

Diversidade e Distância Genética em Populações do Gênero *Steindachnerina* da Planície de Inundação do Alto Rio Paraná

OLIVEIRA¹, Alessandra V.; PRIOLI^{1,2*}, Alberto J.; PRIOLI^{1,2}, Sônia M.A.P.; PAVANELLI¹, Carla S.; JÚLIO Jr.^{1,2}, Horácio F.; PANARARI¹, Renata S.; GALDINO¹, Josiani C.; CARRER⁴, Helaine; PRIOLI^{1,3}, Laudenir M.

¹Nupélia - Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura; ²Depto. Biol. Celular e Genética; ³Depto. Biologia - Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brazil. ⁴Depto. Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, 13418-900 Piracicaba, SP, Brazil * Autor para correspondência (Fone: (44) 261-4750 / Fax: (44) 263-1424; e-mail: ajprioli@nupelia.uem.br)

RESUMO

Na bacia do rio Paraná ocorrem quatro espécies do gênero *Steindachnerina* e *S. insculpta* era a única endêmica da região estudada, o terço inferior do alto rio Paraná, diagnosticada, entre outros, pela ausência de mácula na porção basal da nadadeira dorsal. Entretanto, após a construção da UHE de Itaipu (1982), começaram a aparecer, na região, indivíduos com esse caracter. Objetivando analisar a variabilidade genética das populações de *Steindachnerina* com e sem mácula, foram coletados espécimes em vários pontos da planície de inundação do alto rio Paraná e as amostras foram comparadas através da técnica RAPD e de análises morfológicas. Foram analisados 98 locos amplificados com nove primers arbitrários, em 19 indivíduos de cada população. Os dados de distância genética mostraram grande divergência entre as duas populações, indicando que elas pertencem a diferentes espécies. Os indivíduos com mácula podem ser identificados como *S. brevipinna*, descrita na região abaixo dos saltos de Sete Quedas. Essa espécie deve ter ultrapassado essa barreira geográfica durante a construção da UHE de Itaipu, que inundou as quedas e passou a representar o obstáculo entre o alto e o médio rio Paraná, aproximadamente 150 Km abaixo. As populações não compartilham alelos dominantes, sugerindo ausência de fluxo gênico. No entanto, um híbrido natural foi identificado com RAPD e com alguns caracteres morfológicos e o sentido de cruzamento entre as duas espécies de *Steindachnerina* foi avaliado com base na região D-loop do DNA mitocondrial. A sequência de nucleotídeos dessa região, no híbrido, revelou-se quase idêntica à sequência de *S. insculpta*, demonstrando que o genoma mitocondrial do híbrido foi herdado dessa espécie, que participou como fêmea no cruzamento interespecífico.

Palavras-chave: diversidade genética, RAPD, *Steindachnerina*, híbrido natural, DNA mitocondrial.

INTRODUÇÃO

O gênero *Steindachnerina* Fowler, 1906, redefinido como uma unidade monofilética da família Curimatidae, ordem Characiformes (Vari, 1991) está distribuído em grande parte, pela América do Sul subtemperada e tropical. As espécies *S. conspersa*, *S. brevipinna* e *S. insculpta* ocorrem no rio Paraná nas porções baixa, inferior e superior, respectivamente, além de *S. corumbae*, espécie recentemente descrita por Pavanelli & Britski, (1999), que está restrita ao sistema do rio Paranaíba, bacia do alto rio Paraná, Estado de Goiás, Brasil.

Na área amostrada por este estudo, o terço inferior do alto rio Paraná, *S. insculpta*, endêmica a bacia do alto rio Paraná, ocorria como única espécie do gênero, diagnosticada entre outros caracteres, pela ausência de mácula na porção basal da nadadeira dorsal. Na região abaixo desta, anteriormente isolada pelos saltos de Sete Quedas e atualmente pela usina hidrelétrica de Itaipu, ocorre uma espécie muito similar a *S. insculpta*, *S. brevipinna*, que apresenta uma mácula escura

na base da dorsal. Nos últimos anos, após a construção da usina hidrelétrica de Itaipu, que possibilitou uma mistura entre as ictiofaunas isoladas pelos saltos de Sete Quedas durante sua contenção, começaram a aparecer espécimes com uma mácula escura bem evidente na nadadeira dorsal, bem como espécimes com mácula menos evidente, de pigmentação intermediária. Em virtude dessas circunstâncias, poderiam estar ocorrendo cruzamentos entre indivíduos das populações que antes estariam isoladas pelo salto de Sete Quedas e se iniciando um processo de homogeneização genética dessas populações de peixes.

