

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE
AMBIENTES AQUÁTICOS CONTINENTAIS

ARIADINE HELOISA NUNES

Dispersão da espécie não nativa *Daphnia lumholtzi* (Crustacea: Branchiopoda), em um trecho de uma bacia hidrográfica neotropical: agentes facilitadores e reconstrução genética da rota de invasão

Maringá
2015

ARIADINE HELOISA NUNES

Dispersão da espécie não nativa *Daphnia lumholtzi* (Crustacea: Branchiopoda), em um trecho de uma bacia hidrográfica neotropical: agentes facilitadores e reconstrução genética da rota de invasão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Área de concentração: Ciências Ambientais

Orientadora: Dr^a Claudia Costa Bonecker

Maringá
2015

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

N972d Nunes, Ariadine Heloisa, 1989-
Dispersão da espécie não nativa *Daphnia lumholtzi* (Crustacea: Branchiopoda), em um trecho de uma bacia hidrográfica neotropical : agentes facilitadores e reconstrução genética da rota de invasão / Ariadine Heloisa Nunes. -- Maringá, 2015.
48 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--
Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2015.
Orientadora: Dr.^a Cláudia Costa Bonecker.

1. Microcrustáceos de água doce - Invasões biológicas - Comunidades, Ecologia de - Paraná, Rio, Bacia. 2. Microcrustáceos de água doce - Invasões biológicas - Teorias ecológicas - Paraná, Rio, Bacia. 3. *Daphnia lumholtzi* (Crustacea: Branchiopoda). 4. Cladocera - Invasões biológicas - Análise molecular. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

CDD 23. ed. -595.321782
NBR/CIP - 12899 AACR/2

ARIADINE HELOISA NUNES

Dispersão da espécie não nativa *Daphnia lumholtzi* (Crustacea: Branchiopoda), em um trecho de uma bacia hidrográfica neotropical: agentes facilitadores e reconstrução genética da rota de invasão

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Dr.^a Claudia Costa Bonecker
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Fábio de Azevedo
Faculdade Estadual de Educação, Ciências e Letras de Paranaíba (Fafipa)

Prof. Dr. Sidinei Magela Thomaz
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 31 de julho de 2015.

Local de defesa: Anfiteatro Prof. “Keshiyu Nakatani”, Nupélia, Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

AGRADECIMENTOS

Sou muito grata a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a elaboração deste trabalho e com isso ajudaram no meu crescimento profissional e pessoal. Entre tantos, alguns tiveram uma participação especial, e gostaria de agradecer de forma também especial. Se por ventura minha memória não me permitir lembrar de alguém, peço desculpas por essa falha.

À Deus, por manter as coisas nos trilhos.

À minha mãe, Fátima, por ser meu exemplo de força e garra, por sempre me incentivar e ensinar a não desistir, não importa qual seja a dificuldade.

À minha família, Victor, Jefferson e Alcir, pelo apoio durante toda a minha caminhada acadêmica.

Ao meu marido, Fernando Augusto Vicentini, meu exemplo de profissional. Obrigada pelo apoio, paciência, carinho e o amor de cada dia. Seu apoio me fez ir mais longe.

À minha orientadora, Claudia Bonecker, por todas as oportunidades, apoio, compreensão das minhas limitações me auxiliando a superá-las e por todo o incentivo durante todos esses anos.

Aos Professores Fábio Amodêo Lansac-Tôha (Fabinho) e Felipe Machado Velho (Fê) pelo carinho, incentivo, exemplo e demonstrações de empolgação com o trabalho.

À todos que já passaram pelo laboratório de Zooplâncton (Nadson, Ju, Clarice, Ciro, Leandro, Fabiana, Adelina, Danilo, Ana Paula, Diogo, Leilane, Rodrigo, Louizi, Francislaine, Tássia, Francieli, Thaís, Felipe, Elis, Welinton, Tatiane e muitos outros) pelos momentos de descontração e risadas, pela ajuda diária, por todas as discussões construtivas e o apoio quase que incondicional. Vocês foram parte fundamental da minha construção como profissional.

À Fabiana, Clarice, Leandro, Ana Paula, Louizi, Diogo e Danilo por me ensinarem o que sei sobre identificação da comunidade zooplânctônica. Sei que ainda há um longo caminho a ser trilhado.

Ao Laboratório de Protozooplâncton pela ajuda e pelo desprendimento de tempo e recurso, principalmente ao Professor Fê, Bianca Trevizan, Bianca Ramos, Fernando e Orlando pela ajuda nas análises do Bacterioplâncton.

Aos laboratórios de Limnologia e Fitoplâncton, especialmente à Maria do Carmo (Dú), Jacqueline, Susicley (Sú), Luzia, Jascieli, Aline e Geovani, por todo auxílio em equipamentos, materiais para coleta e análise de dados.

À Thaís, Juliana, Felipe, Diogo, Fran, Claudinha, Seu Ní, Celsão e Gaso pelo suporte, companhia e ajuda nas coletas nos reservatórios. Vocês tornaram o cansaço menor e os dias mais divertidos.

Às meninas da secretaria, Jocemara e Aldenir, por toda a paciência e ajuda com a burocracia de coletas e por sempre me atenderem tão prontamente, de forma tão simpática.

Ao Herick Santana, Thomaz Fabrin e Juliana Deo Dias por esclarecer minhas dúvidas sobre estatística e genética. Vocês foram verdadeiros professores.

À minha amiga Juliana Deo Dias pela disposição, ajuda nos momentos mais desesperadores, por me ouvir, apoiar e atender as minhas 18 ligações diárias com muita paciência, mas principalmente por todo carinho e amizade.

Ao Nadson, pelo apoio, incentivo, cobrança e amizade de todos esses anos. Ele é mesmo o Rei, um grande exemplo que quero sempre seguir e me espelhar.

Aos meus grandes amigos, que carregarei para sempre no coração, Bia, Felipe, Juliana, Thaís e Louizi, por todo o suporte e apoio nos momentos de dificuldade, vocês tornaram meu mestrado mais leve, mais divertido e mais vegetariano.

À minha turma de mestrado, da qual fiquei feliz em fazer parte. Meus ecólogos de verdade.

À professora Maria Rosa Miracle, pelo auxílio nas análises moleculares e sugestões para a discussão.

À Salete e ao João pela ajuda com a parte bibliográfica.

Ao Programa de Pós Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais por fornecer a infraestrutura e pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais por fazer parte da construção do meu conhecimento.

Aos professores Sidinei (Nei) e Lourdes Elmoor-Loureiro, por aceitarem fazer parte da banca e contribuir para a melhoria deste trabalho.

Ao órgão de fomento, CNPq/CAPES pelo suporte financeiro à pesquisa e pela bolsa de mestrado, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

*“Foi o tempo que dedicaste a tua rosa
que a fez tão importante”*

Antoine de Saint-Exupéry

Dispersão da espécie não nativa *Daphnia lumholtzi* (Crustacea: Branchiopoda), em um trecho de uma bacia hidrográfica neotropical: agentes facilitadores e reconstrução genética da rota de invasão

RESUMO

Invasões biológicas constituem uma das principais ameaças a integridade de ecossistemas aquáticos, sendo que, além de prejuízos econômicos, podem levar à perda da diversidade biológica através da extinção de organismos nativos, podendo provocar alteração na transferência de energia e matéria dentro desses ecossistemas. Em ambientes de água doce os cladóceros são componentes representativos do plâncton e possuem grande importância nas redes tróficas. *Daphnia lumholtzi* é uma espécie não nativa do continente americano, e vem sendo registrada cada vez mais no Brasil. Tendo em vista o aumento gradual de sua ocorrência, é necessário avaliar os potenciais riscos e consequências que esta espécie pode causar à comunidade de cladóceros nativos. A primeira abordagem deste trabalho teve como objeto avaliar a distribuição espacial de *Daphnia lumholtzi* em um trecho da bacia hidrográfica do alto rio Paraná, em novembro de 2013 e agosto de 2014, incluindo cinco reservatórios e a planície de inundação do alto rio Paraná, e identificar quais fatores estariam propiciando seu estabelecimento, avaliando o papel dos reservatórios, a disponibilidade de recursos e a resistência biótica no processo de invasão. A espécie não nativa foi registrada em 27 dos 48 locais amostrados, sendo 10 ambientes em novembro de 2013 e 23 em agosto de 2014. Devido a sua densidade e recorrência nos ambientes, esta espécie pode ser considerada uma espécie estabelecida. As maiores densidades da espécie foram registradas em reservatórios e apresentaram uma relação negativa e significativa com a distância geográfica dos pontos de amostragem. Foi observada uma relação positiva e significativa entre as densidades de *Daphnia lumholtzi* e as densidades fitoplanctônicas, enquanto que não houve relação significativa com a riqueza de espécies de cladóceros. Portanto, o sucesso do estabelecimento da espécie foi atribuído aos ambientes antropizados (reservatórios) e ao aumento da disponibilidade de recurso alimentar desses ambientes observados durante este estudo. A segunda abordagem visou avaliar, através de análises moleculares dos genes *COI* e *12S*, a distância genética entre os espécimes de *Daphnia lumholtzi*, coletados na planície de inundação, e outras populações desta espécie distribuídas globalmente, no intuito de identificar possíveis meios de introdução e as rotas de invasão da espécie. A população encontrada na planície assemelha-se geneticamente às populações registradas em lagos dos Estados Unidos, caracterizando uma possível rota de invasão, e ainda, supõe-se que ambas possuam uma origem comum. Dessa forma, embora não tenha sido identificada nenhuma influência negativa da espécie não nativa sobre a comunidade de cladóceros local, observa-se que *Daphnia lumholtzi* apresenta uma ampla dispersão na planície de inundação do alto rio Paraná e monitoramentos constantes devem ser realizados a fim de se compreender melhor o processo de invasão e avaliar possíveis prejuízos à comunidade nativa.

Palavras-chave: Análise molecular. *Daphnia lumholtzi*. Disponibilidade de recurso. Invasão. Reservatórios. Resistência biótica.

Dispersion of a non-native species *Daphnia lumholtzi* (Crustacea: Branchiopoda) in a stretch of an hydrographic basin of a neotropical region: facilitating agents and genetic reconstruction of the invasion route

ABSTRACT

Biological invasions are a major threat to aquatic ecosystems integrity, and, in addition to economic losses, species introduction may lead to loss of biodiversity through extinction of native organisms, probably provoking changes in energy and matter transfer within these ecosystems. In freshwater environments, cladocerans are representative components of plankton communities and it has great importance in food webs. *Daphnia lumholtzi* is a non-native species of American continent, and its register in Brazil has increased. Given the gradual increasing of its occurrence, it is necessary evaluate the potential risks and consequences that this species can cause to the local community. The first approach of this study aimed to evaluate the spatial distribution of *Daphnia lumholtzi* on a stretch of the upper Paraná River floodplain, on November 2013 and August 2014, including 5 reservoirs and the Parana River basin, and identify which factors would facilitate its establishment, assessing the role of reservoirs, resource availability and biotic resistance over the invasion process. The non-native species was recorded in 27 of the 48 sampling points, in which 10 points were on November 2013 and 23 points on August 2014, and its density and recurrence in environments, it can be considered an established species. The highest densities of *Daphnia lumholtzi* were recorded in reservoirs and were negatively related according to geographical distance of the sampling points. Densities of non-native species showed a positive and significant relationship with the phytoplankton densities, although it was not significant association with the richness of cladocerans species. Therefore, the successful establishment of the non-native species was facilitated by anthropogenic environments (reservoir) and the increased availability of food resource during this study. The second approach aimed to evaluate, through molecular analysis of *COI* and *12S* genes, the genetic distance of *Daphnia lumholtzi* specimens collected in Paraná River floodplain environments with other populations of this species located around the world, in order to identify possible pathways of introduction and invasion routes. The floodplain species is resembles genetically to described in lakes of the United States, characterizing a possible invasion route by this population established in the North American continent, and we assumed that both have a common origin. Although it has not been identified any harmful relationship with local communities yet, it has been observed that *Daphnia lumholtzi* presents a growing dispersion in the upper Parana River floodplain and its constant monitoring should be performed in order to better understand the invasion process and evaluate possible damage to native community.

