

**Título do projeto:** Caracterização genética e morfológica das espécies invasoras *Cichla kelberi* (Kullander & Ferreira, 2006), *Cichla piquiti* (Kullander & Ferreira, 2006) e seus possíveis híbridos na bacia do rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro, Brasil.

**Tipo de bolsa solicitada:** Mestrado

**Instituição de Ensino/Programa:** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical)

#### **Dados do aluno**

Nome: Felipe de Souza Cruz Nóbrega

Titulação: Bacharel em Ciências Ambientais pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO)

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/3064848706357610>

Endereço profissional: Avenida Pasteur, 458, Sala 512, Urca - Rio de Janeiro / RJ

#### **Dados do orientador do projeto**

Nome: Fabiano Salgueiro

Titulação: Doutor em Ciências Biológicas (Genética) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro

Cargo/tipo de vínculo com a IES: Professor Associado III / Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Currículo lattes: <http://lattes.cnpq.br/1666081420564041>

Endereço profissional: Avenida Pasteur, 458, Sala 512, Urca - Rio de Janeiro / RJ

## 1. Introdução

Espécies têm sido transportadas pelo homem para além de suas áreas nativas há milênios (Hulme, 2009), porém nas recentes décadas, com o processo de globalização e as facilidades dos meios de transportes, esse processo de introdução de espécies não-nativas tem se intensificado, ao ponto de que hoje, espécies invasoras são 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 tem se 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 introdução de espécies, e são uns dos mais invadidos em todo o mundo (Ricciardi & MacIsaac, 2000; Perry et al., 2002; Moyle, 2006). Um fator que aumenta a invasibilidade desses sistemas são as intervenções humanas, as quais modificam as condições naturais dos ecossistemas, como no caso de represas. Esses ecossistemas lênticos modificados alteram drasticamente e homogeneízam os habitats aquáticos, tornando-os mais adequados à colonização por espécies generalistas e pré-adaptadas a ambientes lênticos, do que aos próprios peixes nativos, especialmente os migradores. Represamentos são, então, reconhecidos como facilitadores de invasões biológicas e dispersores dessa fauna aquática introduzida ao longo das bacias hidrográficas onde estão inseridos (Ricciardi & MacIsaac, 2010). Nesse sentido, estudos que visem o levantamento e monitoramento da composição da ictiofauna desses ambientes com o objetivo não apenas de caracterizar essas comunidades, mas também o de detectar precocemente a presença de espécies invasoras e seus potenciais impactos são de extrema importância para o desenvolvimento e eficácia de medidas de controle, manejo e prevenção adequados a esses ecossistemas (Schwartz et al., 2007; European Environment Agency, 2010).

No caso do Brasil, um levantamento inédito das espécies invasoras em ambientes lênticos aquáticos foi feito por Pereira et al. (2018) que descreveram 91 espécies não-nativas nos grandes reservatórios brasileiros. 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 para abastecimento hídrico e geração de energia elétrica onde diversas espécies não-nativas de peixes foram introduzidas para fins de estocagem, mas, principalmente, para atender aos

interesses da pesca esportiva (Agostinho et al., 2007), destacando-se os tucunarés do gênero *Cichla*. Esses piscívoros nativos das bacias da Amazônia, Orinoco e Tocantins-Araguaia são piscívoros visuais e extremamente vorazes com grande potencial para impactar as comunidades nativas, especialmente por meio da predação e competição com piscívoros nativos (Pelicice & Agostinho, 2009). Dentre as quinze espécies descritas morfológicamente para o gênero *Cichla*, as mais comumente introduzidas são as popularmente conhecidas como tucunarés-amarelos, com destaque para *Cichla kelberi* Kullander & Ferreira, 2006, nativa do Tocantins-Araguaia, que foi introduzida pela primeira vez na bacia do rio Paraíba do Sul em 1950 e hoje encontra-se amplamente distribuída nos reservatórios dessa bacia (Marques et al., 2016; Franco et al., 2018). Recentemente, um estudo reportou, pela primeira vez, a introdução do tucunaré azul *Cichla piquiti* Kullander & Ferreira, 2006, também nativo da bacia do Tocantins-Araguaia, no reservatório de Lajes localizado na bacia do rio Paraíba do Sul (Santos et al., 2016).

