and Ferreira 2006). Specimens of *Cichla* populations in the São João River and the Juturnaíba reservoir vary in their morphology and colour patterns (Fernando Pelicice, personal communication), and differ from patterns originally described for other *Cichla* species. Regarding the occurrence of more than one *Cichla* species in the Juturnaíba reservoir, species hybridization and subsequent changes in the gene pools of invading species should not be underestimated. In fact, the process has already been reported in similar ecosystems (Brinn et al., 2004; Oliveira et al., 2006).

Several genes, or DNA regions, have been traditionally employed as molecular markers to identify species based on genetic differences (Hajibabaei et al., 2007). Herbert (2003) developed a standard marker (COI) for a unified molecular identification system, so that data could be compared both within and between species. Although this DNA region has been widely used for species identification, *Cichla* species cannot be discriminated by COI, since it fails to detect sufficient sequence variations that would differentiate the specimens into distinct species (Gasques et al., 2015). The DNA D-loop region has been used to detect polymorphisms in different *Cichla* species (Willis et al., 2012) and in studies on genetic variability (Oliveira et al., 2006; Briñez et al., 2013), including in yellow peacock cichlids.

The current study characterised the species of *Cichla* populations introduced to the São João River and the Juturnaíba reservoir, and compared them with other introduced and native *Cichla* populations by analysing the DNA D-loop region.

2. Methodology

2.1. DNA sampling and extraction

The São João River is a coastal river system that flows directly into the Atlantic Ocean. Its hydrographic basin (Fig. 1) lies in the Região dos Lagos, state of Rio de Janeiro, Brazil (22°20’–22°50’ S and 42°00’–42°40’ W), with a drainage area of approximately 2,190 km². The river partially runs through six municipalities and

completely through the municipality of Silva Jardim. The Juturnaíba reservoir (43 km²) was built in the 1980s in the middle of the river, some 39 km from its estuary, to supply water to people living nearby.

Specimens of the genus *Cichla* (n = 57) were collected from the Juturnaíba reservoir (voucher specimens: NPM3695, NPM3696, NPM3697, NPM3700 and NPM3706) and downstream from different meandering and straight areas of the São João River (voucher specimens: NPM3693, NPM3694, NPM3699, NPM3701, NPM3702, NPM3703, NPM3704, NPM3705, NPM3707, NPM3708, NPM3709, NPM3717, NPM3718, NPM3719, NPM3720 and NPM3721). Fish were captured using a line, hook and artificial bait. Specimens were then euthanised with an overdose of benzocaine (250 mg/L, previously diluted in 5 mL ethanol) (Griffiths, 2000). Voucher specimens were deposited into the ichthyology collection of the Nucleus in Ecology and Socio-Environmental Development de Macaé, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil.

Fish muscle samples were removed, fixed in commercial ethanol and stored at -20°C. These specimens were then sent to the tissue bank of the genetics lab of the Research Nucleus in Limnology, Ichthyology and Aquaculture, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil. Capture and euthanasia procedures were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the UFRJ–Campus Macaé Prof. Aloísio Teixeira, under reference number MAC029.

Cichla samples from the Tocantins River basin were kindly donated by Professor Carlos Sérgio Agostinho and used in this study. Nucleotide sequences of *Cichla* populations from other Brazilian hydrographic basins, available from GenBank, were also employed for the building of phylogenetic trees and a haplotype network (Table 1).

Total DNA was extracted from the samples using the Promega Wizard Genomics kit, following the manufacturer's instructions. Aliquots of the samples were quantified after electrophoresis through a 1.0% agarose gel and comparison with known quantities of λ DNA.

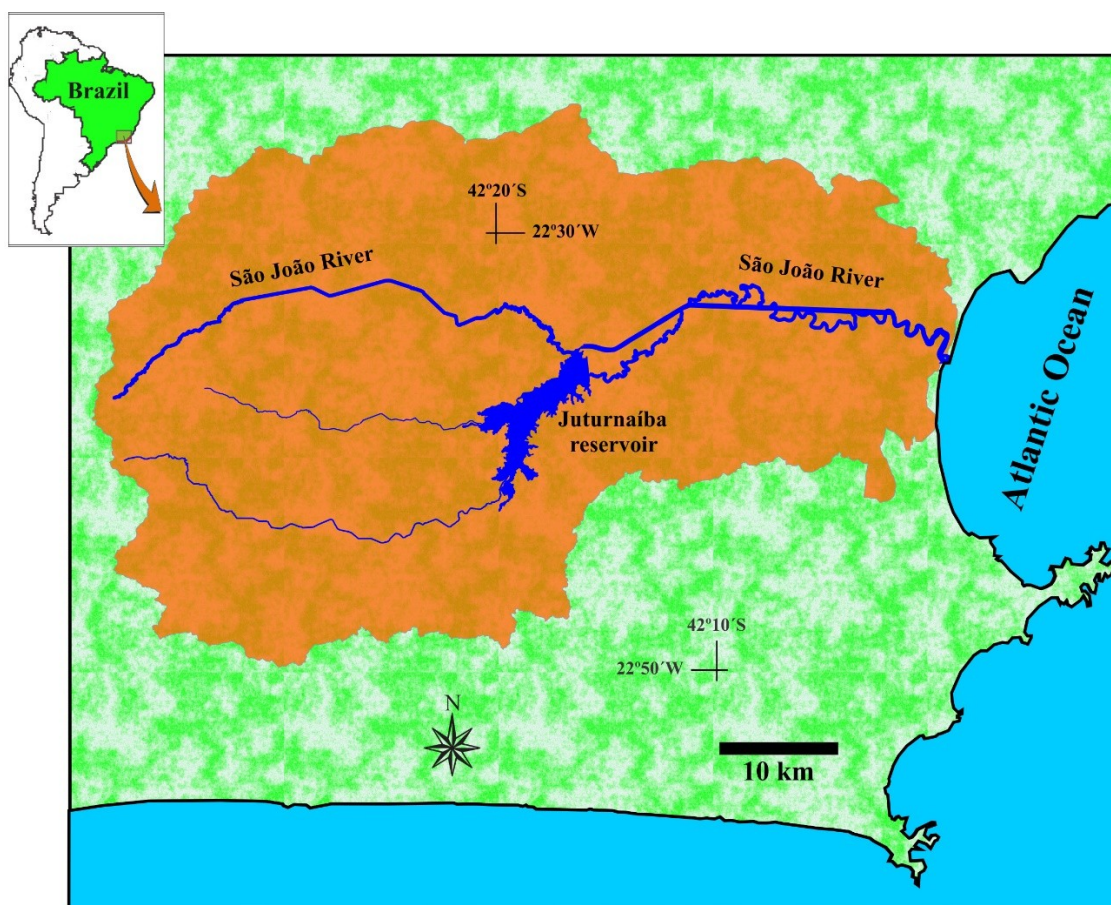


Fig. 1. São João River basin, illustrating the Juturnaíba reservoir and the stretches meandering natural and rectilinear downstream of the dam.

Table 1

Collection sites and number of species of *Cichla* collected in Southamerican river basins.

Species	Locality	Number of samples	Reference - GenBank
<i>C. monoculus</i>	Solimões River, Brazil	5	This work
	Taquaruçu reservoir, Paranapanema River, in the upper Paraná basin, Brazil.	1	Briñez et al., 2013. (FJ872855)
	Capivara reservoir, Paranapanema River, in the upper Paraná basin, Brazil.	2	Oliveira et al., 2006. (AY836728, AY836732)
	Amazonas and Orinoco basins	10	Willis et al., 2007.

			(DQ841897, DQ841892, DQ841891, DQ841888, DQ841887, DQ841885, DQ841884, DQ84180, DQ841878, DQ841875)
	Amazonas and Orinoco basins, and Casiquiare River.	10	Willis et al., 2010. (GU295732-GU295724; GU295714)
<i>C. kelberi</i>	Tocantins River basin, Brazil.	7	This work
	Upper Paraná River floodplain; Taquaruçu reservoir, Paranapanema River, in the upper Paraná basin, Brazil.	4	Briñez et al., 2013. (FJ872916, FJ872899, FJ872898, FJ872895)
	Upper Paraná River floodplain, Brazil.	4	Oliveira et al., 2006. (AY836717- AY836720)
	Tucuruí reservoir, Tocantins River, Brazil.	1	Carvalho et al., 2009. (FJ890812)
	Três Marias reservoir, São Francisco River, Brazil.	1	Carvalho et al., 2009. (FJ890816)
	Itumbiara reservoir, Paranaíba River, in the upper Paraná basin, Brazil.	2	Carvalho et al., 2009. (FJ890811, FJ890809)
	Elvécio Lake, Doce River basin, Brazil.	1	Carvalho et al., 2009. (FJ890815)
	Pereira Passos reservoir, Paraíba do Sul River, Brazil.	1	Marques et al., 2016. (KU882083)
	Tocantins River basin, Brazil	2	Willis et al., 2012. (JQ926871, JQ926872)
	Tocantins River basin, Brazil.	3	Willis et al., 2010. (GU295705, GU295706, GU295707)
<i>C. piquiti</i>	Tocantins River, Brazil.	3	This work
<i>Cichla sp.</i>	São João River, Rio de Janeiro, Brazil.	30	This work
	Juturnaíba reservoir, São João River, Rio de Janeiro, Brazil.	27	This work
Total		114	

2.2. DNA amplification and molecular analyses

The mitochondrial DNA (mtDNA) D-loop region was amplified according to Oliveira et al. (2006). The polymerase chain reaction (PCR) mixture consisted of Tris-KCl [20 mM Tris-HCl (pH 8.4) and 50 mM KCl], MgCl₂ (1.5 mM), H16498 (Meyer et al., 1990) and D-loop L (Cronin et al., 1993) primers (2.5 mM each), dNTPs (0.1 mM each), *Taq* DNA Polymerase Platinum (1.0 U; Invitrogen), 10 ng recently extracted DNA and water, in a total volume of 25 µL. The PCR conditions were denaturation at 94°C for four min, 39 cycles of denaturation at 94°C for 15 s and annealing at 55°C for 30 s, extension at 72°C for two min and a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were purified according to Rosenthal et al. (1993), and the sequencing reaction was performed using the Big Dye Terminator kit. Determination of nucleotide sequence was preceded with an automatic ABI 3500 sequencer, according to the manufacturer's instructions.

Nucleotide sequences with over 90% reliability were manually edited using BioEdit 7.2.0 software (Hall, 1999) and aligned in Clustal W (Thompson et al., 1994) using Mega 6.0 software (Tamura et al., 2013). Phylogenetic analyses were performed using neighbour-joining statistical methods with 10,000 bootstrap and maximum-likelihood resampling. Dendrograms were performed using Mega 6.0 software (Tamura et al., 2013).

Haplotypes from each species were selected using DnaSP 5.1 software (Librado and Rozas, 2009), and databases were generated for analysis using Arlequin 3.5 software (Excoffier et al., 2010). Sequence composition and estimates of haplotype and nucleotide indices were calculated using Arlequin 3.5 software (Excoffier et al., 2010). Distance *P* rates were determined using Mega 6.0 software (Tamura et al., 2013). A haplotype network was constructed to verify the spatial distribution of the haplotypes from all populations using the median-joining method from PopArt software (<http://popart.otago.ac.nz>). All obtained and analysed partial sequences were deposited in GenBank and assigned access numbers KY359146–KY359202.

3. Results

Sequences from 422 bp of the mtDNA D-loop (control region) were obtained from five *Cichla monoculus* specimens from the Solimões River, three *C. piquiti* specimens and seven *C. kelberi* specimens from the Tocantins River basin, and 57 *Cichla* sp. specimens from the Juturnaíba reservoir and São João River (Table 1). Also obtained sequences of D-loop of *C. monoculus* and *C. kelberi* (GenBank) from different hydrographic basins in Brazil, in which the species were either native or introduced (Table 1).