Objetivando analisar a variabilidade genética das populações de *Steindachmerina* com e sem mácula, foram coletados espécimes em vários pontos da planície de inundação do alto rio Paraná e as amostras foram comparadas através da técnica RAPD (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990) e de análises morfológicas. Foram analisados 98 locos amplificados com nove primers arbitrários, em 19 indivíduos de cada população (com mácula, sem mácula e com mácula intermediária). Alterações genéticas induzidas no *pool* gênico das populações nativas poderiam ser irreversíveis e culminariam, a longo prazo, com a extinção das populações locais e formação de uma nova população híbrida na região. Associada à técnica RAPD, foi feita a análise morfológica de indivíduos de todas as populações.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os *primers* selecionados e analisados (OPE-09, OPW-04, OPW-06, OPW-09, OPW-17, OPW-19, OPA-06, OPX-05, OPX-18) produziram diferentes padrões de fragmentos RAPD, embora *primers* individuais tenham diferido na quantidade de variação que eles detectaram. Dos 98 locos analisados para os 9 *primers* randômicos, 76 foram polimórficos (77,6%) e 22 monomórficos (22,4%), constantemente presentes em todos os indivíduos. Embora em vários casos os alelos não estivessem presentes em todos os indivíduos, alguns foram únicos para uma dada população (Figura 1).

Dos 76 locos polimórficos, 27 foram exclusivos da população sem mácula e 31 exclusivos da população com mácula e intermediária, que apresentaram para todos os *primers* o mesmo padrão eletroforético e os mesmos alelos.

Dados de distância genética não-enviesada de Nei, com correção para as frequências gênicas (Lynch & Milligan, 1994), calculadas para as três populações, mostraram grande divergência genética entre a população sem mácula e as populações com mácula. Os valores de distância genética de Nei entre ambas (0,7288) indicam que as populações de *Steindachmerina* da planície de inundação do alto rio Paraná estão representadas por duas espécies, uma vez que valores superiores a 0,3 caracterizam grande parte delas (Thorpe, 1982). Valores inferiores, como por exemplo 0,162, já foram encontrados para espécies do mesmo gênero com estudos enzimáticos (Thorpe & Solé-Cava, 1994). Em contrapartida, a baixa distância observada entre as populações com mácula e intermediária (0,0092) mostram que, além dessas populações pertencerem à mesma espécie, elas estão homogeneizadas geneticamente. O dendrograma baseado nos complementos aritméticos dos coeficientes de similaridade de Nei e Li (1979) obtidos com marcadores RAPD, agrupou os 57 espécimes em dois grandes grupos, um representado por todos os espécimes sem mácula e outro representado por todos os espécimes com mácula e com mácula intermediária. Esse modelo de diferenciação foi corroborado na representação gráfica da análise em coordenadas principais. A análise foi efetuada com a correção pelo método de Lingoes (Legendre & Anderson, 1999), a partir da matriz de complementos aritméticos dos coeficientes de similaridade de Nei e Li, obtidos com marcadores RAPD. Contudo, o espécime STSM-15 apresentou uma posição diferenciada dos demais grupos, compondo um terceiro grupo, na análise em coordenadas principais.

A análise morfológica permitiu detectar algumas diferenças entre as populações. Além da presença ou ausência de mancha escura na nadadeira dorsal, o caráter morfomérico mais

importante para separar exemplares das populações com mácula dos exemplares da população sem mácula, foi o número de escamas da linha lateral (38 a 40 e 40 a 42, respectivamente). Além desse, podem ser destacados o tamanho orbital, altura do corpo, séries de escamas da linha transversal acima da lateral e comprimento do focinho.

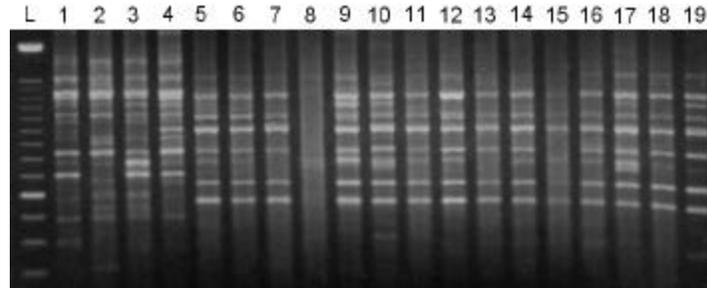


Figura 1. Perfil eletroforético de RAPD das populações de *Steindachnerina* da planície de inundação do alto rio Paraná. Fragmentos amplificados com o *primer* OPX-18, a partir de indivíduos da população com mácula intermediária (1 a 4) e indivíduos da população sem mácula (5 a 19). Observar presença de alelos exclusivos para cada população.

