

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

LÉIA CAROLINA LUCIO

Análise genética e da estratégia de ocupação das populações de *Egeria*
(Hydrocharitaceae) da bacia do alto rio Paraná

Maringá
2009

LÉIA CAROLINA LUCIO

Análise genética e da estratégia de ocupação das populações de *Egeria*
(Hydrocharitaceae) da bacia do alto rio Paraná

Tese 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 Doutor em Ciências Ambientais
Área de concentração: Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli
Co-orientador: Prof. Dr. Sidinei Magela Thomaz

Maringá
2009

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

L938a Lucio, Léia Carolina, 1980-
Análise genética e da estratégia de ocupação das populações de *Egeria*
(Hydrocharitaceae) da bacia do alto rio Paraná / Léia Carolina Lucio. -- Maringá, 2009.
86 f. : il.

Tese (doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--Universidade
Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.

Co-Orientador: Prof. Dr. Sidinei Magela Thomaz.

1. *Egeria* (Hydrocharitaceae) - Análise genética - Planície de inundação - Alto rio
Paraná. 2. *Egeria* (Hydrocharitaceae) - Metapopulações, Dinâmica de - Planície de
inundação - Alto rio Paraná. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de
Biologia. Programa de Pós-Graduação em "Ecologia de Ambientes Aquáticos
Continentais".

CDD 22. ed. -584.7313509816
NBR/CIP - 12899 AACR/2

FOLHA DE APROVAÇÃO

LÉIA CAROLINA LUCIO

Análise genética e da estratégia de ocupação das populações de *Egeria*
(Hydrocharitaceae) da bacia do alto rio Paraná

Tese 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 Doutor em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Alberto José Prioli
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Alessandra Valéria de Oliveira
Centro Universitário de Maringá (Cesumar)

Prof.^a Dr.^a Sandra Andrea Pierini
Faculdade Integrado de Campo Mourão (Integrado)

Prof. Dr. Horácio Ferreira Júlio Júnior
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá/UFPR

Aprovada em: 21 de agosto de 2009.

Local de defesa: Anfiteatro do Nupélia, Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Carlos Lucio e Dulce Aparecida Fugi Lucio, por toda sabedoria e amor destinados a minha pessoa.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Ao meu Orientador, Professor Dr. Alberto José Prioli, pela orientação e confiança que depositou em mim ao longo de dez anos de convivência e de ensinamentos.

À Professora Dra. Sônia Maria A. P. Prioli, pela amizade e apoio em todos esses anos e, também, pela orientação.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Dulce, pela educação, amor, apoio, incentivo e compreensão destinados a mim.

Ao meu irmão Rodrigo pela cumplicidade e ajuda mútua de todos esses anos.

Ao meu namorado Denis pela compreensão e apoio nos momentos difíceis, inclusive, na etapa final deste trabalho.

A minha tia e amiga Rô, por todo apoio e incentivo durante toda etapa acadêmica e contribuição na minha vida.

Ao meu co-orientador e amigo professor Sidinei, pela participação, contribuição científica e apoio pessoal dispensados nestes anos.

A minha amiga fiel Talge, pela ajuda e participação neste trabalho e pela cumplicidade em todos os momentos que convivemos.

Aos amigos do laboratório de genética, Thiago, Thaís e Vivian, pela ajuda nas horas que precisei e pelos anos de convivência.

Aos funcionários do DBC, Mara José e Donizete pela disposição e carinho dispensados nestes anos de trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Limnologia, Josi, Marcio, Dú, e ao funcionário Valmir pela ajuda nas etapas de coleta.

A professora Claudete Ruas e a aluna Luana, pela oportunidade de trabalharmos juntas, numa etapa importante deste estudo.

À Professora Dra. Maria Aparecida Fernandes e a equipe de laboratório pela ajuda no sequenciamento.

A todos meus amigos e colegas de curso.

À toda minha família pelo incentivo e torcida,

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, pelos ensinamentos recebidos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA) pela oportunidade.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM).

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida durante o doutorado.

A Itaipu pela oportunidade e apoio financeiro no desenvolvimento desta tese.

E enfim, a todos que contribuíram para mais esta jornada da minha vida muito obrigada!

Análise genética e da estratégia de ocupação das populações de *Egeria* (Hydrocharitaceae) da bacia do alto rio Paraná