De acordo com estudos moleculares realizados com o gênero, todas as 15 espécies de tucunarés apresentam algum nível de introgressão (Willis et al., 2012), o que indica que, ao coexistirem, essas espécies terão elevado potencial de hibridizar, especialmente em condições de homogeneização da paisagem, como ocorre em reservatórios. Existem relatos da ocorrência de híbridos entre *C. kelberi* e *C. piquiti* na área nativa feitos pelas comunidades ribeirinhas (Mourão, 2013) e por pescadores que atuam em áreas onde ambas as espécies foram introduzidas. Porém, considerando a elevada plasticidade fenotípica do gênero e variações ontogenéticas na coloração, o uso de ferramentas moleculares faz-se necessário para a correta identificação de híbridos entre essas espécies, tais como marcadores genéticos (Schwartz et al., 2007). Apesar de alguns estudos descreverem a ocorrência de híbridos entre *C. kelberi* e *C. piquiti* em ambientes nativos e invadidos (Oliveira et al., 2006; Almeida-Ferreira et al., 2011; Carvalho et al., 2014), nenhum trabalho utilizou ainda a identificação e descrição de caracteres morfológicos diagnósticos em conjunto com ferramentas moleculares mais acuradas, como microssatélites.

Eventos de hibridização podem aumentar a diversidade genética de populações invasoras pela introdução de alelos não antes encontrados nessas populações, bem como minimizando o efeito fundador, gerando novos genótipos e aumentando os níveis de heterozigidade (Lee, 2002; Zalapa et al., 2010). Além disso, maiores níveis de heterozigidade podem gerar a heterose, conhecida como vigor híbrido

(Birchler et al. 2006), a qual permite que indivíduos híbridos tenham um aumento de suas funções biológicas e comportamentais como crescimento, fecundidade, sobrevivência e agressividade, quando comparado com os parentais (Wohlfarth, 1993; Rahman et al., 1995). Com isso, espera-se que os impactos da possível hibridização entre espécies de tucunaré em ambientes invadidos sejam ainda maiores sobre as comunidades nativas, não apenas pelo aumento inevitável da abundância desses predadores, mas também por conta das desconhecidas características autoecológicas desses híbridos. Nesse sentido, o presente projeto visa caracterizar genética e molecularmente as populações invasoras de *C. kelberi* e *C. piquiti*, bem como seus potenciais híbridos, através da genotipagem de marcadores microssatélites nucleares e do sequenciamento do gene Citocromo *b* (CYTB) do mtDNA.

## 2. Justificativa

As espécies do gênero *Cichla*, quando introduzidas em novos ambientes, podem impactar significativamente comunidades nativas devido ao seu comportamento agressivo e piscivoria voraz (Agostinho et al., 2007). Pelo fato de todas as espécies desse gênero terem potencial de hibridizar entre si (Willis et al., 2012), quando duas espécies são introduzidas na mesma localidade, os impactos causados por elas podem ser potencializados devido, por exemplo, à introdução de novos alelos e à heterose. *Cichla kelberi* é uma espécie invasora que está bem estabelecida ao longo de toda a bacia do rio Paraíba do Sul desde a sua introdução por volta de 1950 (Santos et al., 2001). Por outro lado, *C. piquiti* foi introduzida mais recentemente, em 2010 (Santos et al., 2016). Logo, apenas recentemente as duas espécies têm interagido nesse ambiente invadido. Sendo assim, a identificação precoce e evidente de híbridos entre *C. kelberi* e *C. piquiti* no reservatório de Lajes, localizado no rio Paraíba do Sul, assim como a aferição da frequência, extensão e dinâmica desses eventos de hibridização, serão úteis para fins de monitoramento e manejo dessas populações, e para futuros trabalhos genéticos e evolutivos envolvendo essas espécies. Além disso, por meio da correlação entre os dados genéticos e morfológicos, poderão ser identificados caracteres morfológicos externos que possam ser utilizados para identificar rapidamente híbridos entre essas espécies em outras localidades, o que poderá auxiliar no manejo e conservação de outras áreas invadidas.

### 3. Objetivo Geral

Analisar e caracterizar a morfologia e genética das populações invasoras de *C. kelberi*, *C. piquiti* e seus possíveis híbridos no reservatório de Lajes, através da ecomorfologia, genotipagem de marcadores microssatélites nucleares e do sequenciamento do gene Citocromo b (CYTB) do mtDNA.