Keywords: *Daphnia lumholtzi*. Invasion. Molecular analysis. Biotic resistance. Reservoirs. Resource availability.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Biological Invasions* (Capítulos I e II), disponível em: <<http://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/10530>>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	RESERVATÓRIOS E DISPONIBILIDADE DE RECURSO ALIMENTAR CONTRIBUEM PARA O PROCESSO DE INVASÃO DE <i>Daphnia lumholtzi</i> (CLADOCERA) EM UM TRECHO DE UMA BACIA HIDROGRÁFICA NEOTROPICAL	15
2.1	INTRODUÇÃO.....	17
2.2	MÉTODOS.....	19
2.2.1	Área de estudo	19
2.2.2	Desenho amostral	20
2.2.3	Amostragem da comunidade fitoplanctônica	21
2.2.4	Amostragem da comunidade de cladóceros	21
2.2.5	Análises dos dados.....	21
2.3	RESULTADOS	23
2.4	DISCUSSÃO	27
	REFERÊNCIAS	30
	APÊNDICE 1. Tabela de dados da densidade fitoplanctônica nos dois meses de amostragem e nos pontos em que a espécie não nativa estava ou não presente durante todo o estudo.....	35
	APÊNDICE 2. Tabela de dados da riqueza de cladóceros nos dois meses de amostragem e nos pontos em que a espécie não nativa estava ou não presente durante todo o estudo.	36
	APÊNDICE 3. Inventário de espécies de cladóceros que foram registradas durante o estudo.	37
3	RECONSTRUINDO A ROTA DE DISPERSÃO DE UMA ESPÉCIE NÃO NATIVA <i>Daphnia lumholtzi</i> (CLADOCERA) PELO CONTINENTE AMERICANO USANDO MARCADORES GENÉTICOS	38
3.1	INTRODUÇÃO.....	40
3.2	MÉTODO	41
3.2.1	Obtenção dos organismos	41

3.2.2	<i>Análise molecular</i>	41
3.2.3	<i>Análise e comparação das sequências</i>	42
3.3	RESULTADOS	42
3.4	DISCUSSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os casos de invasões biológicas por todo o mundo têm sido cada vez mais frequentes. Com o processo de globalização, atingir novos ambientes, antes considerados como impossíveis, devido às barreiras geográficas, tornou-se muito mais fácil e rápido para espécies com limitada capacidade de dispersão (Havel & Medley 2006). Nesse cenário o homem tem um papel fundamental como um dos principais agentes introdutores de espécies não nativas, além de suas ações, como a construção de barragens e reservatórios, terem como consequência a alteração e desestruturação de ambientes naturais, tornando-os mais suscetíveis às invasões (Havel et al. 2005).

Compreender os fatores que fazem um ambiente ser mais suscetível à invasão do que outro tem sido um dos objetivos motores dos estudos sobre esse tema pelo mundo (Davis et al. 2000; Havel et al. 2005; Mormul et al. 2012). Com o intuito de responder a essas questões, teorias pré-existentes, como competição e nicho, foram usadas como base para a criação de hipóteses acerca desse assunto, entre elas destacam-se a hipótese de fluutuabilidade de recurso e a hipótese de resistência biótica (Elton 1958; Davis et al. 2000). Porém, a complexidade das interações presentes nas comunidades e a complexidade apresentada por ambientes tropicais, fazem com que não apenas um, mas vários fatores atuem sobre o processo de invasão (Havel et al. 2015).

A multidisciplinaridade da ciência tem auxiliado através das análises genéticas, a recriar rotas de invasão e árvores de distância genética. Com estes avanços, atualmente é possível identificar o grau de parentesco entre as espécies nativas e introduzidas e até mesmo a região geográfica de origem de espécies não nativas (Frisch et al. 2013; Teske et al. 2014).

Daphnia lumholtzi G. O. Sars, 1885 (Crustacea: Branchiopoda) é um cladóceros nativo da Austrália, sul da Ásia e norte da África (Benzie 1988) que atualmente se apresenta amplamente distribuída pelo continente americano. Menos de vinte anos após seu primeiro registro em 1990, nos Estados Unidos (Sorensen & Sterner 1992; Havel & Hebert 1993), a espécie já havia se dispersado por todo o continente americano, apresentando registros no Brasil (Zanata et al. 2003), inclusive na planície de inundação do rio Paraná (Simões et al. 2009), chegando a ser registrada até em território argentino (Kotov & Taylor 2014).

A planície de inundação do alto rio Paraná vem sofrendo alterações na sua estrutura e dinâmica desde o início da construção de reservatórios na bacia, e tais alterações foram acentuadas após a construção do último reservatório a sua montante em 1998 (UHE

Engenheiro Sérgio Motta ou reservatório de Porto Primavera) (Agostinho et al. 2009). Acredita-se que essa cadeia de reservatórios na bacia faz com que a planície de inundação se torne mais susceptível às invasões.

Dessa forma, o presente estudo foi elaborado em dois capítulos, cada um correspondendo a um manuscrito científico. O capítulo I testa quais os fatores influenciam a suscetibilidade dos ambientes pertencentes a um trecho da bacia do rio Paraná à invasão por *Daphnia lumholtzi*. Entre os fatores avaliados estão o papel dos reservatórios, a disponibilidade de recurso e a resistência biótica no processo de invasão. O capítulo II foi realizado com o intuito de avaliar a distância genética entre as populações da planície de inundação do alto rio Paraná e as demais populações dessa espécie presentes no mundo, a fim de tentar recriar a rota de invasão da mesma no Brasil, além de identificar o seu possível local de origem.

REFERÊNCIAS

- Agostinho AA, Bonecker CC, Gomes LC (2009) Effects of water quantity on connectivity: the case of the upper Paraná River floodplain. *Ecohydrol Hydrobiol* 9:99–113
- Benzie JAH (1988) The systematics of Australian *Daphnia* (Cladocera, Daphniidae). Species descriptions and keys. *Hydrobiologia* 166:95–161
- Davis MA, Grime JP, Thompson K (2000) Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility. *J Ecol* 88:528–534
- Elton CS (1958) the ecology of invasions by animals and plants. Chicago, London
- Frisch D, Havel JE, Weider LJ (2013) The invasion history of the exotic freshwater zooplankter *Daphnia lumholtzi* (Cladocera, Crustacea) in North America: A genetic analysis. *Biol Invasions* 15:817–828
- Havel JE, Hebert PDN (1993) *Daphnia lumholtzi* in North America: Another exotic zooplankter. *Limnol Oceanogr* 38:1823–1827
- Havel JE, Kovalenko KE, Thomaz SM, et al (2015) Aquatic invasive species: challenges for the future. *Hydrobiologia* 147–170
- Havel JE, Lee CE, Zanden MJV (2005) Do reservoirs facilitate invasions into landscapes? *Bioscience* 55(6):518-525
- Havel JE, Medley KA (2006) Biological invasions across spatial scales: Intercontinental, regional, and local dispersal of cladoceran zooplankton. *Biol Invasions* 8:459–473

- Kotov AA, Taylor DJ (2014) *Daphnia lumholtzi* Sars, 1885 (Cladocera: Daphniidae) invades Argentina. *J Limnol* 73:167–172
- Mormul RP, Ahlgren J, Ekvall MK, et al (2012) Water brownification may increase the invasibility of a submerged non-native macrophyte. *Biol Invasions* 14:2091–2099
- Simões NR, Robertson BA, Lansac-Tôha FA, et al (2009) Exotic species of zooplankton in the Upper Paraná River floodplain, *Daphnia lumholtzi* Sars, 1885 (Crustacea: Branchiopoda). *Braz J Biol* 69:551–558
- Sorensen KH, Sterner RW (1992) Extreme cyclomorphosis in *Daphnia lumholtzi*. *Freshw Biol* 28:257–262
- Teske PR, Sandoval-Castillo J, Waters JM, Beheregaray LB (2014) Can novel genetic analyses help to identify low-dispersal marine invasive species? *Ecol Evol* 4:2848–2866
- Zanata LH, Espíndola ELG, Rocha O, Pereira RHG (2003) First record of *Daphnia lumholtzi* (SARS, 1885), exotic cladoceran, in São Paulo State (Brazil). *Braz J Biol* 63:717–720

**2 RESERVATÓRIOS E DISPONIBILIDADE DE RECURSO ALIMENTAR
CONTRIBUEM PARA O PROCESSO DE INVASÃO DE *Daphnia lumholtzi*
(CLADOCERA) EM UM TRECHO DE UMA BACIA HIDROGRÁFICA
NEOTROPICAL¹**

¹Capítulo I formatado de acordo com as normas da *Biological Invasions*.

RESUMO: Diversos fatores afetam a invasão dos ambientes dulcícolas naturais por espécies não nativas, e o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos reservatórios (porta de entrada de propágulos invasores), disponibilidade de recurso alimentar (densidade fitoplanctônica) e resistência biótica (riqueza de espécies de cladóceros) no processo de invasão de *Daphnia lumholtzi* em ambientes pertencentes a um trecho da bacia do rio Paraná. Foram amostrados 48 pontos distribuídos em reservatórios, lagoas, tributários e rio, associados à planície de inundação do alto rio Paraná, em novembro de 2013 e agosto de 2014. Maiores densidades de *D. lumholtzi* foram registradas em reservatórios e as densidades da espécie não nativa foram influenciadas negativamente pela distância geográfica dos pontos amostrados e positivamente pela disponibilidade de recurso alimentar. Não foi encontrada relação significativa com a resistência biótica. Portanto, além da influência da disponibilidade de recurso alimentar, o aumento da distribuição da espécie registrado em agosto de 2014, pode ter sido consequência da alta densidade registrada pela mesma no reservatório de Porto Primavera, logo acima do trecho amostrado no rio Paraná. Desta forma, observa-se que os reservatórios funcionaram como uma fonte de propágulo para a invasão da espécie e o rio Paraná como um canal de dispersão. Além disso, a disponibilidade de recurso alimentar desempenha um papel fundamental no estabelecimento de *D. lumholtzi* na bacia estudada.

PALAVRAS-CHAVE: *Daphnia lumholtzi*, disponibilidade de recurso, reservatórios e resistência biótica.

ABSTRACT: Several factors affect the invasion of aquatic environments by non-native species, and the aim of this study was to evaluate the influence of reservoirs (entrance for invasive propagules), availability of food resources (phytoplankton density), and biotic resistance (richness of cladocerans) in invasion process of *Daphnia lumholtzi* to the Paraná River basin environments. We sampled 48 points distributed in reservoirs, lakes, tributaries and river, belonging to the upper Parana River floodplain, on November 2013 and August 2014. Higher densities of *D. lumholtzi* were recorded in reservoirs, and densities of non-native species were negatively influenced by the geographical distance of sampling points and positively influenced by availability of food resources. There was no significant relation with the biotic resistance. Besides the availability of food resources influence, increasing in the species distribution recorded on August 2014 may be consequence of the highest density registered in Porto Primavera reservoir, upstream of the sampled section in Parana River. Thus, we observed that reservoirs have a role as a propagules source of non-native species and the Paraná River acts as a dispersion channel. In addition, the availability of food resources plays a key role in *D. lumholtzi* establishment in Paraná River basin environments.

KEYWORDS: *Daphnia lumholtzi*, resource availability, biotic resistance, reservoirs.

2.1 INTRODUÇÃO

As invasões biológicas constituem uma das principais ameaças à integridade de ecossistemas aquáticos, tanto dulcícolas como marinhos (Lennon et al. 2001). Porém, muito além dos prejuízos econômicos, a introdução de espécies, incluindo peixes (Ogutu-Ohwayo 1990; Britton & Orsi 2012; Sepulveda et al. 2013), moluscos (Darrigran 2002; Oliveira et al. 2006) e crustáceos zooplânctônicos (Lehman 1987), pode levar à perda da diversidade biológica através de extinções de espécies nativas, por competição, predação e alteração de habitat (Mack et al. 2000), além de provocar alterações na transferência de energia e matéria dentro desses ecossistemas (Yan & Pawson 1997; Stewart & Sprules 2011).

As atividades antrópicas em ecossistemas naturais, como a construção de barragens, canais, represas e reservatórios, têm tornado esses ecossistemas cada vez mais vulneráveis às invasões (Dzialowski et al. 2000; Havel et al. 2005a). Essas alterações podem modificar a morfologia do sistema, suas propriedades abióticas e sua dinâmica de funcionamento, levando a uma desestruturação das comunidades naturais e favorecendo processos de introdução e estabelecimento de espécies não nativas (Parkes & Duggan 2012).

Recentemente, hipóteses sobre quais fatores têm maior influência sobre a resistência de um ambiente à invasão estão sendo amplamente testadas. Entre elas, as alterações na disponibilidade de recurso, resultante da transformação dos ambientes naturais, e a resistência biótica são apontadas como dois dos principais potencializadores da vulnerabilidade do ambiente à invasão (Elton 1958; Davis et al. 2000; Havel et al. 2005a; Mormul et al. 2012).

A facilitação do estabelecimento de espécies devido ao aumento da disponibilidade de recurso é atualmente uma das principais explicações para os eventos de invasão por espécies não nativas (Davis et al. 1998; Daleo et al. 2009). Davis et al. (2000), ao proporem a “teoria da flutuabilidade de recurso”, afirmam que espécies invasoras terão mais sucesso no processo de invasão se não encontrarem competição intensa pelos recursos das espécies residentes. Dessa forma, espécies invasoras precisam ter acesso a recursos disponíveis para que possam invadir um novo ambiente, e comunidades com maiores quantidades de recursos tornam-se mais suscetíveis à invasão (Davis et al. 2000).

