



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Felipe de Souza Cruz Nóbrega

Caracterização genética e morfológica das espécies invasoras *Cichla kelberi* (Kullander e Ferreira, 2006), *Cichla piquiti* (Kullander e Ferreira, 2006) e seus possíveis híbridos no reservatório de Lajes, bacia do rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro, Brasil.

Rio de Janeiro

2021

Felipe de Souza Cruz Nóbrega

Caracterização genética e morfológica das espécies invasoras *Cichla kelberi* (Kullander e Ferreira, 2006), *Cichla piquiti* (Kullander e Ferreira, 2006) e seus possíveis híbridos no reservatório de Lajes, bacia do rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro, Brasil.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Fabiano Salgueiro

Coorientador: Luciano Neves dos Santos

Rio de Janeiro

2021

Catálogo informatizada pelo(a) autor(a)

N754 Nóbrega, Felipe de Souza Cruz  
Caracterização genética e morfológica das espécies invasoras *Cichla kelberi* (Kullander e Ferreira, 2006), *Cichla piquiti* (Kullander e Ferreira, 2006) e seus possíveis híbridos no reservatório de Lajes, bacia do rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro, Brasil. / Felipe de Souza Cruz Nóbrega. -- Rio de Janeiro, 2021.

47

Orientador: Fabiano Salgueiro.

Coorientador: Luciano Neves dos Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2021.

1. genética da invasão. 2. hibridização. 3. caracterização genética. 4. caracterização morfológica. I. Salgueiro, Fabiano, orient. II. Santos, Luciano Neves dos, coorient. III. Título.

Felipe de Souza Cruz Nóbrega

**Caracterização genética e morfológica das espécies invasoras *Cichla kelberi* (Kullander e Ferreira, 2006), *Cichla piquiti* (Kullander e Ferreira, 2006) e seus possíveis híbridos no reservatório de Lajes, bacia do rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro, Brasil.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 21 de maio de 2021.

**Banca Examinadora**



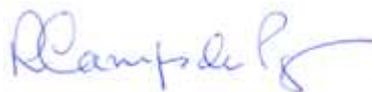
---

Dr. Fabiano Salgueiro (Orientador)  
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO)



---

Dra. Haydée Andrade Cunha  
(Universidade do Estado do Rio de Janeiro/UERJ)



---

Dr. Ricardo Campos da Paz  
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO)

## **Agradecimentos**

AO FUNBIO:

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro concedido pela versão de 2019 do programa “Bolsas FUNBIO - Conservando o Futuro”.

## Resumo

Os peixes conhecidos popularmente como tucunarés (gênero *Cichla*) são piscívoros vorazes nativos das bacias dos rios Amazonas, Orinoco e Tocantins-Araguaia que foram introduzidos em diversas outras bacias do Brasil e do mundo. Eventos de hibridização ocorrem naturalmente entre as espécies desse gênero, tanto entre espécies irmãs, quanto entre espécies filogeneticamente distantes, e podem ser intensificados por meio de distúrbios antropogênicos como a translocação de diferentes espécies para um mesmo reservatório. Um possível resultado da hibridização introgressiva é o aumento da diversidade genética das populações envolvidas. No contexto de invasões biológicas, o aumento da diversidade genética de populações invasoras pode intensificar os impactos causados por elas e facilitar a colonização de novas áreas, caso esses indivíduos sejam translocados para outras regiões. Dessa forma, a identificação de híbridos é importante no manejo e monitoramento dessas populações invasoras. Sendo assim, no presente trabalho utilizamos a identificação de padrões de coloração, genotipagem de marcadores microssatélites do nuDNA e sequenciamento da Região Controle do mtDNA para testar a hipótese de que as espécies *C. kelberi* e *C. piquiti*, introduzidas no reservatório de Lajes na bacia do Rio Paraíba do Sul, estão hibridizando. As análises genéticas dos marcadores microssatélites de 28 indivíduos por meio dos programas Structure e NewHybrids confirmaram a hibridização entre estas espécies. Identificamos híbridos F1, F2 e retrocruzamentos de *C. kelberi*. A maioria dos híbridos possui haplótipos do mtDNA pertencentes à *C. piquiti*, o que indica uma tendência ao cruzamento de machos de *C. kelberi* com fêmeas de *C. piquiti*. Alguns padrões de coloração foram observados apenas em indivíduos híbridos, como a presença de características de ambas as espécies ao mesmo tempo (ex. três barras laterais e manchas pós-orbitais), quatro barras laterais, e presença da barra lateral 4. Apesar da baixa diversidade encontrada na Região Controle, encontramos níveis moderados-altos de diversidade genética nos marcadores microssatélites nucleares, principalmente em indivíduos híbridos.

Palavras-chave: genética da invasão; hibridização; caracterização genética; caracterização morfológica

## Abstract

Fishes popularly known as peacock cichlids (genus *Cichla*) are voracious piscivores native to the Amazon, Orinoco and Tocantins-Araguaia river basins that were introduced in several other basins in Brazil and the world. Hybridization events occur naturally between species of this genus, both between sister species and between more distinct species and can be intensified through anthropogenic disturbs such as the translocation of different species to the same reservoir. A possible result of introgressive hybridization is the increase in the genetic diversity of involved populations. In the context of biological invasions, the increase in genetic diversity of invasive populations can intensify the impacts caused by them and facilitate the colonization of new areas if these individuals are translocated to other regions. Thus, the identification of hybrids is important in the management and monitoring of these invasive populations. Therefore, in the present work, we used the identification of color patterns, genotyping of nuDNA microsatellite markers and sequencing of the mtDNA Control Region to test the hypothesis that the species *C. kelberi* and *C. piquiti*, introduced in the Lajes reservoir in the Paraíba do Sul river basin, are hybridizing. The genetic analyzes of microsatellite markers of 28 individuals in Structure and NewHybrids softwares confirmed the hybridization between these species. We identified F1 and F2 hybrids and *C. kelberi* backcrosses. Most hybrids have mtDNA haplotypes belonging to *C. piquiti*, which indicates a tendency of crossing between males of *C. kelberi* and females of *C. piquiti*. Some color patterns were observed in hybrid individuals only, such as the presence of characteristics of both species at the same time (ex. three lateral bars and postorbital markings), four lateral bars, and the presence of lateral bar 4. Despite the low diversity found in the Control Region, we found moderate-high levels of genetic diversity in the nuclear microsatellite markers, especially in hybrid individuals.

Keywords: invasion genetics; hybridization; genetic characterization; morphological characterization

## Lista de Ilustrações

- Figura 1. (A) Bacia do rio Paraíba do Sul, indicando a posição do reservatório de Lajes; (B) Interior do reservatório de Lajes.....6
- Figura 2. Principais características utilizadas na distinção entre *C. piquiti* (A), *C. kelberi* (B). Manchas pós-orbitais estão presentes em *C. piquiti* apenas, enquanto a barra occipital, manchas abdominais e pontos claros nas nadadeiras anal e pélvica estão presentes em *C. kelberi* apenas. *Cichla kelberi* possui três barras na lateral do corpo (barras 1, 2 e 3), enquanto *C. piquiti* possui cinco barras (barras 1, 1a, 2, 2a e 3).....7
- Figura 3. Peixes A e B representam o padrão encontrado nos peixes identificados morfologicamente como *C. piquiti* e *C. kelberi* respectivamente. Peixes C e D representam alguns dos padrões de peixes identificados morfologicamente como híbridos. *Cichla piquiti* apresentou 5 barras laterais (barras 1, 1a, 2, 2a e 3) e manchas pós-orbitais. *Cichla kelberi* apresentaram 3 barras laterais (barras 1, 2 e 3) e, eventualmente, barra occipital, com ausência de manchas abdominais e pontos claros nas nadadeiras anal e pélvica na maioria dos indivíduos. Peixes identificados morfologicamente como híbridos apresentaram uma grande variação de padrões, possuindo de 3 à 6 barras laterais, assim como manchas pós-orbitais e barra occipital, ocasionalmente ao mesmo tempo.  
\*Barra lateral 4 é reportada como “extremamente rara” em *C. kelberi* e inexistente em *C. piquiti* (Kullander & Ferreira 2006).....12
- Figura 4. Variação encontrada no número de barras laterais. Peixe A foi identificado morfologicamente como *C. kelberi*, enquanto peixes B, C e D foram identificados morfologicamente como híbridos. A - 3 barras laterais (1, 2 e 3); B - 4 barras laterais (1, 1a, 2 e 3); C - 5 barras laterais (1, 1a, 2, 2a e 3); D - 6 barras laterais (1, 1a, 2, 2a, 3 e 4).....13
- Figura 5. Indivíduos que apresentaram a barra lateral 4, todos identificados morfologicamente como híbridos. Número à direita referente ao código do peixe (Tabela S1). A - barras 1, 2, 3, e 4; B - barras 1, 1a, 2, 3 e 4; C - barras 1, 1a, 2, 2a, 3, e 4; D - barras 1, 1a, 2, 3, e 4; E - barras 1, 2, 3 e 4; F - barras 1, 1a, 2, 3 e 4; G - barras 1, 1a, 2, 3 e 4.....14
- Figura 6. Árvore de Máxima Verossimilhança baseada na Região Controle de espécies do gênero *Cichla* com seqüências geradas neste trabalho (tuc) e outras retiradas do GenBank. Os números nos nós representam o resultado do teste de bootstrap com 1000 replicações.....16

Figura 7: Identificação morfológica, haplótipos da Região Controle do mtDNA e gráficos de barras gerados pelo resultado das análises de 28 indivíduos no Structure e NewHybrids. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical. Nos gráficos do Structure e NewHybrids, linhas pontilhadas representam os thresholds utilizados. Para o mtDNA, a cor do retângulo indica que o haplótipo pertence àquela espécie. O gráfico do Structure mostra o valor de mistura de cada indivíduo levando em conta os dois grupos genéticos identificados (Cluster A e Cluster B), enquanto o gráfico do NewHybrids indica a probabilidade posterior do indivíduo pertencer à umas das seis classes genotípicas (C. kelberi e C. piquiti puros, F1, F2, e retrocruzamentos de ambas as espécies). Ordem dos indivíduos segue a ordem na Tabela S1.....19

Figura S1. Intercruzamentos naturais registrados dentro do gênero *Cichla*. Fotos dos peixes retiradas de Willis et al. 2012.....37

Figura S2. Peixes analisados. Números acima dos peixes representam seus códigos de identificação .....38

## Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivo geral.....	4
2.1 Objetivos específicos.....	4
3. Materiais e Métodos.....	5
3.1 Área de estudo.....	5
3.2 Coletas e identificação morfológica .....	7
3.3 Extração de DNA.....	8
3.4 Sequenciamento do mtDNA.....	8
3.5 Marcadores microssatélites nucleares.....	9
4. Resultados.....	11
4.1 Coletas e identificação morfológica.....	11
4.2 Análise da Região Controle do mtDNA.....	14
4.3 Diversidade genética nos <i>loci</i> microssatélites.....	17
4.4 Identificação de híbridos utilizando microssatélites nucleares.....	17
4.5 Comparação da diversidade genética nos <i>loci</i> microssatélites de puros híbrido.....	20
5. Discussão.....	20
6. Conclusão.....	26
7. Referências.....	27

## 1. Introdução

Espécies têm sido transportadas pelo homem para além de suas áreas nativas há milênios (Hulme 2009). Nas recentes décadas, com o processo de globalização e as facilidades dos meios de transportes atuais, a introdução de espécies não-nativas tem sido intensificada, fazendo com que espécies invasoras sejam uma das principais ameaças à biodiversidade no mundo (Mooney & Cleland 2001; Clavero & García-Berthou 2005). Em ambientes de água doce, a introdução de peixes não-nativos é um problema que foi intensificado, principalmente pelas ações da pesca esportiva, da piscicultura e do comércio de espécies ornamentais (Gozlan et al. 2010). Esses ecossistemas estão entre os mais vulneráveis à introduções de espécies, e são uns dos mais invadidos em todo o mundo (Ricciardi & MacIsaac 2000; Perry et al. 2002; Moyle 2006). Um fator que contribui para isso são os represamentos, que alteram drasticamente e homogeneizam os habitats aquáticos, tornando-os mais adequados à colonização por espécies generalistas e pré-adaptadas a ambientes lênticos, do que aos próprios peixes nativos de hábitos lóticos e espécies migradoras. Sendo assim, represamentos são reconhecidos como facilitadores de invasões biológicas e a principal porta de entrada de espécies invasoras para a bacia hidrográfica onde estão inseridos (Ricciardi & MacIsaac 2010).

A bacia do rio Paraíba do Sul possui uma área de 55.300 km<sup>2</sup>, sendo a segunda maior bacia do leste brasileiro (Honji et al. 2017; Moraes et al. 2017). Nela estão localizados reservatórios onde diversas espécies não-nativas de peixes foram introduzidas para fins de estocagem assim como para pesca esportiva (Agostinho et al. 2007). Entre essas espécies introduzidas, as do gênero *Cichla* Bloch & Schneider, 1801, conhecidas popularmente como tucunarés, se destacam por serem piscívoros vorazes, capazes de impactar significativamente as populações nativas por meio da predação (Zaret and Paine, 1973; Pelicice et al. 2015). O gênero *Cichla* é composto por 16 espécies nativas das bacias dos rios Amazonas, Orinoco e Tocantins-Araguaia, que por serem predadores agressivos, foram introduzidas em diversas outras bacias dentro do Brasil e fora, principalmente para serem usadas na pesca esportiva (Kullander & Ferreira 2006; Marques et al. 2016). Três espécies de tucunarés foram introduzidas na bacia do rio Paraíba do Sul, *C. kelberi* Kullander & Ferreira 2006, *C. monoculus* Spix & Agassiz 1831 e *C. piquiti* Kullander & Ferreira 2006 (Santos et al. 2001, 2016a, 2016b; Marques et al. 2016). No reservatório de Lajes especificamente, duas espécies foram identificadas, o tucunaré amarelo *C. kelberi* e o

tucunaré azul *C. piquiti* (Marques et al. 2016; Santos et al. 2016). *Cichla kelberi* está estabelecida como espécie invasora por toda extensão da bacia do rio Paraíba do Sul desde a sua introdução por volta de 1950 (Marques et al. 2016), enquanto *C. piquiti* foi introduzido mais recentemente em 2010, e está restrito a poucos reservatórios (Santos et al. 2016a).