The analysis of 72 different sequences, obtained in the current study led to the identification of 65 polymorphic sites, featuring 68 mutations at 62 sites. The transition/transversion rate was estimated to be 4%, of which 3.2% were transitions and 0.8% were transversions. Mean frequencies of the four nucleotides for all *Cichla* samples were C: 12.1%; T: 38.1%; A: 29.4% and G: 20.5%.

Six haplotypes were identified for the 72 sequences analysed: Three occurred in basins where *Cichla* is a native species, and three occurred in the São João River basin. The population of *C. monoculus* from the Solimões River has an exclusive haplotype, similar to those of *C. kelberi* and *C. piquiti* from the Tocantins River basin. On the other hand, *Cichla* sp. populations from the São João River have two exclusive haplotypes and one shared haplotype with species from the Juturnaíba reservoir (Table 2). Haplotype 5 was the most frequent; it was found in 49 different specimens. Native and introduced populations did not share any haplotypes. Considering the sequences of GenBank, five populations from *Cichla* shared the haplotype H5 with the populations introduced to the São João River basin; and two populations of *C. monoculus* and two populations of *C. kelberi* shared with native populations of *C. monoculus* and *C. kelberi* from the current investigation the haplotypes H1 and H4, respectively (Table 2).

Table 2

Distribution of six haplotypes of *Cichla* in the different Brazilian hydrographic basins analyzed.

Species	Haplotype	JR	SJ	A	T	uPR	PS	SF	DR
<i>C. monoculus</i>	H1	-	-	8	-	2	-	-	-
	H2	-	4	-	-	-	-	-	-
	H3	-	4	-	-	-	-	-	-
<i>C. kelberi</i>	H4	-	-	-	8	2	-	-	-
	H5	27	22	-	1	2	1	1	1
<i>C. piquiti</i>	H6	-	-	-	3	-	-	-	-

JR: Juturnaíba Reservoir; **SJ:** São João River; **A:** Amazon basin; **T:** Tocantins-Araguaia basin; **uPR:** Upper Paraná River basin; **PS:** Paraíba do Sul River basin; **SF:** São Francisco River basin; **DR:** Doce River basin.

The haplotype diversity index (h) for all specimens was 0.522, whereas the nucleotide diversity index (π) was 0.02412. *C. monoculus*, *C. kelberi*, *C. piquiti* and the specimens *Cichla* sp. which were introduced to the Juturnaíba reservoir had neither haplotypes nor nucleotide diversity. *Cichla* sp. from the São João River exhibited high diversity rates (Table 3).

Table 3

Haplotype and nucleotide diversity index for populations of the *Cichla* from São João River and Juturnaíba Reservoir.

Population	Sequences	Haplotypes	Haplotype diversity (h)	Nucleotide diversity (π)
Juturnaíba Reservoir	27	1	0.000 ±0.000	0.00000 ±0.00000
São João River	30	3	0.441 ±0.098	0.02232 ±0.0102

Results of P distance between two populations show that that *C. kelberi*, *C. monoculus* and *C. piquiti* were genetically distant, as expected. Specimens from the São João River revealed a genetic similarity to native populations of *C. kelberi* and *C. monoculus*, whereas specimens from the reservoir were similar to *C. kelberi* (Table 4).

Table 4

Genetic distance (P) between native populations of *Cichla monoculus*, *Cichla kelberi*, *Cichla piquiti*, and introduced populations of *Cichla* from São João River and Juturnaíba reservoir.

	<i>C. Monoculus</i> (1)	<i>C. piquiti</i> (2)	<i>C. kelberi</i> (3)	Juturnaíba reservoir (4)	São João River (5)
1	-				
2	0.142	-			
3	0.045	0.148	-		
4	0.042	0.145	0.007	-	
5	0.032	0.145	0.018	0.012	-

The nucleotide substitution model, which was selected for phylogenetic tree construction of the genus *Cichla*, was HKY + G (Hasegawa-Kishino-Yano + Gama). The two trees generated (Fig. 2) using the neighbour-joining statistical (right) and maximum-likelihood (left) models were congruent in the generation of the three great clades, which included sequences of the control regions from *C. monoculus* and *C. kelberi* (GenBank). The first clade was formed by *C. piquiti* specimens at a basal position (genetic distance = 0.14 when compared to *C. kelberi* and *C. monoculus*) and appeared as an external group. *C. monoculus* specimens formed the second clade, which was divided into two groups: specimens from the Amazon basin, upper Paraná River basin, and São João River, and specimens from the Amazon basin and upper Paraná River basin. This second groups was closer to the third clade, which was composed of populations from the Juturnaíba reservoir and the São João River, native *C. kelberi* populations from the Tocantins River basin, and other introduced *C. kelberi* populations (with genetic distance = 0.04 between the last two clades).

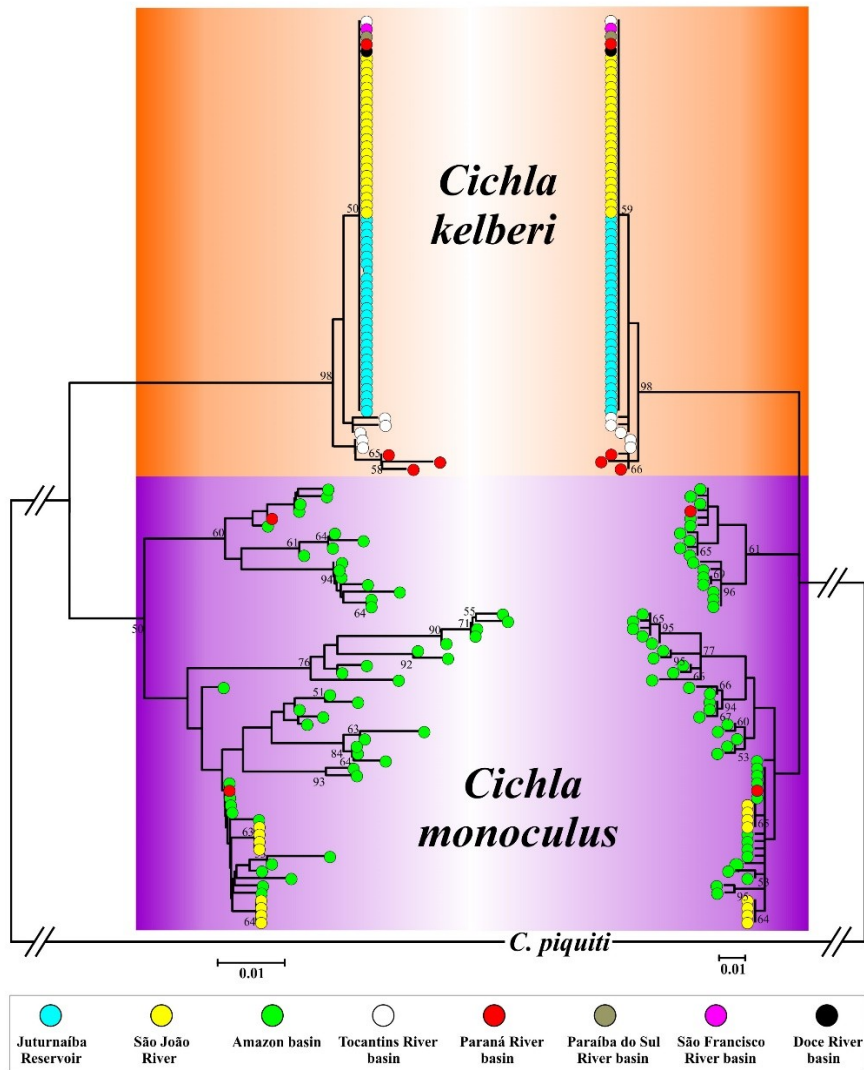


Fig. 2. Phylogenetic trees constructed from D-loop sequences of *Cichla kelberi* and *Cichla monoculus*, in different Brazilian hydrographic basins, by maximum likelihood (left), with 1,000 bootstrap re-sampling, and neighbor-joining (right), with 10,000 bootstrap re-sampling. *Cichla piquiti* appear as external group.

Although results demonstrate low bootstrap rates, phylogenetic trees were similar to the generated haplotype network. One group was formed by haplotypes of native *C. monoculus* specimens from the Amazon basin and introduced to the upper Paraná River basin, which was similar to the second group of haplotypes of native *C. monoculus* from the Amazon basin and upper Paraná River basin, and specimens introduced to the São João River. A third group was formed by *C. kelberi* haplotypes from different Brazilian hydrographic basins (native and introduced populations) and

specimens from the Juturnaíba reservoir and the São João River (Fig. 3). Great species differentiation can be noted by the absence of intermediary haplotypes among the different haplogroups.

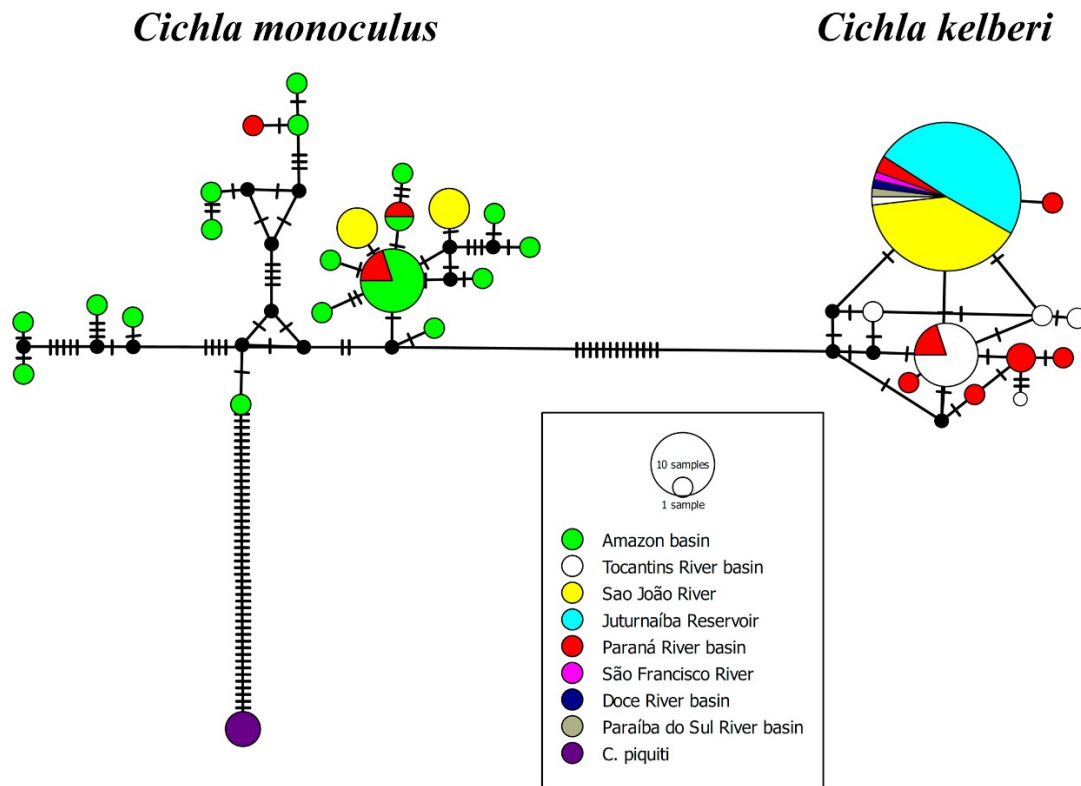


Fig. 3. Network of *Cichla kelberi*, *Cichla monoculus* and *Cichla piquiti* in different Brazilian hydrographic basins, haplotypes based on sequences mitochondrial D-loop.