### 4. Objetivos específicos:

- Determinar a diversidade genética das populações de *Cichla kelberi*, *Cichla piquiti* e seus possíveis híbridos no reservatório de Lajes.
- Detectar possíveis híbridos entre essas espécies, através de caracteres morfológicos externos que indiquem condições intermediárias entre as duas espécies.
- Realizar medidas e índices ecomorfológicos que permitam a caracterização desses indivíduos e sua comparação com o descrito para as espécies parentais.
- Estimar a frequência e extensão da introgressão entre indivíduos dessas espécies no ambiente invadido.
- Aferir a dinâmica dos eventos de hibridização pela genotipagem de marcadores microssatélites e sequenciamento do marcador CYTB do mtDNA.

### 5. Materiais e Métodos

#### *Coletas, identificação morfológica e análises morfométricas*

Indivíduos representantes das espécies parentais de *C. kelberi* e *C. piquiti* serão capturados na área nativa, de forma a permitir uma caracterização acurada e identificação molecular das espécies parentais. Para isso serão coletados 40 indivíduos *C. kelberi* e 40 indivíduos *C. piquiti* em diferentes pontos no rio Tocantins, onde haja a presença apenas de *C. kelberi* ou *C. piquiti*, de forma a garantir a captura de indivíduos puros. As populações introduzidas dessas espécies serão coletadas no reservatório de Lajes (22°42' N–43°53' W; 22°50' N–44°05' W), localizado no Rio de Janeiro, Brasil. Em funcionamento desde 1905, o reservatório de Lajes possui 30 km<sup>2</sup> de área alagada e vem sendo utilizado para geração de energia hidrelétrica e

abastecimento hídrico do estado do Rio de Janeiro. Em Lajes serão coletados 40 espécimes de *C. kelberi*, 40 de *C. piquiti* e 40 indivíduos com características morfológicas híbridas. Todos os espécimes serão coletados na idade adulta (CT > 200 mm) com a utilização de iscas artificiais padronizadas no tempo empreendido na captura dos indivíduos. Os espécimes coletados serão eutanasiados em gelo e mantidos a -20 °C até o momento das análises. Todos indivíduos serão identificados morfológicamente, de acordo com a descrição de Kullander & Ferreira (2006), onde: *Cichla piquiti* pode ser identificado por sua coloração cinza claro (mais comum) até amarelo, presença de cinco barras escuras verticais na lateral do corpo, e um anel branco ou prateado ao entorno da mancha caudal; enquanto *Cichla kelberi* pode ser identificado por sua coloração amarelada, pela presença de três barras escuras verticais na lateral do corpo e presença de pontos claros nas nadadeiras pélvica e anal e no lobo inferior da nadadeira caudal. Todos os indivíduos serão medidos e pesados, e serão realizadas as seguintes medidas ecomorfológicas: comprimento padrão, largura e altura do corpo, comprimento, altura e largura do pedúnculo caudal, comprimento e altura da cabeça, altura e diâmetro do olho, altura e largura da boca, e área das nadadeiras anal e peitoral. Os dados obtidos serão ordenados por uma análise de coordenadas principais (PCoA), de forma a observar o agrupamento e separação entre as espécies parentais e os possíveis híbridos em relação às medidas realizadas.

#### *Extração de DNA, amplificação e genotipagem dos locos microssatélites (nDNA)*

Para as análises genéticas, serão feitas extrações de DNA a partir de 25 mg de tecido muscular com o uso do kit comercial NucleoSpinTissue (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG), segundo as instruções do fabricante. O DNA extraído será analisado em gel de agarose 1% para que haja a confirmação da obtenção do DNA e sua quantificação. O DNA extraído será mantido à -20° C até o momento das reações de amplificação por PCR.

Durante um trabalho anterior foram selecionados 17 locos microssatélites descritos na literatura que já foram previamente testados e suas condições de amplificação já foram calibradas em indivíduos das espécies *C. kelberi*, *C. piquiti* e possíveis híbridos coletados no rio Paraíba do Sul. Os *primers* para amplificação dos locos microssatélites previamente selecionados são: TUC3, TUC4 (Carvalho et al., 2009), CM01, CM02, CM03, CM04, CM05, CM06, CM09 (Lima et al., 2010),