A descrição das espécies do gênero *Cichla* foi feita levando em conta principalmente caracteres diagnósticos relacionados à padrões de coloração (Kullander & Ferreira 2006). Dessa forma, *C. kelberi* pode ser identificado pela presença de três barras laterais, barra occipital geralmente em espécimes grandes, manchas escuras abdominais e pintas claras nas nadadeiras anal e pélvica. Já *C. piquiti* pode ser identificado pela presença de cinco barras laterais e pela presença de manchas pós-orbitais. Em termos de reprodução, as duas espécies possuem o mesmo comportamento reprodutivo, que é o mesmo para todas as espécies do gênero *Cichla*. Esse comportamento envolve a formação de casais, onde o macho faz o cortejo da fêmea, e, ela aceitando, ambos constroem um ninho, onde as larvas e alevinos ficarão. Esse ninho é geralmente escavado próximo a uma estrutura fixa, como um tronco de árvore submerso ou uma rocha, onde a fêmea fará a deposição dos ovos, que logo são fertilizados pelo macho (Muñoz et al. 2006). Ambas as espécies demonstram cuidado biparental, tanto dos ovos, quanto das larvas e posteriormente dos alevinos (Resende et al. 2008; Guedes et al. 2020).

*Cichla kelberi* e *C. piquiti* são espécies simpátricas, nativas da bacia dos rios Tocantins-Araguaia (Kullander & Ferreira 2006). Uma característica das espécies de *Cichla* é a capacidade de hibridizarem entre si, tanto entre espécies irmãs, quanto entre espécies filogeneticamente distantes dentro do gênero (Willis et al. 2012). Análises genéticas têm reconhecido a ocorrência de híbridos entre *C. kelberi* e *C. piquiti* em áreas nativas artificiais, como reservatórios, e áreas introduzidas (Oliveira et al. 2006; Almeida-Ferreira et al. 2011; Carvalho et al. 2014). Não existem registros publicados da ocorrência de híbridos em áreas nativas naturais, porém, pela facilidade que as espécies de *Cichla* hibridizam entre si, é de se esperar que eles também ocorram nessas áreas. A maioria das espécies simpátricas do gênero *Cichla* exibem preferências por diferentes habitats e outros particionamentos de recursos (Winemiller et al. 1997; Willis et al. 2007; Willis et al. 2015), o que pode funcionar como uma barreira reprodutiva, fazendo com que híbridos entre *C. kelberi* e *C. piquiti* em áreas nativas naturais, sejam menos comuns. Embora existam registros de hibridização entre essas espécies, pouco se sabe sobre os padrões de coloração

dos híbridos, uma vez que trabalhos anteriores realizaram apenas a identificação genética, o que, combinado com o fato de ambas as espécies possuírem elevada plasticidade fenotípica, dificulta sua identificação.

Durante coletas realizadas no reservatório de Lajes, nosso grupo de trabalho identificou indivíduos com características morfológicas intermediárias entre *C. kelberi* e *C. piquiti*. Além disso, análises morfológicas e genéticas iniciais revelaram indivíduos que apresentavam características morfológicas de uma das espécies enquanto apresentavam sequências do DNA mitocondrial (mtDNA) referentes a outra espécie, indicando que elas estariam hibridizando na bacia do rio Paraíba do Sul.

Eventos de hibridização podem impactar as populações envolvidas de diferentes maneiras. Por um lado, pode haver uma diminuição da adaptabilidade dos híbridos por meio da perda de caracteres adaptativos de cada uma das espécies, ou por meio de incompatibilidades genéticas devido à epistasias negativas (Dobzhansky–Muller), resultando em depressão por exocruzamento e *hybrid breakdown* (Gharrett et al. 1999; Stelkens et al. 2015; Todesco et al. 2016; Wells et al. 2019). Por outro lado, o cruzamento entre populações geneticamente distintas pode aumentar a diversidade genética delas pela introdução de alelos antes não existentes em uma dada espécie, aliviando o efeito fundador, gerando novos genótipos e aumentando os níveis de heterozigosidade (Lee 2002; Zalapa et al. 2010). Um possível resultado dos maiores níveis de heterozigosidade é a heterose (vigor híbrido) (Birchler et al. 2006), que é o aumento de processos biológicos e comportamentais como crescimento, fecundidade, sobrevivência e agressividade, de indivíduos híbridos, quando comparados com os indivíduos parentais (Wohlfarth 1993; Rahman et al. 1995). Além disso, novos genótipos e fenótipos, assim como características intermediárias de híbridos podem permitir que eles ocupem nichos não antes aproveitados pelas espécies parentais (Selz & Seehausen 2019). Dessa forma, em um contexto de invasões biológicas, a hibridização entre duas espécies invasoras causa preocupações, uma vez que a invasão de novos nichos ou a intensificação de processos biológicos e comportamentais através da heterose pode intensificar os impactos no ecossistema invadido, bem como facilitar novas introduções caso esses indivíduos sejam translocados para outras áreas (Hovick & Whitney 2014; Haynes et al. 2011).

Considerando as 15 espécies de *Cichla* descritas até então, Willis (2012) constatou que 12% (139 de 1177 indivíduos) dos indivíduos coletados em suas áreas de distribuição natural eram híbridos, nenhum desses sendo híbridos entre *C. kelberi* e *C. piquiti*, o que

pode indicar que estes são raros no ambiente nativo. Porém, distúrbios antropogênicos de habitats podem causar um aumento na frequência de hibridização mesmo entre espécies simpátricas (Hasselman et al. 2014). A translocação de indivíduos dessas espécies para um mesmo reservatório é um impacto significativo, que pode desfazer possíveis barreiras reprodutivas e espaciais (ex. através da colonização diferenciada de microhabitats em ambiente nativo natural) que dificultavam e/ou impediam a reprodução entre essas espécies, fazendo com que haja um aumento na frequência de hibridização (Scribner et al. 2000).

A utilização da morfologia visando a identificação de híbridos pode ser insuficiente, já que nem todos os indivíduos híbridos expressam características mistas de cada uma das espécies parentais (Brito et al. 2020). Sendo assim, a análise de marcadores moleculares em conjunto das análises morfológicas é indicada para que haja uma melhor identificação de híbridos. Entre os marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites são frequentemente empregados para este fim por serem codominantes, possuírem ampla distribuição no genoma e serem hiper variáveis (Kalia et al. 2011). Comumente esses marcadores são utilizados em conjunto com marcadores do mtDNA que, por apresentarem herança matrilinear, também podem ser utilizados na detecção de introgressões entre espécies e para aferir a dinâmica dos eventos de hibridização, isto é, se apenas uma ou se ambas as espécies podem ser provedoras dos óvulos (Avice & Saunders 1984).

## **2. Objetivo Geral**

Caracterizar geneticamente as populações invasoras de *C. kelberi*, *C. piquiti* e seus possíveis híbridos, no reservatório de Lajes, através da genotipagem de marcadores microssatélites nucleares e do sequenciamento do loco Região Controle (CR) do mtDNA, bem como comparar os padrões de coloração desses três grupos.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Determinar a diversidade genética das populações de *C. kelberi*, *C. piquiti* e seus possíveis híbridos no reservatório de Lajes.
- Detectar hibridização entre essas espécies.
- Aferir a dinâmica de hibridização.
- Caracterizar o padrão de coloração de indivíduos parentais e híbridos.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1 Área de estudo**

O reservatório de Lajes (22°42'N–43°53'W; 22°50'N–44°05'W) fica na bacia do rio Paraíba do Sul, maior rio do Estado do Rio de Janeiro, no sudeste brasileiro (Figura 1A). Esse reservatório foi o primeiro a ser construído no Estado do Rio de Janeiro, entrando em funcionamento entre 1905 e 1908, é utilizado para geração de energia hidrelétrica e para abastecimento hídrico da região metropolitana do estado, fornecendo água potável para cerca de 12 milhões de pessoas (Santos et al. 2016a). É um reservatório oligotrófico, com uma alta qualidade de água devido ao entorno de Floresta Atlântica bem preservada (Figura 1B), mas apresenta uma baixa complexidade de habitats submersos devido à remoção da floresta antes do enchimento (Santos et al. 2011).

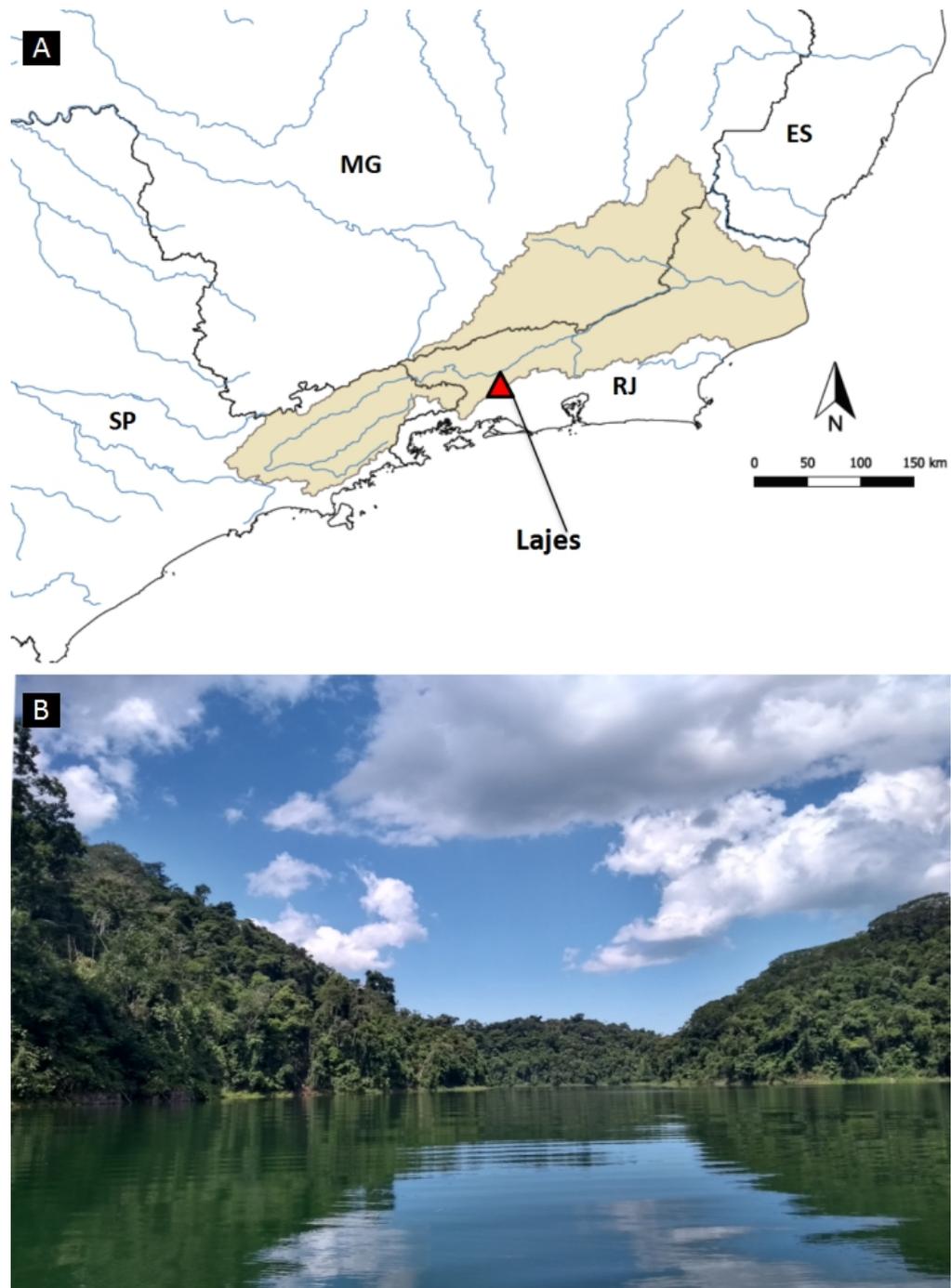


Figura 1. (A) Bacia do rio Paraíba do Sul, indicando a posição do reservatório de Lajes; (B) Interior do reservatório de Lajes.

### 3.2 Coletas e identificação morfológica

As coletas foram realizadas no reservatório de Lajes, durante o período de fevereiro de 2014 a fevereiro de 2019, em grande parte pela equipe do Laboratório de Ictiologia Teórica e Aplicada da UNIRIO, tendo a minha participação no último ano. Os espécimes foram coletados com isca artificial, eutanasiados em gelo e mantidos a -20 °C. Todos os indivíduos foram então pesados e as seguintes medidas morfométricas foram tiradas, de acordo com Kullander & Ferreira 2006: comprimento total, comprimento padrão, comprimento da cabeça, comprimento do focinho, altura máxima do corpo, abertura horizontal da boca, abertura vertical da boca, diâmetro do olho e altura do pedúnculo caudal. *Cichla kelberi* e *C. piquiti* foram identificados morfológicamente de acordo com a descrição de Kullander & Ferreira 2006, peixes que não se enquadravam nessa descrição, ou apresentavam pelo menos uma característica de cada espécie, foram considerados como possíveis híbridos. Além da coloração do corpo, as principais características utilizadas na distinção entre indivíduos puros das duas espécies e híbridos foram o número de barras verticais na lateral do corpo e padrões de pintas e manchas (Figura 2).