3. Discussion

Results of the present study confirm that populations of the genus *Cichla* that were introduced to the Juturnaíba reservoir and downstream areas of the São João River belong to *C. kelberi* and *C. monoculus*. No specimens from either the reservoir or the São João River were genetically similar to *C. piquiti*, which completely differs from the introduced populations. In fact, data reveal the absence of this species in the regions under analysis. Polymorphisms of mtDNA sequences confirm that *C. kelberi* was introduced to the Juturnaíba reservoir and downstream areas of the São João River, whereas *C. monoculus* distribution was limited to downstream river areas. Despite the low support values presented in phylogenetic analyzes, the interspecific genetic

distances and the median-joining haplotype network results, with the lack of intermediate haplotypes among the different haplogroups, confirm these results. Genetic polymorphisms in the D-loop region of different *Cichla* species were previously identified (Oliveira et al., 2006; Briñez et al., 2013), corroborating results obtained using other mitochondrial and nuclear markers (Willis et al., 2012). Results reported here reveal that more than one *Cichla* introduction event occurred at the São João River, as evidenced by the presence of two distinct species.

C. kelberi haplotypes in the present study were shared with haplotypes found in the Tocantins River basin and other Brazilian hydrographic basins, where different species had been introduced; these include populations from the Pereira Passos, Paraíba do Sul River and Três Marias reservoirs from the São Francisco River, Elvelcio Lake, the Doce River basin and the upper Paraná River basin. Consequently, one hypothesis that may be proposed is that *C. kelberi* populations from the São João River basin are derived from native populations of the Tocantins River basin, similar to other introduced populations that have been previously studied (Carvalho et al., 2009; Almeida-Ferreira et al., 2011; Marques et al., 2016). A second hypothesis is that populations from the São João River may be derived from other populations introduced to Brazilian reservoirs, similar to those investigated in the current study, whose haplotypes were shared. Special emphasis is given to populations of the southeastern Brazilian region, due to their geographical proximity to populations of the São João River basin.

Since *C. kelberi* populations from the Juturnaíba reservoir and the São João River shared one haplotype, a single introduction event is suggested, featuring an initial invasion of the reservoir and a later appearance at river areas downstream. The above scenario is plausible, since the reservoir is divided from the downstream areas by a zigzag-shape dam that discharges water only when the reservoir is full. On the dam's bank, canals with continuous water flow guarantee a minimum discharge and eventually let fish pass. Since the water level downstream is below the level of the reservoir, the ascent of fish is improbable, especially in the case of tucunarés, which are neither migrating nor jumping fish (Hoeinghaus et al., 2003). Further, the null rates of haplotype and nucleotide diversity for *C. kelberi* suggest that the original introduction event was performed from a small number of individuals, which did not represent the

genetic variation of the native populations. The low genetic rates in the introduced populations of *Cichla* have been highlighted by other authors (Carvalho et al., 2014; Marques et al., 2016); these rates may have resulted from covert introduction, which always consists of small numbers of specimens during the stocking event.

C. kelberi found in downstream areas of the São João River are related to *C. monoculus*, which have a greater haplotype diversity rate. Although there was no sharing of haplotypes observed, *C. monoculus* haplotypes from the São João River are genetically similar to those from the Solimões and Orinoco Rivers, a fact also observed by Briñez et al. (2013) in populations introduced to the upper Paraná River basin. These data demonstrate the importance of the Amazon basin as an original site for introduced populations of *C. monoculus* to reservoirs and rivers in different Brazilian basins, like the São João River. In addition, *C. monoculus* has been identified in other reservoirs in the southeastern region of Brazil (Gomiero and Braga, 2003; Santos et al., 2016), which are possible sites of clandestine introductions. The presence of different *C. monoculus* haplotypes in the São João River may indicate different introduction events, which are likely when alleles that do not occur together in native populations are found in introduced populations (Johnson et al., 2011; Fitzpatrick et al., 2012). However, single introductory events with large numbers of individuals can result in the presence of different haplotypes in the population.

The formation of two *C. monoculus* groups in the phylogenetic tree shows the great variety of haplotypes related to the Amazon basin. Willis et al. (2012) attribute this variation to natural events, such as gene flow and introgressive hybridization between different nominal species, experienced by the populations.

Our analyses confirm the genetic similarity between *C. kelberi* and *C. monoculus* that was previously shown by Willis et al. (2010) by molecular analyses. Gasques et al. (2015) also detected the similarity between the two clades using nuclear and mitochondrial markers *cytb*, *dlx2* and *cox I*, although *cox I* is only useful to differentiate *C. piquiti* from the other two species. In their manuscript on the genetic introgression of native *Cichla* populations, Willis et al. (2012) suggested that genetic introgression is a natural mechanism of the evolution of several tropical species; these authors thus reduced the number of valid *Cichla* species to eight. Consequently, due to their genetic similarity, the nominal species *C. kelberi* and *C. monoculus* would be

recategorised as subspecies or evolutionarily significant units of *Cichla ocellaris*.

Results from the current study and other investigations indicate that the historical introduction of *C. kelberi* and *C. monoculus* to different Brazilian hydrographic basins began with populations from the Tocantins and Amazon River basins, respectively. While these different events resulted in low diversity rates of the introduced populations (Oliveira et al., 2006; Briñez et al., 2013; Marques et al., 2016), several invading populations were successful. For example, the capture of a great number of juveniles from the high Paraná River basin revealed the high reproductive success of *Cichla* spp. (Espínola et al., 2010). The numbers of several *Cichla* populations increased within a short period in reservoirs (Pelicice et al., 2015). Carvalho et al. (2014) attribute the success of invading *Cichla* populations in the southeastern region of Brazil to feeding and reproduction strategies, the effects of evolution traps and weak biotic resistance due to anthropic modifications of the ecosystem (e.g. Bunn and Arthington, 2002; Koehn, 2004). The ecological requirements for *Cichla* (food and reproduction) should play important roles in their invasion of hydroelectric reservoirs, since *Cichla* is a voracious piscivore adapted to lentic environments where it consumes small fish, builds nests and displays parental care (Vieira et al., 2009; Marto et al., 2015). Consequently, an invasive event that releases both males and females, albeit with low pressure (size and number; Lockwood et al., 2005), should be sufficient to establish viable populations.

Although *Cichla* populations from the Juturnaíba reservoir and the São João River have increased considerably, their specific interactions with local fauna are still unknown. The analysed regions are part of an estuary adjacent to the Campos basin in southeastern Brazil that have rarely been studied. In fact, their ichthyofauna composition is still largely unknown. Data from the present study will be useful for monitoring invasive *Cichla* populations in the coastal basin, since the taxonomic units of *Cichla* inhabitants of both the reservoir (*C. kelberi*) and areas downstream (*C. kelberi* and *C. monoculus*) were identified. Additional studies should prioritise the population dynamics of invasive species, their ecological interactions and their effects on native fauna. In addition, the investigation of *Cichla* introduction events could identify best practices for São João River basin management programmes that would benefit both biodiversity and the fishing industry.

Acknowledgement

The authors are grateful to Universidade Federal do Rio de Janeiro and Universidade Federal do Tocantins for cooperation in the development of this manuscript. We also appreciate Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the project funding and research scholarship and the Nupélia for the infrastructure made available for this research.

Reference

- Agostinho, A.A., Gomes, L.C., Pelicice, F.M., 2007. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatório. EDUEM, Maringá.
- Almeida-ferreira, G.C., Oliveira, A.V., Prioli, A.J., Prioli, S.M.A.P., 2011. Spar genetic analysis of two invasive species of *Cichla* (Tucunaré) (Perciformes: Cichlidae) in the Paraná River basin. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 33, 79-85.
- Briñez, B., Júlio JR., H.F., Prioli, S.M.A.P., Maniglia, T. C., Prioli, A. J., 2013. Molecular identification of *Cichla* (Perciformes: Cichlidae) introduced in reservoirs in Southern Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 35, 233-239.
- Brinn, M.N.A., Porto, J.I.R., Feldberg, E., 2004. Karyological evidence for interspecific hybridization between *Cichla monoculus* and *C. temensis* (Perciformes, Cichlidae) in the Amazon. *Hereditas* 141, 252 – 257.
- Bunn, S.E., Arthington, A.H., 2002. Basic principles and ecological consequences of altered flow regimes for aquatic biodiversity. *Environmental Management* 30, 492–507.
- Carvalho, D.C., Oliveira, D.A.A., Sampaio, I., Beheregaray, L.B., 2014. Analysis of propagule pressure and genetic diversity in the invasibility of a freshwater apex predator: the peacock bass (genus *Cichla*). *Neotropical Ichthyology* 12, 105–116.
- Carvalho, D.C., Oliveira, D.A.A., Santos, J.E., Teske, P. Beheregaray, L.B., Schneider, H., Sampaio, I., 2009. Genetic characterization of native and introduced populations of the Neotropical cichlid genus *Cichla* in Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 32, 601-607.
- Cronin, M.A., Spearman, W.J., Wilmot, R.L., Patton, J.C., Bickham J.W., 1993. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 708–715.
- Cucherousset, J., Olden, J. D., 2011. Ecological impacts of non-native freshwater fishes.

Fisheries 36, 215–230.

Drake, J. A., Mooney, H. A., Di Castri, F., Groves, R. H., Kruger, F. J., Rejmanek, M., Williamson, M., 1989. *Biological Invasions*. John Wiley and Sons, New York.

Espínola, L. A., Minte-Vera, C.V., Júlio Jr., H.F., 2010. Invasibility of reservoirs in the Paraná basin, Brazil, to *Cichla kelberi* Kullander and Ferreira, 2006. *Biological Invasions* 12, 1873 – 1888.

Excoffier, L.G., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47 – 50.

Fitzpatrick, B.M., Fordyce, J.A., Niemiller, M.L., Reynolds, R. G., 2012. What can DNA tell us about biological invasions? *Biological Invasions* 14, 245–253.

Gasques, L.S., Fabrin, T.M.C, Gonçalves, D.D., Prioli, S.M.A.P., Prioli A. J., 2015. Prospecting molecular markers to distinguish *Cichla kelberi*, *C. monoculus* and *C. piquiti*. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 37, 455–462.

Gomiero L.M., Braga F.M.S., 2003. Relação peso-comprimento e fator de condição para *Cichla cf. ocellaris* e *Cichla monoculus* (Perciformes, Cichlidae) no reservatório de Volta Grande, rio Grande - MG/SP. *Acta Scientiarum: Biological Sciences* 25, 79-86.

Griffiths, S.P., 2000. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology* 57, 1453–1464.

Hajibabaei, M., Singer, E.A.C., Hebert, P.D.N., Hickey, D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* 23, 167-172.

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

Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., Waard, J.R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergence among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270, S96-S99.

Hoeinghaus, D.J., Layman, C.A., Arrington, D.A., Winemiller K.O., 2003. Movement of *Cichla* species (Cichlidae) in a Venezuelan floodplain river. *Neotropical Ichthyology* 1, 121-126.

Johnson, J.R., Thomson, R.C., Micheletti, S.J., Shaffer, H.B., 2011. The origin of tiger salamander (*Ambystoma tigrinum*) populations in California, Oregon and Nevada: introductions or relicts. *Conservation Genetics* 12, 355–370.

Koehn, J.D., 2004. Carp (*Cyprinus carpio*) as a powerful invader in Australian waterways. *Freshwater Biology* 49, 882–894.

Kullander, S., Ferreira, E., 2006. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 17, 289-398.

Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.

Lockwood, J.L., Cassey P., Blackburn T., 2001. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *TRENDS in Ecology and Evolution* 20, 223-228.

Marques, A.C.P.B., Franco, A.C.S., Salgueiro, F., García-Berthou, E., Santos, L.N., 2016. Genetic divergence among invasive and native populations of the yellow peacock cichlid *Cichla kelberi*. doi:10.1111/jfb.13144.