De acordo com os dados morfométricos e merísticos, os espécimes com mácula encontrados na região pertencem à espécie *S. brevipinna*, descrita por Vari (1991) na porção inferior do rio Paraná. Essa espécie deve ter colonizado a região acima de Sete Quedas durante a construção do reservatório de Itaipu, em 1982, quando algumas espécies de peixes transpuseram a barreira geográfica e obtiveram sucesso acima (Agostinho, Júlio Jr. & Borguetti, 1992). Em função da diversidade intrapopulacional e da percentagem de locos polimórficos encontrada para essa espécie (34,7%), semelhante e inclusive superior à população representada por *S. insculpta* (29,6%), há indícios de que essa introdução possa ter ocorrido com um grande número de indivíduos, os quais foram suficientes para, apesar do isolamento geográfico, manter a diversidade genética da população original (a jusante de Itaipu). A espécie sem mácula, identificada como *S. insculpta*, e confirmada pela análise morfológica, é endêmica a região a montante de Itaipu (Vari, 1991). Como as populações estão fortemente diferenciadas geneticamente, o fluxo gênico entre elas é pouco provável, uma vez que elas exibem algumas diferenças fixadas. No entanto, um único indivíduo (STSM-15) apresentou um padrão de bandas desigual, apresentando alelos de ambas populações, em função do *primer* utilizado, assim como caracteres morfológicos fora da amplitude de variação das duas espécies. Na análise em coordenadas principais, este espécime compôs um terceiro agrupamento, posicionando-se de forma intermediária entre os dois grandes conjuntos formados pelas populações com e sem mácula. Estes fatos levam à suposição de que talvez estejam ocorrendo cruzamentos entre os indivíduos das diferentes populações, resultando em híbridos, que herdaram alguns alelos típicos das espécies progenitoras. Esses híbridos podem ser inviáveis devido a diferenças cromossômicas ou gênicas (Futuyma, 1997) e isso explicaria o baixo número de indivíduos que poderiam ser encontrados na região. Considerando a esterilidade uma característica desses híbridos, não haveria a possibilidade de retrocruzamentos e alteração na composição genética das populações nativas, bem como homogeneização. No entanto, o sentido de cruzamento com produção de híbridos entre as espécies *S. insculpta* e *S. brevipinna* foi verificado através da amplificação via PCR, de um fragmento de mtDNA consistindo da seqüência parcial do gene citocromo b, as seqüências completas dos genes tRNA^{Thr} e tRNA^{Pro} e uma seqüência parcial da região D-loop. O DNA mitocondrial (mtDNA) é um útil sistema marcador para uso em estudos populacionais e filogenéticos em virtude do modo de herança maternal e relativa ausência de recombinação. A região de início da replicação denominada D-loop (região controle) é a parte

mais variável do mtDNA, com taxa de mutação cinco vezes superior ao restante do genoma da organela.

Análises das seqüências nucleotídicas revelaram similaridade quase total nas regiões do citocromo b, tRNA^{Thr} e tRNA^{Pro}, que são regiões bastante conservadas entre espécies aparentadas. Porém, na região D-loop as seqüências nucleotídicas mostraram-se altamente similares dentro de cada espécie, com vários nucleotídios polimórficos entre *S. brevipinna* e *S. insculpta*. A seqüência de nucleotídeos da região D-loop do híbrido revelou-se quase idêntica à seqüência de *S. insculpta*. Portanto, os resultados demonstram que o genoma mitocondrial do híbrido natural estudado foi herdado de *S. insculpta*, que participou como fêmea no cruzamento interespecífico. Além disso, a informação de que os indivíduos com mancha possuem seqüência D-loop apenas de *S. brevipinna* e que os indivíduos sem mancha possuem seqüência D-loop de *S. insculpta* indicam que não houve quebra do isolamento reprodutivo entre as duas espécies.

Novas amostragens devem ser realizadas com o intuito de investigar, espacial e temporalmente, como essas duas espécies do gênero *Steindachnerina*, há 20 anos ocorrendo sintopicamente na região, estão explorando o mesmo habitat, partilhando recursos e se de alguma forma, uma das espécies está predominando, talvez por alguma vantagem adaptativa. As possíveis perturbações que essa nova população pode ocasionar na comunidade biótica local podem, a longo prazo, trazer efeitos irreversíveis e particularmente importantes do ponto de vista conservacionista. Os dados sugerem que não há risco imediato de extinção local das populações originais por homogeneização genética, no entanto um monitoramento contínuo deve ser realizado, através de coletas periódicas e análises genéticas para controlar a freqüência de híbridos na região. Um aumento dessa freqüência pode nos dar indícios de que um processo de homogeneização está se instalando nessas populações de peixes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Nupélia e ao PEA pelo apoio e ao CNPq-PELD e CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A.A., H.F. JULIO JR.; J.R. BORGUETTI, 1992. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. Revista UNIMAR 14: 89-107.
- FUTUYMA, D.J., 1997. Biologia Evolutiva. 2ª ed. Sociedade Brasileira de Genética Ribeirão Preto, SP.
- Legendre, P.; Anderson, M.J. 1999. Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs*, 69:1-24.
- LYNCH M. & B.G. MILLIGAN, 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- NEL, M.; LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5269-5273.
- PAVANELLI, C.S.; H.A. BRITSKI, 1999. Description of a new species of *Steindachnerina* (Teleostei: Characiformes: Curimatidae) from the upper Rio Paraná basin, Brazil. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 10: 211-216.
- THORPE, J.P., 1982. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 13: 139-168.
- THORPE, J.P.; A.M. SOLÉ-CAVA, 1994. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zool. Sci.* 23: 3-18.
- VARI, R.P., 1991. Systematics of the Neotropical Characiform genus *Steindachnerina* Fowler (Pisces: Ostariophysi). *Smithson. Contr. Zool.* 507: 1-118.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24):7213-7218.

WILLIAMS, J.G.K., A.R. KUBELIK, J. LIVAK, J.A. RAFALSKI; S.V. TINGEY, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