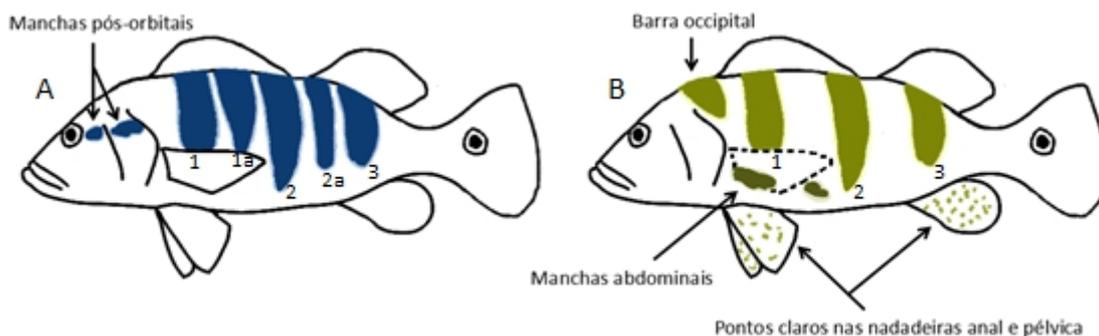


Figura 2. Principais características utilizadas na distinção entre *C. piquiti* (A), *C. kelberi* (B). Manchas pós-orbitais estão presentes em *C. piquiti* apenas, enquanto a barra occipital, manchas abdominais e pontos claros nas nadadeiras anal e pélvica estão presentes em *C. kelberi* apenas. *Cichla piquiti* possui cinco barras na lateral do corpo (barras 1, 1a, 2, 2a e 3), enquanto *C. kelberi* possui três barras (barras 1, 2 e 3).

### 3.3 Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas a partir de 25 mg de tecido muscular com o uso do kit comercial NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel GmbH and Co. KG), segundo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 1% em tampão TAE 0,5X para que houvesse a confirmação da obtenção do DNA e sua quantificação com o auxílio da escada  $\lambda$ PstI. O DNA extraído foi então mantido à -20° C até o momento das reações de amplificação por PCR.

### 3.4 Sequenciamento do mtDNA

Para análise do mtDNA, o marcador molecular Região Controle (RC) foi amplificado utilizando-se o par de *primers* tPro2-5 (5'-ACCC TAACTCCCAAAGC-3') e HN-20-3 (5'-GTGTTATGCTTTAGTTAAGC-3') (Lee et al. 1995; Palumbi, 1996). As reações de PCR para amplificação da RC ocorreram com um volume final de 25  $\mu$ L contendo 1 unidade (U) de Taq DNA polimerase (ThermoScientific Inc., USA), 1 $\times$  tampão de PCR com NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.16 mM dNTPs (ThermoScientific Inc., USA), 8 pmol de cada primer e 5  $\mu$ g de DNA genômico, e as condições de PCR foram definidas em uma etapa inicial de 5 min à 94 °C, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, e uma etapa de extensão final à 72 °C por 5 min. Para confirmar a amplificação dos fragmentos de interesse, uma alíquota dos produtos finais da PCR foi corada com GelRed® e aplicada em gel de agarose 1% em tampão TAE 0,5X. Os produtos amplificados foram então purificados e sequenciados pela Macrogen Inc (Seul, Coréia do Sul) utilizando um sequenciador de capilar e a tecnologia de sequenciamento tradicional (Sanger). Por possuir uma região poli-T, o sequenciamento da porção 3' da RC é problemático (Willis et al. 2007). Desta forma, cada amostra foi sequenciada utilizando apenas o primer tPro2-5 em duplicata. As sequências do mtDNA obtidas foram editadas manualmente no programa MEGA7 (Kumar et al. 2015) e alinhadas pelo método ClustalW no mesmo programa, juntamente à outras sequências de *Cichla* retiradas do GenBank. A partir daí, construímos uma árvore filogenética de Máxima Verossimilhança com 1000 replicações de bootstrap também no MEGA7, utilizando o modelo evolutivo T92+G+I, recomendado pelo próprio software como sendo o que melhor descreve o padrão de substituição para esse conjunto de dados.

### 3.5 Marcadores microssatélites nucleares

Para o presente trabalho testamos 26 pares de *primers* para amplificação de *loci* microssatélites disponíveis na literatura desenvolvidos para diferentes espécies do gênero *Cichla*. Os primers testados foram: TUC3, TUC4, TUC5, TUC9, TUC10, TUC12, TUC13, TUC16, TUC18 (Carvalho et al., 2009), CM01, CM02, CM03, CM04, CM05, CM06, CM07, CM09, CM14 (Lima et al., 2010), CPINC11, CPINC1, CPIND2, CINT22, CORIB6.2, CORID12, CORIB3, CICHLASM2 (Macrander et al., 2012). Destes, conseguimos desenvolver protocolos de amplificação para 12 *loci* nos indivíduos das espécies *C. kelberi*, *C. piquiti* e possíveis híbridos coletados no reservatório de Lajes.

Os 12 *primers* selecionados foram: TUC3, TUC4 (Carvalho et al. 2009), CM01, CM09 (Lima et al. 2010), CPINC11, CPINC1, CPIND2, CINT22, CORIB6.2, CORID12, CORIB3 e CICHLASM2 (Macrander et al. 2012). As reações de amplificação foram feitas com um volume total de 25  $\mu$ l, contendo 1 U de Taq DNA polymerase (Thermo Scientific Inc), 2,5  $\mu$ l de tampão 10XPCR com NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.16 mM dNTPs (Thermo Scientific), 8 pmol de cada primer e 5  $\mu$ g de DNA. As condições de ciclagem para os *primers* TUC3, TUC4 foram compostas de uma temperatura inicial de 94 °C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos de 94 °C por 30 segundos, *touchdown* de 55-45 °C ( $\Delta = -1,0$  °C/ciclo) por 30 segundos, 68 °C por 30 segundos, após esses 10 ciclos iniciais, iniciam-se 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 45 °C por 30 segundos, 68 °C por 30 segundos, e por fim uma fase de extensão final de 68 °C por 5 minutos. Todos os outros *loci* foram amplificados com uma temperatura inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos de 95 °C por 15 segundos, *touchdown* de 55-50 °C ( $\Delta = -0,5$  °C/ciclo) por 15 segundos, 72 °C por 15 segundos, após esses 10 ciclos iniciais, iniciam-se 20 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 50 °C por 15 segundos, 72 °C por 15 segundos, e por fim uma fase de extensão final de 72°C. Os *primers* F utilizados foram sintetizados com uma cauda M13 para que houvesse a marcação com fluoróforos (FAM, VIC, NED, PET), seguindo o protocolo estabelecido por Schuelke (2000), visando a genotipagem em um sequenciador automático de capilar. Para verificar se os *loci* de interesse foram amplificados corretamente, os produtos das PCRs foram corados com GelRed® e analisados em gel de agarose 3% em tampão TAE 0,5X. Os fragmentos amplificados foram enviados para a MacroGen Inc (Seul, Coréia do Sul) para que fossem genotipados.

A leitura dos eletroferogramas foi feita no Peak Scanner v2.0 (Applied Biosystems), onde os alelos foram atribuídos manualmente. O Micro-Checker v2.2.3 (Oosterhout et al. 2004) foi utilizado para detectar a presença de possíveis alelos nulos. Desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e no Desequilíbrio de Ligação (DL) foram testados no Genepop v4.7.5 (Rousset, 2008) utilizando o método de cadeia de Markov. O EHW para cada *loci* foi testado usando a opção teste de probabilidade, e para população usando um teste global tendo como H1 = excesso de heterozigotos. O Fstat v2.9.4 (Goudet, 2003) foi utilizado para calcular o número de alelos ( $N_a$ ), riqueza alélica (AR) e o índice de endogamia ( $F_{IS}$ ). O Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier & Lischer 2010) foi utilizado para calcular as heterozigosidades observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ). Alelos privados ( $PA$ ) foram verificados manualmente. Para detectar evidências de hibridização entre as espécies, foram feitas análises dos *loci* microssatélites nos programas Structure v2.3.4 (Pritchard et al. 2000a) e NewHybrids v1.0 (Anderson & Thompson, 2002), ambos baseados em métodos Bayesianos. No Structure, o modelo que permite ancestralidade de múltiplas populações (admixture model) foi utilizado. Para determinar o número mais provável de grupos genéticos (K), testamos K de 1 a 6. Utilizamos a opção de frequência de alelos independentes, 10 réplicas para cada valor de K, 500.000 gerações da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com período de “burn-in” de 200.000. Dessa forma, foram estimadas as probabilidades ( $q$ ) de cada indivíduo pertencer a cada grupo genético. Utilizamos um *threshold* de  $0,10 \geq q \geq 0,90$  para representar indivíduos puros, já que é um valor amplamente utilizado em trabalhos com espécies de diferentes grupos (Schwartz & Beheregaray 2008; Wyk et al. 2016; Souza et al. 2019), e é indicado em trabalhos que fizeram simulações para testar a eficiência e precisão do Structure na correta identificação de híbridos (Vaha & Primmer, 2006). Para estimar o número de grupos genéticos (K) mais provável, o resultado do Structure foi inserido no Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012) e no CLUMPAK (Kopelman et al. 2015). O NewHybrids foi utilizado para designar indivíduos a diferentes classes genotípicas (puros, F1, F2 e retrocruzamentos), utilizando um *threshold* de 0.5 para designação de indivíduos às diferentes classes já que esse valor também é amplamente utilizado e indicado em trabalhos de simulação da eficácia do programa (Vaha & Primmer, 2006). Para uma classificação mais ampla, indivíduos que não apresentaram valores acima do *threshold* para serem classificados como puros tiveram os valores de probabilidades posteriores de todas as classes híbridas somados, e, caso a

soma fosse superior à 0.5, foram classificados como híbridos onde a classe específica não pode ser determinada.

## 4. Resultados

### 4.1. Coletas e identificação morfológica

Foram coletados 72 espécimes no reservatório de Lajes. Desses, 40 foram identificados morfológicamente como *C. kelberi*, 1 como *C. piquiti* e 31 indivíduos apresentaram características morfológicas híbridas. Desses, 28 foram selecionados para as análises morfológicas e genéticas iniciais, sendo 13 *C. kelberi*, 1 *C. piquiti* e 14 possíveis híbridos. Devido às restrições impostas pela pandemia de COVID-19, não foi possível seguir as análises com outros indivíduos. A maioria dos indivíduos identificados morfológicamente como possíveis híbridos foram classificados dessa forma por possuírem pelo menos uma característica de cada espécie (ex. três barras laterais e manchas pós-orbitais) ou por possuírem caracteres intermediários (ex. quatro barras laterais). O único peixe identificado morfológicamente como *C. piquiti* puro apresentou cinco barras laterais (barras 1, 1a, 2, 2a e 3) e manchas pós orbitais, de acordo com a descrição da espécie. Todos os peixes identificados como *C. kelberi* puros apresentaram três barras laterais (barras 1, 2 e 3), porém, a maioria não apresentou manchas abdominais, manchas claras nas nadadeiras pélvica e anal, e barra occipital (Figura 3). Indivíduos analisados possuem 3, 4, 5 ou 6 barras laterais (Figura 4). Manchas pós-orbitais estão presentes no único indivíduo identificado morfológicamente como *C. piquiti* e em diversos identificados como possíveis híbridos. A barra occipital foi observada em peixes identificados morfológicamente como *C. kelberi* e híbridos. Apesar da presença da barra lateral nº 4 ser reportada como “extremamente rara” na espécie *C. kelberi*, e inexistente em *C. piquiti* (Kullander & Ferreira, 2006), ela está presente em sete dos 28 peixes, todos identificados morfológicamente como possíveis híbridos (Figura 5).