Marto, V.C.O., Akama, A., Pelicice, F.M., 2015. Feeding and reproductive ecology of *Cichla piquiti* Kullander & Ferreira, 2006 within its native range, Lajeado reservoir, rio Tocantins basin. *Neotropical Ichthyology* 13, 625-636.

Mendonça, H.S. Caracterização e afinidades da ictiofauna do Reservatório de Juturnaíba, em Silva Jardim, Estado do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Zoologia. Museu Nacional/UFRJ, 108p. 2004.

Meyer, A., Kocher, T.D., Basasibwaki, P., Wilson, A. C., 1990. Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* 347, 550–553.

Oliveira, A.V., Prioli, A.J., Prioli, S.M.A.P., Bignotto, T.S., Júlio JR., H.F., Carrer, H., Agostinho, C.S., Prioli, L.M., 2006. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. *Journal of Fish Biology* 69, 260 – 277.

Pascual, M., Macchi, P., Urbanski, J., Marcos, F., Riva Rossi, C., Novara, M., Dell’Arciprete, P., 2002. Evaluating potential effects of exotic freshwater fish from incomplete species presence– absence data. *Biological Invasions* 4, 101–113.

Pelicice, F.M., Latini J.D., Agostinho A.A., 2015. Fish fauna disassembly after the introduction of a voracious predator: main drivers and the role of the invader’s demography. *Hydrobiologia* 746, 271–283.

Pelicice, F.M., Vitule, J. R. S., Lima Junior D.P., Orsi, M.L., Agostinho, A. A., 2014. A serious new threat to Brazilian freshwater ecosystems: the naturalization of nonnative fish by decree. *Conservation Letters* 7, 55–60.

Pelicice, F.M.; Agostinho, A.A., 2009. Fish fauna destruction after the introduction of a non-native predator (*Cichla kelberi*) in a Neotropical reservoir. *Biological Invasions* 11 1789 – 1801.

- Rahel, F.J., 2007. Biogeographic barriers, connectivity and homogenization of freshwater faunas: it's a small world after all. *Freshwater Biology* 52, 696–710.
- Rosenthal, A., Coutelle, O., Craxton, M., 1993. Large-scale of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Research* 21, 173-174.
- Santos, L.N., Franco, A.C.S., Marques, A.C.P.B., Nóbrega, F., Salgueiro, F., 2016. Molecular analysis confirms the introduction of a second species of yellow peacock cichlid *Cichla monoculus* Spix & Agassiz 1831 (Cichliformes: Cichlidae) in the Southeast Atlantic Hydrographic province, Brazil. *BioInvasions Records* 5, 277–284.
- Spencer, C.N., McClelland, B.R., Stanford, J.A., 2001. Shrimp stocking, salmon collapse, and eagle displacement. *Bioscience* 41, 14–21.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725 – 2729.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Vieira, A.B.C., Salvador-Jr., L.F., Melo, R.M.C., Santos, G.B., Bazzoli, N., 2009. Reproductive biology of the peacock bass *Cichla piquiti* (Perciformes: Cichlidae), an exotic species in a Neotropical reservoir. *Neotropical Ichthyology* 7, 745-750.
- Willis, S.C, Macrander, J., Farias, I.P., Ortí, G., 2012. Simultaneous delimitation of species and quantification of interspecific hybridization in Amazonian peacock cichlids (genus *Cichla*) using multi-locus data. *BMC Evolutionary Biology* 12, 1471-2148.
- Willis, S.C., Nunes, M., Montana, C.G., Farias, I.P., Orti, G., Lovejoy, N.R., 2010. The Casiquiare river acts as a corridor between the Amazonas and Orinoco river basins: biogeographic analysis of the genus *Cichla*. *Molecular Ecology* 19, 1014–1030.

CAPÍTULO 2

INVESTIGAÇÃO DE EVENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO ENTRE
POPULAÇÕES DE *Cichla kelberi* E *Cichla monoculus*
(CICHLIFORMES, CICHLIDAE) INTRODUZIDAS NO RIO SÃO
JOÃO, RIO DE JANEIRO, BRASIL

*Artigo elaborado e formatado conforme as
normas para publicação científica no
periódico Biochemical Systematic and
Ecology.*

Resumo

No reservatório de Juturnaíba, formado pelo barramento do rio São João, e a jusante do mesmo rio, espécies de tucunaré, identificadas pela análise do DNA mitocondrial como *Cichla kelberi* e *Cichla monoculus* foram introduzidos e nos últimos anos têm apresentado expressivo crescimento populacional. Peixes dessas espécies coletados na bacia do rio São João apresentam distintos padrões de coloração e morfologia e diferem dos padrões originalmente descritos para outras espécies de *Cichla*. Nessa região, a quebra de isolamento geográfico entre as espécies *C. monoculus* e *C. kelberi*, ocasionado pelos eventos de introdução, pode ter levado à quebra de isolamento reprodutivo, culminando com alterações no pool gênico das espécies invasoras e eventos de introgressão. Dessa forma, o presente estudo utilizou os genes *LWS* e *dlx2* do DNA nuclear para caracterizar as espécies de *Cichla* que ocorrem no rio São João e reservatório de Juturnaíba e verificou a presença de híbridos interespecíficos. Os resultados obtidos com *C. kelberi* e *C. monoculus* indicam a ocorrência de híbridos entre *C. kelberi* e *C. monoculus* na região. Uma vez identificados os híbridos, é importante o monitoramento dessas populações, pois híbridos podem ser mais competitivos e agressivos que as espécies parentais e a redução ou expansão populacional de *Cichla* têm consequências sobre as espécies nativas da região.

Palavras-chave: DNA nuclear, *dlx2*, *LWS*, Rio São João, Tucunaré.

Abstract

Hybridization is a frequent occurrence among species of *Cichla* and studies have already verified the presence of hybrids in both natural and introduced populations. In the Juturnaíba reservoir, formed by the São João River damming, and downstream of the same river, species of tucunaré, identified by the mitochondrial DNA analysis as *Cichla kelberi* and *Cichla monoculus* were introduced and in recent years have presented significant population growth. Specimens of these species collected in the São João River basin have different patterns of color and morphology and differ from the patterns originally described for other *Cichla* species. In this region, the breakdown of geographic isolation between the species *C. monoculus* and *C. kelberi*, caused by the introduction events, may have led to the breakdown of reproductive isolation, culminating with changes in the gene pool of invasive species and introgression events. Thus, the present study used the *LWS* and *dlx2* genes of nuclear DNA to characterize the *Cichla* species occurring in the São João River and the Juturnaíba reservoir and to verify the presence of interspecific hybrids. The results confirm the introduction of *C. kelberi* and *C. monoculus* and indicate the occurrence of hybrids in the region. The region studied is part of an estuarine system of socioeconomic expression and lacking scientific studies. Once hybrids are identified it is important to monitor these populations, hybrids may be more competitive and aggressive than parental species and the population reduction or expansion of *Cichla* has consequences on the native species of the region.

Keywords: *dlx2*, *LWS*, nuclear DNA, São João River, Tucunaré.

1. Introdução

A Taxonomia de *Cichla* Bloch & Schneider, 1801 é bastante controversa. Kullander e Ferreira (2006) reportam 15 diferentes espécies de *Cichla* na revisão do gênero baseada apenas na morfologia, mas um estudo realizado por Willis et al. (2012) mostra introgressão genética entre várias destas espécies e sugerem que apenas oito espécies sejam válidas.

Eventos de hibridização podem tornar a taxonomia desse gênero ainda mais confusa, pois é bastante complicado diferenciar espécies e híbridos. As linhagens híbridas, especialmente as mais avançadas, podem assemelhar-se aos parentais, dificultando a correta identificação das espécies (Allendorf et al., 2001).

Para *Cichla* a hibridização é um fenômeno natural que foi verificado em inúmeros estudos (Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2008, Willis et al., 2012, Willis et al., 2013, Mourão et al., 2017). Híbridos entre *C. temensis* Humboldt, 1821 e *C. ocellaris* Bloch & Schneider, 1801 foi observado em cativeiro já em meados do século anterior (Sawaya e Maranhão, 1946). Na região amazônica, onde as espécies são nativas, Willis et al. (2007) encontraram evidências da introgressão entre *C. orinocensis* Humboldt, 1821 e *C. monoculus* Agassiz, 1831 e Brinn et al. (2004) e Teixeira e Oliveira (2005) evidenciaram a hibridização entre *C. monoculus* e *C. temensis*. Além disso os autores sugerem a possibilidade da ocorrência de híbridos em regiões onde espécies de *Cichla* foram introduzidas, fato confirmado por Oliveira et al. (2006).

Na região dos lagos, no estado do Rio Janeiro, Brasil, juvenis de tucunarés foram inicialmente introduzidos no reservatório Juturnaíba, formado há mais de três décadas pelo barramento do rio São João, por pescadores amadores na década de 1990, onde se estabeleceram e desde então sustentam uma pesca amadora e esportiva. Nos últimos cinco anos, entretanto, pescadores têm capturado esse peixe a jusante da barragem de Juturnaíba, especialmente nos últimos 39 km do rio São João, trecho altamente modificado por intervenções antrópicas. As espécies de *Cichla* que ocorrem no reservatório de Juturnaíba foram identificadas como *Cichla kelberi* Kullander e Ferreira, 2006 e as espécies do rio São João como *C. monoculus* e *C. kelberi* por meio de análises do DNA mitocondrial (*D-loop*) (Diamante et al., 2017) e distintos eventos de introdução foram confirmados.

Com a ocorrência de mais de uma espécie de *Cichla* em Juturnaíba e no rio São João, a hibridização entre espécies e a consequente alteração do *pool* gênico desses

invasores não está descartada, principalmente porque os espécimes estudados apresentaram distintos padrões de coloração e morfologia, diferindo das características diagnósticas descritas para outras espécies de *Cichla*. (citação)

Na região estudada, a quebra de isolamento geográfico entre as espécies *C. monoculus* e *C. kelberi*, ocasionado pelos eventos de introdução, pode ter levado à quebra de isolamento reprodutivo, culminando com alterações no pool gênico das espécies invasoras e eventos de introgressão. Este processo já foi relatado em sistemas similares (Brinn et al., 2004; Oliveira et al., 2006). A hibridização entre espécies pode resultar em híbridos férteis, bem-adaptados e vigorosos que são mais competitivos e agressivos que as espécies parentais (Arthington, 1991) que quando introduzidos representam uma ameaça ainda maior para espécies nativas. Reduções drásticas na diversidade de peixes nativos têm sido atribuídas à ocorrência dos tucunarés em sistemas onde estes foram introduzidos (Latini e Petreire Junior, 2004; Pelicice e Agostinho, 2009; Britton e Orsi, 2012).

A correta caracterização genética das espécies de *Cichla* no reservatório de Juturnaíba e rio São João e a elucidação de um possível evento de hibridização serão úteis para o monitoramento de *Cichla* na região e para o estabelecimento de estratégias de manejo, envolvendo toda a comunidade ictiofaunística local e de bacias adjacentes.

Com base nessas informações, o objetivo do presente estudo foi verificar por meio de marcadores do DNA nuclear se está ocorrendo hibridização entre *C. kelberi* e *C. monoculus* provenientes do reservatório de Juturnaíba e rio São João-RJ. Os marcadores nucleares *dlx2* (*distal-less homeobox 2 protein*) e *LWS* (*Long Wavelength Sensitive*), que já se mostraram eficientes para estudos com *Cichla* (Gasques et al., 2015; Fabrin et al., 2015) auxiliaram na detecção de possíveis híbridos.