CPINC11, CPINC1, CPIND2, CINT22, CORIB6.2, CORID12, CORIB3 e CICHLASM2 (Macrander et al., 2012). Esses marcadores genéticos serão empregados em uma análise bayesiana que fará a identificação dos indivíduos híbridos. As reações de amplificação dos marcadores serão feitas com um volume total de 25  $\mu$ l, contendo 1 U de Taq DNA polimerase (ThermoScientificInc), 2,5  $\mu$ l de tampão 10XPCR com  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.16 mM dNTPs (ThermoScientific), 8 pmol de cada primer e 5  $\eta$ g de DNA. As condições de ciclagem para os *primers* TUC3, TUC4, CM03 e CM04 serão 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) 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 primers serão 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) 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 serão marcados com fluoróforos (FAM, VIC, NED, PET), visando a futura genotipagem em um seqüenciador automático de capilar. Para verificar se os locos de interesse foram amplificados corretamente, os produtos da reação de amplificação via PCR serão analisados em gel de agarose 3% corados com GelRed®. Os fragmentos amplificados serão enviados para a MacroGenInc (Seul, Coréia do Sul) para que sejam genotipados.

Após a genotipagem, para a análise dos dados, o programa ARLEQUIN v. 3.5 5 (Excoffier et al., 2005) será utilizado para calcular o número de alelos, e índices de diversidade genética como heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_E$ ). Também no ARLEQUIN, de forma a caracterizar a estrutura genética das populações estudadas, serão calculados índices de Estatística F para analisar o grau de endogamia ( $F_{IS}$ ) e uma Análise de Variância Molecular (AMOVA, Excoffier et al., 1992). Para detectar evidências de hibridização entre as espécies, serão feitas análise dos microssatélites nos programas Structure e NEWHYBRIDS, que utilizam um método Bayesiano (Anderson & Thompson, 2002; Vaha & Primmer 2006; Schwartz & Beheregaray, 2008). A vantagem desse método é que os marcadores utilizados não precisam ser diagnósticos de cada espécie, já que a identificação de indivíduos

híbridos é feita a partir das frequências dos diferentes alelos presentes em cada população (Anderson & Thompson, 2002). No Structure, o modelo que permite ancestralidade de múltiplas populações (admixture model) será utilizado. Esse método é baseado em um número ( $K$ ) de populações, que são caracterizadas pelas frequências alélicas em cada loco analisado. Será utilizado  $K = 2$  em referência as duas espécies. Dessa forma, serão estimadas as probabilidades ( $q$ ) de cada indivíduo pertencer a uma espécie pura ( $q \geq 0,90$ ) ou ser um híbrido ( $q < 0,90$ ). O NEWHYBRIDS será utilizado para designar cada indivíduo à diferentes classes genotípicas (espécies parentais puras, F1, F2, e retrocruzamentos) a partir das frequências alélicas dos marcadores utilizados.

#### *Amplificação e sequenciamento do loco CYTB (mtDNA)*

Marcadores moleculares do DNA mitocondrial (mtDNA) são amplamente utilizados para identificação de espécies invasoras de peixes, assim como em estudos de diversidade genética de suas populações (Oliveira et al. 2006; Schwartz et al., 2007; Fitzpatrick et al., 2012; Marques et al., 2016). Em estudos de hibridização, por meio destes marcadores pode-se caracterizar alelos específicos de cada espécie, o que somado com a herança matrilinear do DNA mitocondrial, faz com que eles possam ser utilizados para aferir a dinâmica dos eventos de hibridização, isto é, se apenas uma ou se ambas as espécies podem ser provedoras dos óvulos. O marcador CYTB já foi utilizado em outros trabalhos com espécies do gênero *Cichla* de forma que ele pode ser utilizado para diferenciar as espécies *Cichla kelberi* e *Cichla piquiti*, e para avaliar a diversidade genética a nível populacional, já que possui uma elevada taxa de mutação.

O marcador molecular CYTB será amplificado pelo par de *primers* GLUDG-5' (5'- CGAAGCTTGACTTGAARAACCAAYCGTTG-3') e Cytb3-3' (3'-GCCAAATAGGAARTATCATTC-5') (Lee et al. 1995; Palumbi 1996). As reações de PCR para amplificação do CYTB também já estão calibradas, de forma que serão realizadas com um volume final de 25 uL contendo 1 unidade (U) de Taq DNA polimerase (ThermoScientific Inc., USA), 1× 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 ng de DNA genômico, e as condições de PCR estão definidas em uma etapa inicial de 5 min à 94 °C, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72°C por 15 s, e uma etapa de extensão final à 72 °C por 5 min. Para confirmar a

amplificação dos fragmentos do DNA de interesse, os produtos finais da PCR serão aplicados em um gel de agarose 1%. Os produtos amplificados serão então purificados e sequenciados pela MacroGenInc (Seul, Coréia do Sul), nos sentidos 5'-3' (fita F) e 3'-5' (fita R), utilizando os mesmos *primers* utilizados na etapa de amplificação.