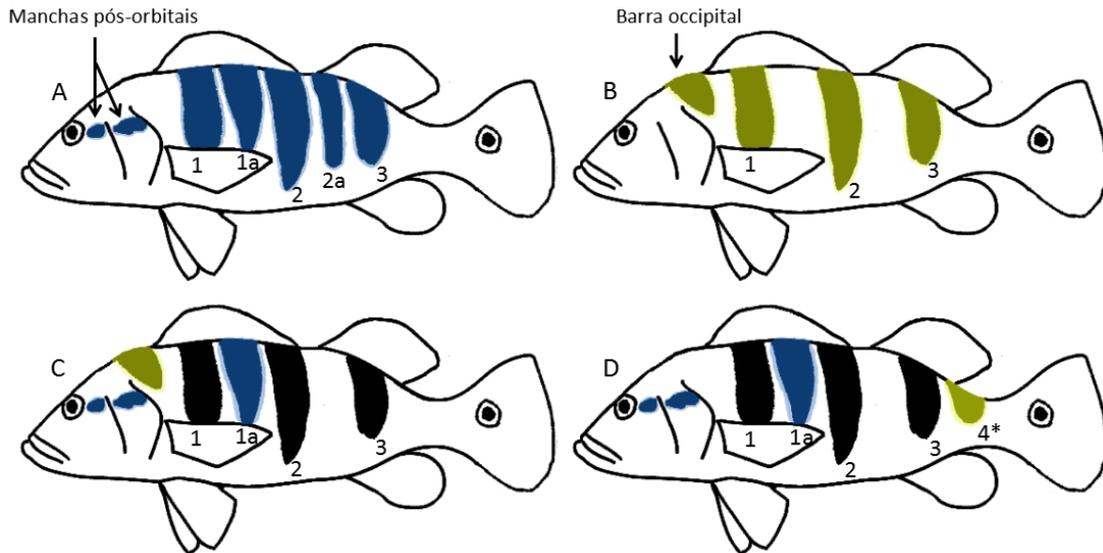


Figura 3. Peixes A e B representam o padrão encontrado nos peixes identificados morfológicamente como *C. piquiti* e *C. kelberi* respectivamente. Peixes C e D representam alguns dos padrões de peixes identificados morfológicamente como possíveis híbridos. *Cichla piquiti* apresentou cinco barras laterais (barras 1, 1a, 2, 2a e 3) e manchas pós-orbitais. *Cichla kelberi* apresentaram três barras laterais (barras 1, 2 e 3) e, eventualmente, barra occipital, com ausência de manchas abdominais e pontos claros nas nadadeiras anal e pélvica na maioria dos indivíduos. Peixes identificados morfológicamente como híbridos apresentaram uma grande variação de padrões, possuindo de 3 a 6 barras laterais, assim como manchas pós-orbitais e barra occipital, ocasionalmente ao mesmo tempo.

\*Barra lateral 4 é reportada como “extremamente rara” em *C. kelberi* e inexistente em *C. piquiti* (Kullander & Ferreira 2006).

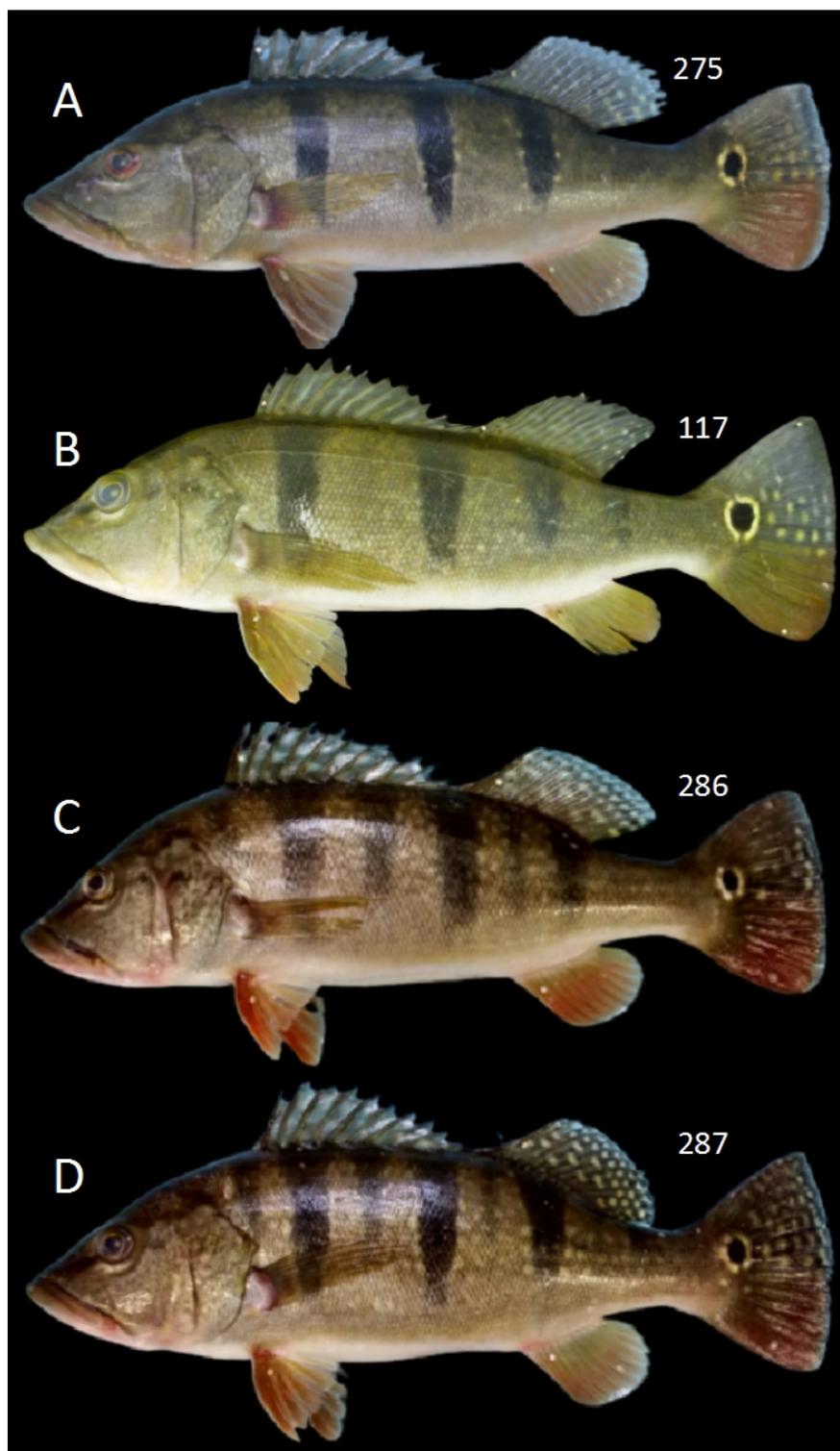


Figura 4. Variação encontrada no número de barras laterais. Peixe A foi identificado morfologicamente como *C. kelberi*, enquanto peixes B, C e D foram identificados morfologicamente como possíveis híbridos. A - 3 barras laterais (1, 2 e 3); B - 4 barras laterais (1, 1a, 2 e 3); C - 5 barras laterais (1, 1a, 2, 2a e 3); D - 6 barras laterais (1, 1a, 2, 2a, 3 e 4)

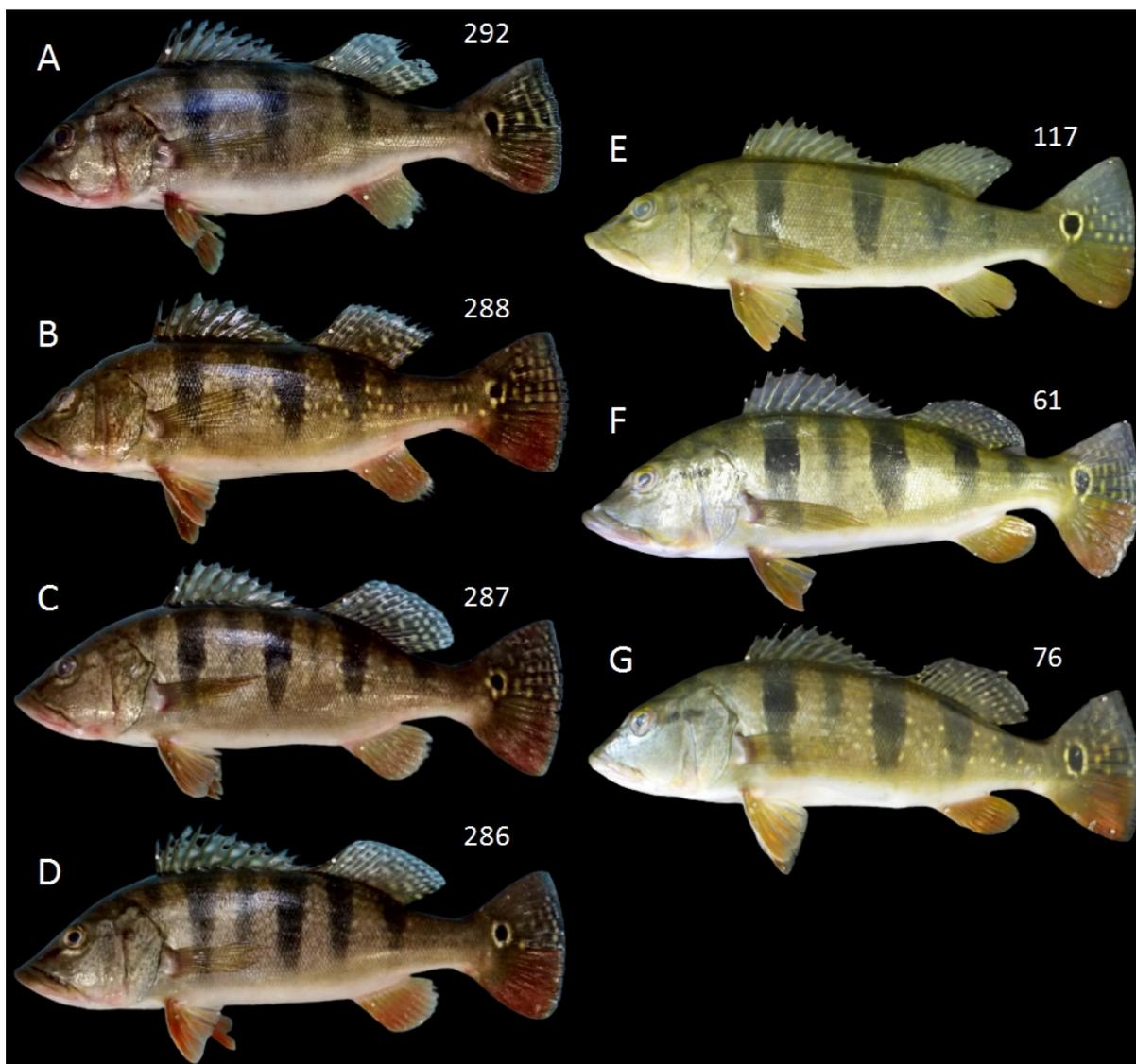


Figura 5. Indivíduos que apresentaram a barra lateral 4, todos identificados morfologicamente como possíveis híbridos. Número à direita referente ao código do peixe (Tabela S1). A - barras 1, 2, 3, e 4; B - barras 1, 1a, 2, 3 e 4; C - barras 1, 1a, 2, 2a, 3, e 4; D - barras 1, 1a, 2, 3, e 4; E - barras 1, 2, 3 e 4; F - barras 1, 1a, 2, 3 e 4; G - barras 1, 1a, 2, 3 e 4.

#### 4.2. Análise da Região Controle do mtDNA

Obtivemos sequências da Região Controle de 27 dos 28 indivíduos selecionados para as análises. O tamanho das sequências obtidas após o alinhamento foi de aproximadamente 490pb. Essas sequências foram utilizadas para construir uma árvore filogenética de Máxima Verossimilhança junto de outras sequências de 14 das 16 espécies do gênero *Cichla* retiradas do GenBank (Figura 6). As sequências dos peixes do reservatório de Lajes se agruparam em dois clados distintos, ambos com altos valores de bootstrap, um deles

composto por sequências do Genbank de *C. kelberi* e outro de *C. piquiti*. Identificamos três haplótipos nos peixes analisados, sendo dois pertencentes à *C. kelberi* e um pertencente à *C. piquiti*. O haplótipo único encontrado de *C. piquiti* e um dos haplótipos de *C. kelberi* já haviam sido identificados em trabalhos prévios no rio Paraíba do Sul (Marques et al. 2016, Santos et al. 2016). Onze indivíduos apresentaram sequências referentes à *C. kelberi*, enquanto 16 apresentaram sequências referentes à *C. piquiti*. Dos 11 indivíduos que apresentaram sequências de *C. kelberi*, 10 foram identificados morfologicamente como *C. kelberi* e 1 como possível híbrido, enquanto dos 16 indivíduos que apresentaram sequências pertencentes à *C. piquiti*, 1 foi identificado morfologicamente como *C. piquiti*, 2 como *C. kelberi* e 13 como possíveis híbridos.

