

IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA *VERSUS* MARCADORES MOLECULARES NA DIFERENCIAÇÃO DE *Ludwigia lagunae* (MORONG) H. HARA (ONAGRACEAE) E OUTROS CONGÊNERES

Adrian Cesar da Silva¹, Alessandra Valéria de Oliveira², Karina Fidanza³

¹Acadêmico do Curso de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Estadual de Maringá/PR - UEM. Bolsista CAPES. adriancesar2606@gmail.com

²Docente, Doutora, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA), Universidade Estadual de Maringá/PR - UEM. avoliveira@uem.br

³Docente, Doutora, Departamento de Biologia/Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (NUPÉLIA). karina.fidanza@gmail.com

RESUMO

As espécies de *Ludwigia* L. (Onagraceae) são em sua maioria macrófitas aquáticas que estão distribuídas amplamente pela América do Sul. Muitas espécies desse gênero apresentam alta plasticidade fenotípica, dificultando a identificação morfológica. Dentre esses táxons, *Ludwigia lagunae* é uma das espécies mais polimórficas deste grupo. Nesse sentido, estudos genéticos com regiões barcode podem ser úteis para esclarecer os limites interespecíficos dessas espécies. Por essa razão, o objetivo desse estudo foi confrontar informações moleculares e morfológicas de *L. lagunae* com outros congêneres com intuito de auxiliar na distinção desses táxons. Para isso, foi amplificado sequências da região *rbcL* para *L. lagunae*, coletadas na planície de inundação do alto rio Paraná (Brasil), comparando com sequências disponíveis nos bancos de dados BOLD e Genbank para espécies congêneres. Adicionalmente, foi obtido exsiccatas relativas a sequências que se mostraram idênticas com as obtidas neste trabalho para *L. lagunae*, confrontando com a identificação molecular. Verificou-se que as sequências obtidas para *L. lagunae* foram idênticas entre si, sendo indistinguíveis, também, de alguns espécimes de *L. octovalvis*, *L. sedioides*, e outros espécimes não-identificados. No entanto, usando imagens de exsiccatas e descrições morfológicas, averiguou-se que alguns espécimes de *L. octovalvis* são similares, enquanto outros são diferentes de *L. lagunae* coletados neste trabalho. Foi atestado uma grande variação genética e morfológica entre amostras de *L. octovalvis* depositadas no BOLD, indicando problemas na identificação. Contudo, as exsiccatas de *L. sedioides* foram consistentes com a descrição dessa espécie. Sendo assim, conclui-se que o fragmento parcial de *rbcL* obtido neste trabalho não é eficiente para diferenciar *L. lagunae* de *L. octovalvis* e *L. sedioides*. Essa constatação foi possível graças a análise conjunta de dados moleculares e morfológicos, sendo necessário utilização de outros marcadores moleculares mais informativos.

PALAVRAS-CHAVE: Identificação molecular; Macrófitas aquáticas; *rbcL* Taxonomia.

1 INTRODUÇÃO

Ludwigia (Onagraceae) é constituído por espécies adaptadas a viverem em habitats úmidos ou totalmente alagados (WAGNER *et al.*, 2007). Dentre as áreas alagadas do Brasil, a planície de inundação do alto rio Paraná (PIARP) destaca-se por apresentar uma rica e diversa flora aquática, cujos representantes de *Ludwigia* estão entre as macrófitas mais frequentes, e um dos táxons mais difíceis para identificar à campo (CRIVELARI, 2017).

Ludwigia lagunae (Morong) H. Hara é uma das nove espécies de *Ludwigia* ocorrentes na PIARP, e que se apresenta altamente polimórfica, com variações especialmente em sua parte vegetativa (MORONG; BRITTON, 1892; AMARAL *et al.*, 2008; CRIVELARI, 2017). Dentre as demais congêneres, *L. lagunae* se assemelha muito à *L. octovalvis* (Jacq.) Raven, sendo comumente confundidas a campo (WAGNER *et al.*, 2007; CRIVELARI, 2017).

De acordo com a atual circunscrição, *L. lagunae*, é nativa do Brasil, sendo mais frequente na região Sul e Sudeste (VIEIRA, 2015). Na PIARP, *L. lagunae* mostra-se um táxon emergente bastante frequente, mas não é considerada invasora, com relatos de ocorrências em áreas impactadas por ações antrópicas (CRIVELARI, 2017). Essa tolerância a diferentes condições ambientais pode estar relacionada à plasticidade

fenotípica, conferindo capacidade de alterar caracteres morfológicos, o que a torna de difícil identificação (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Com o objetivo de auxiliar nas dificuldades de identificação de táxons como *L. lagunae*, que apresenta uma ampla plasticidade fenotípica, os taxonomistas utilizam o *DNA barcode* (CENIM, 2012). O marcador do DNA cloroplastidial *rbcL* tem sido promissor para discernir espécies de plantas (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2011).

