

PROSPECÇÃO DE MARCADORES NUCLEARES E PLASTIDIAIS PARA ESTUDOS GENÉTICOS DA ESPÉCIE INVASORA *Urochloa arrecta*, NA PLANÍCIE DE INUNDAÇÃO DO ALTO RIO PARANÁ E RESERVATÓRIO DA USINA HIDRELÉTRICA DE ITAIPU

Lara Hoffmeister Luz¹, Bárbara Scorsim Arjona², Nathália Alves Diamante³, Márcio José Silveira⁴, Sidinei Magela Thomaz⁵, Alessandra Valéria de Oliveira⁶

¹Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá - UEM. Programa de Iniciação Científica PIC/UEM. [lahahluz98@gmail.com](mailto:larahluz98@gmail.com)

²Discente do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA), Universidade Estadual de Maringá. barbarascorsim@gmail.com

³Doutora em Biologia Comparada-Universidade Estadual de Maringá – UEM. nathaliadiamante@gmail.com

⁴Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia / Universidade Estadual de Maringá – UEM. s.marciojs@gmail.com

⁵Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA) / Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia/ Universidade Estadual de Maringá - UEM. smthomaz@nupelia.uem.br

⁶Orientadora, Doutora, Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular/Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia / Universidade Estadual de Maringá - UEM. avoliveira@uem.br

RESUMO

As macrófitas aquáticas possuem uma importante diversidade dentro dos ecossistemas, porém seu crescimento excessivo, bem como a introdução de espécies exóticas, pode interferir no ambiente em que vivem. No reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu estão presentes diversas famílias de macrófitas aquáticas, destacando-se as espécies invasoras de *Poaceae* pertencentes ao gênero *Urochloa*. Apesar de ser altamente invasiva, reduzindo a diversidade da comunidade de macrófitas nativas, não se sabe ao certo qual é a estratégia reprodutiva utilizada por espécimes de *Urochloa arrecta*, nem existem dados sobre a variação genética desse grupo na região. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi realizar a prospecção de marcadores moleculares nucleares e do cloroplasto para futuros estudos de variabilidade genética de *Urochloa arrecta* no alto rio Paraná e reservatório de Itaipu. As amostras coletadas tiveram seu material genético extraído e amplificado com primers específicos para as regiões *ITS*, *rbcl* e *trnL-trnF*. As sequências de DNA obtidas foram comparadas com sequências do gênero *Urochloa* depositadas no GenBank, buscando por polimorfismos e calculando a distância *p*. Os marcadores utilizados se mostraram úteis para a discriminação de espécies próximas, porém foram detectados apenas polimorfismos pontuais, sendo necessário a análise de um maior número de indivíduos para conclusões mais seguras a respeito de sua variabilidade genética.

PALAVRAS-CHAVE: Introdução; Macrófitas; Variabilidade genética.

1 INTRODUÇÃO

As macrófitas aquáticas tem se destacado em estudos ecológicos sobre invasões de espécies, muitos deles abordando sua ocorrência, já que nos sistemas lênticos das regiões tropicais, frequentemente encontram condições favoráveis para o desenvolvimento o ano todo. O grande enfoque dos estudos recentes tem sido a introdução de macrófitas aquáticas, na tentativa de prever quais ambientes seriam mais favoráveis a serem invadidos e por quais espécies. Segundo FLEMING et al. (2015), um conjunto de fatores pode afetar o potencial invasor das espécies. Esta preocupação está mais presente quando se trata de ecossistemas de água doce, onde a invasão pode deslocar espécies nativas e não nativas e degradar o ambiente.

O processo de invasão de espécies pode impactar o meio ambiente de diversas maneiras, por exemplo, aumentar a competição entre espécies nativas e não nativas, fator este que pode alterar a biodiversidade e conseqüentemente levar à extinção de espécies. Além disso, pode impactar também a geração de energia pelas hidrelétricas (MORMUL et al., 2010) quando presentes em reservatórios. No reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu existem diversas famílias de macrófitas

aquáticas, destacando-se as espécies invasoras da família *Poaceae*, que possui a maior diversidade na região do alto rio Paraná (21 espécies) (FERREIRA et al., 2011). Uma das espécies mais significativas deste grupo é a *Urochloa arrecta*, originária da África, que até recentemente era identificada como *U. subquadrifida* (THOMAZ et al., 2012).