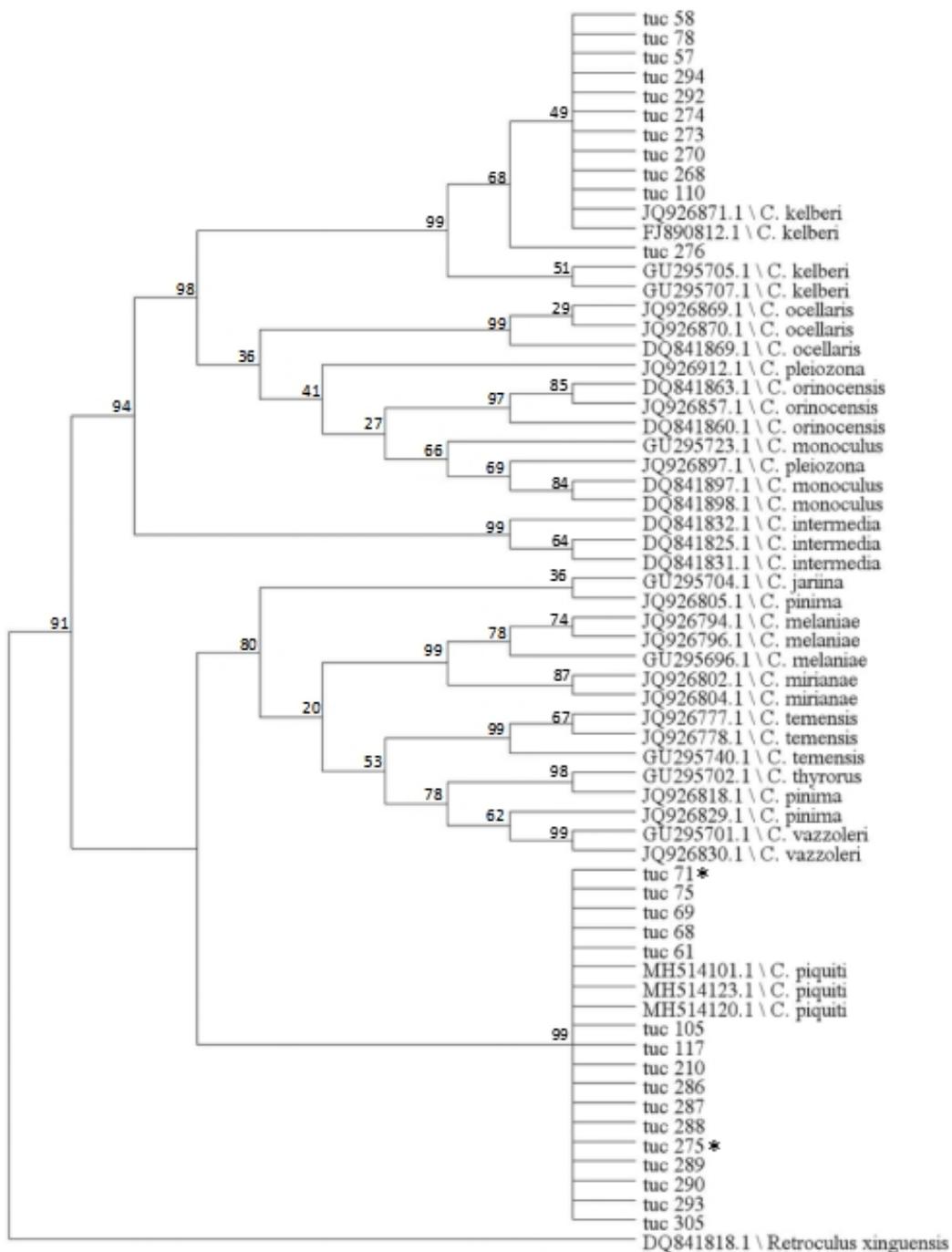


Figura 6. Árvore de Máxima Verossimilhança utilizando o modelo de Tamura de 1992, baseada em sequências da Região Controle de 490 pb de espécies do gênero *Cichla*, com sequências geradas neste trabalho (tuc) e outras retiradas do GenBank. Os números nos nós representam o resultado do teste de bootstrap com 1000 replicações. Indivíduos com asterisco ao lado do código de identificação apresentaram discordância entre a identificação morfológica e o mtDNA, de forma que foram identificados morfológicamente como *C. kelberi* e possuem haplótipos da RC de *C. piquiti*.

### 4.3. Diversidade genética nos *loci* microssatélites

O Micro-Checker identificou a presença de alelos nulos apenas no *locus* TUC3. Sendo assim, esse marcador foi excluído das análises. Após a correção de Bonferroni, não houve evidência de desequilíbrio de ligação entre os *loci*, enquanto apenas o *loci* CORID12 demonstrou desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg. O número de alelos variou entre 2 e 8, enquanto a heterozigosidade esperada ( $He$ ) e observada ( $Ho$ ) variaram entre 0,408 e 0,812, e 0,407 e 0,869, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Número de indivíduos genotipados ( $N$ ), número de alelos ( $Na$ ), heterozigosidade esperada ( $He$ ), heterozigosidade observada ( $Ho$ ) e coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) dos *loci* microssatélites de todos os indivíduos.

<i>Locus</i>	$N$	$Na$	$AR$	$He$	$Ho$	$F_{IS}$	$HWE$ (P-value)
TUC4	27	4	3.677	0.470	0.629	-0.348	0.2506
CORIB3	27	7	6.414	0.645	0.555	0.142	0.0180
CICHLSM2	21	3	3.000	0.570	0.571	-0.002	0.5999
CM09	25	6	5.527	0.613	0.640	-0.043	0.5169
CPINC11	27	2	2.000	0.408	0.407	0.003	1.0000
CM01	28	8	6.817	0.602	0.785	-0.311	0.1151
CPIND2	23	7	6.609	0.755	0.869	-0.155	0.4629
CORIB6.2	20	5	6.000	0.812	0.700	0.091	0.0137
CORID12	28	7	6.428	0.764	0.607	0.209	0.0021*
CPINC1	27	5	4.726	0.682	0.592	0.133	0.0383
Média / Total	25.3	5.4	5.119	0.632	0.635	-0,012	0.8517

\*Desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05/10 = 0.005$ )

### 4.4. Identificação de híbridos utilizando microssatélites nucleares

Tanto o Structure Harvester quanto o CLUMPAK indicaram que o número mais provável para  $K$  na análise feita no Structure é dois. A análise no Structure revelou um alto grau de hibridização entre as duas espécies no reservatório de Lajes (Figura 7). Utilizando o valor de  $0,10 \geq q \geq 0,90$  para indivíduos puros, identificamos 9 *C. kelberi*, 1 *C. piquiti* e 18 híbridos. De forma semelhante, a análise do NewHybrids utilizando um *threshold* de 50% também identificou 9 *C. kelberi*, 1 *C. piquiti* e 18 híbridos, porém, os dois métodos discordaram na classificação de 2 indivíduos (peixes 268 e 275). Dos 18 híbridos

identificados pelo NewHybrids, 6 são híbridos F1, 1 híbrido F2, 9 retrocruzamentos de *C. kelberi* (BxK) e 2 peixes onde não foi possível determinar a classe híbrida exata (ND).

Dos 13 peixes identificados morfológicamente como *C. kelberi*, 10 foram classificados pelo NewHybrids como *C. kelberi* e 3 como retrocruzamentos de *C. kelberi*, enquanto todos os 14 peixes identificados morfológicamente como possíveis híbridos também foram identificados pela análise como tal, e o único peixe identificado morfológicamente como *C. piquiti* também foi o único identificado como tal por esse método. Dos 13 peixes identificados morfológicamente como *C. kelberi*, 9 foram classificados pelo Structure como *C. kelberi* e 4 como híbridos, enquanto todos os 14 peixes identificados morfológicamente como híbridos foram identificados pela análise como tal, e o único peixe identificado morfológicamente como *C. piquiti* também foi o único identificado como tal por esse método. Vale notar que um dos peixes identificados como *C. kelberi* puro pelo Structure possui haplótipo do mtDNA referente à *C. piquiti*, indicando que ele seja na verdade um híbrido backcross de *C. kelberi*, como foi identificado pelo NewHybrids.

Devido às diferenças entre os resultados apresentados pelas análises do Structure e NewHybrids, consideramos apenas a classificação de indivíduos que apresentaram o mesmo resultado em ambas, enquanto peixes que apresentaram classes diferentes em cada uma das análises foram considerados não-determinados. A única exceção foi o peixe 275 que foi identificado como *C. kelberi* puro pelo Structure mas que possui haplótipo do mtDNA referente à *C. kelberi*, sugerindo que ele seja na verdade um híbrido, como foi identificado pelo NewHybrids. Dessa forma, considerando as análises genéticas do mtDNA e nuDNA em conjunto, identificamos 8 *C. kelberi* puros, 1 *C. piquiti* puro, 18 híbridos e 1 peixe não-determinado.

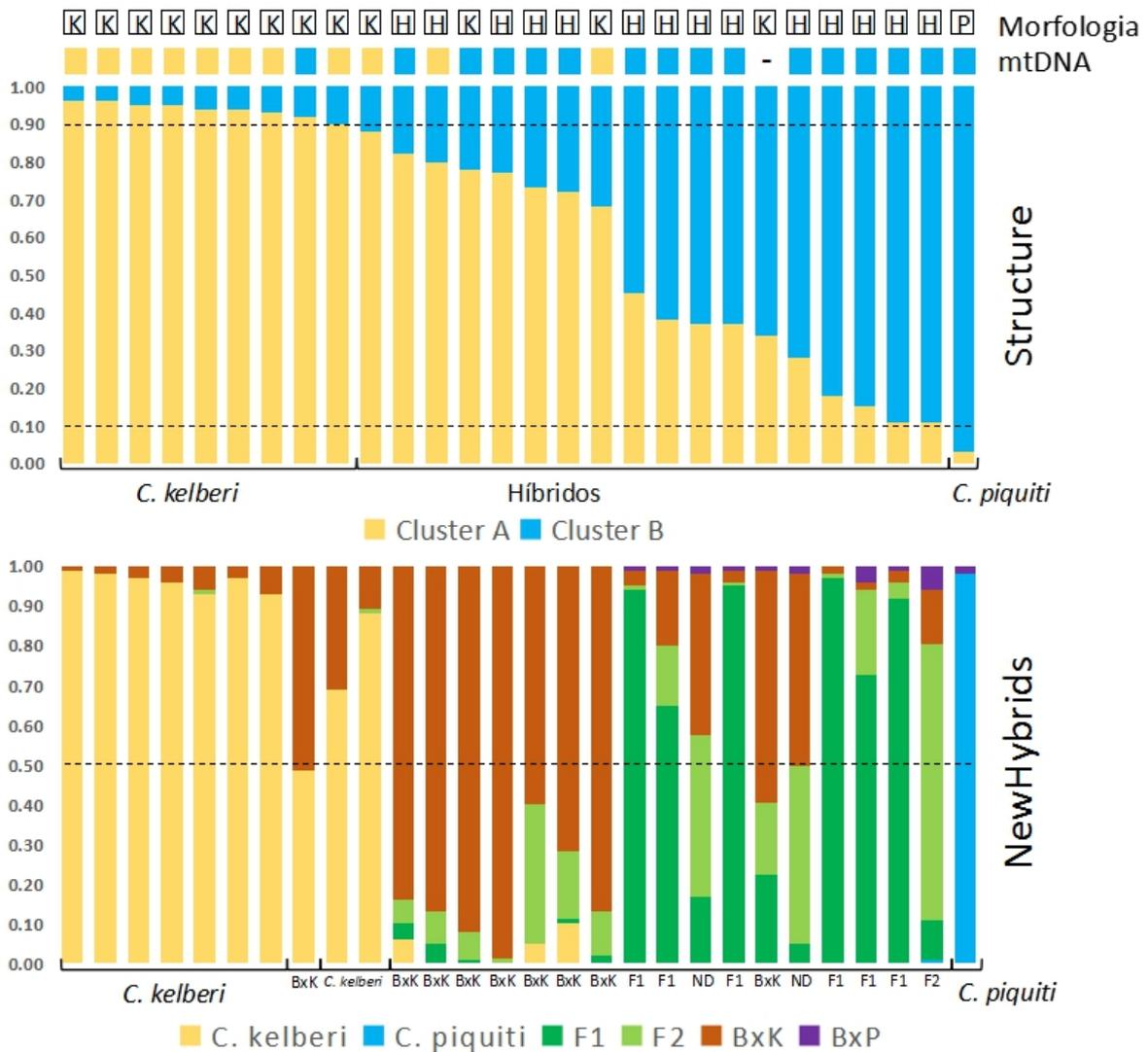


Figura 7: Identificação morfológica, haplótipos da Região Controle do mtDNA e gráficos de barras gerados pelo resultado das análises de 28 indivíduos no Structure e NewHybrids. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical. Nos gráficos do Structure e NewHybrids, linhas pontilhadas representam os *thresholds* utilizados. Para o mtDNA, a cor do retângulo indica que o haplótipo pertence àquela espécie (amarelo para *C. kelberi* e azul para *C. piquiti*). O gráfico do Structure mostra o valor de mistura de cada indivíduo levando em conta os dois grupos genéticos identificados (Cluster A e Cluster B), enquanto o gráfico do NewHybrids indica a probabilidade posterior do indivíduo pertencer à umas das seis classes genotípicas (*C. kelberi* e *C. piquiti* puros, F1, F2, e retrocruzamentos de ambas as espécies). Ordem dos indivíduos segue a ordem na Tabela S1.

#### 4.5. Comparação da diversidade genética nos *loci* microssatélites de peixes puros e híbridos

Tendo como base o resultado da identificação genética, podemos comparar índices de diversidade entre indivíduos puros e híbridos (Tabela 2). Como apenas um *C. piquiti* foi identificado, apenas *C. kelberi* fez parte desta análise. Indivíduos puros da espécie *C. kelberi* apresentaram uma média de 2.8 alelos por *loci*, as heterozigosidades esperada média (*He*) e heterozigosidade observada média (*Ho*) foram de 0.521 e 0.538 respectivamente. Indivíduos híbridos apresentaram uma média de 4.6 alelos por *loci*, as heterozigosidades esperada média (*He*) e heterozigosidade observada média (*Ho*) foram de 0.642 e 0.733 respectivamente.

Tabela 2: Número de indivíduos genotipados (N), número médio de alelos (Na), heterozigosidade esperada (*He*) e heterozigosidade observada (*Ho*), coeficiente de endogamia (*F<sub>IS</sub>*) dos *loci* microssatélites dos indivíduos identificados geneticamente como *C. kelberi* e híbridos.