Diante disso, o primeiro objetivo deste trabalho consistiu em obter sequências do marcador molecular *rbcL* para espécimes de *L. lagunae* ocorrentes na PIARP, comparando os dados genéticos obtidos com sequências dos bancos de dados Barcode of Life Datasystems (BOLD) e Genbank de espécies congêneres. O segundo objetivo compôs-se em buscar imagens de exsicatas referentes às sequências de *Ludwigia* obtidas nos bancos de dados que se mostraram idênticas às amostras de *L. lagunae* coletadas na PIARP, a fim de confrontar a identificação morfológica com a identificação molecular desses espécimes conflitantes, provendo uma análise da eficiência do marcador *rbcL* em distinguir espécies proximamente aparentadas de *L. lagunae*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas foram conduzidas no alto rio Paraná, obtendo dois espécimes de *L. lagunae*, os quais foram prensados, confeccionando exsicatas para cada material testemunho. Três folhas de cada indivíduo foram selecionadas e acondicionadas em uma solução tampão para preservação do DNA. O material genético foi extraído utilizando o kit Genome Wizard/Promega seguindo as instruções do fabricante, o qual foi quantificado por meio de eletroforese por comparação com DNA lambda de concentração conhecida.

Para comparar as sequências de *L. lagunae* obtidas na PIARP com outras espécies congêneres para o marcador *rbcL*, foram resgatadas sequências do BOLD e do Genbank. Obteve-se 67 sequências de *Ludwigia* pelo BOLD e 2 sequências pelo Genbank, totalizando 69 amostras. O banco de dados BOLD foi utilizado para adquirir imagens de espécimes referentes às sequências que se mostraram idênticas as obtidas para *L. lagunae* na PIARP, objetivando comparar as características morfológicas com os resultados da análise molecular.

Utilizou-se a técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction) para amplificar o *locus* cloroplastidial *rbcL*, cuja reação foi conduzida em volume total de 25 µL, contendo tampão Tris-KCl [20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl], MgCl₂ (1,5 mM), primers (2,5 mM cada), dNTPs (0,1 mM cada), Taq DNA Polimerase Platinum – Invitrogen (1,0 U) e 10 ng de DNA recém-extraído. Foi utilizado o par de primers *rbcLa* (*rbcLaF* 5'ATGTCACCACAAACAGAGACTAAA 3', *rbcLaR* 5'GTAAAATCAAGTCCACCRG 3') para amplificar a região *rbcL*. Posteriormente, os produtos da PCR foram purificados e sequenciados em sequenciador automático ABI 3700 XL.

As sequências obtidas foram editadas manualmente utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999) e alinhadas com algoritmo Clustal W implementado no programa MEGA 7 (TAMURA *et al.*, 2013) onde também foram calculados os valores de distância-*p*. Para as reconstruções filogenéticas utilizando o marcador *rbcL*, além das sequências obtidas neste trabalho foram adicionadas sequências de *Ludwigia* disponibilizadas nos bancos de dados BOLD e Genbank.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram obtidas sequências parciais da região *rbcL* com tamanho de 457 pb após alinhamento e edição para os dois espécimes de *L. lagunae*. Não foi possível confirmar a sua identificação morfológica por meio das análises moleculares, por isso, esses espécimes foram tratados como *Ludwigia* sp.1 e *Ludwigia* sp.2 (Figura 1).



Figura 1: Exsiccatas de *L. lagunae* coletados na PIARP.
1= *Ludwigia* sp.1; 2= *Ludwigia* sp.2.

As sequências de *Ludwigia* sp.1 e *Ludwigia* sp.2 foram idênticas entre si. Ao comparar a distância-*p* desse único haplótipo com sequências obtidas no BOLD e no Genbank, observou-se que *Ludwigia* sp.1 e *Ludwigia* sp.2 compartilham a mesma sequência com amostras de *L. octovalvis*, *L. sedioides* e com espécimes de *Ludwigia* ESPINOZA5669 não identificados. Entretanto, outras sequências de *L. octovalvis* e *L. sedioides* mostraram-se divergentes daquelas obtidas neste trabalho.

Essas sequências conflitantes com as obtidas neste trabalho foram confrontadas morfológicamente utilizando as suas exsiccatas correspondentes (Figura 2).

