



## AVALIAÇÃO DOS EVENTOS DE HIBRIDIZAÇÃO ENTRE POPULAÇÕES INTRODUZIDAS E ENDÊMICAS DE *Steindachnerina* (PISCES, CHARACIFORMES) DO ALTO RIO PARANÁ

Paula Garcia Martin<sup>1</sup>; Alessandra Valéria de Oliveira<sup>2</sup>, Alberto José Prioli<sup>3</sup>, Sônia Maria Alves Pinto Prioli<sup>3</sup>

**RESUMO:** *Steindachnerina insculpta* era a única espécie do gênero no terço inferior do alto rio Paraná. Com a submersão dos Saltos de Sete Quedas, um segmento do Médio Paraná passou a ter continuidade com o Alto rio Paraná e populações de *Steindachnerina brevipinna* foram introduzidas na região. Essas espécies próximas poderiam estar formando híbridos naturais e iniciando um processo de homogeneização genética na região. O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer metodologia para caracterização molecular de *S. insculpta* e *S. brevipinna* e identificação de possíveis híbridos através da metodologia SPAR. Foram obtidos marcadores moleculares diagnósticos para as duas espécies e dos 50 indivíduos analisados, somente um apresentou a presença de ambos os marcadores das espécies parentais, indicando ser um híbrido natural. Em função do baixo número de indivíduos híbridos encontrados, provavelmente estes são estéreis e não estão retrocruzando com as espécies parentais. Dessa forma não existe riscos, a longo prazo, de introgressão de genes no pool gênico de ambas espécies.

**PALAVRAS-CHAVE:** Rio Paraná; SPAR; *Steindachnerina*

### 1 INTRODUÇÃO

As bacias hidrográficas da região neotropical estão entre as regiões de maior diversidade de peixes do planeta e essas regiões foram as que mais receberam espécies exóticas (25,3% do total mundial), sendo o Brasil o país com o maior número de introduções (AGOSTINHO e ZALEWSKI, 1996). Embora os efeitos ecológicos da introdução de espécies já estejam bem compreendidos, os efeitos genéticos e os impactos da hibridização entre espécies relacionadas, também representando um mecanismo de extinção de espécies e ameaça à integridade de *pools* gênicos endêmicos, são muito menos estudados.

Além dos efeitos genéticos diretos da introdução de espécies exóticas, que incluem híbridos estéreis (causando efeitos genéticos mínimos na população) e híbridos viáveis, que podem cruzar entre si ou retrocruzar com espécies parentais culminando com a introdução de genes das espécies introduzidas no *pool* gênico das espécies nativas, podemos observar efeitos genéticos indiretos da introdução de espécies exóticas. Um tipo

<sup>1</sup> Acadêmica do curso de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas. Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá-PR. [paulagarcia\\_22@hotmail.com](mailto:paulagarcia_22@hotmail.com)

<sup>2</sup> Docente do CESUMAR. Departamento de Ciências Biológicas. Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá-PR. [alessoli@cesumar.br](mailto:alessoli@cesumar.br)

<sup>3</sup> Docentes da Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia Celular e Genética. Maringá-PR. [ajprioli@nupelia.uem.br](mailto:ajprioli@nupelia.uem.br); [priolis@nupelia.uem.br](mailto:priolis@nupelia.uem.br)

Fonte financiadora da pesquisa: CESUMAR.

de efeito genético indireto é a alteração de forças seletivas, pois a introdução de formas não nativas traz novas formas de competição, predação, modificações ambientais, além de parasitas e doenças que podem contribuir para a modificação das pressões de seleção. A perda da integridade genética através da hibridização entre espécies introduzidas e nativas tem sido relatada por diversos autores (OLIVEIRA et al., 2002, OLIVEIRA et al., 2006).