Espécies de *Urochloa* causam preocupação, pois além de serem altamente invasivas, reduzem a diversidade da comunidade de macrófitas nativas (MICHELAN et al., 2010) e são bastante frequentes, ocupando grande parte das margens dos reservatórios que habitam, por exemplo, no reservatório de Itaipu (MORMUL et al., 2010) e no reservatório de Rosana (THOMAZ et al., 2012). Além disso *Urochloa* também é encontrada na planície de inundação do alto rio Paraná, que possui a terceira maior variedade de macrófitas aquáticas da América do Sul, possuindo 153 espécies ao todo, perdendo apenas para área costeira do Rio Grande do Sul e para o Pantanal-Matogrossense (FERREIRA et al., 2011).

Plantas aquáticas em geral, incluindo o gênero *Urochloa*, possuem a capacidade de se reproduzir sexualmente, por meio da dispersão de sementes, e assexualmente, via fragmentos, dando origem à novos indivíduos. O modo de reprodução tem efeitos importantes sobre a distribuição espacial da variação genética, dentro e entre populações, e em sua capacidade invasiva. Não se sabe ao certo qual é a estratégia reprodutiva que espécimes de *Urochloa* estão utilizando para colonizar a região, além disso, não existem dados sobre a variação genética desse gênero. Uma forma de estudar essa variação genética relacionada com o modo de reprodução e a distribuição de plantas aquáticas, pode ser através de marcadores moleculares plastidiais e nucleares (SANTOS et al., 2015; WANG et al., 2017).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi prospectar marcadores moleculares úteis para discriminação de espécies de *Urochloa* e contribuir para futuros estudos de variabilidade genética do gênero, na planície de inundação do alto rio Paraná e reservatório de Itaipu.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de *Urochloa arrecta* (n=10) foram coletadas no reservatório da usina hidrelétrica de Itaipu e na planície de inundação do alto rio Paraná, próximo a Porto Rico, Paraná, Brasil. As amostras foram identificadas e acondicionadas em tubos falcon contendo tampão TE e posteriormente transportadas para o Laboratório de Genética do NUPÉLIA da Universidade Estadual de Maringá.

A extração de DNA das amostras foi realizada usando o kit de extração Wizard Genomic DNA Purification Kit, seguindo as instruções do fabricante. Foram amplificados por PCR os loci *ITS*, *trnL-trnF*, *rbcl*, *matK* e alguns loci de microssatélites. Os fragmentos de DNA obtidos nas amplificações foram separados em gel de agarose 1%, purificados de acordo com ROSENTHAL et al. (1993) e encaminhados para sequenciamento.

As sequências obtidas foram editadas manualmente utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999) e alinhados no programa MEGA 7 (TAMURA et al., 2013), utilizando o algoritmo Clustalw (THOMPSON et al., 1994). Ainda foram calculados nesse programa os valores de distância *p* entre as amostras obtidas. As sequências foram comparadas com sequências disponíveis em banco de dados (GenBank e Bold Systems).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram obtidos fragmentos parciais de aproximadamente 516 e 854 pb, para os marcadores *ITS* e *trnL-trnF*, respectivamente. Para o marcador *rbcL* foram obtidos fragmentos de 504 pb (Figura 1). O locus *matK* e alguns loci de microssatélites, já utilizados em outras espécies de gramíneas, não foram amplificados com sucesso.

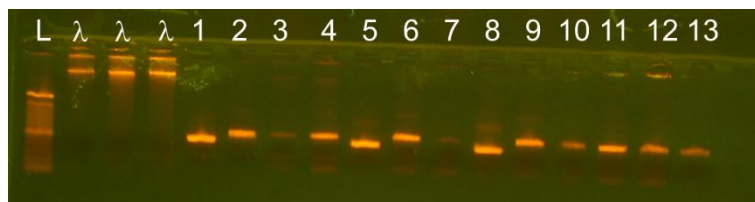


Figura 1: Fragmentos de DNA amplificados com o marcador *rbcL*, em gel de agarose 1%. L= DNA Ladder 100pb, λ = DNA *lambda* de concentração conhecida, 1 a 13= Amostras de *U. arrecta*.