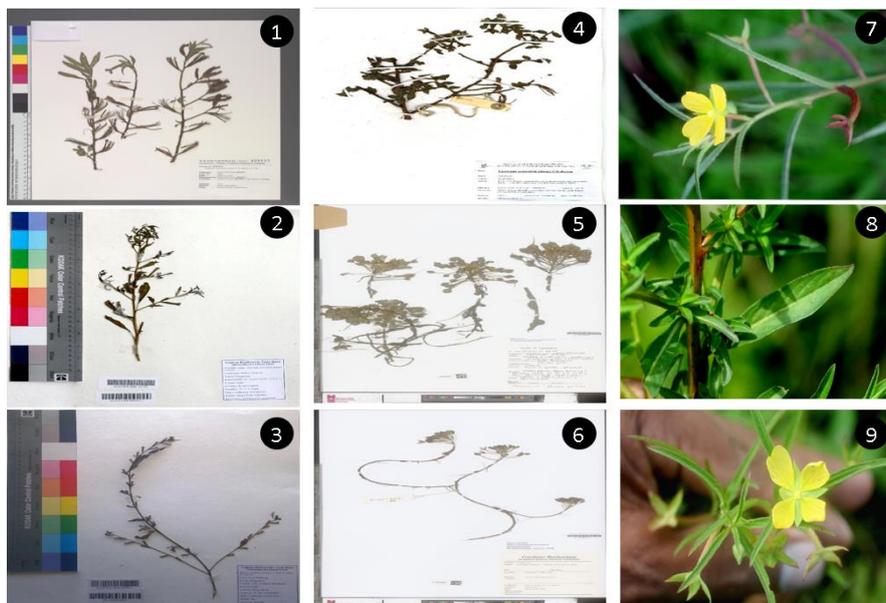


Figura 2: Imagem das exsiccatas de *Ludwigia* correspondentes às sequências para o marcador *rbcL* obtidas no BOLD.

1= *L. octovalvis*, distância-*p* 0; 2= *L. octovalvis*, distância-*p* 0,2; 3= *L. octovalvis*, distância-*p* 0,7; 4= *L. octovalvis*, distância-*p* 1,2; 5= *L. sedioides*, distância-*p* 0; 6= *L. sedioides*, distância-*p* 0,2; 7= *Ludwigia* ESPINOZA5669, distância-*p* 0; 8= *Ludwigia* ESPINOZA5669, distância-*p* 0; 9= *Ludwigia* ESPINOZA5669, distância-*p* 0.

Os espécimes de *L. octovalvis* estão representados da imagem 1 à imagem 4. O espécime da imagem 1 assemelha-se morfológicamente com *L. lagunae*, apresentando distância-*p* 0. A imagem 2 remete a um espécime morfológicamente distinto de *L. lagunae* e geneticamente distante em 0,7. Já as imagens 3 e 4 não possuem caracteres morfológicos que possam confirmar a sua identificação como *L. octovalvis* e apresentam distância-*p* 0,2 e 1,2, respectivamente, das amostras coletadas na PIARP. Em relação a *L. sedioides*, os espécimes das imagens 5 e 6 são correspondentes a sua identificação morfológica, no entanto, apresentam distância-*p* 0 e 0,2, respectivamente em relação aos espécimes da PIARP. Por fim, os espécimes de *Ludwigia* ESPINOZA5669 não identificados não divergiram geneticamente daqueles coletados na PIARP, contudo, os espécimes 7 e 9

se assemelham mais à *L. lagunae* do que o espécime 8, cujas características foliares são mais próximas de *L. octovalvis*.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que o fragmento parcial da região *rbcL* obtida para espécimes identificados morfológicamente como *L. lagunae* da PIARP não puderam confirmar a sua identificação, além de não os distinguir com outros espécimes congêneres de *Ludwigia*. Portanto, o marcador *rbcL* parece não ser adequado como DNA *barcode* para identificar espécimes de *Ludwigia* proximamente aparentados. Essa constatação só foi possível graças a análise conjunta dos dados moleculares com as informações morfológicas.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, M. C. E.; BITTRICH, V.; FARIA, A. D.; ANDERSON L. O.; AONA, L. Y. S. **Guia de campo para plantas aquáticas e palustres do Estado de São Paulo**. Ribeirão Preto, 2008.
- CENIM, L. C. M. **O uso de um fragmento do marcador *matK* como sequência DNA *barcode* em Araceae**. 2012. 179 f. Tese - Universidade de Brasília, 2012.
- CRIVELARI, T. C. **Sistemática de macrófitas aquáticas ocorrentes em lagoas da planície de inundação do Alto Rio Paraná**. 2017. Dissertation - Universidade Estadual de Maringá, 2017.
- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT**. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HOLLINGSWORTH, P. M.; GRAHAM, S. W.; LITTLE, D. P. Choosing and using a plant DNA barcode. **Plos One**, v. 6, n. 5, e19254, 2011
- MORONG, T.; BRITTON, N. L. An enumeration of the plants collected by Dr. Thomas Morong in Paraguay, 1880-1890. **Annals N. Y. Acad. Sci.**, v. 7, p. 45-280, 1892.
- RODRIGUES, S., SCREMIN-DIAS, E., MEDEIROS, S. C. H., SOUZA, M. C. Alterações estruturais do caule e da folha de *Ludwigia inclinata* (L.f.) M. Gómez, desenvolvidos emersos e submersos. **R. Bras.Bioci.**, v. 5, n. 1, p. 174-176, 2007.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Mol. Biol. Evo.**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- VIEIRA, A. O. S. Onagraceae na lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015.
Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB114750>.
- WAGNER, L. W.; HOCH, P. C.; RAVEN, P. H. Revised classification of the Onagraceae. **Syst. Bot. Monogr.**, v. 83, p. 1-240, 2007.