2. Metodologia

2.1. Área de amostragem e extração de DNA

O rio São João é um sistema fluvial costeiro que deságua diretamente no Oceano Atlântico. Sua bacia hidrográfica (Figura 1) está localizada na Região Dos Lagos, Estado do Rio de Janeiro (22°20' – 22°50' S e 42°00' – 42°40' W), possui área de drenagem de cerca de 2.190 km², envolve seis municípios parcialmente e Silva Jardim integralmente. No trecho médio desse rio, a 39 km a montante da foz, o reservatório de

Juturnaíba (43 km² de área) foi formado na década de 1980, com a finalidade de abastecimento hídrico.

Exemplares de *Cichla* foram coletados no reservatório de Juturnaíba a jusante, em diferentes trechos do rio São João, naturais meandantes e retelinizados. Os peixes foram amostrados através de pesca ativa, com a utilização de linha, anzol e iscas artificiais. Após a captura, os exemplares foram eutanasiados com overdose de benzocaína (250 mg L⁻¹ previamente diluída em 5 mL de etanol). As amostras de músculo dos indivíduos foram retiradas, fixadas em álcool etílico comercial, armazenadas a -20° C e enviadas para o banco de tecidos do laboratório de Genética do Núcleo de Pesquisa em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA), Universidade Estadual de Maringá (UEM). O procedimento de captura e eutanásia foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus UFRJ – Macaé Prof. Aloísio Teixeira sob o número de referência MAC029.

O DNA total das amostras foi extraído utilizando-se kit de extração Promega Wizard Genomics, de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram aliquotadas e quantificadas em gel de agarose 1,0% por comparação com DNA λ de concentração conhecida.

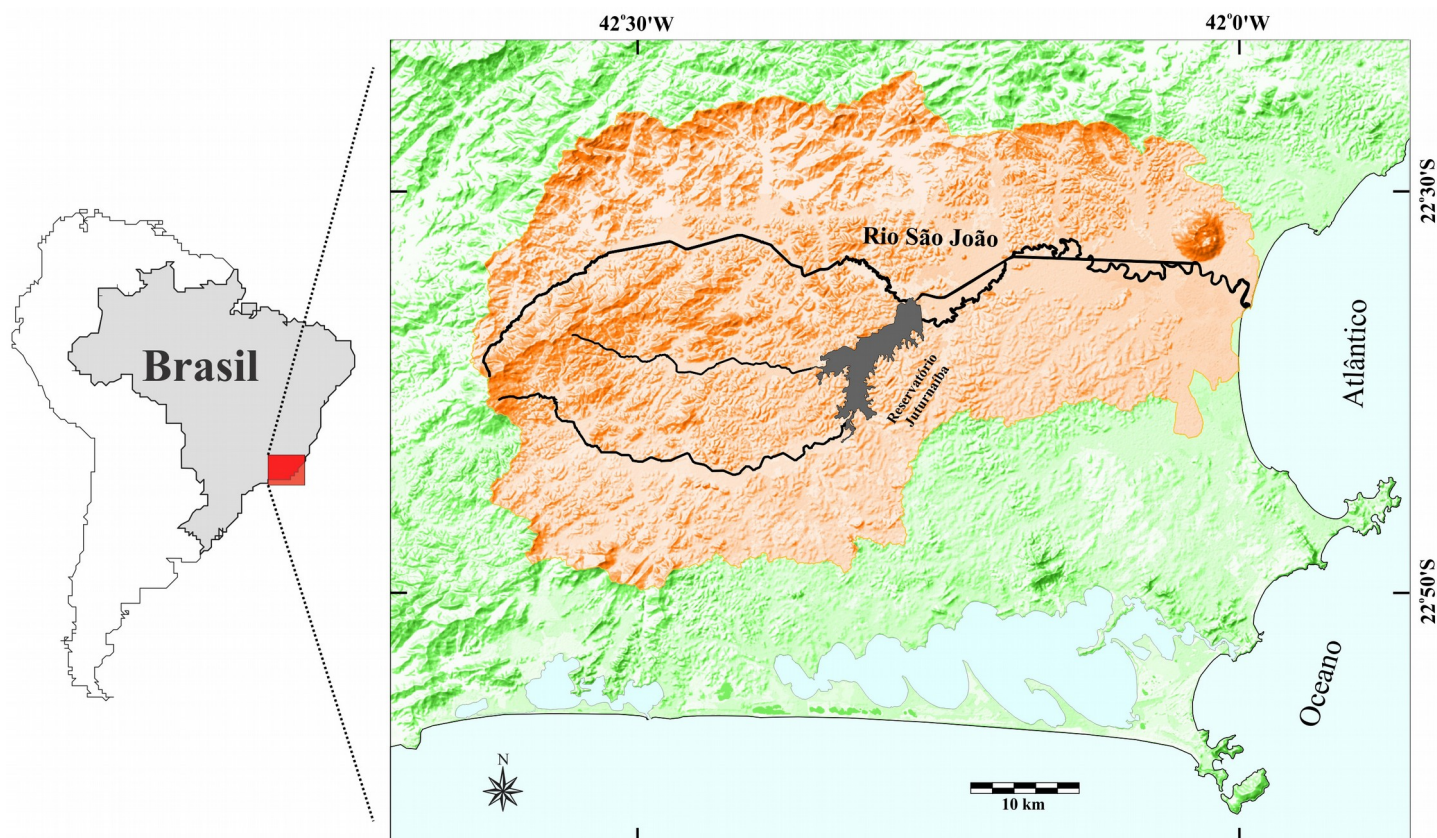


Fig. 1. Bacia hidrográfica do rio São João, ilustrando o reservatório de Juturnaíba e os trechos naturais meandrantés e retelinizados a jusante da represa.

2.2. Marcadores moleculares

A região *dlx2* do DNA nuclear foi amplificada de acordo com Gasques et al. (2015) utilizando os primers *dlx2* f760 5'GAAGAGAGYGAGCCAGAAATC3' e *dlx2* r2 5'AGTTTGCCAAAAACGACGACGAA3' descritos por Smith et al. (2008). O programa de PCR iniciou com 1 min de desnaturação a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s de desnaturação (95 °C), 1 min de anelamento (55 °C) e 1 min e 30 s de extensão (72 °C), seguidos por 5 min de extensão final (72 °C). Foram utilizados os primers F1e1 5'GCGGTACCATGAAGATACAACAA3' e R2e5 5'CTCCTTCTGCTGCATGGCA3' descritos por Weadick et al. (2012) que abrange as regiões do éxon 2, íntron 2 e éxon 3 do gene *LWS*. O programa de PCR iniciou com 3 min de desnaturação a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30 s de desnaturação (94 °C), 30 s de anelamento (52 °C) e 2 min e 40 s de extensão (72 °C), seguidos por 7 min de extensão final (72 °C). As reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram conduzidas em volume total de 25 µL, contendo

tampão Tris-KCl [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl], MgCl₂ (1,5 mM), *primers* (2,5 mM cada), dNTPs (0,1 mM cada), *Taq* DNA Polimerase Platinum – Invitrogen (1,0 U) e 10 ng de DNA recém-extraído. Os produtos do PCR foram purificados seguindo o protocolo de Rosenthal et al. (1993) e a reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit Big Dye Terminator. A determinação da sequência dos nucleotídeos foi procedida em sequenciador automático ABI 3500 seguindo instruções do fabricante.

2.3. Análises genéticas

As sequências nucleotídicas com confiabilidade superior a 90% foram editadas manualmente com o programa BioEdit 7.2.0 (Hall, 1999) e alinhadas em Clustal W (Thompson et al., 1994). A seleção do melhor modelo de substituição nucleotídica, construção das árvores gênicas e os cálculos de distância-*p* foram realizados no programa Mega 6.0 (Tamura et al., 2013). A árvore gênica foi construída por meio do método maximum-likelihood (ML), com 1,000 reamostragens de bootstrap.

Para a construção da árvore gênica e cálculos de distância genética foram utilizadas sequências de *dlx2* e *LWS* disponíveis no GenBank de *C. monoculus* introduzidas no reservatório de Taquaruçu, no rio Paraná e *C. kelberi* e *C. piquiti* nativas do rio Tocantins, além de algumas sequências cedidas pelo professor Dr. Luciano Seraphim Gasques, de *C. monoculus* nativas do rio Solimões (Tabela 1).

Tabela 1

Localidade, número de acesso ao *GenBank* e referências para todas amostras *Cichla* nativas (N) e introduzidas (I) estudadas com os marcadores nucleares *LWS* e *dlx2*

Espécies	Localidade	Marcador Nuclear	Acesso ao <i>GenBank</i>/Referências
<i>C. monoculus</i>	Rio Solimões, Amazonas, Brasil (N)	<i>LWS</i>	Deste trabalho
		<i>dlx2</i>	Deste trabalho
	Reservatório de Taquaruçu, Paraná, Brasil (I)	<i>LWS</i>	KU686416, KU686417, KU686418, KU686419, KU686420/Fabrin et al., 2015
		<i>dlx2</i>	KU686402, KU686403, KU686404, KU686406/Gasques et al., 2015
	Rio São João, Rio de Janeiro, Brasil (I)	<i>LWS</i>	Deste trabalho
		<i>dlx2</i>	Deste trabalho
<i>C. kelberi</i>	Rio Tocantins, Brasil (N)	<i>LWS</i>	KU686412, KU686413, KU686414, KU686415/Fabrin et al., 2015
		<i>dlx2</i>	KU686398, KU686399, KU686400, KU686401/Gasques et al., 2015
	Rio São João, Rio de Janeiro, Brasil (I)	<i>LWS</i>	Deste trabalho
		<i>dlx2</i>	Deste trabalho
	Reservatório de Juturnaíba (I)	<i>LWS</i>	Deste trabalho
	<i>C. piquiti</i>	Rio Tocantins, Brasil (N)	<i>LWS</i>
<i>dlx2</i>			KU686408, KU686410, KU686411/Gasques et al., 2015

3. Resultados

Foram obtidas sequências do gene *LWS* do DNA nuclear de 32 amostras com 707 pb de 18 indivíduos identificados como *Cichla kelberi* do reservatório de Juturnaíba e de 14 indivíduos do rio São João, sete identificados como *C. kelberi* e a outra metade identificada como *C. monoculus*. Também foram obtidas 17 sequências com 504 pb da região *dlx2* de 12 indivíduos identificados como *C. kelberi* e 5 indivíduos identificados *C. monoculus* do Rio São João. A frequência média dos quatro nucleotídeos para todas as amostras de *Cichla* foi C: 20,2%; T: 32,8%; A: 25,2%; G: 21,9% e C: 25,7%; T:25,4%; A: 28,2%; G: 20,6% para *LWS* e *dlx2*, respectivamente. As sequências de *LWS* apresentaram 7 sítios variáveis enquanto para *dlx2* todas as sequências obtidas foram idênticas.

Os valores de distância-*p* foram calculados entre as populações introduzidas de *C. kelberi* e *C. monoculus* do rio São João e reservatório de Juturnaíba, populações nativas de *C. kelberi* e *C. piquiti* do rio Tocantins e populações de *C. monoculus* nativas do rio Solimões e introduzidas no reservatório de Taquaruçu (Tabela 2 e 3). Com o gene *LWS* os valores de distância entre as populações nativas de *C. kelberi* e *C. monoculus* nativas e introduzidas é de 0,0002. As distâncias genéticas de *C. monoculus* do Rio São João para as outras populações nativas e introduzidas de *C. monoculus* e também em relação a *C. kelberi* do rio São João são nulas, e encontra-se a uma distância de 0,0003 para a população de *C. kelberi* do reservatório de Juturnaíba. *C. kelberi* do rio São João também encontra-se a uma distância genética de 0,0003 de *C. kelberi* do reservatório de Juturnaíba e de 0,0002 de *C. kelberi* do Tocantins. Já *C. kelberi* do reservatório está a uma distância de 0,0005 de *C. kelberi* do rio Tocantins. Todas as populações estudadas estão a uma distância genética entre 0,0014 e 0,0017 de *C. piquiti*.