O conceito de resistência biótica sugere que ambientes com comunidades mais diversas (riqueza de espécies) seriam mais resistentes à invasão do que aqueles com menor número de espécies (Elton 1958). Esta concepção baseia-se na teoria de nichos proposta por Hutchinson (1957), na qual os nichos em comunidades mais ricas estariam amplamente ocupados, tornando-se indisponíveis para novas espécies colonizadoras. Embora

primariamente esta teoria tenha sido dirigida para ambientes terrestres, estudos com a comunidade zooplanctônica dulcícola foram realizados corroborando esta hipótese (Dzialowski et al. 2000; Duggan et al. 2012).

Daphnia lumholtzi G. O. Sars, 1885 (Crustacea: Branchiopoda) é uma espécie nativa da Austrália, sul da Ásia e norte da África (Benzie 1988). Apresentou seu primeiro registro na América do Norte em 1990 (Sorensen & Sterner 1992; Havel & Hebert 1993), onde, pouco mais de uma década depois, sua presença já era constatada em mais de 125 lagos e reservatórios (Havel & Shurin 2004). No Brasil, dez anos após o seu primeiro registro (Zanata et al. 2003), essa espécie vem sendo registrada em cada vez mais ambientes pertencentes à planície de inundação do alto rio Paraná (Simões et al. 2009).

Daphnia lumholtzi está entre as espécies de maior tamanho que compõem a comunidade zooplanctônica. Características morfológicas como a presença de espinhos nas partes laterais do elmo, e o fato dos espinhos nas partes superior da cabeça e posterior da carapaça serem maiores do que aqueles apresentados por outras espécies de *Daphnia*, a tornam de fácil distinção (Simões et al. 2009). Em um estudo realizado por Swaffar & O'Brien (1996), os autores ressaltaram a eficiência destas adaptações morfológicas em evitar a predação por pequenas espécies de peixes planctívoros, embora esta questão ainda seja contraditória (Lienesch & Gophen 2001; Effert & Pederson 2006).

A planície de inundação do alto rio Paraná vem sofrendo alterações na sua estrutura e dinâmica desde o início da construção de reservatórios na bacia, e tais alterações foram acentuadas após a construção do último reservatório a montante em 1998 (UHE Engenheiro Sérgio Motta ou reservatório de Porto Primavera) (Agostinho et al. 2009). Dentre as principais alterações a jusante destas barragens, destaca-se o processo de oligotrofização, decorrente da sedimentação de material particulado nos reservatórios. Após 1998, este efeito foi constatado em quase todos os ambientes adjacentes à calha do rio Paraná, na área da planície de inundação (Roberto et al. 2009). Estudos mostraram que a riqueza de espécies planctônicas, bem como a densidade de alguns grupos, reduziram-se no primeiro trecho da planície, a jusante da barragem de Porto Primavera e a foz do rio Ivinhema (Bonecker et al. 2009; Bovo-Scomparin et al. 2013).

Segundo o que é proposto por Havel et al. (2005a), que reservatórios facilitam a invasão por espécies não nativas, pode-se considerar que a cadeia de reservatórios na bacia faz com que os ambientes localizados a jusante desses reservatórios se tornem mais susceptível às invasões. Considerando que *Daphnia lumholtzi* tem ocorrido neste ecossistema (Simões et al. 2009) e apresenta uma elevada capacidade de dispersão (Havel et al. 2005b),

fez-se necessário o estudo sobre a ocorrência e abundância da espécie nos reservatórios a montante e na própria planície, a fim de inferir sobre a vulnerabilidade dos ambientes pertencentes a um trecho da bacia hidrográfica do alto rio Paraná à invasão de *Daphnia lumholtzi*.

Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a distribuição espacial de *Daphnia lumholtzi* em um trecho da bacia hidrográfica do alto rio Paraná e identificar quais fatores (vulnerabilidade de ambientes artificiais à invasão, disponibilidade de recurso e resistência biótica) tornam este ecossistema mais suscetível à invasão desta espécie. Dessa forma, foram testadas as seguintes hipóteses: (i) a densidade de *Daphnia lumholtzi* difere entre os trechos amostrados, sendo maior nos ambientes artificiais (reservatórios) e nos pontos mais próximos a eles; (ii) a densidade de *Daphnia lumholtzi* é influenciada positivamente por uma maior disponibilidade de recurso alimentar (densidade fitoplanctônica); (iii) menores densidades de *Daphnia lumholtzi* são encontradas em locais com maior resistência biótica (riqueza de cladóceros).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Área de estudo

A bacia do rio Paraná possui uma ampla área de drenagem que é intensamente regulada por barragens destinadas, principalmente, à geração de energia elétrica e abastecimento, sendo considerada a segunda maior bacia e uma das mais barradas da América do Sul (Agostinho et al. 2004). Dentre elas, as barragens dos reservatórios de Ilha Solteira, Três Irmãos, Jupia, Porto Primavera e Rosana (Figura 1 e Tabela 1) apresentam forte influência sobre várias características físicas e químicas do rio Paraná, como o nível hidrológico do rio.

A jusante da cadeia de reservatórios, citada acima, se localiza o último trecho do livre de barragens do rio Paraná. No seu último trecho no Brasil, este rio está associado a uma planície de inundação (planície de inundação do alto rio Paraná), que é caracterizada por ampla heterogeneidade ambiental. Nesta planície, que chega a 20 km de largura, anastomosam-se numerosos canais secundários, o rio Baía e os trechos inferiores dos rios Paranapanema, Ivaí, Ivinheima, Piquiri, Amambaí e Iguatemi; além de canais, lagoas abertas e ressacos. Essa planície possui ainda, um importante papel ambiental, por ser um sistema com elevada diversidade biológica (Agostinho et al. 2004).

Tabela 1. Características dos reservatórios estudados*. (TR – Tempo de residência da água, Vol. – Volume total, Altura – Altura da barragem).

Reservatórios	Rio	TR (dias)	Área (Km ²)	Vol. (Km ³)	Altura (m)	Ano de enchimento
Ilha Solteira	Paraná	47,6	1.26	21,2	74	1973
Três Irmãos	Tietê	217,9	817	14	82	1991
Jupiaá	Paraná	6,9	352	3,68	43	1968
Rosana	Parapanema	18,6	220	1,9	30	1987
Porto Primavera	Paraná	33,9	2.14	20	38	1998

* Dados obtidos em Agostinho et al. (2007).

2.2.2 *Desenho amostral*

Foram realizadas amostragens em novembro de 2013 e agosto de 2014, em 48 pontos ao longo da bacia hidrográfica do rio Paraná, compreendendo os estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná. O mês de novembro foi selecionado para amostragem por se tratar de um período de início de chuvas, o que poderia apresentar grande influência sobre a dispersão de *Daphnia lumholtzi*. Por sua vez, o mês de agosto foi selecionado por se tratar de um período de seca, em que o efeito da diluição sobre a densidade dos organismos é menor. Em ambos os meses são registradas temperaturas mais elevadas, o que está relacionado positivamente com a densidade dessa espécie (Lennon et al. 2001).

Foram realizadas nesses períodos, além das amostragens nos reservatórios (reservatórios de Ilha Solteira, Três Irmãos, Jupiaá, Porto Primavera e Rosana), amostragens em 43 pontos no trecho do rio Paraná, entre a jusante de Porto de Primavera e a montante do reservatório de Itaipu (região fluvial), sendo amostrados tributários, lagoas abertas e o canal do rio Paraná.

Cada amostragem foi realizada em um período de 12 dias. Nos reservatórios foram estabelecidos três pontos próximos a barragem, tanto no centro como o mais próximo possível das margens, e em cada um deles foi gerada uma amostra composta; em cada um dos 7 tributários foram estabelecidos três pontos de coleta (centro, margens direita e esquerda) e a amostra resultante de cada ponto também foi composta; as amostragens nas seis lagoas foram realizadas em um ponto central; e no rio Paraná, em cada um dos dez pontos de amostragem, também foram estabelecidos três pontos (centro, margens direita e esquerda) e as amostras foram individualizadas, devido a largura do canal e a presença de ilhas fluviais ao longo do trecho do rio. No total foram obtidas 48 amostras.

2.2.3 Amostragem da comunidade fitoplanctônica

As amostragens do fitoplâncton foram realizadas diretamente com frascos de vidro de 100 mL, à subsuperfície, de cada ponto de amostragem e fixadas com lugol acético. O enquadramento taxonômico das Cyanobacteria foi feito segundo Komárek & Anagnostidis (1989, 1998, 2005), e para as demais classes, segundo Reviere (2003).

A abundância da comunidade (ind.mL^{-1}) foi estimada a partir da sedimentação das amostras em câmara de Utermöhl (Utermöhl, 1958), e posteriormente foi realizada contagem de 100 campos aleatórios, sob microscópio invertido, com retículo milimétrico até a estabilização do incremento do número de indivíduos por classe. A classe dominante foi considerada como aquela (ou aquelas) que perfizeram mais de 80% da abundância.

Essa comunidade foi analisada pelo Laboratório de Fitoplâncton do Nupélia, e os dados foram cedidos para realização do estudo a fim de inferir sobre a disponibilidade de alimento nas estações de amostragem.

2.2.4 Amostragem da comunidade de cladóceros

A comunidade de cladóceros também foi amostrada a subsuperfície, com o auxílio de uma motobomba, sendo filtrados 600 L de água em rede de plâncton (68 μm). As amostras foram fixadas com solução de formaldeído a 4% tamponado com carbonato de cálcio.

A identificação das espécies de cladóceros foi realizada com auxílio de bibliografia especializada (Elmoor-Loureiro 1997; 2014), e a riqueza específica de cada amostra foi analisada até a estabilização da curva de incremento de espécies. Esses dados foram utilizados para inferência sobre a resistência biótica da riqueza de cladóceros à invasão de *Daphnia lumholtzi* nos pontos de amostragem.

As abundâncias dessa espécie e da comunidade de cladóceros (ind.m^{-3}) foram estimadas a partir da contagem de no mínimo 50 indivíduos (Bottrell et al. 1976) em três subamostragens subsequentes, obtidas com pipeta do tipo Hensen-Stempel (2,5ml), em câmaras de Sedgewick-Rafter modificada, sob microscópio óptico.

2.2.5 Análises dos dados

Para testar se a densidade média da espécie não nativa e a riqueza média de cladóceros diferiam entre os trechos amostrados, foram realizadas análises de variância. Para tanto, os pontos de amostragem foram agrupados espacialmente em diferentes trechos: (i) reservatórios a montante (R), (ii) trecho superior do rio Paraná (TS, incluindo o rio e as lagoas conectadas, um tributário da margem esquerda – rio Paranapanema – e dois tributários da margem direita

– rios Baía e Ivinhema), (iii) trecho médio do rio Paraná (TM, incluindo o rio e as lagoas conectadas, um tributário da margem direita – rio Amambai – e outro da margem esquerda – rio Ivaí) e (iv) trecho inferior (TI, incluindo o rio e as lagoas conectadas, um tributário da margem direita – rio Iguatemi – e outro da margem esquerda – rio Piquirí) em cada um dos meses de coleta.

Para averiguar se a densidade média da espécie não nativa e a riqueza média de cladóceros, em cada um dos meses de amostragem, diferiam entre os trechos citados acima e para verificar se os meses de amostragem diferiam entre si (hipóteses i e iii), foram realizadas ANOVAs unifatoriais: espaço e tempo quando atendidos os pressupostos, e, Kruskal-Wallis, quando não atendidos os pressupostos. A significância considerada foi de $p < 0,05$ e as análises foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico Statistica versão 7.1 (Statsoft, 2005).

Para testar a relação entre a distância geográfica e a densidade de *Daphnia lumholtzi* (hipótese i), foi realizada uma regressão linear simples para cada mês de amostragem (Sokal & Rohlf 1991). A distância geográfica foi calculada com base nas coordenadas geográficas dos pontos de amostragem e posteriormente foi calculada uma matriz de distância euclidiana com base no ponto de amostragem mais distante (reservatório de Ilha Solteira) através do programa estatístico R, versão 2.14.1 (R Core Team 2011), utilizando o pacote estatístico vegan (Oksanen et al., 2014). A distância euclidiana entre os pontos com base no ponto de amostragem mais distante foi usada para efetuar a análise de regressão simples juntamente com a densidade de *Daphnia lumholtzi* de cada ponto. Os pressupostos de normalidade, linearidade e homocedasticidade foram testados e o $p < 0,05$ foi considerado significativo. Essa análise foi realizada com o auxílio do pacote estatístico Statistica versão 7.1 (Statsoft, 2005).

Para testar as relações entre a abundância do recurso alimentar disponível (densidade fitoplanctônica) e resistência biótica (riqueza de espécies de cladóceros) com a abundância de *Daphnia lumholtzi* (hipóteses ii e iii) foram realizadas regressões lineares simples (Sokal & Rohlf, 1991). Os dados foram padronizados em $\log(x+1)$. Os pressupostos de normalidade, linearidade e homocedasticidade foram testados para cada análise. Estas análises foram realizadas com o programa estatístico R, versão 2.14.1 (R Core Team 2011) e a sua significância foi considerada quando a probabilidade foi menor do que 0,05.