As sequências do mtDNA obtidas serão alinhadas pelo método ClustalW implementado no programa MEGA7, onde também serão editadas manualmente. Os haplótipos do loco mitocondrial serão definidos no programa DNASP v.5.1 (Librado & Rozas 2009), e as diversidades haplotípicas (*h*) e nucleotídicas ( $\pi$ ) serão calculadas no programa ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier et al., 2005).

## 6. Atividades previstas

- Coletas no estado do Tocantins: para realização desta pesquisa, a coleta de indivíduos na área nativa é uma etapa fundamental, pois para a correta identificação genética de indivíduos híbridos no ambiente invadido, é necessário fazer a caracterização genética de indivíduos puros das duas espécies.
- Coletas no reservatório de Lajes, no estado do Rio de Janeiro: além das coletas na área nativa, também serão realizadas coletas no reservatório de Lajes, nossa área de estudo. Já foram realizadas parte das coletas necessárias nesse reservatório, porém, ainda é preciso aumentar o número amostral de *Cichla piquiti* e de indivíduos com características morfológicas híbridas. Os custos relacionados com esta coleta são de combustível para o carro disponibilizado pela UNIRIO, e para o barco disponibilizado pelo Laboratório de Ictiologia Teórica e Aplicada (LICTA) da UNIRIO, estadia em pousadas com duração de 2-3 dias, e alimentação das pessoas envolvidas na coleta.
- Triagem e dissecação dos espécimes coletados: a triagem e dissecação dos peixes serão realizadas no LICTA, que possui toda a infraestrutura e materiais necessários.
- Extrações de DNA com o uso de kit comercial: as extrações de DNA serão realizadas com o uso do kit comercial NucleoSpinTissue (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG). Este kit é utilizado habitualmente no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LABEM) da UNIRIO, pois possui um bom rendimento e um protocolo rápido.

- Reações de PCR para amplificação dos locos microssatélites nucleares e do gene Citocromo b do mtDNA: também serão realizadas no LABEM que dispõem de três termocicladores, sendo necessário apenas a compra dos insumos utilizados, como reagentes e materiais descartáveis.
- Envio dos fragmentos amplificados para genotipagem e sequenciamento na empresa Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul): os laboratórios da UNIRIO não dispõem do seqüenciador automático de capilar, necessário para a genotipagem e sequenciamento dos marcadores genéticos a serem utilizados, de forma que será preciso terceirizar estes processos. A empresa Macrogen Inc será escolhida para a realização desses serviços pois possui um baixo custo, e já foi utilizada pelos membros de nosso laboratório, de forma que ela presta um serviço com qualidade e rapidez.
- Análise dos dados: todos os dados morfométricos e moleculares coletados serão analisados no laboratórios LICTA e LABEM, que já dispõem dos computadores e softwares necessários.

## **7. Detalhamento da infraestrutura física e tecnológica a ser utilizada**

A maior parte do presente trabalho será realizado utilizando a infraestrutura oferecida pelos laboratórios da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), em especial, o Laboratório de Ictiologia Teórica e Aplicada (LICTA) e Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LABEM). O LICTA possui os equipamentos necessários para realização das coletas como varas de pesca, iscas, e barco que podem ser transportado da UNIRIO até os locais de coleta. Além disso, possui uma sala disponível para a realização da triagem, medições, e dissecação dos peixes após as coletas, além de freezers onde estes serão estocados. No LABEM estão disponíveis todos os equipamentos necessários para a realização das atividades de extrações de DNA, realizações de PCRs, e análises dos dados, em laboratórios aptos para essas práticas moleculares, ficando necessária apenas a aquisição de insumos, reagentes de PCR e kits de extração de DNA. O LABEM não dispõe de um sequenciador automático de capilar, equipamento necessário para a genotipagem e sequenciamento dos marcadores genéticos a serem utilizados, ficando assim a necessidade de terceirizar estes processos na empresa Macrogen Inc.