RESUMO

Egeria densa e *Egeria najas* (Hydrocharitaceae) são espécies nativas da bacia do alto rio Paraná (Brasil), e colonizam diversos ecossistemas com intenso fluxo de propágulos dentro e entre os ambientes. Os principais objetivos desse trabalho foram: (i) avaliar a diversidade genética das populações de *Egeria*; (ii) utilizar marcadores moleculares correspondente a sequência parcial do *trnL* e do espaçador intergênico *trnL-trnF* do cpDNA e a região ITS do rDNA para caracterizar as populações de *E. densa* e *E. najas*; e (iii) isolar regiões microssatélites para o desenho de *primers* que flanqueiem os *SSR* de *Egeria densa*. A baixa diversidade genética, determinada por marcadores moleculares dominantes, observada nas populações tanto de *E. densa* quanto de *E. najas*, indica predomínio de reprodução vegetativa nas espécies, no entanto, não descarta totalmente a ausência de reprodução sexuada. A caracterização de sequências nucleotídicas do genoma cloroplastídico e nuclear identificou haplótipos distintos em cada uma das espécies, no entanto, somente o genoma nuclear, correspondente ao ITS do rDNA, permitiu discriminar e caracterizar molecularmente *E. densa* e *E. najas*. Além disso, dentre as combinações haplotípicas encontradas nas populações de *Egeria*, uma delas pode ser um indicativo que a recombinação genética, embora rara, pode estar presente. Marcadores moleculares codominantes como os microssatélites (*SSR*) geram maior polimorfismo e permitiram avaliações mais conclusivas sobre a diversidade genética das populações de *Egeria*, porém, poucos *primers SSR* são encontrados para vegetação aquática. O isolamento e desenvolvimento destes iniciadores foram concluídos, com perspectivas futuras para seu emprego. A análise genética das populações de *Egeria* auxilia na compreensão da estratégia de ocupação dos ambientes da bacia do alto rio Paraná. A relação entre processos migratórios de fragmentos vegetativos entre *patches* vizinhos e a baixa variabilidade genética dentro e entre estes *patches*, e progressivamente entre os ambientes conectados rio abaixo, sugere uma dinâmica metapopulacional para o gênero. Os marcadores microssatélites são mais eficientes que os marcadores dominantes e proporcionaram investigações, ainda, mais conclusivas sobre a genética e a ocupação das populações nativas de *E. densa* e *E. najas* da bacia do alto rio Paraná.

Palavras-chaves: bacia do alto rio Paraná. *Egeria*. Metapopulação. Microssatélites.

Occupation Strategy and Genetic Analyses of *Egeria* (Hydrocharitaceae) populations in the Upper Paraná River Basin

ABSTRACT

Egeria densa and *Egeria najas* (Hydrocharitaceae) are native species from the Upper Paraná River Basin (Brazil). They colonize a variety of ecosystems and are characterized by having an intense flow of propagules within and between environments. The main goals of this thesis were to: (i) assess the genetic diversity of *Egeria* populations, (ii) use markers corresponding to the *trnL* partial sequence and to *trnL-trnF* intergenic spacer from the cpDNA and ITS region of rDNA to molecularly characterize *E. densa* and *E. najas* populations; and (iii) isolate microsatellites region to design primers that flank SSR regions for *Egeria densa*. The low genetic diversity of both *E. densa* and *E. najas* populations, observed using dominant molecular markers, indicates a predominance of vegetative reproduction. However, this observation does not discard completely the presence of sexual reproduction. The characterization of nucleotide sequences from both chloroplastidic and nuclear genomes identified distinct haplotypes in both species. However, only the nuclear genome (corresponding to the ITS region of rDNA) allowed the discrimination of different haplotypes and was useful to molecularly characterize *E. densa* and *E. najas*. Moreover, one of the haplotype combinations may indicate that genetic recombination is present, although rare. Codominant molecular markers, such as microsatellites (SSR), generated higher polymorphism and were more successful to evaluate the genetic diversity of *Egeria* populations. However, few SSR primers are currently described for aquatic vegetation. The isolation and development of these primers were completed in our study, with future prospects for their employment. Genetic analyses of *Egeria* populations are useful to understand the occupation strategy of the environments of the Upper Paraná River basin. The migration processes of vegetative fragments and the low genetic variability of individuals, which increases with distance among patches, suggests that *Egeria* populations follow a Metapopulation dynamics. Microsatellite markers were more efficient than the dominant markers and support more conclusive investigations about the genetics and occupancy of native populations of *E. densa* and *E. najas* in the Upper Paraná River basin.

Keywords: Macrophytes. Metapopulation. Microsatellite. Molecular Markers.

Tese elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Aquatic Botanic*. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/03043770>

SUMÁRIO

Capítulo 1 - Diversidade genética de populações de *Egeria*, da bacia do alto rio Paraná, determinadas por marcadores RAPD E ISSR

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1 Área de estudo e amostragem.....	17
2.2 Extração e Quantificação do DNA.....	17
2.3 Amplificação RAPD.....	19
2.4 Amplificação ISSR.....	20
2.5 Análise dos dados de RAPD e ISSR	20
3 RESULTADOS	21
3.1 Perfil RAPD nas espécies de <i>Egeria</i>	21
3.2 Perfil ISSR de <i>E. najas</i> e <i>E. densa</i>	29
4. DISCUSSÃO.....	30
4.1 <i>Egeria najas</i>	30
4.2 <i>Egeria densa</i>	32
4.3 Variantes genotípicos.....	34
4.4 Caso de dinâmica de metapopulações.....	34
REFERÊNCIAS	36