2.3 RESULTADOS

Daphnia lumholtzi foi registrada em 27 dos 48 pontos de amostragem, sendo eles: três reservatórios, vinte e três pontos ao longo do canal do rio Paraná e uma lagoa conectada ao rio Paraná (Figura 1). Em novembro de 2013 a espécie não nativa foi registrada em 10 pontos de amostragem (Figura 2a) e em agosto de 2014 (Figura 2b) em 23 pontos.

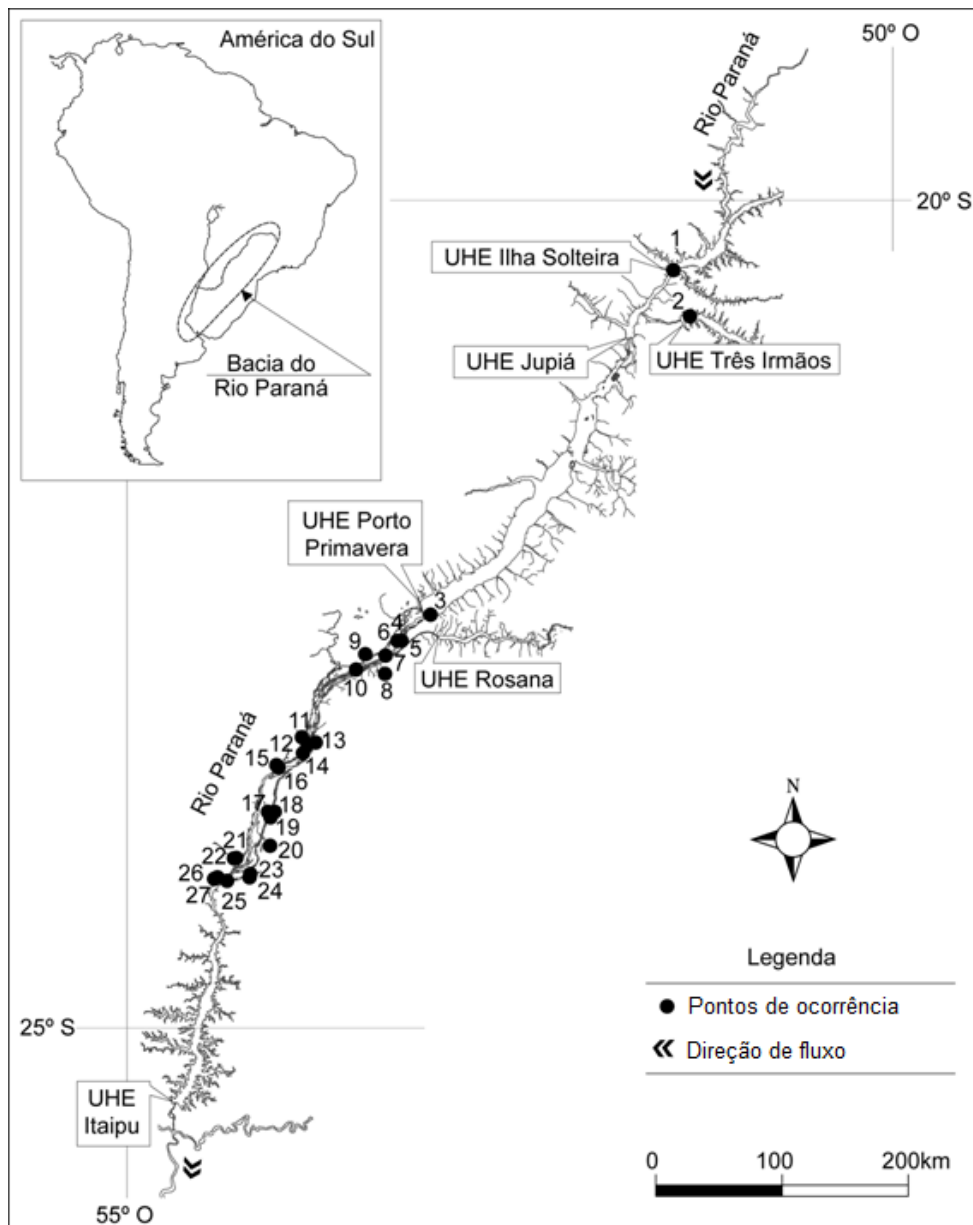


Figura 1. Mapa do trecho de estudo destacando os pontos de ocorrência de *Daphnia lumholtzi* durante todo o período de amostragem. Reservatórios de (1) Ilha Solteira; (2) Três Irmão; (3) Porto Primavera; rio Paraná (4) ponto 1, margem esquerda; (5) ponto 1, centro; (6) ponto 1, margem direita, (7) ponto 2, centro; (8) ponto 3, centro; (9) ponto 2, margem direita, (10) ponto 3, margem direita; (11) ponto 4, centro; (12) ponto 4, margem direita, (13) ponto 4, margem esquerda; (14) ponto 5, centro; (15) ponto 7, centro, (16) ponto 7, margem esquerda; (17) ponto 6, centro; (18) ponto 6, margem direita, (19) ponto 6, margem esquerda, (20) lagoa São

João; (21) ponto 10, margem esquerda, (22) ponto 10, centro; (23) ponto 11, margem direita; (24) ponto 11, margem esquerda, (25) ponto 12, centro; (26) ponto 12, margem direita, (27) ponto 12, margem esquerda.

A densidade da espécie variou de 1 a 885 ind/m³ entre os pontos de amostragem em todo o estudo. Em novembro de 2013, a maior densidade da espécie foi registrada no reservatório de Três Irmãos e em agosto de 2014, em Porto Primavera (Figura 2 e Tabela 2). A densidade média de *Daphnia lumholtzi* diferiu significativamente entre os meses amostrados ($H= 8,76$; $p=0,003$) (Figura 3). No mês de novembro não foi possível testar a diferença da densidade da espécie entre os trechos, pois esta ocorreu em baixas densidades e em poucos pontos de amostragem (Figura 2 e tabela 2) e no mês de agosto de 2014 não houve diferença significativa na densidade de *Daphnia lumholtzi* entre os trechos ($H= 2,97$; $p=0,390$).

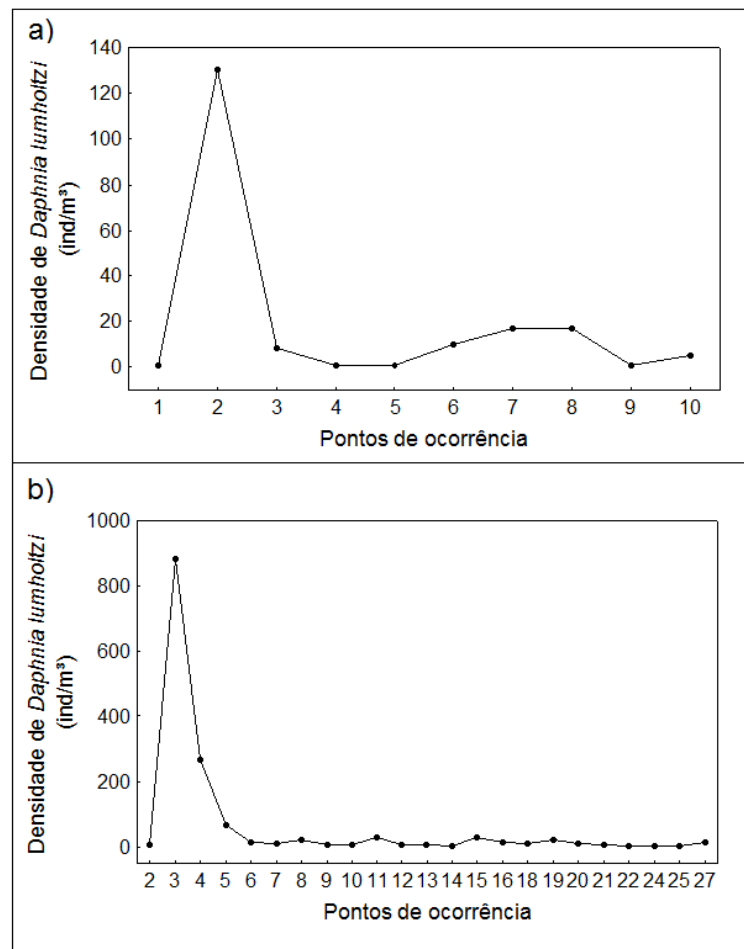
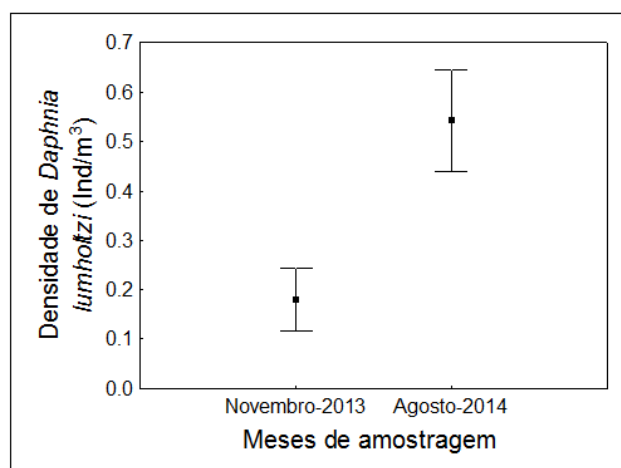


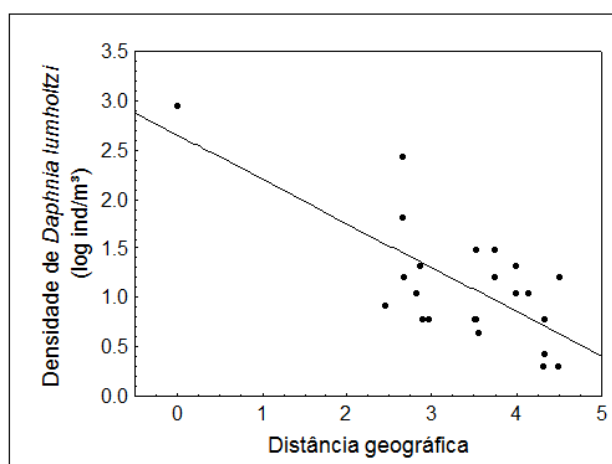
Figura 2. Densidade de *Daphnia lumholtzi* nos pontos de amostragem onde ela ocorreu em (a) novembro de 2013 e (b) agosto de 2014. Escalas do eixo Y diferenciadas. Para o reconhecimento dos pontos ver Figura 1.

Tabela 2. Densidade de *Daphnia lumholtzi* em cada mês de amostragem

	Densidade de <i>Daphnia lumholtzi</i> (ind/m ³)	
	Novembro – 2013	Agosto – 2014
média	3,9	29,8
± DP	18,9	132,1
máximo	130,2	885,1
mínimo	1,0	1,0

**Figura 3.** Densidade de *Daphnia lumholtzi* registrada nos meses de amostragem (símbolo = média; barra= erro).

No mês de novembro não foi possível testar a influência da distância geográfica sobre a densidade da espécie, pois também, esta ocorreu em baixas densidades e em poucos pontos de amostragem, porém, no mês de agosto de 2014, foi observada uma relação negativa e significativa da distância geográfica sobre a densidade da espécie ($R^2= 0,01$; $p= 0,61$) (Figura 4).

**Figura 4.** Relação entre as densidades de *Daphnia lumholtzi* e a distância geográfica entre os pontos de amostragem em que a espécie ocorreu no mês de agosto de 2014.

Quanto à disponibilidade de alimento (Apêndice 1), foi encontrada uma relação positiva e significativa entre a densidade de *Daphnia lumholtzi* e a densidade fitoplanctônica ($R^2_{ajustado}=0.69$; $p<0.001$), (Figura 5).

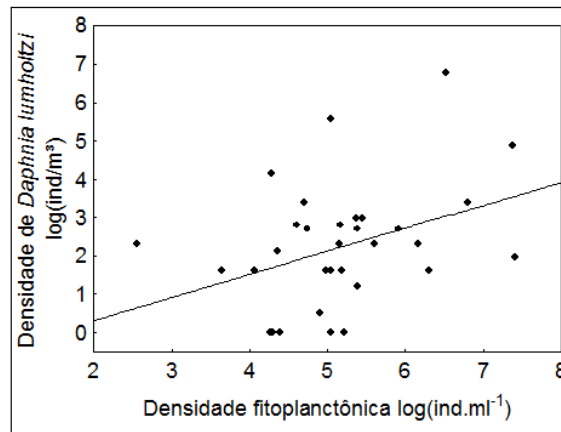


Figura 5. Relação entre as densidades de *Daphnia lumholtzi* e da comunidade fitoplanctônica nos pontos de ocorrência da espécie, durante os dois meses de amostragem.

Em todo o estudo foram registradas 49 espécies de cladóceros (Apêndices 2 e 3), sendo que 41 espécies ocorreram em novembro de 2013, e 30, em agosto de 2014 (Figura 6).