Os saltos de Sete Quedas constituíam uma barreira geográfica que delimitava os segmentos alto e médio do Rio Paraná, e representava uma barreira natural à dispersão de peixes (AGOSTINHO e ZALEWSKI, 1996). Com a construção da Hidrelétrica de Itaipu essa barreira foi deslocada para 150 km abaixo e mais de 30 espécies do médio e baixo Paraná, invadiram o trecho superior (AGOSTINHO et al., 1997), espécies estas, que poderiam estar até então, parcialmente isoladas. *Steindachnerina brevipinna* foi uma dessas espécies introduzidas e estaria colonizando o alto rio Paraná.

Anteriormente ao fechamento da barragem de Itaipu não havia registro de ocorrência da espécie *S. brevipinna* no alto rio Paraná, isto é, acima dos Saltos de Sete Quedas. Recentemente, muitos exemplares de *S. brevipinna* têm sido coletados em campanhas do Nupélia na planície de inundação do alto rio Paraná (C.S. PAVANELLI, comunicação pessoal).

A espécie *S. insculpta* é endêmica do rio Paraná superior. A presença e a ausência de mácula na nadadeira dorsal caracterizam as espécies *S. brevipinna* e *S. insculpta* (Figura 1), respectivamente.

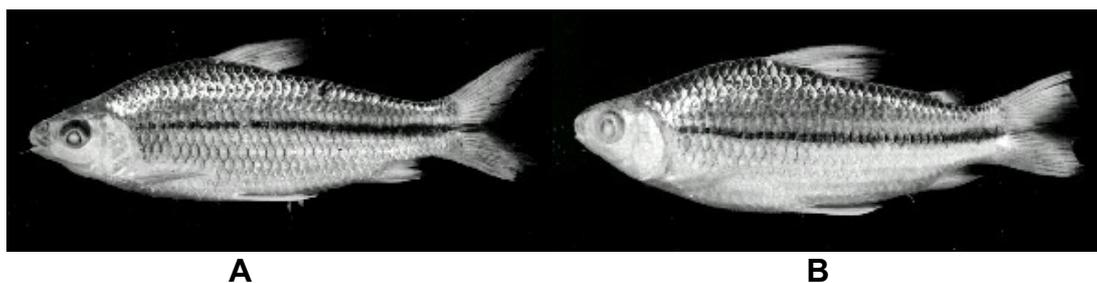


Figura 01: A : Exemplar de *Steindachnerina brevipinna* e B : Exemplar de *Steindachnerina insculpta*.

Como as espécies *S. brevipinna* e *S. insculpta* não estão mais separadas por Sete Quedas, há cerca de 20 anos, uma delas pode estar interferindo no ciclo reprodutivo da outra e de alguma forma predominando em decorrência de vantagens adaptativas. Além disso, em algum grau, estão sendo produzidos híbridos entre as duas espécies, conforme verificado por Oliveira et al. (2006), em estudos com marcadores moleculares RAPD. A hibridação poderia, a longo prazo, resultar na substituição das populações por uma população híbrida ou, pelo menos, na introgressão de genes de uma espécie em outra.

O uso de metodologias moleculares pode gerar informações preciosas para prever a probabilidade de hibridização e introgressão entre espécies nativas e exóticas. A discriminação desses indivíduos, populações ou espécies e o seu monitoramento é de extrema importância para o manejo.

Uma das técnicas utilizadas é conhecida como *Single Primers Amplifications Reactions* (SPAR), que tem gerado marcadores moleculares efetivos em plantas e animais (GUPTA et al., 1994). A amplificação é realizada via PCR e a peculiaridade da técnica é o emprego de um único *primer* com a seqüência repetitiva de um microssatélite ou SSR (*single sequence repeats*). Os *primers* SPAR com seqüências tetranucleotídicas mostram ser eficientes na produção de padrões polimórficos informativos intraespecíficos e interespecíficos (GUPTA et al., 1994; FERNANDES-MATIOLI, 1999), uma vez que amplificam regiões entre dois blocos de microssatélite.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a diferenciação genética entre populações de *Steindachnerina insculpta* e *Steindachnerina brevipinna* da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná e identificar a presença de marcadores moleculares SPAR espécie-específicos nos híbridos naturais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 50 espécimes de *Steindachnerina*, sendo 16 indivíduos com mácula e 34 sem mácula em vários pontos da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná, incluindo lagoas, rios, canais, Rio Baía e Rio Paraná. Os peixes foram fixados em álcool etílico comercial e estocados em freezer -20°C.