	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>PA</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>FIS</i>	<i>HWE</i> (P-value)
<i>C. kelberi</i>	8	2.8	6	0.521	0.538	-0.024	0.3524
Híbridos	18	4.6	15	0.642	0.733	-0.122	0.2288

## 5. Discussão

Por meio da genotipagem de marcadores microssatélites do nuDNA e sequenciamento da Região Controle do mtDNA, foi confirmada a hipótese de que as espécies *C. kelberi* e *C. piquiti*, introduzidas no reservatório de Lajes, estão hibridizando, e que seus híbridos são férteis. Hibridização entre espécies de peixes de água doce, mesmo em ambientes naturais, é relativamente comum quando comparado com outros grupos de vertebrados (Scribner et al. 2001). Eventos de hibridização têm ocorrido mais frequentemente devido às atividades humanas como translocação de espécies, fragmentação e modificação de habitats (Allendorf, 2001). Das 16 espécies descritas para o gênero *Cichla*, 13 possuem registros de hibridização natural com pelo menos uma outra espécie do mesmo gênero, seja em ambientes nativos ou introduzidos (Figura S1) (Andrade et al. 2001; Brinn et al. 2004; Teixeira & Oliveira 2005; Oliveira et al. 2006; Almeida-Ferreira et al. 2011; Willis et al. 2012; Carvalho et al. 2014; Diamante et al. 2020). Apesar de outros trabalhos feitos com o

grupo não identificarem classes híbridas específicas, há evidências de que híbridos entre outros pares de espécies de tucunarés também são férteis (Oliveira et al. 2006; Willis et al. 2012; Carvalho et al. 2014), o que pode ser facilitado pelo fato de todas as espécies do gênero *Cichla* possuírem o mesmo número de cromossomos  $2n = 48$  (Arnold, 1997; Brinn et al. 2004; Mourão et al. 2003; Willis et al. 2012; Quadros et al. 2020). Isso sugere que as barreiras reprodutivas no gênero *Cichla* são pré-zigóticas, assim como na maioria dos ciclídeos, principalmente entre espécies simpátricas (Willis et al. 2012; Rometsch et al. 2020).

Geralmente, o isolamento reprodutivo pré-zigótico está relacionado com os isolamentos espacial, temporal e comportamental (Scribner et al. 2001). Willis et al. 2012 et al. notaram que a maioria das espécies simpátricas do gênero *Cichla*, como é o caso de *C. kelberi* e *C. piquiti*, possuem preferências por diferentes habitats e outros particionamentos de recursos, o que pode funcionar como uma barreira reprodutiva. A introdução de duas espécies no mesmo reservatório pode acarretar a quebra do isolamento reprodutivo entre elas, já que pode interferir com os isolamentos espacial, temporal e comportamental. Um exemplo dessa interferência pode ser observado na época reprodutiva dessas espécies. Enquanto em ambientes nativos essas espécies possuem épocas reprodutivas bem definidas, quando estão presentes em reservatórios passam a se reproduzirem praticamente durante o ano todo, podendo haver uma sobreposição do período reprodutivo (Souza et al. 2008; Vieira et al. 2009; Luiz et al. 2011; Guedes et al. 2020).

Porém, no caso de *C. kelberi* e *C. piquiti*, outros fatores também devem influenciar na hibridização, e com que frequência ela ocorrerá. Carvalho et al. (2014), baseado na genotipagem de marcadores microssatélites e no sequenciamento da Região Controle do mtDNA, não encontraram híbridos entre *C. kelberi* e *C. piquiti* em um reservatório do Rio Paraná onde ambas as espécies foram introduzidas (reservatório de Itumbiara). Porém, encontraram uma frequência muito baixa de hibridização em um reservatório da área nativa (reservatório de Tucuruí), de forma que 2 de 38 indivíduos analisados eram híbridos (Carvalho et al. 2014). Mourão et al. (2017), utilizando análises morfológicas e a técnica RFLP aplicada à *loci* do mtDNA e nuDNA, também não encontraram híbridos entre *C. kelberi* e *C. piquiti* em algumas populações introduzidas do Rio Paraná e Rio Tietê.

Que fatores ambientais e demográficos têm um papel importante na dinâmica de hibridização de peixes já é bem estabelecido (Hubbs 1955), mas como esses fatores afetam especificamente a dinâmica de hibridização do gênero *Cichla* ainda não é conhecido. No

caso de Lajes, uma possível explicação para o grande número de indivíduos híbridos encontrados é o fato desse reservatório possuir um grau muito baixo de complexidade de habitats submersos. Estruturas submersas são necessárias para a desova das espécies de tucunarés (Muñoz et al. 2006). Na falta de substrato adequado para deposição dos ovos, algumas espécies de peixes recorrem à desova em grupo, o que está relacionado com um aumento de hibridização (Hubbs 1955; Hata et al. 2019). A nidificação em grupos já foi observada nas espécies *C. orinocensis*, *C. temensis* e *C. aff. monoculus*, estando relacionada à limitação de habitat adequado em alguns casos (Winemiller 2001; Muñoz et al. 2006). Além disso, sabe-se que a introdução de uma espécie com um número reduzido de indivíduos, em uma área onde já existe a presença de outra espécie em grande quantidade, pode levá-las a hibridizar, provavelmente pela maior dificuldade da espécie rara em achar parceiros coespecíficos (Hubbs 1955; Avise & Saunders, 1984).

Espécies do gênero *Cichla* possuem elevada plasticidade fenotípica e variações ontogenéticas nos padrões de coloração (Kovalenko et al. 2010; Reiss et al. 2012; Gasques et al. 2014), o que dificulta a identificação de indivíduos híbridos por meio de caracteres morfológicos apenas. Tucunarés amarelos frequentemente apresentam coloração esverdeada, enquanto tucunarés azuis frequentemente apresentam coloração amarela ou acinzentada (Kullander & Ferreira, 2006). Além disso, híbridos nem sempre apresentam fenótipos intermediários dos indivíduos parentais, e muitas vezes podem ser idênticos à indivíduos puros, principalmente híbridos de classes superiores (Allendorf et al. 2001; Diamante et al. 2020). Esse foi o caso com quatro indivíduos capturados em Lajes, que eram morfológicamente idênticos a *C. kelberi*, mas foram identificados pelas análises genéticas como híbridos. No entanto, todos os indivíduos identificados morfológicamente como híbridos foram confirmados pela análise genética como tal. A utilização de dados genéticos nos permitiu identificar algumas características observadas apenas em indivíduos híbridos.

Todos os indivíduos analisados que apresentam características descritas por Kullander & Ferreira (2006) como exclusivas entre *C. kelberi* e *C. piquiti* ao mesmo tempo, como por exemplo manchas pós-orbitais e 3 barras laterais, foram identificados geneticamente como híbridos. A barra lateral 4, que é reportada por Kullander & Ferreira (2006) como extremamente rara em *C. kelberi*, não foi observada em indivíduos puros dessa espécie, porém, apareceu em 7 dos 14 peixes identificados como híbridos pelas análises genéticas. A maioria dos peixes identificados como *C. kelberi* puros não apresentaram manchas

abdominais ou pintas claras nas nadadeiras anal e pélvica, apresentando um padrão de coloração semelhante ao descrito para a espécie *C. monoculus*, cuja principal diferença de *C. kelberi* é justamente a ausência de pintas claras nas nadadeiras anal e pélvica (Kullander & Ferreira 2006).

Apesar de *C. monoculus* ter sido introduzido na bacia do Rio Paraíba do Sul, sendo identificada nos reservatórios de Paraibuna e Ilha dos Pombos (Santos et al. 2016b), os resultados de nossas análises não indicam a presença dessa espécie no reservatório de Lajes. *Cichla kelberi* e *C. monoculus* possuem haplótipos da Região Controle distintos. Os haplótipos encontrados em Lajes referentes à *C. kelberi* se agruparam na análise filogenética de Máxima Verossimilhança com um haplótipo (número de acesso GenBank JQ926872.1) encontrado por Willis et al. (2012) na área nativa dessa espécie, onde não há ocorrência de *C. monoculus*, o que confirma a identificação taxonômica dos indivíduos analisados. Além disso, apenas dois grupos genéticos foram identificados pela análise do Structure. Dessa forma, a falta de pintas claras nas nadadeiras anal e pélvica na maioria dos indivíduos é uma característica da população de Lajes. Esse resultado vai de acordo com as observações de Winemiller et al. (2021), que a presença de pintas claras nas nadadeiras anal e pélvica não é uma característica sempre expressa em *C. kelberi*. Isso ressalta as dificuldades na identificação morfológica das espécies do grupo chamado de tucunarés amarelos, composto pelas espécies *C. kelberi*, *C. monoculus*, *C. ocellaris*, *C. pleiozona* e *C. nigromaculata*. Além disso, as semelhanças entre essas espécies não são restritas apenas às características morfológicas, de forma que, Willis et al. (2012), utilizando dados genéticos (marcadores do mtDNA e microssatélites) e tendo como base um conceito politípico de espécies, considerou as cinco espécies desse grupo como apenas uma, *C. ocellaris* sensu lato.

Segundo o método empregado pelo programa NewHybrids, foram identificados híbridos F1, F2 e retrocruzamentos de *C. kelberi*. Dos 18 híbridos identificados, 16 possuem haplótipos do mtDNA referente à *C. piquiti*, indicando que há uma forte tendência ao cruzamento de machos de *C. kelberi* com fêmeas de *C. piquiti*. Curiosamente, no trabalho de Oliveira et al. (2006), onde *loci* RAPD nucleares e a Região Controle do mtDNA foram analisados, híbridos de *C. kelberi* com *C. piquiti* do alto Rio Paraná apresentaram, em sua maioria, haplótipos da Região Controle pertencentes à *C. kelberi* (9 de 11 híbridos analisados), sugerindo que a direção da hibridização entre essas espécies

estaria mais relacionada à fatores ambientais ou demográficos do que à possíveis incompatibilidades unilaterais.

A falta de indivíduos provenientes do retrocruzamentos de *C. piquiti* pode ser explicada, por exemplo, pela menor quantidade de indivíduos dessa espécie no reservatório de Lajes. A introdução de *C. kelberi* neste reservatório aconteceu na década de 50 (Santos et al. 2016), sendo assim, a população já estava bem estabelecida quando *C. piquiti* foi introduzido em 2010 (Santos et al. 2016). Pelo mecanismo de *genetic swamping*, sendo a espécie mais rara, é de se esperar que genótipos puros de *C. piquiti* sejam extirpados primeiro, dificultando o encontro de retrocruzamentos dessa espécie (Ellstrand & Rieseberg 2016; Todesco et al. 2016). O efeito do *genetic swamping* pode ainda ser intensificado pela assimetria observada na hibridização entre as duas espécies no reservatório de Lajes, já que segundo a revisão de Todesco et al. (2016), quando a espécie mais rara tende a ser a fêmea, o risco de extinção dela é muito maior. Esse mesmo padrão foi observado em populações intercruzantes entre *C. kelberi* x *C. piquiti* e *C. kelberi* x *C. monoculus* na bacia do Rio Paraná, onde genótipos puros das espécies que tendem a ser fêmeas foram encontrados em menor quantidade, corroborando com os achados de Todesco et al. (2016). A diminuição de genótipos puros da espécie que tende a ser a fêmea pode ser explicado pelo maior investimento energético das fêmeas dedicado à reprodução (Todesco et al. 2016).

A diversidade genética da Região Controle do mtDNA foi baixa, de forma que encontramos apenas um haplótipo de *C. piquiti* e dois haplótipos de *C. kelberi*. Essa baixa diversidade genética do mtDNA já foi observada em outros trabalhos com populações de tucunarés no rio Paraíba do Sul (Marques et al. 2016; Santos et al. 2016). No geral, populações invasoras apresentam baixos níveis de diversidade genética devido ao efeito fundador, o que é comumente observado em outras populações invasoras de tucunarés e outras espécies de peixes (Oliveira et al. 2006; Vidal et al. 2010; Panarari-Antunes et al. 2012; Briñez et al. 2013; Carvalho et al. 2014; Mourão et al. 2017). Porém, ao analisarmos a diversidade genética dos *loci* microssatélites de todos os indivíduos de Lajes em conjunto, encontramos níveis relativamente altos de diversidade quando comparamos com outras populações nativas e invasoras do gênero *Cichla*.

Os níveis de heterozigosidade encontrados nos *loci* microssatélites dos indivíduos do reservatório de Lajes foram muito superiores aos encontrados por Carvalho et al. (2014) em populações invasoras de *C. kelberi* e *C. piquiti*, e um pouco superiores à única

população nativa analisada pelos autores. Ao compararmos com o trabalho de Willis et al. (2015), podemos observar valores de heterozigosidade menores na grande maioria das populações nativas de *C. temensis* analisadas pelos autores. Em Lajes, até mesmo os níveis de diversidade genética encontrados nos indivíduos identificados como puros (Tabela 2) foram altos quando comparados com outras populações invasoras de tucunarés. Isso poderia ser uma evidência para a hipótese de que esses indivíduos possuem uma herança híbrida com *C. monoculus*, levantada pelo padrão de coloração da maioria desses indivíduos. Hibridização é comumente utilizada em resgates genéticos de populações com altos níveis de endocruzamento devido a sua capacidade de aumentar a diversidade genética de populações ameaçadas (Stelkens et al. 2014). O efeito da hibridização no aumento da diversidade genética pode ser responsável pela maior diversidade encontrada nos *loci* nucleares.

O efeito da hibridização na diversidade genética fica mais evidente ao analisarmos indivíduos identificados geneticamente como híbridos separadamente, onde encontramos maiores níveis de heterozigosidade (Tabela 2). De forma similar, Oliveira et al. (2006) e Almeida-Ferreira et al. (2011) encontraram altos níveis de diversidade genética em populações invasoras na bacia do Rio Paraná onde *C. kelberi* e *C. piquiti* estão hibridizando, assim como Diamante et al. (2020) em populações invasoras intercruzantes de *C. kelberi* e *C. monoculus*. Como essas populações de tucunarés são invasoras, o aumento da diversidade genética pode significar um aumento na adaptabilidade dos indivíduos a esses ambientes, além de facilitar a colonização de novas áreas caso esses indivíduos sejam translocados para outras regiões (Crawford & Whitney, 2010).