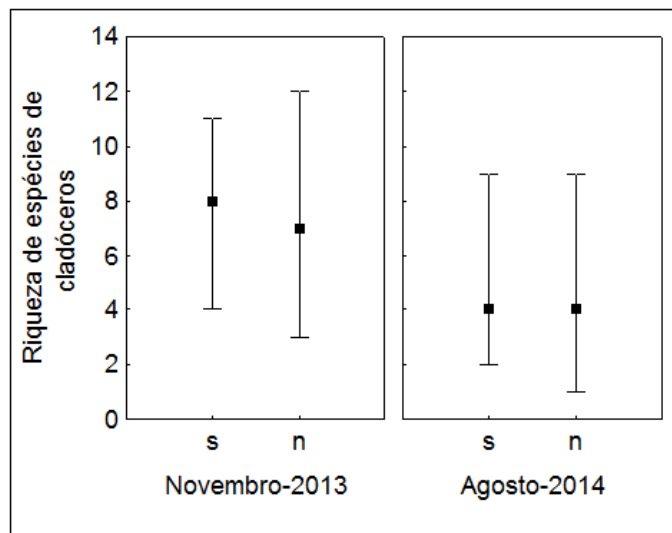


Figura 6. Valores (■) médio, (I) máximo e mínimos da riqueza de espécies de cladóceros nos pontos em que a espécie invasora *Daphnia lumholtzi* (s) ocorreu e (n) não ocorreu nos diferentes meses de amostragem.

A riqueza de espécies de cladóceros não apresentou uma diferença significativa entre os trechos de amostragem (novembro de 2013: $F=1.27$; $p=0,29$; agosto de 2014: $F= 0,40$; $p=0,75$), porém diferiu significativamente entre os meses (ANOVA, $F=27.33$; $p < 0,001$)

(Figura 7), apresentando menores valores de riqueza no mês em que a espécie não nativa apresentou a maior frequência de ocorrência. No entanto, a riqueza de espécies de cladóceros não apresentou relação significativa com a densidade de *Daphnia lumholtzi* ($R^2= 0,006$; $p=0.076$).

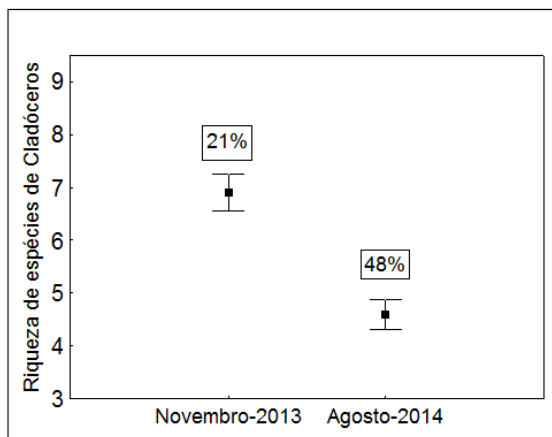


Figura 7. Valores médios \pm erro padrão da riqueza de espécies de cladóceros nos dois meses de amostragem com as porcentagens de frequência de ocorrência de *Daphnia lumholtzi* para cada mês.

2.4 DISCUSSÃO

Daphnia lumholtzi pode ser considerada como uma espécie estabelecida na bacia do rio Paraná devido a sua ampla distribuição no local de estudo, as altas densidade registradas pela espécie nos reservatórios de Porto Primavera e Três Irmãos e a capacidade da espécie de manter populações nos ambientes conectados, no próprio rio Paraná e no reservatório de Três Irmãos, desde o seu primeiro registro em 2003 (Zanata et al. 2003; Simões et al. 2009).

A densidade elevada de *Daphnia lumholtzi* encontrada nos reservatórios e a influência da distância geográfica sobre as densidades de *Daphnia lumholtzi*, ainda que os reservatórios não tenham apresentado diferenças significativas quanto à densidade média de *Daphnia lumholtzi* em relação aos demais trechos de amostragens, sugerem que estes ambientes têm um importante papel no processo de invasão desta espécie. Havel e Shurin (2004) relatam uma maior incidência das populações de *Daphnia lumholtzi* em ambientes de reservatórios nos Estados Unidos e discutem, ainda, o papel dos reservatórios como facilitadores do processo de invasão (Havel et al. 2005a).

Teorias mais antigas já discutiam a suscetibilidade de ambientes mais simples e antropizados à invasão, devido às interações interespecíficas serem mais fortes nos

ecossistemas naturais, provendo barreiras ao sucesso de colonização (Elton 1958). Casos de invasão a partir de reservatórios já foram registrados para outras espécies (Johnson et al. 2008), inclusive na planície de inundação do alto rio Paraná, como no caso do ciclídeo *Geophagus proximus* (Gois et al. 2014).

As maiores densidade de *Daphnia lumholtzi* registradas nos reservatórios e o fato das ocorrências na planície de inundação do alto rio Paraná limitarem-se a ambientes conectados ao rio, demonstram a importância do rio Paraná como um canal de dispersão para esta espécie, dos reservatórios para outros locais da planície. Para os organismos aquáticos, as ligações que os rios exercem entre os reservatórios podem aumentar consideravelmente as taxas de dispersão dos organismos zooplancônicos (Shurin & Havel 2002). Isso pode ser observado pelo fato de que em novembro de 2013 *Daphnia lumholtzi* apresentou uma baixa frequência de ocorrência e menos de um ano depois o número de registros dobrou, aumentando sua distribuição em agosto de 2014.

A ocorrência de *Daphnia lumholtzi* no baixo rio Paraná (Argentina) (Kotov & Taylor 2014) apenas três anos após ser registrada no alto rio Paraná (Brasil) e a rápida capacidade de dispersão desta espécie, comentada por Havel e Shurin (2004), suportam a ideia de que o rio Paraná pode ter um papel fundamental na dispersão da espécie para outros locais, podendo futuramente atingir ambientes localizados dentro de unidades de conservação ambiental a jusante dos reservatórios, na planície de inundação.

Estudos de longa duração realizados na planície de inundação do alto rio Paraná mostram o registro de *Daphnia lumholtzi*, no ano de 2013, em um canal que liga o rio Paraná a um de seus tributários na margem direita (Sub-bacia do rio Ivinhema), dentro de uma unidade de conservação ambiental (Parque Estadual das Várzeas do Rio Ivinhema). Entretanto, a espécie nunca foi registrada em qualquer outro ambiente pertencente a esta sub-bacia, e nem na sub-bacia de outro tributário na planície (Sub-bacia do rio Baía) (Bonecker, dados não publicados).

Na maior parte do estudo, foi possível observar que quando *Daphnia lumholtzi* ocorreu em maiores densidades, a densidade fitoplanctônica também foi maior, e quando a espécie ocorreu em menores densidade ou não ocorreu, a densidade fitoplanctônica também foi menor, indicando que suas populações colonizaram ambientes com maior quantidade de recurso. Davis et al. (2000) predizem que ambientes que apresentarem maior disponibilidade de um recurso limitante, seja porque o uso deste recurso por parte da comunidade nativa declinou ou por que o recurso aumentou mais rapidamente do que a comunidade é capaz de

assimilar, tornam-se mais vulneráveis a invasão por apresentar mais recurso disponível ao invasor.

A densidade de *Daphnia lumholtzi* também apresentou uma relação positiva e significativa com a densidade fitoplanctônica, corroborando a hipótese de que uma maior disponibilidade de alimento favorece maiores densidades da espécie introduzida. Resultado semelhante foi encontrado em um estudo realizado com outra espécie de cladóceros invasor (*Bythotrephes longimanus*), onde foi encontrada uma relação positiva do estabelecimento da espécie com ambientes mais produtivos (Brown et al. 2012).

Pesquisas tentam compreender quais fatores tornam os ambientes mais suscetíveis à invasão de *Daphnia lumholtzi* (Lennon et al. 2001; Dzialowski et al. 2007). Dzialowski et al. (2007) não observaram influência da disponibilidade de alimento (clorofila a) sobre o estabelecimento ou a densidade dessa espécie em condições experimentais, enquanto que a resistência biótica (biomassa e riqueza de espécies de microcrustáceos) foi apontada como o principal fator que impediu o estabelecimento da espécie não nativa. Embora estes resultados sejam opostos aos encontrados por este estudo, no qual não foi observada influência significativa da riqueza de espécies de cladóceros sobre a densidade de *Daphnia lumholtzi*, variáveis diferentes foram usadas como medida de disponibilidade de recursos e resistência biótica em cada estudo, podendo explicar a divergência entre estes resultados.

Acredita-se que maiores disponibilidade de recurso reduzam a competição por alimento (Davis et al. 1998), possibilitando que a espécie invista mais em reprodução (Lehman 1987), podendo assim, colonizar mais ambientes. Além disso, quanto maior o distúrbio a que um ambiente está sujeito, maiores são as variações ambientais que nele ocorre e maiores podem ser as alterações na disponibilidade de recursos, como por exemplo, o recurso alimentar (Havel et al. 2005a). Pelo fato de os reservatórios serem ambientes mais sujeitos a estes distúrbios, isto pode, em certos momentos, favorecer uma maior densidade de algas (Havel et al. 2005a), explicando assim, as maiores densidades de *Daphnia lumholtzi* registradas nesses ambientes.

Desde que foi registrada pela primeira vez na planície de inundação do alto rio Paraná (Simões et al. 2009), *Daphnia lumholtzi* não foi registrada novamente por um período de quase quatro anos. A partir de 2011, a espécie passou a ter novos registros em poucos ambientes e em baixas densidades (Bonecker, dados não publicados). Tinha-se como pressuposto deste estudo, que a resistência biótica fosse um fator importante na explicação das baixas densidades da espécie ou da ausência da mesma nos pontos de amostragem localizados na planície de inundação, corroborando os resultados experimentais encontrado

por Dzialowski et al. (2007). Porém, não foi verificada influência significativa da resistência biótica sobre as densidades das populações da espécie, ainda que o período com menor riqueza de cladóceros tenha coincidido com o período de maior frequência de ocorrência de *Daphnia lumholtzi*. Provavelmente, um dos fatores que influenciou o aumento da frequência de ocorrência da espécie de novembro de 2013 para agosto de 2014 não tenha relação com a diversidade de cladóceros e sim, com a alta densidade de *Daphnia lumholtzi* registrada no reservatório de Porto Primavera. Como já dito anteriormente, o reservatório acaba funcionando como uma fonte de propágulos desta espécie para o rio (Havel et al. 2015), e isso possibilitou que a alta densidade apresentada pela espécie durante este período fosse suficiente para que ela se dispersasse amplamente pelo rio Paraná. De fato, a relação da resistência biótica com a capacidade de um ambiente em resistir à invasão de uma espécie, tem se mostrado bastante contraditória em diversos estudos (Levine & D'Antonio 1999), sendo que outros autores evidenciam que, possivelmente, variáveis como a pressão de propágulo tenham maior influência nesse processo (Von Holle & Simberloff, 2005).

Embora ainda não tenha sido identificado nenhum efeito negativo sobre as comunidades locais ou a espécie ainda não tenha sido registrada nos ambientes pertencentes à unidade de conservação ligada ao rio Paraná, este estudo mostra que os reservatórios e a disponibilidade de recurso alimentar têm facilitado o estabelecimento de *Daphnia lumholtzi*, e que a conectividade entre os ambientes da planície de inundação propicia a dispersão desta espécie, fazendo com que ela atinja grandes distâncias rapidamente. Sendo assim, monitoramentos constantes devem ser realizados a fim de identificar quais outros fatores podem ser responsáveis pelo aumento da invasibilidade destes ambientes e quais os possíveis efeitos que esta espécie pode exercer sobre a comunidade local.