**8. Cronograma de atividades**

ATIVIDADES	BIMESTRES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pesquisa bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Coleta dos peixes	X			X			X			X		
Medições morfométricas e análise morfológica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Extrações de DNA	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
PCR e genotipagem de todas as amostras coletadas		X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Análise das sequencias			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Análise dos dados moleculares				X	X	X	X	X	X	X	X	
Análise dos dados morfométricos				X	X	X	X	X	X	X	X	
Relatório final						X	X	X	X	X	X	X
Divulgação dos resultados em eventos científicos												X
Elaboração de manuscrito						X	X	X	X	X	X	X

## 9. Planilha de orçamento

<b>Título do projeto</b>	Caracterização genética e morfológica das espécies invasoras <i>Cichla kelberi</i> (Kullander & Ferreira, 2006), <i>Cichla piquiti</i> (Kullander & Ferreira, 2006) e seus possíveis híbridos na bacia do rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro, Brasil.					
<b>Nome do Proponente</b>	Felipe de Souza Cruz Nóbrega					
<b>Instituição de Ensino e Programa</b>	Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical)					
<b>Tipo de Bolsa (Mestrado ou Doutorado)</b>	Mestrado					
<b>Total requisitado (R\$)</b>	R\$ 19.870					
Orçamento da Pesquisa						
<b>Categoria de despesa</b>	<b>Descrição dos itens</b>	<b>Material será cedido para Instituição (Sim ou Não)</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Unidade (un; litro; metro; dia; km)</b>	<b>Valor Unitário (R\$)</b>	<b>Valor Total (R\$)</b>
Uso e consumo	Kit de extração de DNA (250 amostras)	Não	1	unidade	5200,00	<b>5200,00</b>
	Enzima Taq DNA polimerase	Não	4	unidade	550,00	<b>2200,00</b>
	Microtubos de 1.5 mL (Caixa com 1000 tubos)	Não	4	unidade	100,00	<b>400,00</b>
	Microplacas para PCR (pct)	Não	2	unidade	380,00	<b>760,00</b>
	Etanol absoluto	Não	2	litros	20,00	<b>40,00</b>
	Solução de dNTPs (100 mM)	Não	1	unidade	650,00	<b>650,00</b>
Serviço de terceiros Pessoa Jurídica	Purificação e genotipagem de DNA	Não	4	Placas	1000,00	<b>4000,00</b>
Viagens	Passagens (Rio de Janeiro-RJ/Palmas-TO)	Não	3	Passagens	900,00	<b>2700,00</b>
	Hospedagem e alimentação	Não	7	Dias	450,00	<b>3150,00</b>
	Aluguel de carro, combustível	Não	7	Dias	110,00	<b>770,00</b>
<b>TOTAL</b>						<b>19870,00</b>

## 10. Resultados esperados e impacto previsto do projeto

Com o presente trabalho espera-se confirmar a hibridização entre as espécies invasoras *C. kelberi* e *C. piquiti* na bacia do Rio Paraíba do Sul por meio de análises morfológicas e genéticas. Além disso, tendo em vista a importância de uma rápida identificação de espécies invasoras ou de seus híbridos no processo de manejo e conservação de ecossistemas, por meio da correlação dos dados genéticos e morfológicos, espera-se identificar características morfológicas ou morfométricas que possam ser utilizadas para um rápido reconhecimento de indivíduos híbridos em outras localidades onde ambas espécies foram introduzidas.

## 11. Referências

AGOSTINHO, A. A. et al. **Ecologia e Manejo dos Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brazil**. Maringá: EDUEM, 2007.

ALMEIDA-FERREIRA, G. et al. 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, fev. 2001.

ANDERSON, E. C.; THOMPSON, E. A. A Model-Based Method for Identifying Species Hybrids Using Multilocus Genetic Data. **Genetics**. [s.l.], v. 160, pp. 1217-1229, mar. 2002.

BIRCHLER, J. A. et al. Unraveling the genetic basis of hybrid vigor. **PNAS**. [s.l.], v. 103, n. 35, pp. 12957–12958, ago. 2006.

CARVALHO, D. C. et al. Microsatellite markers for the Amazon peacock bass (*Cichla piquiti*). **Molecular Ecology Resources**. [s.l.], v. 9, p. 239–241, mai. 2009.

CARVALHO, et al. Analysis of propagule pressure and genetic diversity in the invasibility of a freshwater apex predator: the peacock bass (genus *Cichla*). **Neotropical Ichthyology**. [s.l.], v. 12, n. 1, pp. 105-116, 2014.