## 6. Conclusão

O presente estudo confirmou a hipótese que as espécies de tucunarés *C. kelberi* e *C. piquiti*, introduzidas no reservatório de Lajes, bacia do rio Paraíba do Sul, estão hibridizando entre si. Híbridos são férteis, corroborado pela presença de híbridos de diversas classes. Embora alguns híbridos sejam fenotipicamente idênticos a uma das espécies parentais, destacando a importância da utilização de ferramentas moleculares, a maioria pode ser distinguida por exibir padrões intermediários. Alguns padrões foram observados apenas em indivíduos híbridos, como a presença de características de ambas as espécies ao mesmo tempo (ex. três barras laterais e manchas pós-orbitais), quatro barras

laterais, e presença da barra lateral 4.. A dificuldade em encontrar indivíduos puros, principalmente de *C. piquiti*, pode ser devido ao processo de *genetic swamping*, o qual pode levar a extirpação (extinção local) de genótipos puros de uma ou ambas as espécies envolvidas (Ellstrand & Rieseberg, 2016; Todesco et al. 2016). A diversidade genética encontrada nos *loci* microssatélites ao analisar todos os indivíduos em conjunto foi relativamente alta quando comparada com outras populações invasoras de tucunarés, que no geral apresentam baixos níveis de diversidade genética, e foi equivalente e em alguns casos superior à diversidade encontrada em populações nativas. Quando analisados separadamente, indivíduos híbridos apresentaram níveis de diversidade genética ainda maiores, o que também é observado em outras populações invasoras intercruzantes de espécies do gênero *Cichla*, indicando ser efeito da hibridização. O aumento da diversidade genética dessas populações invasoras pode aumentar os impactos causados nas comunidades nativas, assim como aumentar a capacidade em invadir outros ambientes, caso haja translocação de indivíduos para outros reservatórios e bacias. Esses resultados ressaltam a importância da utilização de ferramentas moleculares, como complemento à identificação morfológica de espécies invasoras, de forma a permitir e entender a dinâmica das invasões, bem como a identificação precoce de novas introduções e potenciais híbridos.

## 8. Referências

- Agostinho A. A., Gomes L. C., Pelicice F. M. (2007). Ecologia e Manejo dos Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brazil. Maringá: EDUEM, 2007.
- Allendorf F. W., Leary R. F., Spruell P., Wenburg J. K. (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.*, v. 16, pp. 613–622.
- Almeida-Ferreira G., Oliveira A. V., Prioli A. J., Prioli S. M. (2011). Spar genetic analysis of two invasive species of *Cichla* (Tucunaré) (Perciformes: Cichlidae) in the Paraná river basin. *Acta Scientiarum Biological Sciences*. [s.l.], v. 33, n. 1, pp. 79–85.
- Anderson E.C, Thompson E.A. (2002). A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, v. 160, pp. 1217–1229.
- Andrade F., Schneider H., Farias I. P., Feldberg E., Sampaio I. (2001). Análise filogenética de duas espécies simpátricas de tucunaré (*Cichla*, Perciformes), com registro de

hibridização em diferentes pontos da bacia amazônica. *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA*, v. 1, n. 1.

Arnold M. L. (1997). *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford Series in Ecology and Evolution.

Avise J. C., Saunders N. C. (1984). Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. *Genetics*, 108, 237-255.

Birchler J. A., Yao H., Chudalayandi S. (2006). Unraveling the genetic basis of hybrid vigor. *PNAS*, v. 103, n. 35, pp. 12957–12958.

Briñez B., Júlio H. F. Jr., 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*, v. 141, n. 3, pp. 252-257.

Brito C., Vilaça S. T, Lacerda A. L., Maggioni R., Marcovaldi M .A, Vélez-Rubio G., Proietti M. C. (2020). Combined use of mitochondrial and nuclear genetic markers further reveal immature marine turtle hybrids along the South Western Atlantic. *Genetics and Molecular Biology*, v. 43 n. 2.

Carlsson J. (2008). Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. *Journal of Heredity*, v. 99, n. 6, pp. 616–623.

Carvalho D. C., Oliveira D. A. A., Sampaio I., Beheregaray L. B. (2009). Microsatellite markers for the Amazon peacock bass (*Cichla piquiti*). *Molecular Ecology Resources*, v. 9, p. 239–241.

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*, v. 12, n. 1, pp. 105-116.

Clavero M., García-Berthou E. (2005). Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 20, n. 3, pp. 110.

- Crawford K. M., Whitney K. D. (2010). Population genetic diversity influences colonization success. *Molecular Ecology*, v. 19, pp. 1253–1263.
- Diamante N. A., Oliveira A. V., Petry A. C., Catelani P. A., Pelicice F. M., Mueller L. P., Prioli S. M., Prioli A. J. (2020). Genomic markers confirm introgressive hybridization in *Cichla* (Teleostei) in an invaded coastal system. *International Review of Hydrobiology*, v. 1, pp. 1-10.
- Earl D. A., VonHoldt B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, v. 4, pp. 359–361.
- Ellstrand N. C., Rieseberg L. H. (2016). When gene flow really matters: gene flow in applied evolutionary biology. *Evolutionary Applications*, v. 9, n. 7, pp. 833-836.
- Excoffier L., Lischer H.E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, pp. 564-567.
- Fitzpatrick B. M, Fordyce J. A., Niemiller M. L., Reynolds R. G. (2012). What can DNA tell us about biological invasions? *Biological invasions*, v. 14, n. 2, pp. 245-253.
- Gasques L. S., Fabrin T. M. C., Prioli S. M. A. P., Prioli A. J. (2014). A introdução do gênero *Cichla* [Block & Schneider, 1801] na planície de inundação do alto Rio Paraná. *Arq. Ciênc. Vet. Zool*, v. 17, n. 4, pp. 261-266.
- Gharrett A. J., Smoker W. W., Reisenbichler R.R., Taylor S.G. (1999). Outbreeding depression in hybrids between odd- and even-year pink salmon. *Aquaculture*, v. 173, n. 1, pp. 117-129.
- Goudet J. (2003). FSTAT (version 2.9. 4), a program (for Windows 95 and above) to estimate and test population genetics parameters. Department of Ecology and Evolution, Lausanne University, Switzerland.
- Gozlan R. E., Britton J. R., Cowx I., Copp G. H. (2010). Current knowledge on non-native freshwater introductions. *Journal of Fish Biology*, v. 76, n. 4, pp. 751-786.

- Guedes G. H. S., Gomes I. D., Nascimento A. A., Aguiar F. S., Araújo F. G (2020). Equilibrium reproductive strategy of the peacock bass *Cichla kelberi* facilitates invasion into a Neotropical reservoir. *Journal of Fish Biology*, v. 98, n. 3, pp. 743-755;
- Hasselman D. J., Argo E. E., McBride M. C., Bentzen P., Schultz T. F., Perez-Umphrey A. A., Palkovacs E. P. (2014). Human disturbance causes the formation of a hybrid swarm between two naturally sympatric fish species. *Molecular Ecology*, v. 23, n. 5, pp. 1137–1152.
- Haynes G. D., Gongora J., Gilligan D. M., Grewe P., Moran C. Nicholas F. W. (2011). Cryptic hybridization and introgression between invasive Cyprinid species *Cyprinus carpio* and *Carassius auratus* in Australia: implications for invasive species management. *Animal Conservation*, v. 15, n. 1, pp. 83-94.
- Honji R. M., Tolussi C. E., Caneppele D., Polaz C. N. M. H., Hilsdorf A. W. S., Moreira R. G. (2017). Biodiversidade e conservação da ictiofauna ameaçada de extinção da bacia do rio Paraíba do Sul. *Revista da Biologia*, v. 17, n. 2, pp. 18-30.
- Hovick S. M., Whitney K. D. (2014). Hybridisation is associated with increased fecundity and size in invasive taxa: meta-analytic support for the hybridisation-invasion hypothesis. *Ecology Letters*, v. 17, n. 11, pp. 1464-1477.
- HUBBS C. L., HUBBS L. C. (1932). Experimental verification of natural hybridization between distinct genera of sunfishes. *Pap. Mich. Acad. Sci., Arts, Letters*, v. 15, pp. 427-437.
- Hubbs C.L. (1955). Hybridization between fish species in nature. *Systematic Zoology*, v. 4, pp. 1–20.
- Hulme P. E. (2009). Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology*, v. 46, pp. 110-118.
- Kalia R. K., Rai M. K., Kalia S., Singh R., Dhawan A. K. (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* v. 177, pp. 309-334.
- Kopelman N. M., Mayzel J., Jakobsson M., Rosenberg N. A., Mayrose I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, v. 15 n. 5, pp. 1179-1191.

- Kovalenko K. E., Dibble E.D., Agostinho A.A., Pelicice F.M. (2010). Recognition of non-native peacock bass, *Cichla kelberi* by native prey: testing the naiveté hypothesis. *Biol Invasions*, v. 12, pp. 3071–3080.
- Kullander S. O., Ferreira E. J. G. (2006). A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, v. 17, n. 4, pp. 289–398.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 7, pp. 1870–1874.
- Lee W. J., Conroy J., Howell W. H., Kocher T. D. (1995). Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution*, v. 41, n. 1, pp. 54–66.
- Lee, C. E. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *TRENDS in Ecology and Evolution*, v. 17, n. 8, pp. 386-391.
- Lima M. P., Campos T., Sousa A. C. B., Souza A. P., Almeida-Val V. M. F. (2010). Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cichla monoculus* (Agassiz, 1831), an important freshwater fish in the Amazon. *Conservation Genetic Resources*, v. 2, p. 215-218.
- Luiz T. F., Velludo M. R., Peret A. C., Filho R. J. L., Peret A.M. (2011). Diet, reproduction and population structure of the introduced Amazonian fish *Cichla piquiti* (Perciformes: Cichlidae) in the Cachoeira Dourada reservoir (Paranaíba River, central Brazil). *Revista de Biologia Tropical*, v. 59, n. 2, pp. 727-741.
- Macrander, J. (2012). Polymorphic microsatellite loci for the Amazonian Peacock Basses, *Cichla orinocensis* and *C. temensis*, and cross-species amplification in other *Cichla* species. *Molecular Ecology Resources*. In press.
- 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*. *Journal of Fish Biology*, v. 89, n. 6, pp. 2595-2606.
- Mooney H. A., Cleland E. E. (2001). The evolutionary impact of invasive species. *PNAS*, v. 98, n. 10.

- Mourão A. A. F. Caracterização citogenética e molecular das espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti* e seu possível híbrido interespecífico coletados em ambientes naturais. 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, Série Zoologia*, v.107.
- Moraes M. B., Polaz C. N. M., Caramaschi É. P., Júnior S. S., Souza G. N., Carvalho F. L. (2017). Espécies exóticas e alóctones da bacia do rio Paraíba do Sul: implicações para conservação. *Biodiversidade Brasileira*, v. 7, n. 1, pp. 34-54.
- Moyle P. B., Marchetti P. M. (2006). Predicting invasion success: Freshwater fishes in California as a model. *BioScience*, v. 56, n. 6, pp. 515-524.
- Muñoz H., Van Damme P.A., Duponchelle, F. (2006). Breeding behaviour and distribution of the tucunaré *Cichla* aff. *monoculus* in a clear water river of the Bolivian Amazon. *Journal of Fish Biology*, vol. 69, no. 4, p. 1018-1030.
- Oliveira A. V., Prioli A. J., Prioli S. M. A. P., Bignotto T. S., Julio 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*, v. 69, pp. 260–277.
- Oosterhout C. V., Hutchinson W. F., Wills D. P. M., Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, n. 3, pp. 535-538.
- Palumbi S. R. Nucleic acid II: the polymerase chain reaction (1996). In *Molecular Systematics* (Hillis, D. M., Moritz, G. and Mable, B. K., eds), pp. 205–247.
- Panarari-Antunes R. S., Prioli A. J., Prioli S. M. A. P., Gomes V. N., Júlio H. F. Jr., Agostinho C. S., Silva Filho J. P., Boni T. A., Prioli L. M. (2012). Genetic divergence among invasive and native populations of *Plagioscion squamosissimus* (Perciformes, Sciaenidae) in neotropical regions. *Journal of Fish Biology* 80, 2434–2447.

- Pelicice F. M., 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*, v. 746, pp. 271-283.
- Perry W. Lodge D. M., Feder J. L. (2002). Importance of hybridization between indigenous and nonindigenous freshwater species: An overlooked threat to North American biodiversity. *Systematic Biology*, v. 51, n. 2, pp. 255-275.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, v. 155, n. 2, pp. 945-959.
- Quadros J., Ferreira A. M. V., Viana P. F., Marajó L., Oliveira E., Ferreira E., Feldberg E. Comparative cytogenetic of six species of Amazonian Peacock bass (*Cichla*, Cichlinae): intrachromosomal variations and genetic introgression among sympatric species. *Comparative Cytogenetics*, v. 14, n. 3, pp. 437-451.
- Rahman, M. A., Bhadra A., Begum N., Islam M.S., Hussain M. G. (1995). Production of hybrid vigor through cross breeding between *Clarias batrachus* Lin. and *Clarias gariepinus* Bur. *Aquaculture*, v. 138, n. 1-4, pp. 125-130.
- Reiss P., Able K. W., Nunes M. S., Hrbek T. (2012). Color pattern variation in *Cichla temensis* (Perciformes: Cichlidae): resolution based on morphological, molecular, and reproductive data. *Neotropical Ichthyology*, v.10, n.1, pp.59-70.
- Ricciardi A., Macisaac H. J. (2010). Impacts of Biological Invasions on Freshwater Ecosystems. *Fifty Years of Invasion Ecology*, pp. 211-224.
- Ricciardi A., Macisaac H. J. (2000). Recent mass invasion of the North American Great Lakes by Ponto-Caspian species. *Trends in Ecology and Evolution*, v.15, n. 2, pp. 62-65.
- Rometsch S. J., Torres-Dowdall J., Meyer A. (2020). Evolutionary dynamics of pre and postzygotic reproductive isolation in cichlid fishes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 375, n. 1806: 20190535.
- Santos L. N., Gonzalez A. F., Araújo F. G. (2001). Dieta do tucunaré-amarelo *Cichla monoculus* (Bloch and Schneider) (Osteichthyes, Cichlidae), no Reservatório de Lajes, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 18, n. 1, pp. 191-204.