Tabela 2

Valores de distância-*p* das populações de *Cichla kelberi*, *C. monoculus* e *C. piquiti* estudadas a partir do gene *LWS*.

	<i>C. k</i> -JT	<i>C. k</i> -SJ	<i>C. k</i> -TO	<i>C. m</i> -SJ	<i>C. m</i> -SO	<i>C. m</i> -TA	<i>C. p</i>
<i>C. kelberi</i> -JT							
<i>C. kelberi</i> -SJ	0,0003						
<i>C. kelberi</i> -TO	0,0005	0,0002					
<i>C. monoculus</i> -SJ	0,0003	0,0000	0,0002				
<i>C. monoculus</i> -SO	0,0003	0,0000	0,0002	0,0000			
<i>C. monoculus</i> -TA	0,0003	0,0000	0,0002	0,0000	0,0000		
<i>C. piquiti</i>	0,0017	0,0014	0,0016	0,0014	0,0014	0,0014	

JT: Reservatório de Juturnaíba; SJ: Rio São João; SO: Rio Solimões; TA: Taquaruçu; TO: Rio Tocantins.

Para a região *dlx2* não foram obtidas sequências do reservatório de Juturnaíba mas foram calculados as distâncias-*p* para as outras populações. A distância genética entre os exemplares de *C. monoculus* nativos do rio Solimões e introduzidos no rio São João e Taquaruçu apresentaram distância genética entre 0,0135 e 0,0139 de *C. kelberi* nativo do Tocantins. Assim como nas análises do gene *LWS* a população de *C. kelberi* do rio São João está a uma distância genética insignificativa de *C. monoculus* do rio São João e Solimões. *Cichla monoculus* do rio São João não se diferencia da população de *C. monoculus* nativa do rio Solimões e está a uma distância de 0,0004 das populações introduzidas em Taquaruçu. *C. Kelberi* e *C. Monoculus* se diferenciam de *C. piquiti* (distâncias genéticas entre 0,0147 e 0,0233).

Tabela 3

Valores de distância-*p* das populações de *Cichla kelberi*, *C. monoculus* e *C. piquiti* estudadas a partir da região *dlx2*.

	<i>C. k</i> -SJ	<i>C. k</i> -TO	<i>C. m</i> -SJ	<i>C. m</i> -SO	<i>C. m</i> -TA	<i>C. p</i>
<i>C. kelberi</i> -SJ						
<i>C. kelberi</i> -TO	0,0135					
<i>C. monoculus</i> -SJ	0,0000	0,0135				
<i>C. monoculus</i> -SO	0,0000	0,0135	0,0000			
<i>C. monoculus</i> -TA	0,0004	0,0139	0,0004	0,0004		

<i>C. piquiti</i>	0,0147	0,0233	0,0147	0,0147	0,0152
-------------------	--------	--------	--------	--------	--------

SJ: Rio São João; SO: Rio Solimões; TA: Taquaruçu; TO: Rio Tocantins.

A árvore gênica de máxima verossimilhança construída a partir de sequências do gene *LWS* (Figura 2) não separou as populações de *C. monoculus* e *C. kelberi*. Todas as amostras de *C. kelberi* introduzidas no reservatório de Juturnaíba e rio São João e as nativas do Tocantins, além de *C. monoculus* introduzida no rio São João e Taquaruçu e as espécies nativas do rio Solimões ficaram agrupadas em um grande clado. *C. piquiti* ficaram separados em um grupo mais basal. *Oreochromis niloticus* (AF247128) foi utilizada como outgroup.

Já árvore de máxima verossimilhança da região *dlx2* discriminou as espécies *C. monoculus*, *C. kelberi* e *C. piquiti* ao posicionar essas espécies em grupos distintos, porém *C. kelberi* do rio São João ficou dentro do mesmo grupo formado pelas espécies *C. monoculus*. *Oreochromis tanganyicae* (KC285515) foi utilizada como outgroup. (Figura 3).

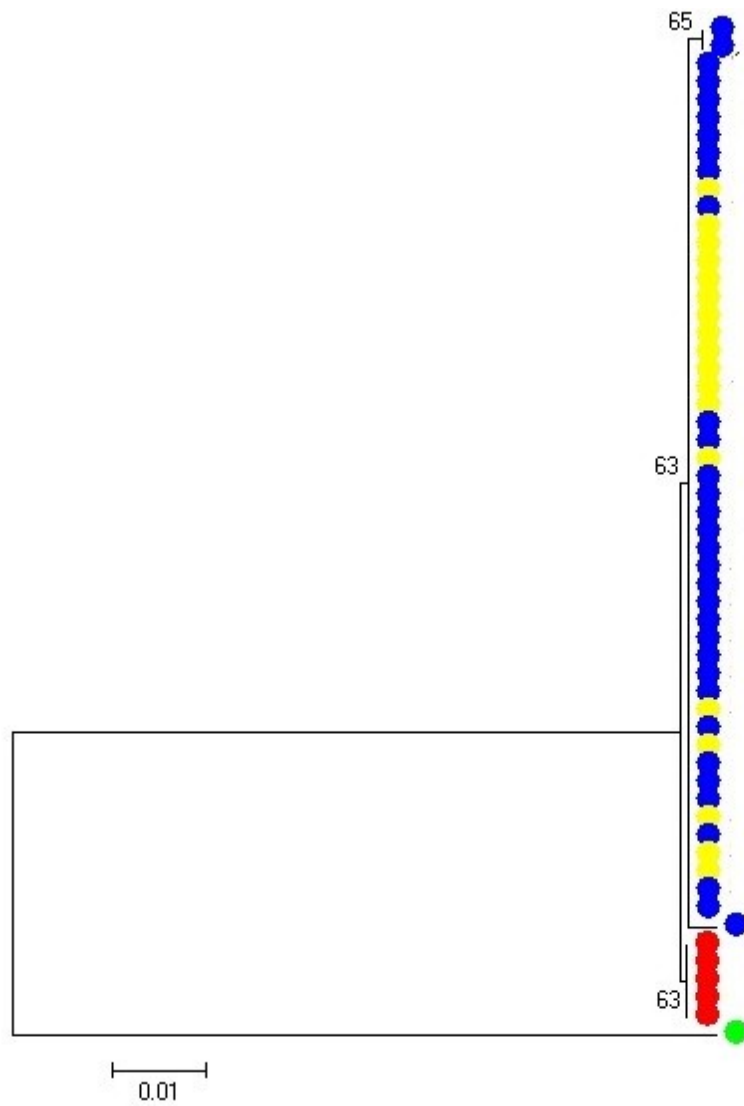


Fig. 2. Árvore gênica *LWS* gerada a partir de sequências de *Cichla* pelo método estatístico de máxima verossimilhança com valores de suporte de bootstrap. Populações de *C. monoculus* (Amarelo), populações de *C. kelberi* (Azul), populações de *C. piquiti* (Vermelho) *O. niloticus* (Verde).

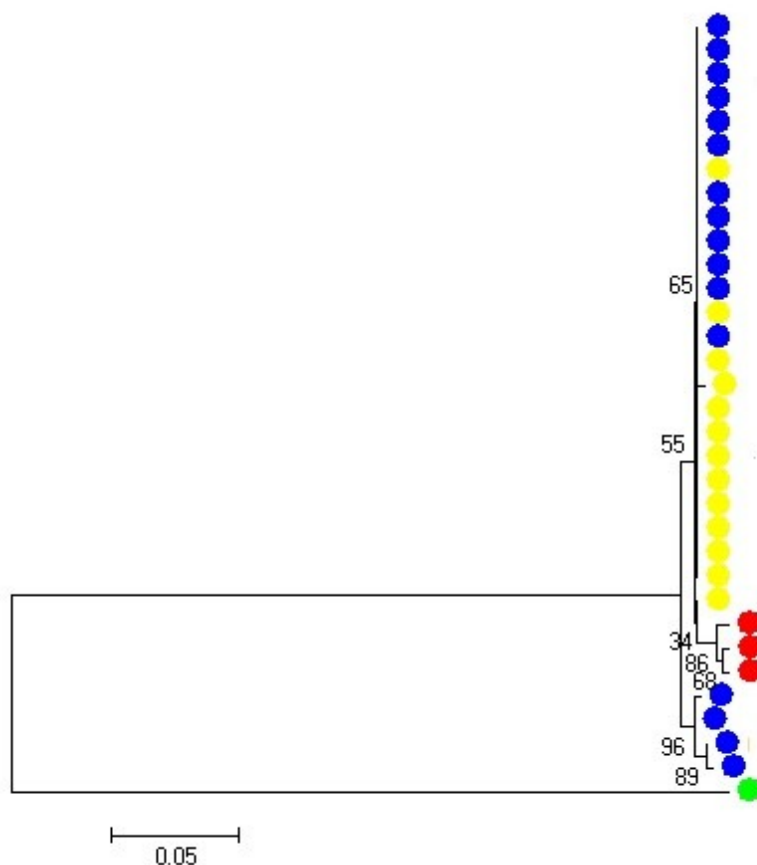


Fig. 3. Árvore gênica *dlx2* gerada a partir de sequências de *Cichla*, pelo método estatístico de máxima verossimilhança com valores de suporte de bootstrap. Populações de *C. monoculus* (Amarelo), populações de *C. kelberi* (Azul), populações de *C. piquiti* (Vermelho) e *O. tanganycae* (Verde).

Apesar da árvore gênica de *LWS* não possibilitar a discriminação entre *C. kelberi* e *C. monoculus* podemos diferenciar essas espécies pelos polimorfismos que possuem na região do gene *LWS*. O mesmo ocorre para a região *dlx2* onde também foram verificados sítios variáveis com polimorfismos característicos de *C. monoculus*, *C. kelberi* e *C. piquiti* (Tabela 4). A análise dessas regiões polimórficas foram úteis na caracterização das espécies de *Cichla* do rio São João e reservatório de Juturnaíba e forneceram indícios para a ocorrência de híbridos interespecíficos.

Na posição 73 do gene *LWS* os exemplares de *C. piquiti* apresentaram o nucleotídeo A enquanto *C. kelberi* e *C. monoculus* o nucleotídeo G. Os exemplares nativos de *C. kelberi* e *C. monoculus* apresentaram na posição 126 a presença do

nucleotídeo A e G, respectivamente, enquanto a maioria dos introduzidos *C. kelberi* e *C. monoculus* apresentaram o nucleotídeo G, característico de *C. monoculus*. Ainda em relação ao sítio 126 temos um indivíduo *C. monoculus* do rio São João que apresentou o nucleotídeo A característico de *C. kelberi*, dois exemplares de *C. kelberi* do reservatório de Juturnaíba e dois exemplares de *C. kelberi* do rio São João que apresentaram sobreposição dos nucleotídeos G e A (indicado na tabela pela letra R).

O sítio 421 discrimina os exemplares nativos de *C. kelberi* (nucleotídeo T) e *C. monoculus* (nucleotídeo C). *Cichla monoculus* de Taquaruçu também apresenta nessa posição o nucleotídeo C e um indivíduo com sobreposições das bases nucleotídicas C e T (letra Y na tabela), assim como *C. monoculus* do rio São João que também apresenta o nucleotídeo C, com exceção de um indivíduo com a base T. *Cichla kelberi* do rio São João e reservatório de Juturnaíba apresentam tanto o nucleotídeo C, T e a sobreposição dessas bases (indicada pela letra Y). Dos sete indivíduos de *C. kelberi* do rio São João quatro apresentam o nucleotídeo C, específico de *C. monoculus*, três o nucleotídeo T e um apresenta as sobreposições dos nucleotídeos C e T. Para os 18 indivíduos de *C. kelberi* do reservatório de Juturnaíba oito apresentam o nucleotídeo característico de *C. kelberi* (T), seis apresentam o nucleotídeo característico de *C. monoculus* (C) e quatro apresentam sobreposição das bases nucleotídicas C e T.