A metodologia utilizada para a extração de DNA total foi baseada em fenol/clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989).

Para a aplicação da técnica SPAR foram realizados testes com dez *primers* com seqüências de microssatélites. Dos *primers* testados, três deram bons resultados e foram selecionados para serem utilizados na amplificação do DNA de todos os indivíduos coletados, sendo eles: (GGAC)<sub>3</sub>A, (GGAC)<sub>3</sub>C e (AAGC)<sub>4</sub>. Estes *primers* produziram bandas nítidas e reproduzíveis, fornecendo marcadores polimórficos para cada espécie.

Para a separação dos produtos amplificados foi utilizado gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídio. A visualização foi feita em um transluminador sob luz UV. A análise foi realizada pelo registro dos comprimentos, em pb, das bandas produzidas.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na técnica SPAR, o *primer* é constituído por uma seqüência tetranucleotídica repetitiva, que amplifica regiões que se encontram entre dois locos de microssatélite. Esta técnica está sendo utilizada por vários pesquisadores para identificação de espécies de peixes, já que esta tem estabelecido um padrão de bandas espécie-específicas (LUCIO, 2002; PANARARI, 2002; ALMEIDA, 2005).

No presente trabalho foram analisados 50 espécimes do gênero *Steindachnerina*, de vários pontos da planície de inundação do alto rio Paraná. Os *primers* testados e selecionados, para a amplificação do DNA via PCR, produziram diferentes padrões de fragmentos SPAR, onde o número total de locos observados foi de 49. A quantidade de locos observados por *primer* variou de 13 a 21 e o tamanho dos produtos amplificados ficou entre 380 e 2200 pares de bases (pb).

Marcadores moleculares diagnósticos, ou seja, exclusivos para cada espécie, foram obtidos pela técnica SPAR. De um total de 49 locos amplificados, 20 locos foram exclusivos de *S. insculpta* e 13 foram exclusivos de *S. brevipinna*.

Uma alta porcentagem de locos polimórficos foi encontrada na análise do DNA amplificado dos espécimes de *Steindachnerina insculpta* e *S. brevipinna*, indicando uma acentuada variabilidade genética intrapopulacional, corroborando dados obtidos por Oliveira et al. (2002).

A Figura 2 mostra o perfil eletroforético de alguns espécimes de *Steindachnerina insculpta* e *S. brevipinna*, analisados com o *primer* (GGAC)<sub>3</sub>C.

Dentre os 50 indivíduos analisados, apenas um indivíduo com características morfológicas de *S. insculpta* apresentou, com o *primer* (GGAC)<sub>3</sub>A, marcadores exclusivos das duas populações. Isto indica que pode estar havendo cruzamento entre indivíduos das duas espécies de *Steindachnerina*, contudo esses híbridos devem ser estéreis e não devem estar ocorrendo retrocruzamentos com os indivíduos parentais.

