

## DIVERSIDADE GENÉTICA EM INDIVÍDUOS DE *Egeria najas* PLANCH. (HYDROCHARITACEAE) OCORRENTES NO RIO PARANÁ, BRASIL

Julia Naomi Morimoto de Carvalho<sup>1</sup>, Bárbara Scorsim<sup>2</sup>, Alessandra Valéria de Oliveira<sup>3</sup>,  
Karina Fidanza Rodrigues<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Graduada em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá – UEM. julianaomibio@gmail.com

<sup>2</sup> Doutoranda pelo programa de pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Maringá – UEM. barbarascorsim@gmail.com

<sup>3</sup> Coordenadora. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – NUPÉLIA, Programa de pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Universidade Estadual de Maringá – UEM. avoliveira@uem.br

<sup>4</sup> Orientadora. Departamento de Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – NUPÉLIA, Programa de pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, Programa de pós-graduação em Biologia Comparada, UEM. karina.fidanza@gmail.com

### RESUMO

*Egeria najas* é uma espécie pertencente à família Hydrocharitaceae Juss., nativa da América do Sul e encontrada em ambientes continentais e de águas lânticas. É muito estudada devido à sua importância ecológica, porém com poucos trabalhos que exploram sua biologia reprodutiva. A principal forma de reprodução dessa espécie é assexuada, por propagação vegetativa. Mesmo havendo poucas evidências da produção de sementes pela espécie, há registro de variação genética nas populações de *E. najas* no reservatório Jupuí (Brasil), sugerindo que pode haver ocorrência de reprodução sexuada. Este trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética das populações de *E. najas* do reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu utilizando o marcador molecular ITS. Foi encontrado um único haplótipo para os exemplares de *E. najas* coletados em Itaipu, indicando ausência de variação genética.

**PALAVRAS-CHAVE:** Itaipu; ITS; Macrófita aquática; Reprodução; Variabilidade genética.

## 1 INTRODUÇÃO

Hydrocharitaceae Juss. possui 18 gêneros e 140 espécies que ocorrem em áreas tropicais e subtropicais, sendo que *Egeria* Planch. (Anacharidoidae) é composto por três espécies submersas e dióicas nativas da América do Sul, onde ocorrem em ambientes continentais de águas lânticas (COOK; URMI-KÖNIG; 1984, KOEHLER; BOVE, 2001).

*Egeria najas* Planch., conhecida por suas características de alta reprodução vegetativa e por aumentar a complexidade do ambiente, é uma espécie amplamente estudada em seus aspectos ecológicos (PIERINI *et al.*, 2004; FREITAS *et al.*, 2011). Entretanto, são poucos os trabalhos dedicados exclusivamente à biologia reprodutiva desta espécie (LES *et al.*, 2006). Não existe registro de sementes geradas na natureza por *E. najas*; mesmo sem a constatação de reprodução cruzada na natureza, no Brasil, ao longo dos afluentes do reservatório Jupuí, localizado na divisa entre os estados de São Paulo e Paraná, foi constatada variação genética das populações desta espécie (MORI *et al.*, 1999). O mesmo ocorreu no reservatório de Itaipu, no Paraná, onde poucos locos polimórficos RAPD foram encontrados. Os autores sugerem que o modo de reprodução assexuada seja predominante na região, mas não descartam a possibilidade de existência de propagação sexuada em *E. najas* (LÚCIO, 2009).

A utilização de marcadores moleculares possibilita a pesquisa de variações intra e interespecíficas, o estabelecimento de relações filogenéticas entre grupos próximos e dados sobre a estrutura genética populacional, fornecendo, muitas vezes indícios sobre o mecanismo reprodutivo de alguns grupos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi analisar a variabilidade genética das populações de *E. najas* do reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu utilizando o marcador molecular ITS, complementando as informações genéticas obtidas anteriormente na região.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta de espécimes de *Egeria najas* (n=13) foi realizada entre novembro de 2018 e abril de 2019 em diferentes pontos do Reservatório de Itaipu. A posição geográfica de cada ponto de amostragem foi determinada pelo uso do GPS (Global Position System). As amostras foram acondicionadas, logo após serem coletadas, em tampão TE pH 8,0 (Tris HCl (1M), EDTA (0.5 mM)).

O DNA total das amostras foi extraído utilizando o kit de extração Promega Wizard® Genomics, de acordo com instruções do fabricante. Para a estimativa da concentração de DNA presente em cada amostra, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1.0% e a comparação com DNA de fago  $\lambda$  de concentração conhecida. Em sequência, foram amplificados fragmentos parciais da região ITS, do DNA nuclear, os quais posteriormente foram purificados seguindo o protocolo de Rosenthal *et al.* (1993) e para a reação de sequenciamento unidirecional foi utilizado o kit Big Dye Terminator. O sequenciamento foi realizado no Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá.