REFERÊNCIAS

- Agostinho AA, Bonecker CC, Gomes LC (2009) Effects of water quantity on connectivity: the case of the upper Paraná River floodplain. *Ecohydrol Hydrobiol* 9:99–113
- Agostinho AA, Gomes LC, Pelicice FM (2007) Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Eduem, Maringá
- Agostinho AA, Gomes LC, Thomaz SM, Hahn NS (2004) The upper Paraná river and its floodplain: main characteristics and perspectives for management and conservation. In: *The upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation*. Backhuys Publishers, Leiden, pp 381–393

- Benzie JAH (1988) The systematics of Australian *Daphnia* (Cladocera, Daphniidae). Species descriptions and keys. *Hydrobiologia* 166:95–161
- Bonecker CC, Aoyagui ASM, Santos RM (2009) The impact of impoundment on the rotifer communities in two tropical floodplain environments: interannual pulse variations. *Brazilian J Biol* 69:529–537
- Bottrell HH, Duncan A, Gliwicz ZM, et al. (1976) Review of some problems in zooplankton production studies. *Norw J Zool* 24:419–456
- Bovo-Scomparin VM, Train S, Rodrigues LC (2013) Influence of reservoirs on phytoplankton dispersion and functional traits: a case study in the Upper Paraná River, Brazil. *Hydrobiologia* 702:115–127
- Britton JR, Orsi ML (2012) Non-native fish in aquaculture and sport fishing in Brazil: Economic benefits versus risks to fish diversity in the upper River Paraná Basin. *Rev Fish Biol Fish* 22:555–565
- Brown ME, Branstrator DK, Shannon LJ (2012) Population regulation of the spiny water flea (*Bythotrephes longimanus*) in a reservoir: Implications for invasion. *Limnol Oceanogr* 57:251–271
- Daleo P, Alberti J, Iribarne O (2009) Biological invasions and the neutral theory. *Divers Distrib* 15:547–553
- Darrigran G (2002) Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. *Biol Invasions* 4:145–156
- Davis MA, Grime JP, Thompson K (2000) Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility. *J Ecol* 88:528–534
- Davis MA, Wrage KJ, Reich PB (1998) Competition between tree seedlings and herbaceous vegetation: Support for a theory of resource supply and demand. *J Ecol* 86:652–661.
- Duggan I, Robinson K, Burns CW, et al (2012) Identifying invertebrate invasions using morphological and molecular analyses: North American *Daphnia* “*pulex*” in New Zealand fresh waters. *Aquat Invasions* 7:585–590
- Dzialowski AR, Lennon JT, Smith VH (2007) Food web structure provides biotic resistance against plankton invasion attempts. *Biol Invasions* 9:257–267
- Dzialowski AR, O’Brien WJ, Swaffar SM (2000) Range expansion and potential dispersal mechanisms of the exotic cladoceran *Daphnia lumholtzi*. *J Plankton Res* 22:2205–2223
- Effert EL, Pederson CL (2006) Failure of cyclomorphic features to deter size-dependent predation by *Leptodora kindti* on *Daphnia lumholtzi*. *J Freshw Ecol* 21:457–466
- Elmoor-Loureiro, LMA 1997 Manual de identificação de cladóceros límnicos do Brasil. Universal, Brasília.

- Elmoor-Loureiro, LMA Cladóceros do Brasil: Famílias Chydoridae e Euryceridae. Disponível em: <<https://cladocera.wordpress.com/>>. Acessado em: novembro de 2014
- Elton CS (1958) The ecology of invasions by animals and plants. Chicago, Londres
- Gois KS, Pelicice FM, Gomes LC, Agostinho AA (2014) Invasion of an Amazonian cichlid in the Upper Paraná River: facilitation by dams and decline of a phylogenetically related species. *Hydrobiologia* 746:401–413
- Havel JE, Hebert PDN (1993) *Daphnia lumholtzi* in North America: Another exotic zooplankter. *Limnol Oceanogr* 38:1823–1827
- Havel JE, Kovalenko KE, Thomaz SM, et al (2015) Aquatic invasive species: challenges for the future. *Hydrobiologia* 147–170
- Havel JE, Lee CE, Zanden MJV (2005a) Do reservoirs facilitate invasions into landscapes? *Bioscience* 55:518-525
- Havel JE, Shurin JB (2004) Mechanisms, effects, and scales of dispersal in freshwater zooplankton. *Limnol Oceanogr* 49:1229–1238
- Havel JE, Shurin JB, Jones JR (2005b) Environmental limits to a rapidly spreading exotic cladoceran. *Ecoscience* 12:376–385
- Hutchinson GE (1957) Population studies - animal ecology and demography - concluding remarks. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 22:415–427
- Johnson PTJ, Olden JD, Zanden MJV (2008) Dam invaders: impoundments facilitate biological invasions into freshwaters. *Front Ecol Environ* 6:357–363
- Komárek J, Anagnostidis K (1989) Modern approach to the classification system of Cyanophytes: Nostocales. *Arch Hydrobiol Supplement* 3:247-345
- Komárek J, Anagnostidis K (1998) Cyanoprokaryota. 1. Teil Chroococcales. In Ettl, H., G. Gärtner, H. Heynig & D. Möllenhauer, D. (Ed.). Jena, Sübwasserflora von Mitteleuropa. Gustav Fischer Verlag
- Komárek J, Anagnostidis K (2005) Cyanoprokaryota. 2. Teil Oscillatoriales. In Büdel, B., G. Gärtner, L. Krienitz & M. Schagerl, D. (Ed.). München, Sübwasserflora von Mitteleuropa. Elsevier GmbH
- Kotov AA., Taylor DJ (2014) *Daphnia lumholtzi* Sars, 1885 (Cladocera: Daphniidae) invades Argentina. *J Limnol* 73:167–172
- Lehman JT (1987) Palearctic predator invades North American Great Lakes. *Oecologia* 74:478–480
- Lennon JT, Smith VH, Williams K (2001) Influence of temperature on exotic *Daphnia lumholtzi* and implications for invasion success. *J Plankton Res* 23:425–433

- Levine JM, D' Antonio CM (1999) Elton revisited : a review of evidence linking diversity and invasibility. *Oikos* 87:15–26
- Lienesch PW, Gophen M (2001) Predation by inland silversides on an exotic cladoceran, *Daphnia lumholtzi*, in Lake Texoma, U.S.A. *J Fish Biol* 59:1249–1257
- Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, et al (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecol Appl* 10:689–710
- Mormul RP, Ahlgren J, Ekvall MK, et al (2012) Water brownification may increase the invasibility of a submerged non-native macrophyte. *Biol Invasions* 14:2091–2099
- Ogutu-Ohwayo R (1990) The decline of the native fishes of lakes Victoria and Kyoga (East Africa) and the impact of introduced species, especially the Nile perch, *Lates niloticus*, and the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environ Biol Fishes* 27:81–96
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, et al. (2014) *Vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.2-0. <<http://CRAN.R-project.org/package=vegan>>
- Oliveira MD, Takeda AM, De Barros LF, et al (2006) Invasion by *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) of the Pantanal Wetland, Brazil. *Biol Invasions* 8:97–104
- Parkes SM, Duggan IC (2012) Are zooplankton invasions in constructed waters facilitated by simple communities? *Divers Distrib* 18:1199–1210
- R Development core team. R: A Language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for statistical computing. 2011
- Reviere B (2003) *Biologie et phylogénie des algues, tome 2*. Paris: Éditions Berlin
- Roberto MC, Santana NN, Thomaz SM (2009) Limnology in the Upper Paraná River floodplain: large-scale spatial and temporal patterns, and the influence of reservoirs. *Braz J Biol* 69:717–725
- Sepulveda AJ, Rutz DS, Ivey SS, et al (2013) Introduced northern pike predation on salmonids in southcentral Alaska. *Ecol Freshw Fish* 22:268–279
- Shurin JB, Havel JE (2002) Hydrologic connections and overland dispersal in an exotic freshwater crustacean. *Biol Invasions* 4:431–439
- Simões NR, Robertson BA, Lansac-Tôha FA, et al (2009) Exotic species of zooplankton in the Upper Paraná River floodplain, *Daphnia lumholtzi* Sars, 1885 (Crustacea: Branchiopoda). *Braz J Biol* 69:551–558
- Sokal RR, Rohlf FJ (1991) *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. W.H. Freeman and Company. New York

- Sorensen KH, Sterner RW (1992) Extreme cyclomorphosis in *Daphnia lumholtzi*. *Freshw Biol* 28:257–262
- Statsoft (2005) Statistica for Windows. (Version 7.1). Statsoft Inc., Tulsa., USA
- Stewart TJ, Sprules WG (2011) Carbon-based balanced trophic structure and flows in the offshore Lake Ontario food web before (1987-1991) and after (2001-2005) invasion-induced ecosystem change. *Ecol Modell* 222:692–708
- Swaffar SM, O'Brien WJ (1996) Spines of *Daphnia lumholtzi* create feeding difficulties for juvenile bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *J Plankton Res* 18:1055–1061
- Utermöhl H (1958) Zur. Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitt. d. Internat. Vereinig. f. Limnologie.* 9:1-39
- Von Holle B, Simberloff D (2005) Ecological resistance to biological invasion overwhelmed by propagule pressure. *Ecology* 86:3212–3218
- Yan ND, Pawson TW (1997) Changes in the crustacean zooplankton community of Harp Lake, Canada, following invasion by *Bythotrephes cederstroemi*. *Freshw Biol* 37:409–425
- Zanata LH, Espíndola ELG, Rocha O, Pereira RHG (2003) First record of *Daphnia lumholtzi* (SARS, 1885), exotic cladoceran, in São Paulo State (Brazil). *Braz J Biol* 63:717–720

APÊNDICE 1. Tabela de dados da densidade fitoplanctônica nos dois meses de amostragem e nos pontos em que a espécie não nativa estava ou não presente durante todo o estudo.

Tabela 3. Disponibilidade de recurso alimentar em cada período de coleta e por pontos de amostragem com a presença e ausência de *Daphnia lumholtzi*; Média \pm Desvio Padrão, Máximo e Mínimo.

		Novembro – 2013	Agosto – 2014
Densidade Fitoplanctônica (ind.ml⁻¹)	média	616,2	1487,5
	\pm DP	1493,9	4710,4
	máximo	8777,0	25099,0
	mínimo	13,0	19,0
		Presença de <i>D. lumholtzi</i>	Ausência de <i>D. lumholtzi</i>
Densidade Fitoplanctônica (ind.ml⁻¹)	média	296,4	1447,5
	\pm DP	394,7	4273,4
	máximo	1654,0	25099,0
	mínimo	13,0	19,0

APÊNDICE 2. Tabela de dados da riqueza de cladóceros nos dois meses de amostragem e nos pontos em que a espécie não nativa estava ou não presente durante todo o estudo.

Tabela 4. Riqueza de cladóceros em cada período de coleta e por pontos de amostragem com a presença e ausência de *Daphnia lumholtzi*; Média \pm Desvio Padrão, Máximo e Mínimo.

Riqueza de Cladóceros		
	Novembro – 2013	Agosto – 2014
média	6,9	4,6
\pm DP	2,4	1,9
máximo	12,0	9,0
mínimo	3,0	1,0
	Presença de <i>D. lumholtzi</i>	Ausência de <i>D. lumholtzi</i>
média	5,4	5,9
\pm DP	2,2	2,6
máximo	11,0	12,0
mínimo	2,0	1,0

APÊNDICE 3. Inventário de espécies de cladóceros que foram registradas durante o estudo.

Phylum: Arthropoda	
Subphylum: Crustacea	
Classe: Brachiopoda	
Ordem: Cladocera	
Família: Bosminidae	
<i>Bosmina freyi</i> De Melo & Hebert, 1994	<i>B. tubicen</i> Brehm, 1939
<i>B. hagmanni</i> Stingelin, 1904	<i>Bosminopsis deitersi</i> Richard, 1895
Família: Chydoridae	
<i>Acroperus tupinamba</i> Sinev & Elmoor Loureiro, 2010	<i>C. cf sphaericus</i>
<i>Alona glabra</i> Sars, 1901	<i>Coronatella monacantha</i> (Sars, 1901)
<i>A. dentifera</i> (Sars, 1901)	<i>C. poppei</i> (Richard, 1897)
<i>A. guttata</i> Sars, 1862	<i>Dunhevedia odontoplax</i> Sars, 1901
<i>A. iheringula</i> Sars, 1901	<i>Ephemeroporus barroisi</i> (Richard, 1894)
<i>A. intermedia</i> Sars, 1862	<i>E. hybridus</i> (Daday, 1905)
<i>Alonella clathratula</i> Sars, 1896	<i>E. tridentatus</i> (Bergamin, 1931)
<i>A. dadayi</i> Birge, 1910	<i>Euryalona brasiliensis</i> Brehm & Thomsen, 1936
<i>Alonella</i> sp.	<i>Graptoleberis occidentalis</i> Sars, 1901
<i>Anthalona verrucosa</i> (Sars, 1901)	<i>Karualona muelleri</i> (Richard, 1897)
<i>Bergamina lineolata</i> (Sars, 1901)	<i>Leydigia ipojucae</i> Brehm, 1938
<i>Camptocercus australis</i> Sars, 1896	<i>Nicsmirnovius cf fitzpatricki</i> (Chien, 1970)
<i>Chydorus eurynotus</i> Sars, 1901	<i>Notoalona sculpta</i> (Sars, 1901)
<i>C. parvireticulatus</i> Frey, 1987	<i>Picripleuroxus cf denticulatus</i>
<i>C. pubescens</i> Sars, 1901	
Família: Daphniidae	
<i>Ceriodaphnia cornuta</i> Sars, 1886	<i>Daphnia gessneri</i> Herbst, 1967
<i>C. reticulata</i> (Jurine, 1820)	<i>D. lumholtzi</i> (Sars, 1885)
<i>C. silvestrii</i> Daday, 1902	<i>Simocephalus serrulatus</i> Koch, 1841
Família: Ilyocryptidae	
<i>Ilyocryptus spinifer</i> Herrick, 1882	
Família: Macrothricidae	
<i>Macrothrix elegans</i> Sars, 1901	<i>M. squamosa</i> Sars, 1901
Família: Moinidae	
<i>Moina micrura</i> Kurz, 1874	<i>M. minuta</i> Hansen, 1899
Família: Sididae	
<i>Diaphanosoma birgei</i> Korineck, 1981	<i>D. spinulosum</i> Herbst, 1967
<i>D. brevireme</i> Sars, 1901	<i>D. polypina</i> Korovchinsky 1982
<i>D. fluviatile</i> Hansen, 1899	

**3 RECONSTRUINDO A ROTA DE DISPERSÃO DE UMA ESPÉCIE NÃO NATIVA
Daphnia lumholtzi (CLADOCERA) PELO CONTINENTE AMERICANO
USANDO MARCADORES GENÉTICOS²**

² Capítulo II formatado de acordo com as normas da *Biological Invasions*.