- Santos A., Santos L. N., Araújo F. G. (2011). Digestive tract morphology of the neotropical piscivorous fish *Cichla kelberi* (Perciformes: Cichlidae) introduced into an oligotrophic Brazilian reservoir. *Revista de Biologia Tropical*, v. 59, n. 3, pp. 1245-1255.
- Santos L. N., Salgueiro F., Franco A. C. S., Marques A. C. P. B., Nóbrega, F. (2016a). First record of the invasive blue peacock cichlid *Cichla piquiti* Kullander and Ferreira 2006 (Cichliformes: Cichlidae) in the Paraíba do Sul river basin, south eastern Brazil. *BioInvasions Records*, v. 5, n. 4, p. 267–275.
- Santos L. N., Salgueiro F., Franco A. C. S., Marques A. C. P. B., Nóbrega, F. (2016b). 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*, v. 5, n. 4, p. 277–284.
- Schuelke M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, v. 18, n. 2, pp. 233-234.
- Schwartz T. S., Beheregaray L. B. (2008). Using genotype simulations and Bayesian analyses to identify individuals of hybrid origin in Australian bass: lessons for fisheries management. *Journal of Fish Biology*, v. 72, n. 2, pp. 435-450.
- Scribner K. T. Page K. S., Bartron M. L. (2000). Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 10, n. 3, pp. 293–323.
- Selz O. M., Seehausen O. (2019). Interspecific hybridization can generate functional novelty in cichlid fish. *Proc. R. Soc. B*. v. 286, n. 1913: 20191621.
- Souza J. E., Fragoso-Moura E. N., Fenerich-Verani N., Rocha O., Verani J. R. (2008). Population structure and reproductive biology of *Cichla kelberi* (Perciformes, Cichlidae) in Lobo Reservoir, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 6, n. 2, pp. 201-210.
- Souza, S. G., Symes C., Smit-Robinson H. A., Mollett J. (2019). Minimal evidence of interspecific hybridisation between the Yellow-billed Duck and introduced Mallard in central and northwestern South Africa. *Journal of African Ornithology*, v. 90, n. 4, pp. 285-301.

- Stelkens R. B., Brockhurst M. A., Hurst G. D. D., Greig D. (2014). Hybridization facilitates evolutionary rescue. *Evolutionary Applications*, v. 7, n. 10, pp. 1209-1217.
- Stelkens R. B., Schmid C., Seehausen O (2015). Hybrid breakdown in cichlid fish. *PLOS ONE*, v. 10, n. 5: e0127207
- 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*, v. 4 n. 1, pp. 74-83.
- Todesco. M., Pascual M. A., Owens G. L., Ostevik K. L., Moyers B. T., Hübner S., Heredia S. M., Hahn M. A., Caseys C., Bock D. G., Rieseberg L. H. (2016). Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications*, v. 9, n. 7, pp. 892-908.
- Vähä J., Primmer C. R. (2006). Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*, v. 15, n. 1, pp. 63-72.
- Vidal O., García-Berthou E., Tedesco P. A., García-Martín J. L. (2010). Origin and genetic diversity of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) introduced to Europe. *Biological Invasions* 12, 841–851.
- 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. *Neotrop. ichthyol.*, v. 7, n. 4, pp. 745-750.
- Wells Z. R. R., Bernos T. A., Yates M. C., Fraser D. J. (2019). Genetic rescue insights from population- and family-level hybridization effects in brook trout. *Conservation Genetics*, v. 20, pp. 851-863.
- Willis S. C., Nunes M. S., Montana C. G., Farias I. P., Lovejoy N. R. (2007). Systematics, biogeography, and evolution of the neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 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*, v. 12, n. 96.

- Willis S.C., Winemiller K.O., Montaña C.G., Macrander J., Reiss P., Farias I.P. and Ortí G. (2015). Population genetics of the speckled peacock bass (*Cichla temensis*), South America's most important inland sport fishery. *Conservation Genetics*, v. 16, n. 6, pp. 1345-1357.
- Winemiller K. O., Taphorn D. C., Barbarino-Duque A. (1997). Ecology of *Cichla* (Cichlidae) in two blackwater rivers of southern Venezuela. *Copeia*, Copeia v. 1997, N. 4, pp. 690-696,
- Winemiller K. O. (2001). Ecology of peacock cichlids (*Cichla* spp.) in Venezuela. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences*, v. 9, pp. 93–112.
- Winemiller K. O., Winemiller L. C. K., Montaña C. G. (2021). Peacock Bass: Diversity, Ecology and Conservation. 1ª Edição. Academic Press, 15 de maio de 2021.
- Wohlfarth G. W. (1993). Heterosis for growth rate in common carp. *Aquaculture*, v. 113, n. 1-2, pp. 31-46.
- Wyk A. M. V., Dalton D. L. Hoban S., Bruford M. W., Russo I. M., Birss C., Grobler P., Vuuren B. J., Kotzé A. (2017). Quantitative evaluation of hybridization and the impact on biodiversity conservation. *Ecology and Evolution*, v. 7. n. 1, pp. 320-330.
- Zalapa J. E. Brunet J., Guries R. P. (2010). The extent of hybridization and its impact on the genetic diversity and population structure of an invasive tree, *Ulmus pumila* (Ulmaceae). *Evol Appl*, v. 3, n. 2, pp. 157–168.
- Zaret M. T., Paine R. T. (1973). Species introduction in a tropical lake. *Science*, v. 182, n. 4111, pp. 449-455.

Tabela S1. Código dos indivíduos analisados, valor de mistura de cada indivíduo levando em conta os dois grupos genéticos identificados no Structure (Cluster A e Cluster B), e probabilidades posteriores de cada indivíduo pertencer à cada uma das seis classes genotípicas (*C. kelberi* e *C. piquiti* puros, F1, F2, e retrocruzamentos de ambas as espécies) no NewHybrids. Valores acima do *threshold* utilizado para cada análise estão em negrito.

Código	Structure ( <i>q-value</i> )		NewHybrids					
	Cluster A	Cluster B	<i>C. kelberi</i>	<i>C. piquiti</i>	F1	F2	BxK	BxP
294	<b>0.963</b>	0.037	<b>0.984</b>	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000
110	<b>0.959</b>	0.041	<b>0.980</b>	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000
276	<b>0.952</b>	0.048	<b>0.956</b>	0.000	0.000	0.000	0.043	0.000
58	<b>0.951</b>	0.049	<b>0.969</b>	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000
57	<b>0.942</b>	0.058	<b>0.936</b>	0.000	0.000	0.001	0.061	0.000
78	<b>0.938</b>	0.062	<b>0.970</b>	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000
273	<b>0.929</b>	0.071	<b>0.929</b>	0.000	0.000	0.001	0.069	0.000
275	<b>0.919</b>	0.081	0.482	0.000	0.000	0.006	<b>0.510</b>	0.009
270	<b>0.901</b>	0.099	<b>0.681</b>	0.000	0.000	0.004	0.313	0.000
268	0.885	0.115	<b>0.890</b>	0.000	0.000	0.005	0.000	0.103
288	0.820	0.180	0.062	0.000	0.430	0.065	<b>0.829</b>	0.000
292	0.794	0.206	0.006	0.000	0.054	0.080	<b>0.857</b>	0.006
71	0.774	0.226	0.001	0.000	0.013	0.069	<b>0.914</b>	0.000
120	0.767	0.233	0.001	0.000	0.005	0.095	<b>0.898</b>	0.000
287	0.728	0.272	0.048	0.000	0.000	0.359	<b>0.590</b>	0.000
293	0.719	0.281	0.104	0.000	0.013	0.166	<b>0.714</b>	0.000
274	0.683	0.317	0.001	0.000	0.021	0.112	<b>0.864</b>	0.000
61	0.449	0.551	0.000	0.000	<b>0.940</b>	0.013	0.044	0.001
117	0.383	0.617	0.000	0.000	<b>0.655</b>	0.151	0.186	0.006
286	0.371	0.629	0.000	0.000	0.173	0.411	0.408	0.006
75	0.369	0.631	0.000	0.000	<b>0.956</b>	0.011	0.031	0.000
269	0.338	0.662	0.008	0.001	0.218	0.183	<b>0.582</b>	0.004
105	0.279	0.868	0.004	0.000	0.057	0.444	0.484	0.009
289	0.150	0.850	0.000	0.000	<b>0.725</b>	0.210	0.026	0.037
76	0.109	0.891	0.000	0.000	<b>0.957</b>	0.016	0.024	0.001
290	0.103	0.897	0.000	0.007	0.093	<b>0.694</b>	0.144	0.059
77	0.101	0.899	0.000	0.000	<b>0.917</b>	0.045	0.026	0.045
305	0.029	<b>0.971</b>	0.000	<b>0.980</b>	0.000	0.001	0.000	0.175

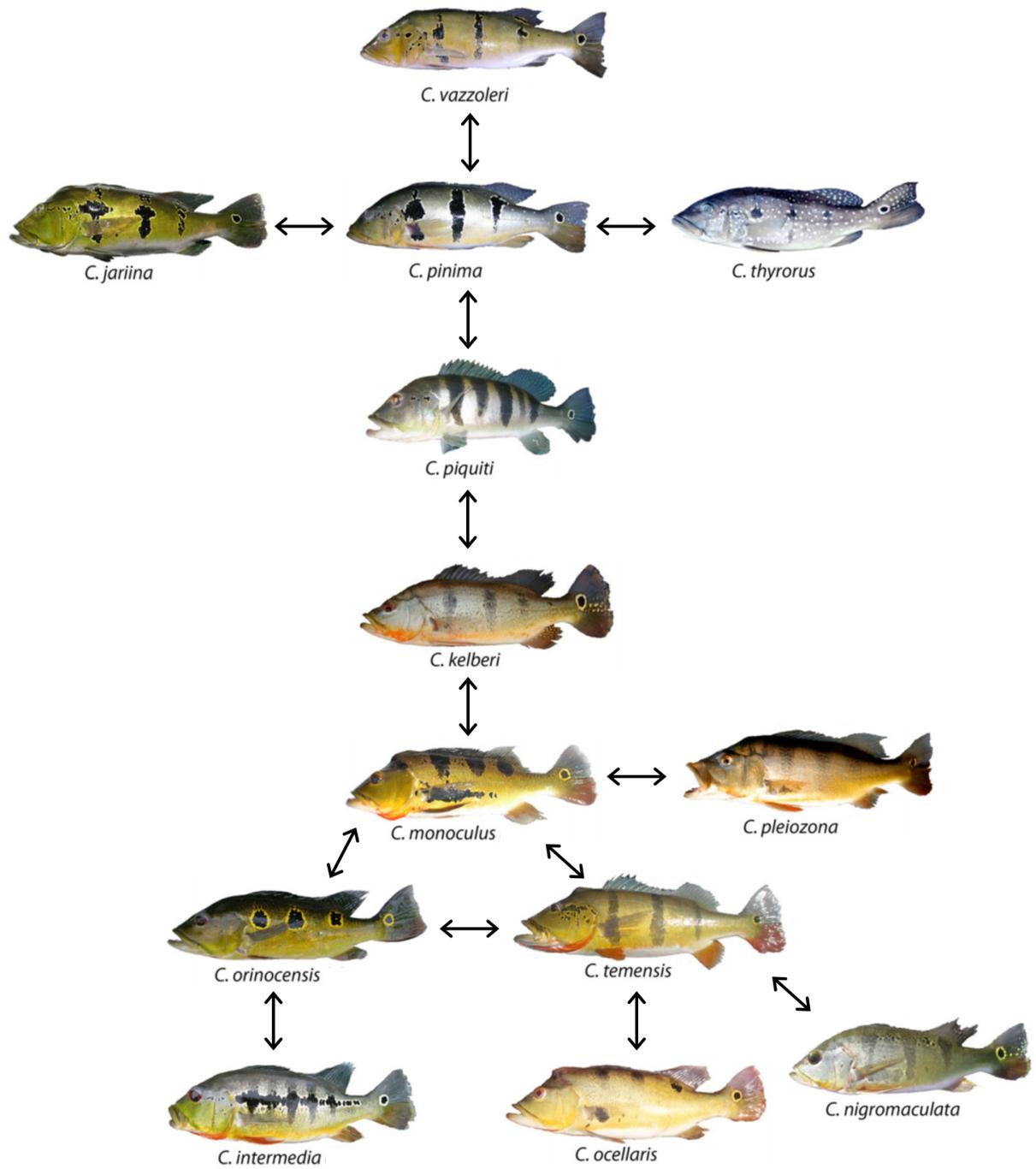


Figura S1. Intercruzamentos naturais registrados dentro do gênero *Cichla*. Fotos dos peixes retiradas de Willis et al. 2012.



Figura S2. Peixes analisados. Números acima dos peixes representam seus códigos de identificação.



Figura S2. (Continuação)