As sequências nucleotídicas obtidas foram editadas manualmente utilizando o software Bioedit (HALL 1999) e posteriormente alinhadas pelo algoritmo Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994) implementado no software MEGA 7 (TAMURA *et al.*, 2013), no qual também foi determinada a distância genética entre os espécimes.

Os valores de similaridade das sequências foram obtidos através da comparação com dados do GenBank, utilizando a ferramenta BlastN. As árvores gênicas foram construídas com o algoritmo de Máxima Verossimilhança, utilizando o modelo HKY com 1.000 reamostragens de *bootstrap*. Além das 13 sequências obtidas neste estudo, para a construção da árvore foram utilizadas sequências do GenBank. *Hydrilla verticillata* foi utilizada como grupo externo.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sequências do marcador ITS (685 pb) foram obtidas após a edição e alinhamento. Não foram identificados polimorfismos, as sequências de todos os espécimes de *Egeria najas* foram idênticas, com índices de diversidade haplotípica (*h*) e de nucleotídeos ( $\pi$ ) iguais a zero.

Ao analisar a árvore genética de máxima verossimilhança obtida (Figura 1), podemos perceber que as amostras do presente estudo formaram um único agrupamento com as amostras de *E. najas* disponíveis no banco de dados, apresentando 100% de similaridade entre si (Tabela 1). Já os espécimes de *Egeria densa* se posicionaram em um grupo distinto (distância *p* igual a 12,9%).

**Tabela 1:** Valores de distância *p* entre as sequências da região ITS obtidas no GenBank e sequências de *Egeria najas* obtidas no presente estudo, agrupadas de acordo com o haplótipo.

|                                           | 1     | 2     | 3     |
|-------------------------------------------|-------|-------|-------|
| 1. <i>Egeria najas</i> (este estudo)      |       |       |       |
| 2. <i>Egeria najas</i> (GenBank)          | 0.000 |       |       |
| 3. <i>Egeria densa</i> (GenBank)          | 0.129 | 0.129 |       |
| 4. <i>Hydrilla verticillata</i> (GenBank) | 0.394 | 0.394 | 0.396 |