RESUMO: Ambientes aquáticos continentais têm se mostrado frágeis aos episódios de invasão biológica. Ferramentas moleculares têm sido um importante aliado para o estudo das invasões, auxiliando a recriar rotas e identificar a origem de indivíduos não nativos. Este estudo teve como objetivo comparar as sequências genéticas de populações de *Daphnia lumholtzi* provenientes da planície do alto rio Paraná com as sequências genéticas de populações desta espécie provenientes de outras partes do mundo. Procurou-se identificar a proximidade genética entre as populações desta espécie, recriar a rota de invasão da mesma neste ecossistema e identificar o seu possível local de origem. Os espécimes utilizados para o sequenciamento genético foram coletados em uma lagoa conectada ao rio Paraná, e para a comparação gênica foram utilizados os genes *COI* e *12S*. As sequências genéticas das populações de outras localidades fora do Brasil foram obtidas através do *GenBank*. Os espécimes de *Daphnia lumholtzi* sequenciados são muito próximos geneticamente das populações provenientes dos Estados Unidos e México, e consideravelmente distantes das populações provenientes da Austrália. Os dados indicam que as populações da planície foram introduzidas, provavelmente, a partir de populações provenientes dos Estados Unidos e que, possivelmente, ambas possuam uma origem comum. Além disso, a considerável distância genética que os espécimes provenientes deste estudo apresentaram das populações provenientes da Austrália sugerem que ambas possam ser espécies distintas.

PALAVRAS-CHAVE: *Daphnia lumholtzi*, rotas de invasão, sequenciamento genético, *COI*, *12S*.

ABSTRACT: Continental aquatic ecosystems have been vulnerable to episodes of invasion. Molecular techniques have been an important tool in the study of biological invasions, helping to recreate routes and identify the source of non-native individuals. The aim of this study was to compare genetic sequences of *Daphnia lumholtzi* population from Upper Paraná River floodplain, with the genetic sequences of populations from other countries. We identified genetic proximities of these populations to recreate the invasion route of this species in our ecosystem, and to identify its possible origin. Specimens applied for genetic sequencing were collected in a pond connected to the Parana River and for gene comparison, *COI* and *12S* genes were used. Genetic sequences of populations outside Brazil were obtained from GenBank. *Daphnia lumholtzi* specimens sequenced in this study are closer genetically from United States and Mexico populations and considerably distant from Australia's populations. Our data indicate that populations present in the Paraná River floodplain were probably introduced from the United States' populations and possibly both have a common origin. Moreover, genetic distance between Brazil's specimens and Australia's populations suggests that both may be even different species.

KEYWORDS: *Daphnia lumholtzi*, invasion pathway, genetic sequencing, *COI*, *12S*.

3.1 INTRODUÇÃO

As taxas de introduções de espécies não nativas em novos ambientes têm crescido nos últimos anos, e as atividades antrópicas contribuem para aceleração deste processo, rompendo barreiras biogeográficas e possibilitando a colonização de um novo ambiente por uma espécie não nativa (Havel et al. 2015). Desta forma, invasões intercontinentais têm sido cada vez mais comuns, uma vez que a barreira geográfica é transposta e nem sempre os filtros fisiológicos e biológicos são suficientes para impedir o estabelecimento da espécie não nativa.

Ambientes aquáticos continentais têm se mostrado frágeis aos episódios de invasão. A elevada conectividade que os sistemas fluviais podem apresentar constitui uma rota de fácil dispersão para espécies não nativas (Simões et al. 2009). Porém, devido ao tamanho variado dos organismos aquáticos continentais, nem sempre estes processos são fáceis de acompanhar em todas as comunidades.

Cladóceros são componentes do plâncton de água doce e possuem grande importância nas redes tróficas (Sommer & Stibor 2002). Seu elevado tamanho corporal, quando comparado aos outros organismos filtradores da comunidade zooplânctônica, permite que ele seja um bom competidor devido a sua eficiência na filtragem de alimento (Burns 1968). Pesquisas recentes mostram a importância de organismos invasores pertencentes a esta comunidade nos processos relacionados a predação, fluxo de energia e competição (Yan & Pawson 1997; Mack et al. 2000; Stewart & Sprules 2011). Apesar da dificuldade em se acompanhar este processo, devido ao tamanho destes organismos, muito já se conhece sobre o papel das invasões nesta comunidade, porém, muitos outros aspectos precisam ainda ser estudados.

Daphnia lumholtzi G. O. Sars, 1885 (Crustacea: Branchiopoda), uma espécie de cladóceros nativa da Austrália, África e Ásia, teve seu primeiro registro de invasões no continente americano nos Estados Unidos na década de 90 (Sorensen & Sterner 1992) e rapidamente se alastrou por diversos lagos e reservatórios (Havel et al. 2005). Em 2000 a espécie teve o seu primeiro registro em águas brasileiras (Zanata et al. 2003). Posteriormente, em 2003 a espécie foi encontrada por Simões et al. (2009) na planície de inundação do alto rio Paraná e, três anos depois, foi registrada por Kotov & Taylor (2014) no baixo rio Paraná.

Análises moleculares mostradas por Havel et al. (2000) indicam que a origem de populações norte americanas de *Daphnia lumholtzi* podem estar relacionadas aos continentes da Ásia e África, porém é necessário verificar a origem das populações presentes na América

do Sul para determinar possíveis meios de introdução desta espécie no Brasil e sua rota de invasão.

A crescente utilização de ferramentas moleculares nos últimos anos tem e continuará a ter um forte impacto na compreensão da diversidade, filogenia e biogeografia de cladóceros (Schwenk et al. 2000; Taylor et al. 2002). O método de identificação molecular do *COI* tem sido um importante aliado no estudo de invasões biológicas para recriar rotas e identificar a origens de indivíduos não nativos (Teske et al. 2014).

Dessa forma, este estudo teve por objetivo comparar os genes *COI* e *12S* dos espécimes encontrados em um ambiente da planície de inundação do alto rio Paraná, com os genes das demais populações de *Daphnia lumholtzi* presentes no continente americano e das populações dos locais de origem da espécie, para que assim, seja possível identificar qual a origem das populações introduzidas no Brasil.

3.2 MÉTODO

3.2.1 Obtenção dos organismos

Os espécimes analisados foram coletados por meio de arrastos verticais, com rede de plâncton de 68 µm de abertura de malha, em uma lagoa conectada ao rio Paraná (22°44' S; 53°15' W). Posteriormente, estes indivíduos foram identificados morfológicamente, de acordo com chave de identificação específica, separados através de microscópio óptico comum e cultivados em laboratório. Foram separados 10 indivíduos adultos para a análise molecular utilizando os genes mitocondriais citocromo oxidase subunidade I (*COI*) e *12S*.

3.2.2 Análise molecular

A extração de DNA foi realizada através do protocolo HotShot (Montero-Pau et al. 2008). O gene *COI* foi amplificado utilizando os primers ZplankF1 e ZplankR1 (Prosser et al. 2013). Para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram seguidos os seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C (2') seguido por 5 ciclos de desnaturação, emparelhamento e extensão de 94°C (40"), 45 °C (40"), 72°C (60"), e 35 ciclos de desnaturação a 94°C (40"), *annealing* 51°C (40") e extensão 72°C (60"), e extensão final a 72°C (5').

O gene *12S* foi amplificado utilizando os primers L13337-12S e H13842-12S (Machida et al. 2004). Durante a realização da PCR foram seguidos os seguintes passos:

desnaturação inicial a 95°C (4'), seguido por 40 ciclo de desnaturação, emparelhamento e extensão de 94°C (45"), 60°C (45"), 72°C (90"), e extensão final a 72°C (6').

Para purificar os produtos finais da reação da PCR foi utilizado o "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche). O sequenciamento foi realizado pelo sistema ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) em um sequenciador automatizado ABI 3730. Os produtos da PCR foram sequenciados, em ambas as direções, pelos primers amplificados e foram sobrepostas para obter o *12S* RNAr completos e as sequências dos genes *COI*.

3.2.3 Análise e comparação das sequências

As sequências foram alinhadas no programa Mega 6 (Tamura et al. 2013) a partir do algoritmo Clustal W (Thompson et al. 1994). A seleção do melhor modelo de substituição nucleotídica para cada fragmento foi realizada no programa MEGA 6. Duas reconstruções filogenéticas foram realizadas: a primeira utilizando o gene *COI* e a segunda o gene *12S*, de acordo com o modelo GTR com distribuição gama e sítios invariáveis, a partir do método estatístico de máxima verossimilhança. A espécie de cladóceros *Moina micrura* foi utilizada como *outgroup* para as análises e suas sequências genéticas foram obtidas no banco de dados do *GenBank*.

As edições das árvores resultantes das análises foram realizadas no programa MEGA6. Em ambas as análises de verossimilhança, foram utilizadas 1000 reamostragens de bootstrap.

As sequências das populações de *Daphnia lumholtzi* das demais localidades foram obtidas no banco de dados *GenBank* (Tabela 1).

3.3 RESULTADOS

Foram encontrados, através do banco de dados do *GenBank*, sequências de populações de *Daphnia lumholtzi* coletadas em três localidades diferentes para o gene do *COI* e duas localidades deferentes para o gene *12S* (Tabela 1).

O resultado obtido através da análise do gene *COI* evidencia que as populações de *Daphnia lumholtzi*, encontradas neste estudo, são mais semelhantes às populações dos Estados Unidos e México (Figura 1).

Tabela 1. Localidades das populações de *Daphnia lumholtzi* e número de acesso para os genes COI e 12S no *GenBank*. (BRA= Brasil; EUA= Estados Unidos da América; MEX= México; AUS= Austrália).

Cidade	País	COI	12 S	Referências
Paraná	BRA	Neste estudo	Neste estudo	
Mississippi, Missouri	EUA	AF308974.1	FJ427408; U34739.1	(Taylor et al. 1996; Hebert et al. 2002; Adamowicz et al. 2009)
Sonora	MEX	EU702127.1	--	(Elías-Gutiérrez et al. 2008)
Nova Gales do Sul	AUS	AY921417.1	AY921466.1	(Adamowicz et al. 2009)

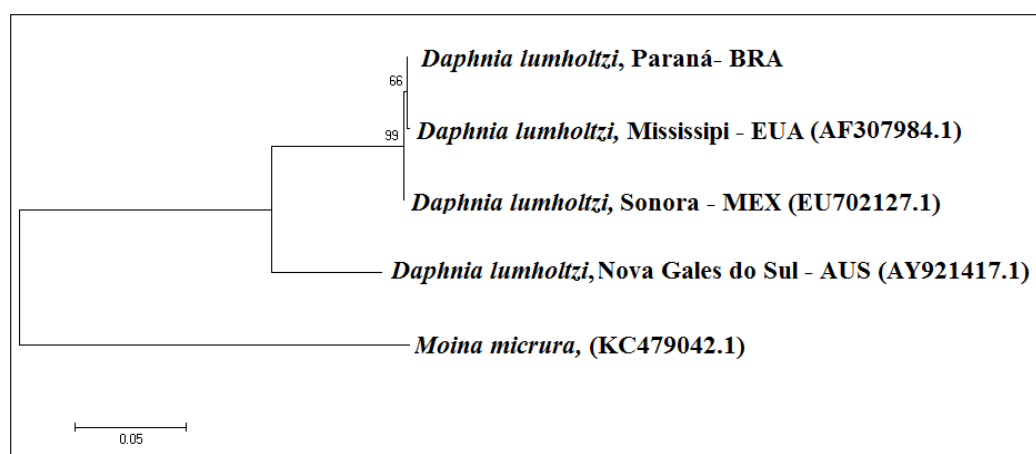


Figura 1. Árvore filogenética de máxima verossimilhança construída a partir do gene COI das populações de *Daphnia lumholtzi*, de acordo com modelo de substituição nucleotídica GTR+I+G com 1000 reamostragens de bootstrap. (BRA= Brasil; EUA= Estados Unidos da América; MEX= México; AUS= Austrália). *Moina micrura* foi utilizada como *outgroup*. Entre parênteses estão os códigos de acesso ao *GenBank*.

As análises com base no gene *12S* (Figura 2) confirmam a proximidade genética entre os espécimes de *Daphnia lumholtzi* coletados no Brasil e as populações dos Estados Unidos.