O nucleotídeo G para *C. kelberi* e A para *C. monoculus* na posição 586 caracteriza essas duas espécies nativas. *C. monoculus* de Taquaruçu apresentam nessa posição o nucleotídeo que caracteriza *C. monoculus* (A) e um indivíduo com sobreposições das bases nucleotídicas A e G (letra R na tabela), a grande maioria dos exemplares de *C. monoculus* e *C. kelberi* do rio São João e reservatório de Juturnaíba apresentam nesse sítio o polimorfismo característico de *C. kelberi* (nucleotídeo G), exceções para *C. monoculus*, onde um indivíduo apresenta a base A de *C. kelberi* e dois indivíduos indicados com a letra R (sobreposição das bases G e A), e para um indivíduo de *C. kelberi* do rio São João também com sobreposição de bases A e G.

Na posição três das sequências da região *dlx2*, as espécies nativas de *C. kelberi* apresentam o nucleotídeo T, *Cichla monoculus* o nucleotídeo A, *Cichla piquiti* a base nucleotídica G e as espécies introduzidas, tanto *C. kelberi* como *C. monoculus*, apresentaram o nucleotídeo A. A região *dlx2* apresentou ainda mais 5 sítios polimórficos que caracterizaram *C. monoculus* e *C. kelberi* (Tabela 4) e em todos eles

os exemplares introduzidos de *C. kelberi* e *monoculus* apresentaram a base nucleotídica que caracteriza *C. monoculus*.

Em síntese, para as espécies introduzidas no reservatório de Juturnaíba e rio São João temos indivíduos identificados pelo DNA mitocondrial como *C. kelberi* mas que apresentaram nos sítios polimórficos do DNA nuclear os nucleotídeos característicos de *C. monoculus*, e vice-versa. Para outros indivíduos a análise dos sítios polimórficos do DNA nuclear confirmam a identificação do DNA mitocondrial.

Tabela 4

Sítios polimórficos interespecíficos de sequências de *LWS* e *dlx2* de espécies de *Cichla*.

Posição dos sítios polimórficos	<i>LWS</i>					<i>dlx2</i>				
	7	1	4	5	3	3	7	9	1	1
	3	2	2	8		2	1	3	6	7
		6	1	6					7	7
<i>C. kelberi</i> -TO	G	A	T	G	T	W	Y	W	G	T
<i>C. kelberi</i> -SJ	G	G/R	T/C/Y	G/R	A	A	C	A	A	G
<i>C. kelberi</i> -JT	G	G/R	T/C/Y	G						
<i>C. monoculus</i> -SO	G	G	C	A	A	A	C	A	A	G
<i>C. monoculus</i> -TA	G	G	C/Y	A/R	A	A	C	A	A	G
<i>C. monoculus</i> -SJ	G	G/A	C/T	G/A/R	A	A	C	A	A	G
<i>C. piquiti</i>	A	A/G	C/Y	G	G	A	C	A	A	G

JT: Reservatório de Juturnaíba; SJ: rio São João; SO: rio Solimões; TA: Taquaruçu; TO: rio Tocantins. Letras Y, R e W representam bases inespecíficas.

4. Discussão

Os resultados obtidos por meio da análise dos genes *LWS* e *dlx2* confirmam a presença do DNA de *Cichla monoculus* e *C. kelberi* nas populações introduzidas do rio São João e reservatório de Juturnaíba e a ausência de *C. piquiti* na região estudada, em acordo com os resultados do DNA mitocondrial (Diamante et al., 2017) onde nenhum espécime do reservatório do rio São João apresentou similaridade genética com *C. piquiti*.

A partir de uma investigação mais detalhada dos sítios polimórficos, que diferenciam as espécies, é possível obter indícios da ocorrência de híbridos. Estudos realizados por Fabrin et al. (2015) detectaram nessas mesmas regiões do gene *LWS*

sítios variáveis que diferenciaram *C. monoculus* e *C. kelberi*. O gene *dlx2* que faz parte da família de genes ‘*dlx homebox*’ também se mostrou eficiente para a diferenciação de espécies com a presença de sítios polimórficos interespecíficos entre *C. monoculus*, *C. kelberi* e *C. piquiti* (Gasques et al., 2015) e permitiu a distinção de duas espécies de ciclídeos africanos com hibridização introgressiva (Mims et al., 2010).

Apesar de parecer pouco informativo apenas três sítios polimórficos, como no caso do gene *LWS*, para caracterizar uma espécie, marcadores moleculares baseados na detecção da variabilidade e diferenças diagnósticas do DNA nuclear e mitocondrial permitem a identificação de espécies que pode ser determinada pela variação, até mesmo, em um único nucleotídeo polimórfico taxonomicamente importante para o grupo (Hashimoto et al., 2012).

Para a identificação das espécies e também dos híbridos de *Cichla* do reservatório e rio S. João tornou-se necessário a associação de genes nucleares e mitocondriais disponibilizados por Diamante et al. (2017). O uso em conjunto de marcadores do DNA nuclear e mitocondrial permitem obter grande quantidade de informações sobre as espécies e a identificação de híbridos (De-Franco et al., 2012; Gomes et al., 2012; Karlsson et al., 2012). O uso do DNA mitocondrial e nuclear é importante porque indivíduos híbridos herdam o DNA nuclear de ambos os parentais mas o DNA mitocondrial tem origem apenas materna.

Todos os indivíduos do reservatório e do rio São João identificados pelo DNA mitocondrial como *C. kelberi* apresentaram em, pelo menos, um sítio polimórfico o nucleotídeo característico de *C. monoculus*. O mesmo vale para os indivíduos do rio São João identificados pelo DNA mitocondrial como *C. monoculus*, com exceção de um indivíduo que apresentou todos os sítios polimórficos do DNA nuclear o padrão para *C. monoculus*, todos os outros apresentam algum polimorfismo de *C. kelberi*, com destaque para um indivíduo que apresentou nos três sítios variáveis do gene *LWS* os nucleotídeos que caracterizam *C. kelberi*.

Exemplares de *Cichla* com DNA mitocondrial, de origem materna, característico de uma espécie e DNA nuclear caracterizando outra espécie é um forte indicio de hibridização. A heterozigose, indicada pelos sítios com sobreposição de bases nucleotídicas de *C. monoculus* e *C. kelberi*, precisa ser confirmada pelo sequenciamento da outra fita de DNA, mas também é uma evidência da ocorrência de híbridos.

Excluindo um único indivíduo do rio São João que se caracterizou tanto pelo DNA mitocondrial como pelo DNA nuclear como *C. monoculus*, todos os outros exemplares do reservatório e do rio São João aparentam ser híbridos interespecíficos de *C. monoculus* e *C. kelberi*.

A ocorrência de hibridização já foi relatada entre espécies de *Cichla*, em outras localidades (Brinn et al., 2004; Oliveira et al., 2006), inclusive entre *C. monoculus* e *C. kelberi* (Gasques, 2013). Por meio da identificação do genótipo encontrado nos híbridos e nas espécies maternas, a direção da hibridização pode ser determinada. Como foi detectado a presença do DNA mitocondrial (origem materna) tanto característico de *C. kelberi* como de *C. monoculus* se pode concluir que a hibridização seja bilateral, com a possibilidade de cruzamentos envolvendo fêmeas de ambas as espécies.

No geral, os exemplares de *Cichla* do rio São João e reservatório tendem a ser mais aparentados com *C. monoculus*, embora as regiões do DNA os caracterizaram como *C. kelberi*. Com os resultados obtidos podemos inferir que os híbridos que ocorrem na região estudada sejam de gerações mais avançadas. O DNA de *C. kelberi* pode ter sido introgrado em populações de *C. monoculus*, através do retrocruzamento de híbridos dessas duas espécies com exemplares puros de *C. monoculus*, esse evento é chamado de hibridização introgressiva. A hibridização introgressiva é comum entre peixes e já foi documentada para Ciclídeos (Salzburger et al., 2002; Genner e Turner, 2012; Keller et al., 2012; Meier et al., 2016; Meyer et al., 2017). Quando os híbridos da geração F₁ são viáveis podem ocorrer retrocruzamentos com as espécies parentais resultando em introgressão. O fenômeno é caracterizado como o fluxo de genes do pool gênico de uma espécie para o pool gênico de outra espécie ou subespécie e o evento é menos comum que a hibridização.

Em relação aos valores de distância genética entre as populações estudadas, assim como na análise do DNA mitocondrial (Diamante et al., 2017) e outros estudos com o DNA nuclear (Gasques et al., 2015), os valores distância-*p* entre as populações de *C. kelberi* e *C. monoculus* foram baixos, vale lembrar que Willis et al. (2012) considerou essas duas espécies como subespécies de *C. ocellaris*. A grande similaridade genética de *C. kelberi* e *C. monoculus* torna ainda mais provável a possibilidade de eventos de hibridização para essas duas espécies. Além disso as duas espécies apresentam número diploide de 2n=48 cromossomos (Feldberg et al., 2003, Mourão,

2013) possibilitando o pareamento dos cromossomos homólogos e consequentemente a viabilidade dos híbridos.

A grande similaridade genética entre todos os exemplares do rio São João e a distância em relação a população do reservatório (0,003) confirmam a ocorrência de múltiplas introduções. Como há compartilhamento de haplótipos mitocondriais de *C. kelberi* no reservatório e rio São João (Diamante et al., 2017) podemos aferir que os parentais maternos *C. kelberi* foram introduzidos no reservatório e posteriormente descenderem pelos canais laterais da barragem, que possuem fluxo hídrico contínuo e podem servir de passagem para peixes, até o trecho a jusante do rio. Mas os parentais *C. monoculus* podem ter origem distintas, os exemplares do rio São João são bastante similares aos espécimes nativos de *C. monoculus* do rio solimões, podendo ser essa sua origem. Outros estudos sobre a introdução de *C. kelberi* e *C. monoculus* em diferentes bacias hidrográficas brasileiras apontam as populações do rio Tocantins e bacia amazônica como o ponto de origem para as introduções (Oliveira et al., 2006; Briñez et al., 2013; Marques et al., 2016).

Mas para os indivíduos do reservatório, que estão mais distantes das populações nativas, os parentais podem ser originários de populações de outros reservatórios da região Sudeste (Santos et al., 2001; Gomiero; Braga, 2003; Santos et al., 2016). Não foram feitos trabalhos investigando a hibridização nessas áreas, mas não podemos descartar a possibilidade de que a introdução de *Cichla* do reservatório de Juturnaíba seja originária de uma população formada por indivíduos híbridos.

Uma vez identificados os híbridos é importante o monitoramento dessas populações, híbridos podem ser mais competitivos e agressivos que as espécies parentais (Arthington, 1991) e a redução ou expansão populacional de *Cichla* têm consequências sobre as espécies nativas da região. Hibridações podem estar relacionadas à diversificação e especiação, aumentam a diversidade genética e transferem mutações adaptativas que serão importantes na evolução da biodiversidade (Willis et al., 2012). Além do mais, a hibridização quando ocorre em ambientes com oportunidades ecológicas favoráveis, podem facilitar a rápida e extensa radiação adaptativa (Meier et al., 2017).