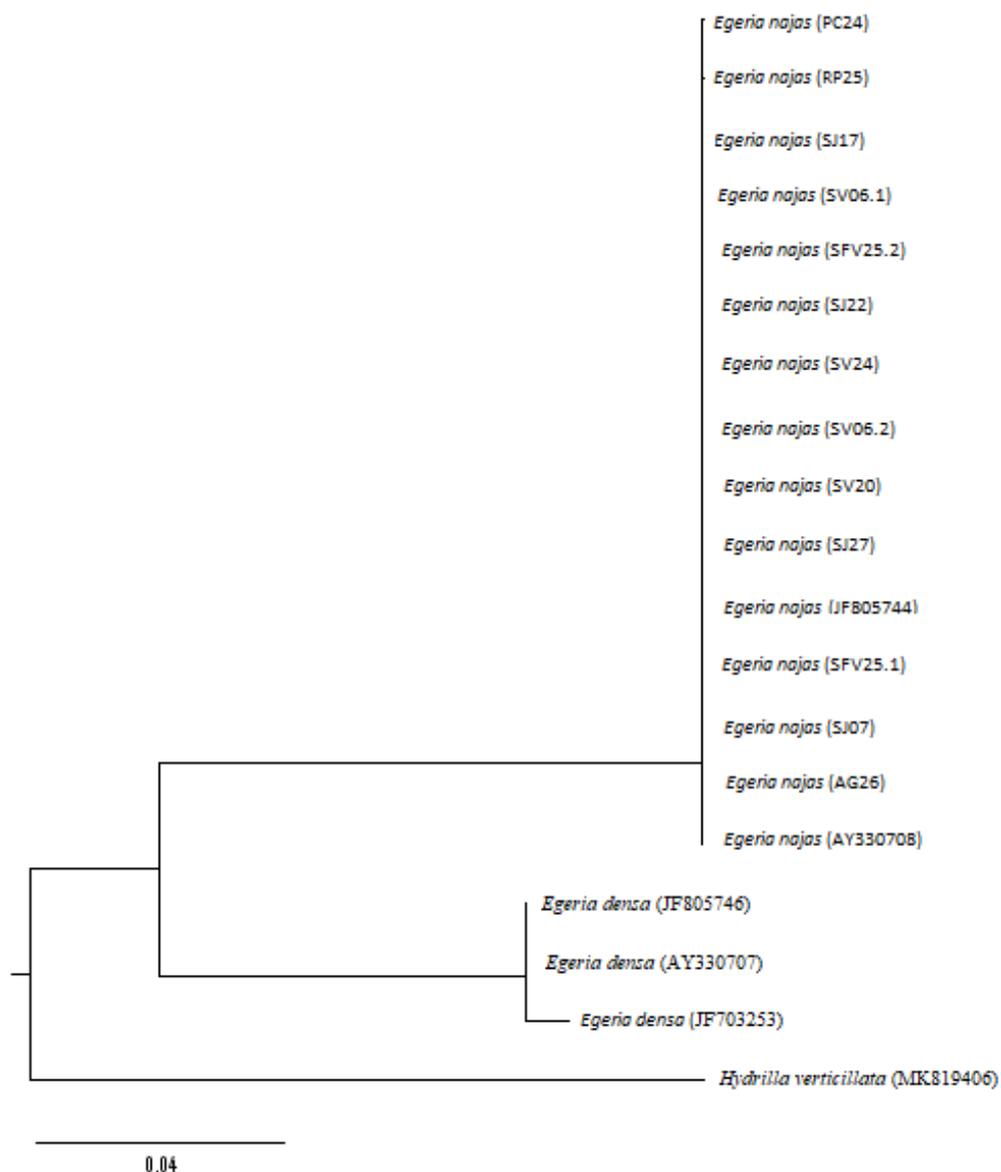


Figura 1. Árvore gênica de máxima verossimilhança gerada a partir de sequências de ITS de *Egeria*, obtidas no presente estudo e disponíveis no GenBank. *Hydrilla verticillata* foi usada como grupo externo.

Em termos de diversidade, plantas aquáticas geralmente apresentam valores menores do que as plantas terrestres (NAKAMURA; KADONO, 2000), entretanto, a capacidade invasora destas não parece ser prejudicada por este fator (LAMBERTINI *et al.* 2010). Baixos níveis de diversidade genética têm sido relatados comumente em estudos com macrófitas aquáticas, independente da distância de amostragem (LAMBERTINI *et al.* 2010; LÚCIO *et al.*, 2019), o que também foi observado nesse estudo. Populações de *E. najas* do rio Tietê, também apresentaram ausência de variabilidade genética (MORI *et al.*, 1999), o que fez com que os autores propusessem que a espécie estivesse formando grandes colônias por reprodução vegetativa, o que também pode ser sugerido para as populações de Itaipu. Os nossos resultados sugerem que os indivíduos presentes podem estar se reproduzindo por propagação clonal.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises de sequências de *ITS* indicaram ausência de variabilidade genética entre espécimes de *E. najas* coletados na usina hidrelétrica de Itaipu. Estudos reprodutivos e moleculares, incluindo outras regiões do genoma, serão necessários para entender a estratégia de reprodução que influencia a ausente ou baixa variabilidade genética de *E. najas* na região.

#### REFERÊNCIAS

COOK, C. D. K.; URMI-KÖNIG, K. A revision of the genus *Egeria* (Hydrocharitaceae). **Aquatic Botany**, v. 19, n. 1-2, p. 73-96, 1984.

FREITAS, A.; THOMAZ, S. M. Inorganic carbon shortage may limit the development of submersed macrophytes in habitats of the Paraná River basin. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 23, p. 57-62, 2011.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic Acids Symposium Series**, 1999. p. 95-98.

KOEHLER, S.; BOVE, C. P. Hydrocharitaceae from central Brazil: a new species of *Egeria* and a note on *Apalanthé granatensis*. **Novon**, p. 63-66, 2001.

LAMBERTINI, C. *et al.* Genetic diversity in three invasive clonal aquatic species in New Zealand. **BMC genetics**, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2010.

LES, D. H.; MOODY, M. L.; SOROS, C. L. A Reappraisal of Phylogentic Relationships in the Monocotyledon Family Hydrocharitaceae (Alismatidae). **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany**, v. 22, n. 1, p. 211-230, 2006.

LÚCIO, L. C. Análise genética e da estratégia de ocupação das populações de *Egeria* (Hydrocharitaceae) da bacia do alto rio Paraná. 2009.

LÚCIO, L. C. *et al.* Molecular characterization of the invasive aquatic macrophyte *Hydrilla verticillata* (Hydrocharitaceae) in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, 2019.

MORI, E. S. *et al.* Caracterização genética de populações de *Egeria najas* presentes no reservatório de Jupia e rios afluentes. **Planta Daninha**, v. 17, n. 2, p. 217-225, 1999.

NAKAMURA, T.; KADONO, Y. Genetic diversity of the submerged macrophyte *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle in a river system in Japan. **Limnology**, v. 1, n. 1, p. 27-31, 2000.

PIERINI, S. A.; THOMAZ, S. M. Effects of inorganic carbon source on photosynthetic rates of *Egeria najas* Planchon and *Egeria densa* Planchon (Hydrocharitaceae). **Aquatic Botany**, v. 78, n. 2, p. 135-146, 2004.

ROSENTHAL, A.; COUTELLE, O.; CRAXTON, M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 1, p. 173, 1993.

TAMURA, K. *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.