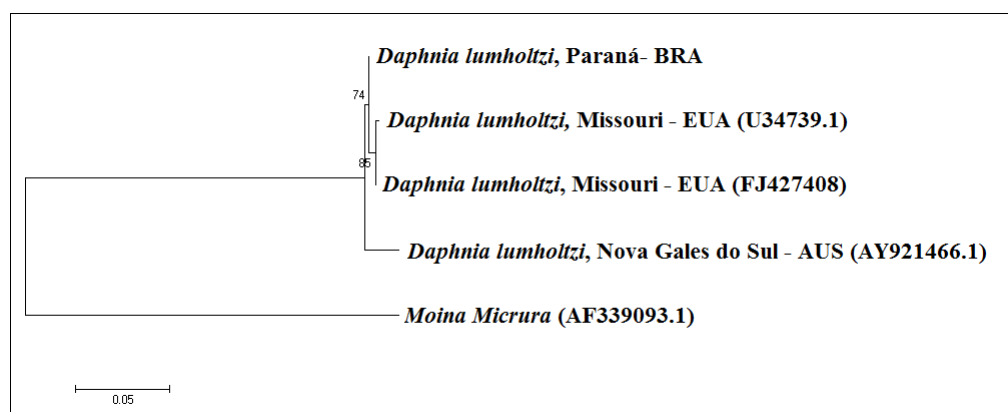


Figura 2. Árvore filogenética de máxima verossimilhança construída a partir do gene 12S das populações de *Daphnia lumholtzi*, de acordo com modelo de substituição nucleotídica GTR+I+G com 1000 reamostragens de bootstrap. (BRA= Brasil; EUA= Estados Unidos da América; AUS= Austrália). *Moina micrura* foi utilizada como *outgroup*. Entre parênteses estão os códigos de acesso ao *GenBank*.

Foram obtidas, ainda, informações genéticas de uma linhagem diferente proveniente da Austrália. Porém, os espécimes encontrados no Brasil se mostram mais distantes geneticamente desta linhagem, tanto de acordo com o gene 12S quanto com o gene COI (Tabela 2).

Tabela 2. Distâncias genéticas entre populações de *Daphnia lumholtzi* para o gene *COI*. (BRA= Brasil; EUA= Estados Unidos da América; MEX= México; AUS= Austrália).

	1	2	3	4
1 <i>Daphnia lumholtzi</i> , Paraná - BRA				
2 <i>Daphnia lumholtzi</i> , Mississipi - EUA	0.002	0.002		
3 <i>Daphnia lumholtzi</i> , Sonora - MEX	0.002	0.002	0.003	
4 <i>Daphnia lumholtzi</i> , Nova Gales do Sul - AUS	0.084	0.084	0.086	0.082

3.4 DISCUSSÃO

No continente americano *Daphnia lumholtzi* possui registros em uma ampla extensão dos Estados Unidos (Havel et al. 2002), México (Silva-Briano et al. 2010), Brasil (Zanata et al. 2003; Simões et al. 2009) e Argentina (Kotov & Taylor 2014), sendo a sua distribuição expandida em menos de 20 anos. Após o seu primeiro registro no Brasil em 2000 (Zanata et al. 2003), essa espécie vem sendo registrada cada vez em mais ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná (Simões et al. 2009), evidenciando sua alta capacidade de dispersão, já registrada em outras partes do continente (Havel & Lampert 2006).

A proximidade genética que os espécimes do presente estudo apresentaram com as populações das regiões americanas sugere que a população encontrada no Brasil pode ter sido introduzida a partir das populações de *Daphnia lumholtzi* proveniente dos Estados Unidos, e que ambas possuam uma origem comum.

Havel e Hebert (1993) discutem que a introdução dessa espécie nos reservatórios norte americanos pode ter ocorrido em associação ao peixamento de tilápia (*Oreochromis aureus*) ou a introdução de perca do Nilo (*Lates niloticus*), ambas as espécies de peixes provenientes da África. Apesar de não terem sido encontradas sequências genéticas disponíveis desta espécie para as localidades da África, Ásia e Argentina no GenBank, tanto do gene *COI* quanto do *12S*, e não ter sido possível analisar a distância genética do espécime deste estudo com as populações destas localidades, acredita-se que as populações presentes no Brasil sejam próximas geneticamente às populações nativas da África e/ou Ásia, visto a proximidade genética que estes últimos apresentam com as populações dos Estados Unidos.

Daphnia lumholtzi também apresentou proximidade com as populações do México, ainda que menor quando comparada com as populações provenientes dos Estados Unidos. Silva-Briano et al. (2010) relatam que as características morfológicas apresentadas pelos espécimes do México indicam diferenças destes para os espécimes encontrados no Brasil. Enquanto que, os espécimes do México se aproximam mais dos de origem Australiana, por apresentarem o pós-abdômen bilobado, com os espinhos da parte posterior distal mais largos e compridos, os espécimes registrados no Brasil possuem o pós-abdômen reto, com os espinhos da parte posterior distal mais curtos (Silva-Briano et al. 2010). Isso reforça que a introdução da espécie no Brasil pode ter ocorrido a partir das populações presentes nos Estados Unidos. Benzie (1988) relata o caráter variável destas características, enquanto que Silva-Briano et al. (2010) discutem que populações de ambas as variações (pós-abdômen bilobado ou retilíneo) são encontradas nos Estados Unidos, sugerindo distintos eventos de invasão, por populações com espécimes de características morfológicas distintas.

Independente do gene escolhido para a comparação entre as populações, os espécimes utilizados neste estudo sempre apresentaram maior distância genética das populações oriundas da Austrália. A elevada distância genética encontrada entre estas populações, quando comparados os genes *COI*, apresenta um indício de que podem se tratar de duas espécies distintas. Ratnasingham e Hebert (2013) consideram que para comparações realizadas usando o gene *COI*, distâncias superiores a dois por cento já podem ser consideradas espécies distintas para alguns grupos. Porém, devido à baixa quantidade de espécimes obtidos na lagoa do rio Paraná, análises mais criteriosas envolvendo um maior número de indivíduos, devem ser realizadas, a fim de comparar as populações, tanto da localidade tipo quando das demais localidades.

Além disso, estudos mais abrangentes devem ser realizados com a espécie em questão e suas cogenéricas, no intuito de determinar a distância genética, para o gene *COI*, necessária para que as espécies deste grupo possam ser consideradas distintas. Um próximo passo seria, ainda, comparar um maior número de indivíduos provenientes das populações da localidade tipo e as demais populações do globo, a fim de verificar a existência de uma possível espécie críptica de *Daphnia lumholtzi*.

REFERÊNCIAS

Adamowicz SJ, Petrusek A, Colbourne JK, et al (2009) The scale of divergence: A phylogenetic appraisal of intercontinental allopatric speciation in a passively dispersed freshwater zooplankton genus. *Mol Phylogenet Evol* 50:423–436

- Benzie JAH (1988) The systematics of Australian *Daphnia* (Cladocera, Daphniidae). Species descriptions and keys. *Hydrobiologia* 166:95–161
- Burns CW (1968) The relationship between body size of filter-feeding Cladocera and the maximum size of particle ingested. *Limnol Oceanogr* 13:675–678
- Elías-Gutiérrez M, Jerónimo FM, Ivanova NV, et al (2008) DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa* 42:1–42
- Havel JE, Colbourne JK, Hebert PDN (2000) Reconstructing the history of intercontinental dispersal in *Daphnia lumholtzi* by use of genetic markers. *Limnol Oceanogr* 45:1414–1419
- Havel JE, Hebert PDN (1993) *Daphnia lumholtzi* in North America: Another exotic zooplankter. *Limnol Oceanogr* 38:1823–1827
- Havel JE, Kovalenko KE, Thomaz SM, et al (2015) Aquatic invasive species: challenges for the future. *Hydrobiologia* 147–170
- Havel JE, Lampert W (2006) Habitat partitioning of native and exotic *Daphnia* in gradients of temperature and food: Mesocosm experiments. *Freshw Biol* 51:487–498
- Havel JE, Lee CE, Zanden MJV (2005) Do Reservoirs Facilitate Invasions into Landscapes? *Bioscience* 55:518
- Havel JE, Shurin JB, Jones JR (2002) Estimating dispersal from patterns of spread: spatial and local control of lake. *Ecology* 83:3306–3318.
- Hebert PDN, Remigio EA, Colbourne JK, et al (2002) Accelerated molecular evolution in halophilic crustaceans. *Evolution (NY)* 56:909–926
- Kotov AA, Taylor DJ (2014) *Daphnia lumholtzi* Sars, 1885 (Cladocera: Daphniidae) invades Argentina. *J Limnol* 73:167–172
- Machida RJ, Miya MU, Nishida M, Nishida S (2004) Large-scale gene rearrangements in the mitochondrial genomes of two calanoid copepods *Eucalanus bungii* and *Neocalanus cristatus* (Crustacea), with notes on new versatile primers for the srRNA and *COI* genes. *Gene* 332:71–78
- Mack RN, Simberloff D, Lonsdale WM, et al (2000) Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecol Appl* 10:689–710
- Montero-Pau J, Gómez A, Muñoz J (2008) Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnol Oceanogr Methods* 6:218–222
- Prosser S, Martínez-Arce A, Elías-Gutiérrez M (2013) A new set of primers for *COI* amplification from freshwater microcrustaceans. *Mol Ecol Resour* 13:1151–1155

- Ratnasingham S, Hebert PDN (2013) A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) system. *PLoS One*. 8(8):e66213
- Schwenk K, Posada D, Hebert PDN (2000) Molecular systematics of European *Hyalodaphnia*: the role of contemporary hybridization in ancient species. *Proc Biol Sci* 267:1833–1842
- Silva-Briano M, Arroyo-Bustos G, Beltrán-Álvarez R, et al (2010) *Daphnia Ctenodaphnia lumholtzi* G. O. Sars, 1885 (Crustacea: Cladocera); un cladóceros exótico en México. *Hidrobiologica* 20:275–280
- Simões NR, Robertson BA, Lansac-Tôha FA, et al (2009) Exotic species of zooplankton in the Upper Paraná River floodplain, *Daphnia lumholtzi* Sars, 1885 (Crustacea: Branchiopoda). *Braz J Biol* 69:551–558
- Sommer U, Stibor H (2002) Copepoda - Cladocera - Tunicata: The role of three major mesozooplankton groups in pelagic food webs. *Ecol Res* 17:161–174
- Sorensen KH, Sterner RW (1992) Extreme cyclomorphosis in *Daphnia lumholtzi*. *Freshw Biol* 28:257–262
- Stewart TJ, Sprules WG (2011) Carbon-based balanced trophic structure and flows in the offshore Lake Ontario food web before (1987-1991) and after (2001-2005) invasion-induced ecosystem change. *Ecol Modell* 222:692–708
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729
- Taylor DJ, Hebert PD, Colbourne JK (1996) Phylogenetics and evolution of the *Daphnia longispina* group (Crustacea) based on 12S rDNA sequence and allozyme variation. *Mol Phylogenet Evol* 5:495–510
- Taylor DJ, Ishikane CR, Haney RA. (2002) The systematics of *Holarctic bosminids* and a revision that reconciles molecular and morphological evolution. *Limnol Oceanogr* 47:1486–1495
- Teske PR, Sandoval-Castillo J, Waters JM, Beheregaray LB (2014) Can novel genetic analyses help to identify low-dispersal marine invasive species? *Ecol Evol* 4:2848–2866
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Yan ND, Pawson TW (1997) Changes in the crustacean zooplankton community of Harp Lake, Canada, following invasion by *Bythotrephes cederstroemi*. *Freshw Biol* 37:409–425
- Zanata LH, Espíndola ELG, Rocha O, Pereira RHG (2003) First record of *Daphnia lumholtzi* (SARS, 1885), exotic cladoceran, in São Paulo State (Brazil). *Braz J Biol* 63:717–720

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A planície de inundação do alto rio Paraná possui uma ampla heterogeneidade ambiental e é um sistema com elevada diversidade biológica que está sob grande influência dos reservatórios a montante. Com base nisso, este trabalho contribui para a compreensão dos fatores que facilitam o processo de invasão da espécie não nativa de cladóceros, *Daphnia lumholtzi*, nos ambientes da planície de inundação e serve como base para estudos futuros a respeito da invasão desta espécie em águas brasileiras e a dispersão da mesma pelo continente americano.

A primeira abordagem deste estudo identificou uma importante influência dos reservatórios e da disponibilidade de alimento como facilitadores da invasão de *Daphnia lumholtzi* nos ambientes da planície, porém não foi identificada influência da resistência biótica em barrar este processo. A segunda abordagem permitiu identificar a proximidade genética dos espécimes registrados na planície de inundação com os provenientes das populações dos Estados Unidos e também identificar a elevada distância que os espécimes do presente estudo possuem com as populações provenientes da Austrália, facilitando assim a construção de uma possível rota de invasão desta espécie em águas brasileiras.