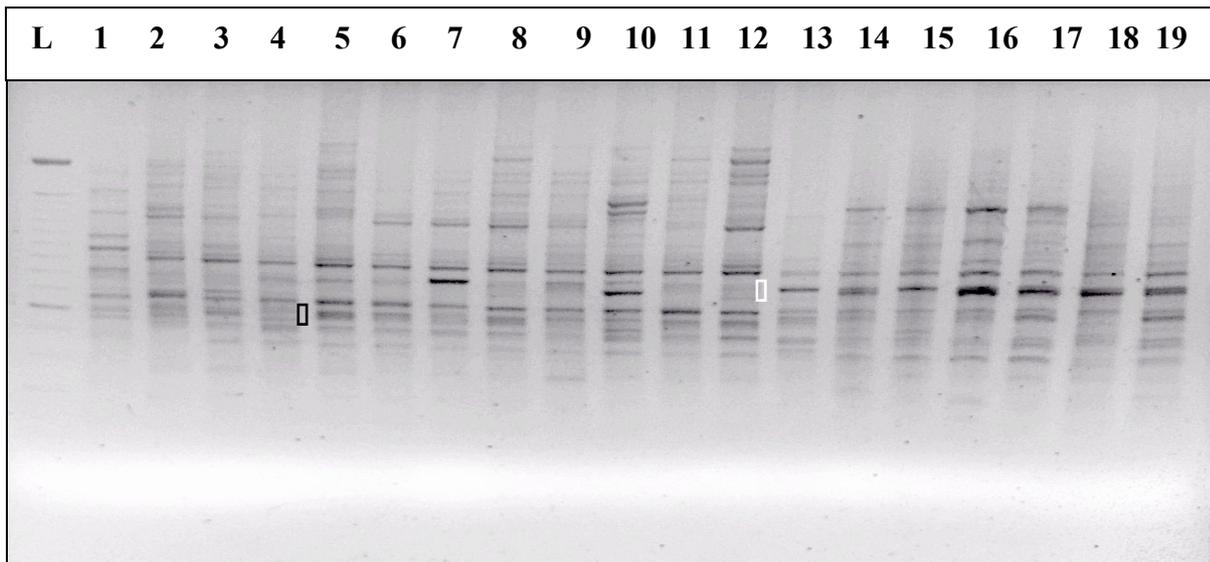


Figura 2: Perfil eletroforético de indivíduos analisados pela técnica SPAR com *primer* (GGAC)<sub>3</sub>C a partir de espécimes de *Steindachnerina insculpta* (linhas 1 a 12) e *S. brevipinna* (linhas 13 a 19). A seta preta indica um marcador exclusivo de *S. insculpta* e a seta branca indica um marcador exclusivo de *S. brevipinna*. A linha L contém os fragmentos marcadores de peso molecular.

#### 4 CONCLUSÃO

Devido ao baixo número de indivíduos híbridos encontrados na região, os quais provavelmente são estéreis, não há ameaça, a longo prazo, de homogeneização genética e de introgressão de genes no pool gênico das espécies em questão.

Futuras avaliações e monitoramento das populações das duas espécies na planície de inundação produzirão informações sobre a dinâmica das interações entre espécies próximas recentemente colocadas em contato. O desenvolvimento deste projeto disponibilizará nova ferramenta molecular para aquisição de conhecimentos sobre estas interações interespecíficas.

#### REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A.A.; ZALEWSKI, M. **A planície alagável do Alto Rio Paraná: Importância e preservação.** Maringá, PR: Editora Universidade Estadual de Maringá, 1996. p.100.

AGOSTINHO, A.A. et al. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.) **A planície de inundação do Alto Rio Paraná: Aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos.** Maringá, PR: Ed. Universidade Estadual de Maringá, 1997. p. 460.

ALMEIDA, G.C.A. **Análise genética via SPAR, de duas espécies do gênero *Cichla* introduzidas na bacia do Rio Paraná.** 2005. Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, 2005.

FERNANDES-MATIOLI, F.M.C. **Evolução e estrutura de populações do gênero *Gymnotus* (Pisces:Gymnotiformes)**, 1999. Tese (Doutorado Biologia/Genética) Instituto de Biociências USP, São Paulo, 1999. p.176

GUPTA, M. et al. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theor. Appl. Genet.** v.89, p.998-1006, 1994.

LUCIO, L.C. **Caracterização Molecular e Variabilidade Genética em Populações de *Hoplias aff. malabaricus* da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná**, 2002. (Pós-graduação). Departamento de Biologia Celular e Genética; Departamento de Biologia Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Paraná, 2002.

OLIVEIRA, A.V. et al. Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the upper Paraná river floodplain of Brazil. **Genetica**, v.115, p.259-267, 2002.

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

PANARARI, R.S. **Polimorfismo Molecular em populações de *Inga spp* (Mimosaceae), *Eugenia spp* (Myrtaceae) e *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (Fabaceae) em Floresta Ripária do Alto rio Paraná**, 2002. Departamento de Biologia Celular e Genética; Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá. Maringá, Paraná, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.