Por outro lado eventos de hibridização também podem estar relacionados a extinção de populações e espécies (Allendorf et al., 2001). O processo já mencionado de

hibridização introgressiva pode causar a perda de fontes genéticas únicas, de uma espécie, subespécie ou população. De acordo com o sugerido por Rhymer e Simberloff (1996) hibridização e introgressão são os maiores mecanismos pelos quais espécies introduzidas mudam ou eliminam os *pools* gênicos endêmicos. *Pools* gênicos adaptados a condições ambientais locais podem ser substituídos e a manutenção de adequados níveis de diversidade genética dentro e entre populações pode ser prejudicada. (citação)

Esse trabalho é pioneiro ao realizar a análise do DNA nuclear e investigar a hibridização entre as espécies de *Cichla* que ocorrem no reservatório de Juturnaíba e rio São João. Além de Gasques (2013) nenhum outro estudo havia verificado a possibilidade de hibridização entre *C. monoculus* e *C. kelberi*.

Sabendo de toda essa problemática envolvendo a hibridização, outros estudos devem ser feitos, principalmente para verificar se hibridizações também estão ocorrendo em outros rios e reservatórios da região onde espécies de *Cichla* também foram introduzidas. A região estudada faz parte de um sistema estuarino de expressão socioeconômica adjacente à Bacia de Campos, Sudeste do Brasil, é carente de estudos científicos e sua composição ictiofaunística é ainda desconhecida.

Agradecimentos

A Capes pela concessão de Bolsa de pesquisa, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, ao Laboratório de Genética do NUPÉLIA e COMCAP pela infraestrutura, apoio e parceria oferecidos para a realização deste trabalho.

Referências

- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P., Wenburg, J.K., 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 613-622.
- Arthington, A.H., 1991. Ecological and genetic impacts of introduced and translocated freshwater fishes in Australia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48, 33-43.
- Carvalho, D.C., Oliveira, D.A.A., Sampaio, I., Beheregaray, L.B., 2014. Analysis of propagule pressure and genetic diversity in the invasibility of a freshwater apex predator: the peacock bass (genus *Cichla*). *Neotropical Ichthyology* 12, 105-116.
- Briñez, B., Júlio JR., H. F., Prioli, S. M. A. P., Maniglia, T. C., Prioli, A. J., 2013. Molecular identification of *Cichla* (Perciformes: Cichlidae) introduced in reservoirs in Southern Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 35, 233-239.
- Brinn, M.N., Porto J.I., Feldberg, E., 2004. Karyological evidence for interspecific hybridization between *Cichla monoculus* and *C. temensis* (Perciformes, Cichlidae) in the Amazon. *Hereditas* 141, 252-257.
- Britton, J.R., Orsi, M.L., 2012. Non-native fish in aquaculture and sport fishing in Brazil: Economic benefits versus risks to fish diversity in the upper River Paraná Basin. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22, 1 - 11.
- De-Franco, B., Mendonça, F.F., Oliveira, F.C., Foresti, F., 2012. Illegal trade of the guitarfish *Rhinobatos horkelii* on the coasts of central and southern Brazil: genetic identification to aid conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystem* 22, 272-276.
- Diamante, N.A., Oliveira, A.V., Petry, A.C., Catelani, P.A., Pelicice, F.M., Prioli, S.M.A.P., Prioli, A.J., 2017. Molecular analysis of invasive *Cichla* (Perciformes, Cichlidae) populations in neotropical regions. *Biochemical systematics and ecology* 72, 15-22.
- Fabrin, T.M.C., Gasques, L.S., Prioli, S.M.A.P., Prioli, A.J., 2015. A novel molecular marker for the study of Neotropical cichlid phylogeny. *Genetics and Molecular Research* 14, 18131-18139.
- Gasques, I. S. O gênero *Cichla* (Teleostei: Cichlidae) na planície de inundação do alto rio Paraná: Uma análise de sequências de DNA de regiões nucleares e mitocondriais. Maringá: UEM, 2013. 104 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.
- Gasques, L.S., Fabrin, T.M.C., Prioli, S.M.A.P., Prioli, A.J., 2015. Prospecting of molecular markers for species of the *Cichla* genus. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 37, 455-460.

Genner, M. J., Turner, G. F., 2012. Ancient hybridization and phenotypic novelty within Lake Malawi's cichlid fish radiation. *Molecular Biology and Evolution* 29, 195–206.

Gomiero L. M., Braga F. M. S., 2003. Relação peso-comprimento e fator de condição para *Cichla cf. ocellaris* e *Cichla monoculus* (Perciformes, Cichlidae) no reservatório de Volta Grande, rio Grande - MG/SP. *Acta Scientiarum: Biological Sciences* 25, 79-86.

Gomes, F., Schneider, H., Barros, C., Sampaio, D., Hashimoto, D. T., Porto-Foresti, F., Sampaio, I., 2012. Innovative molecular approach to the identification of *Colossoma macropomum* and its hybrids. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 84,517-525.

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

Hashimoto, D.T., Prado, F.D., Senhorini, J.A., Foresti, F., PortoForesti, F., 2012. Detection of post-F1 fish hybrids in broodstock using molecular markers: approaches for genetic management in aquaculture. *Aquaculture Researches* 44,876-884.

Karlsson, S., Hagen, M., Eriksen, L., Hindar, K., Jensen, A.J., Leaniz, C.G., Cotter, D., Guðbergsson, G., Kahilainen, K., Guðjónsson, S., Romakkaniemi, A., Ryman, N., 2012. A genetic marker for the maternal identification of Atlantic salmon x brown trout hybrids. *Conservation Genetic Resources* 5, 47-49.

Keller, I., Wagner, C. E., Greuter, L., Mwaiko, S., Selz, O. M., Sivasundar, A., Seehausen, O., 2012. Population genomic signatures of divergent adaptation, gene flow and hybrid speciation in the rapid radiation of Lake Victoria Cichlid fishes. *Molecular Ecology* 22, 2848–2863.

Kullander, S., Ferreira, E., 2006. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters* 17, 289-398.

Latini, A. O., Petrere Junior, M., 2004. Reduction of a native fish fauna by alien species: an example from Brazilian freshwater tropical lakes. *Fisheries Management and Ecology* 11, 71–79.

Marques, A. C. P. B., Franco, A. C. S., Salgueiro, F., García-Berthou, E., Santos, L. N., 2016. Genetic divergence among invasive and native populations of the yellow peacock cichlid *Cichla kelberi*. doi:10.1111/jfb.13144.

Meier, J.I., Sousa, V.C., Marques, D.A., Selz, O.M., Wagner, C.E., Excoffier, L., Seehausen, O., 2016. Demographic modelling with whole-genome data reveals parallel origin of similar *Pundamilia* Cichlid species after hybridization. *Molecular Ecology* 26, 123–141.

Meier, J. I., Marques, D. A., Mwaiko, S., Wagner, C. E., Excoffier, L., Seehausen, O., 2017. Ancient hybridization fuels rapid Cichlid fish adaptive radiations. *Nature Communications* 8, 14363.

Meyer, B. S., Matschiner, M., Salzburger, W., 2017. Disentangling incomplete lineage sorting and introgression to refine species-tree estimates for Lake Tanganyika cichlid fishes. *Systematics Biology* 66, 531-550.

Mims, M.C., Hulsey, D., Fitzpatrick, B.M., Streelman, J.T., 2010. Geography disentangles introgression from ancestral polymorphism in Lake Malawi cichlids. *Molecular Ecology* 19, 940-951.

Mourão, A.A.F. Caracterização citogenética e molecular das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* e seu possível híbrido interespecífico, coletados em ambientes naturais. Botucatu: Unesp, 2013. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2013.

Mourão, A.A.F., Freitas-Souza, D., Hashimoto, D.T., Ferreira, D.C., Prado, F.D., Silveira, R.V., Foresti, F., Porto-Foresti, F., 2017. Molecular and morphological approaches for species delimitation and hybridization investigations of two *Cichla* species. *Iheringia* 107, e2017016.

Oliveira, A.V. et al., 2006. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. *Journal of Fish Biology* 69, 260-277.

Oliveira, V. F., Oliveira, A. V., Prioli, A.J., Prioli, S.M., 2008. Obtaining 5S rDNA molecular markers for native and invasive *Cichla* populations (Perciformes- Cichlidae), in Brazil. *Acta Scientiarum, Biological Sciences* 30, 83-89.

Pelicice, F. M.; Agostinho, A. A. 2009. Fish fauna destruction after the introduction of a non-native predator (*Cichla kelberi*) in a Neotropical reservoir. *Biological Invasions*, v.11, p. 1789 – 1801, 2009.

Rhymer, J. M.; Simberloff, D., 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual Revision Ecol Systematics* 27, 83-109.

Rosenthal, A., Coutelle, O., Craxton, M., 1993. Large-scale of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Research* 21, 173-174.

Salzburger, W., Baric, S., Sturmbauer, C., 2002. Speciation via introgressive hybridization in East African cichlids? *Molecular Ecology* 11, 619–625.

Santos, L.N., Gonzales, A.F., Araujo, F.G., 2001. Dieta do tucunaré-amarelo *Cichla monoculus* (Bloch & Schneider) (Osteichthyes, Cichlidae), no reservatório de Lajes, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 18, 191–204.

- Santos, L. N., Franco, A. C. S., Marques, A. C. P.B., Nóbrega, F., Salgueiro, F., 2016. Molecular analysis confirms the introduction of a second species of yellow peacock cichlid *Cichla monoculus* Spix & Agassiz 1831 (Cichliformes: Cichlidae) in the Southeast Atlantic Hydrographic province, Brazil. *Biology Invasions Records* 5, 277–284.
- Sawaya, P., Maranhão, A. A., 1946, A construção de ninhos e a reprodução de alguns peixes neotrópicos (Cichlidae – gen. *Cichla* e *Astronotus*). *Boletim da Faculdade de Filosofia e Ciências da Universidade de São Paulo* 11, 357-381.
- Smith, L.L., Fessler, J.L., Alfaro, M.E., Streebman, J.T., Westneat, M.W., 2008. Phylogenetic relationships and the evolution of regulatory gene sequences in the parrot fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49, 136-152.
- Tamura, K., G., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725 – 2729.
- Teixeira, A.S., Oliveira, S.S., 2005. Evidence for a natural hybrid of peacock bass (*Cichla monoculus* vs. *Cichla temensis*) based on esterase electrophoretic patterns. *Genetics and Molecular Research* 4, 74–83.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Weadick, C.J., Loew, E.R., Rodd, F.H., Chang, B.S.W., 2012. Visual pigment molecular evolution in the Trinidadian pike cichlid (*Crenicichla frenata*): a less colorful world for neotropical cichlids? *Molecular Biology and Evolution* 29, 3045-3060.
- Willis, S.C, Nunes, M.S., Montaña, C.G., Farias, I.P., Lovejoy, N.R., 2007. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae) Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44, 291-307.
- Willis, S.C, Macrander, J., Farias, I.P., Ortí, G., 2012. Simultaneous delimitation of species and quantification of interspecific hybridization in Amazonian peacock cichlids (genus *Cichla*) using multi-locus data. *BMC Evolutionary Biology* 12, 1471-2148.
- Willis, S.C., Farias, I.P., Ortí, G., 2013. Testing Mitochondrial capture and deep coalescence in amazonian cichlid fishes (Cichlidae: *Cichla*). *Evolution*, 1-13.

ANEXO 1

BIOCHEMICAL SYSTEMATICS AND ECOLOGY

Article structure

Subdivision – numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork. • Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text. • Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they

should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, Cross Ref and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: Van Decar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that

support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style.

If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking [the following link:](http://open.mendeley.com/use-citation-style/biochemicalsystematics-and-ecology) <http://open.mendeley.com/use-citation-style/biochemicalsystematics-and-ecology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. AUTHOR INFORMATION PACK 7 Jul 2017 www.elsevier.com/locate/biochemsyseco 11

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S.,

Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.