Na análise da variação genética obtida com cada marcador, onde foi calculado a distância p entre as amostras utilizadas, verificou-se que na região *trnL-trnF* não há variação intraespecífica, nem quando foi comparado as amostras do reservatório de Itaipu e planície de inundação do alto rio Paraná com sequências de *Urochloa arrecta* do GenBank. Em relação à comparação com outras espécies do gênero, os valores de distância genética ficam entre 0,9 e 2,2%. Já, a análise da região *ITS* possibilitou detecção de pequena variação entre as amostras da área de estudo e sequências de *U. arrecta* depositadas no GenBank, o que resultou em uma distância p de 0,4%. Além disso, os valores de distância apresentados em relação a outras espécies de *Urochloa* foram altos, superiores a 8%.

Ao analisar a região amplificada *rbcL*, foi encontrado um polimorfismo entre as amostras estudadas, o que resultou em uma distância p de 0,2% entre algumas sequências. O polimorfismo foi identificado no sítio 122, com uma substituição de bases timina-adenina. Em relação à comparação com outras espécies do gênero, os valores de distância genética ficam entre 0,8 e 1,0%.

Conforme podemos verificar, os espécimes de *U. arrecta* do reservatório de Itaipu e da planície de inundação do alto rio Paraná apresentaram uma baixa variação molecular nas regiões analisadas, o que parece ser comum em plantas aquáticas introduzidas (ZHANG et al., 2010), entretanto, puderam ser discriminados de outras espécies do gênero. Por fim, estudos com mais indivíduos de diferentes regiões da bacia do rio Paraná serão necessários para compreensão da variação genética dessas populações e dos mecanismos de reprodução dessa espécie, com conclusões mais seguras.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do presente estudo, é possível concluir que os marcadores *ITS*, *rbcL* e *trnL-trnF* foram amplificados com sucesso e se mostraram úteis para o estudo genético da espécie *Urochloa arrecta* na planície de inundação do alto rio Paraná, discriminando essa espécie de outras espécies próximas do gênero. Além disso, a análise dessas regiões indica que a população estudada apresenta pouca variação genética, o que poderá ser confirmado com novas análises moleculares contemplando um maior número de indivíduos.

REFERÊNCIAS

FERREIRA, F. A.; MORMUL, R. P.; THOMAZ, S. T.; POTT, A.; POTT, V. J. Macrophytes in the upper Paraná river floodplain: checklist and comparison with other

large South American wetlands. **Revista de Biologia Tropical**, v. 59, n. 12, p. 541-556, 2011.

FLEMING, J. P.; DIBBLE, E. D. Ecological mechanisms of invasion success in aquatic macrophytes. **Hydrobiologia**, v. 746, p. 23-37, 2015.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

MICHELAN, T. S.; THOMAZ, S. M.; MORMUL, R. P.; CARVALHO, P. Effects of an exotic invasive macrophyte (tropical signalgrass) on native plant community composition, species richness and functional diversity. **Freshwater Biology**, v. 55, p. 1315-1326, 2010.

MORMUL, R. P.; FERREIRA, F. A.; MICHELAN, T. S.; CARVALHO, P.; SILVEIRA, M. J.; THOMAZ, S. M. Aquatic macrophytes in the large, sub-tropical Itaipu Reservoir, Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 58, n. 4, p. 1437-1452, 2010.

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. 173-174, 1993.

SANTOS, J. C. S.; BARRETO, M. A.; OLIVEIRA, F. A.; VIGNA, B. B. Z.; SOUZA, A. P. Microsatellite markers for *Urochloa humidicola* (*Poaceae*) and their transferability to other *Urochloa* species. **BMC Research Notes**, v. 8, p. 83, 2015.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

THOMAZ, S. M.; SILVEIRA, M. J.; MICHELAN, T. S. The colonization success of an exotic *Poaceae* is related to native macrophyte richness, wind disturbance and riparian vegetation. **Aquatic Science**, v. 74, p. 809-815, 2012.

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.

WANG, A.; GOPURENKO, D.; WU, H.; LEPSCHI, B. Evaluation of six candidate DNA barcode loci for identification of five important invasive grasses in eastern Australia. **Periodic PLoS ONE**, v. 12, n. 4, e0175338, 2017.

ZHAN, Y.Y.; ZHANG, D.Y.; BARRET, S.C.H. Genetic uniformity characteriz the 560 invasive spread of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) a clonal aquatic plant. 561 **Molecular Ecology** v. 19, p. 1774-1786, 2010.