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

EXCOFFIER, L., et al. Arlequinver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**. [s.l.], v. 1, pp. 47–50, 2005.

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

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

HASSELMAN, D. J. et al. Human disturbance causes the formation of a hybrid swarm between two naturally sympatric fish species. **Molecular Ecology**. [s.l.], v. 23, n. 5, pp. 1137–1152, mar. 2014.

HOVICK, S. M.; WHITNEY, K. D. Hybridisation is associated with increased fecundity and size in invasive taxa: meta-analytic support for the hybridisation-invasion hypothesis. **Ecology Letters**. [s.l.], v. 17, n. 11, pp. 1464-1477, nov. 2014.

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

KULLANDER, S. O.; FERREIRA, E. J. G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**. [s.l.], v. 17, n. 4, pp. 289–398, dez. 2006.

LEE, W. J. et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. **Journal of Molecular Evolution**. [s.l.], v. 41, n. 1, pp. 54–66, jul. 1995.

LEE, W. et al. Evolutionary genetics of invasive species. **TRENDS in Ecology & Evolution**. [s.l.], v. 17, n. 8, pp. 386-391, ago. 2002

LIMA, M. P. et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cichlamonoculus* (Agassiz, 1831), an important freshwater fish in the Amazon. **Conservation Genetic Resources**. [s.l.], v. 2, p. 215-218, mai. 2010.

MACRANDER, J. et al. Polymorphic microsatellite loci for the Amazonian Peacock Basses, *Cichlaorinocensis* and *C. temensis*, and cross-species amplification in other *Cichla* species. **Molecular Ecology Resources**. [s.l.], 2012. In press.

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

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

MOYLE, P. B.; MARCHETTI, P. M. Predicting invasion success: Freshwater fishes in California as a model. **BioScience**. [s.l.], v. 56, n. 6, pp. 515-524, jun. 2006.

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**. [s.l.], v. 69, pp. 260–277, nov. 2006.

PALUMBI, S. R. **Nucleic acid II: the polymerase chain reaction**. In Molecular Systematics (Hillis, D. M., Moritz, G. & Mable, B. K., eds), pp. 205–247.

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**. [s.l.], v. 11, n. 8, pp. 1789-1801, out. 2009.

PERRY, W. et al. Importance of hybridization between indigenous and nonindigenous freshwater species: An overlooked threat to North American biodiversity. **Systematic Biology**. [s.l.], v. 51, n. 2, pp. 255-275, abr. 2002.

RAHMAN, M. A. et al. Production of hybrid vigor through cross breeding between *Clarias batrachus* Lin. and *Clarias gariepinus* Bur. **Aquaculture**. [s.l.], v. 138, n. 1–4, pp. 125-130, dez. 1995.

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

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

SANTOS, L. N. et al. Dieta do tucunaré-amarelo *Cichlamonoculus* (Bloch & Schneider) (Osteichthyes, Cichlidae), no Reservatório de Lajes, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. [s.l.], v. 18, n. 1, pp. 191-204.

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

SCHWARTZ, T. S.; BEHEREGARAY, L. B. Using genotype simulations and Bayesian analyses to identify individuals of hybrid origin in Australian bass: lessons for fisheries management. **Journal of Fish Biology**. [s.l.], v. 72, n. 2, pp. 435-450, fev. 2008.

SCRIBNER, K. T. et al. Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. [s.l.], v. 10, n. 3, pp. 293–323, set. 2000.

VAHA, J. P.; PRIMMER, C. R. Efficiency of modelbased Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. **Molecular Ecology**. [s.l.], v. 15, n. 1, pp. 63-72, jan. 2006.

WOHLFARTH, G. W. Heterosis for growth rate in common carp. **Aquaculture**. [s.l.], v. 113, n. 1-2, pp. 31-46, jun. 1993.

WILLIS, S. C. et al. Simultaneous delimitation of species and quantification of interspecific hybridization in Amazonian peacock cichlids (genus *Cichla*) using multi-locus data. **BMC Evolutionary Biology**. [s.l.], v. 12, n. 96, jun. 2012.

ZALAPA, J. E. et al. The extent of hybridization and its impact on the genetic diversity and population structure of an invasive tree, *Ulmuspumila* (Ulmaceae). **EvolAppl**. [s.l.], v. 3, n. 2, pp. 157–168, mar. 2010.