Capítulo 2 - Caracterização molecular de duas espécies nativas de *Egeria* da bacia do alto rio Paraná

1 INTRODUÇÃO.....	45
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
2.1 Área de estudo e amostragem.....	47
2.2 Extração e Quantificação do DNA.....	47
2.3 Amplificação de Sequências de cpDNA, ITS do rDNA e Sequenciamento.....	49
2.4 Análise dos dados das sequências do cpDNA e do ITS.....	50
3 RESULTADOS	50
3.1 Sequências do DNA do cloroplasto.....	50
3.2 Região ITS do DNA ribossômico.....	55
3.3 Ocorrência de haplótipos nas populações de <i>E. densa</i> e <i>E. najas</i>	60

3.4 Caracterização molecular de <i>Egeria densa</i> e <i>Egeria najas</i> pelo ITS do rDNA.....	63
4. DISCUSSÃO.....	68
4.1 Sequências parciais do tRNAL e trnL-trnF do cp DNA.....	68
4.2 Sequências ITS do rDNA nuclear.....	69
4.2.1 ITS na caracterização molecular de <i>Egeria</i>	70
REFERÊNCIAS	71

Capítulo 3 - Desenvolvimento de marcadores microssatélites (*SSR*) para *Egeria densa*
(Hydrocharitaceae)

1 INTRODUÇÃO.....	79
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	80
2.1 Extração e Quantificação do DNA.....	80
2.2 Construção de Biblioteca de DNA enriquecida com <i>SSR</i>	80
2.3 Análise dos dados.....	81
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
REFERÊNCIAS	84

CAPÍTULO 1

**Diversidade genética de populações de *Egeria*, da bacia do alto rio Paraná,
determinadas por marcadores RAPD E ISSR**

Diversidade genética de populações de *Egeria*, da bacia do alto rio Paraná, determinadas por marcadores RAPD E ISSR

Resumo

A diversidade genética das populações de *Egeria densa* e *Egeria najas* (Hydrocharitaceae), nativas da bacia do alto rio Paraná (Brasil), foi determinada através de marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Ambos marcadores foram eficazes em detectar homogeneidade genética dentro e entre as populações. No entanto, apenas os marcadores RAPD permitiram a identificação de uma baixa diversidade genética nas duas espécies. Essa pequena variação foi determinada pela presença de seis (19,35%) locos gênicos polimórficos dos 31 estudados em *E. densa* e de nove (23,08%) locos polimórficos dos 39 estudados em *E. najas*. O predomínio de reprodução assexuada e da dispersão de propágulos vegetativos são fatores determinantes da pequena diversidade genética encontrada dentro e entre as populações de *Egeria* da bacia do alto rio Paraná. O ecossistema aquático favorece os processos de migração de propágulos das macrófitas aquáticas e, no caso das espécies de *Egeria*, a frequência nas migrações sustenta a grande homogeneidade genética verificada nas populações. Além disso, a capacidade de ocupação de habitats novos e de recolonizar habitats perturbados, são fortes indicativos que tanto *E.densa* quanto *E. najas*, ocupam os ambientes por modelos que seguem a dinâmica de metapopulações.

Palavras-chave: *Egeria*, dinâmica de metapopulações, RAPD, ISSR.

Genetic diversity of *Egeria* populations from the Upper Paraná River basin, determined by RAPD and ISSR markers

Abstract

The genetic diversity of native populations of *Egeria densa* and *Egeria najas* (Hydrocharitaceae) was evaluated using the molecular markers RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) in the Upper Paraná River Basin (Brazil). Both markers successfully detected genetic homogeneity within and between populations of a same species. In addition, RAPD markers identified that populations of both species have a low genetic diversity. This small variation was characterized by the presence of six (19.35%) of the 31 polymorphic genetic loci studied in *E. densa* and nine (23.08%) of the 39 polymorphic loci studied in *E. najas*. Asexual reproduction and dispersion through vegetative propagules are the mechanisms responsible for the low genetic diversity found within and between populations of *Egeria* in the Upper Paraná River basin. The spatial configuration of the aquatic ecosystem favors the dispersion of aquatic macrophytes through vegetative propagules. Considering *Egeria* species, the frequency of dispersion maintain the high genetic evenness among populations. Furthermore, the ability to colonize new habitats and/or to re-colonize disturbed habitats indicates that both *E. densa* and *E. najas* follow a metapopulation dynamics.

Keywords: *Egeria*, metapopulation dynamic, RAPD, ISSR.

1. Introdução

As espécies de macrófitas aquáticas submersas da família Hydrocharitaceae (Cook e Urmi-König, 1984) *Egeria densa* e *Egeria najas* são nativas da América do Sul e desenvolvem-se, acentuadamente em corpos hídricos com águas transparentes e sedimentos ricos (Martins et al., 2003). Os benefícios ecológicos promovidos por essa vegetação são inúmeros (Esteves, 1998; Wetzel, 2001), porém as mesmas podem ocasionar problemas indesejáveis quando crescem demasiadamente (Thomaz, 1998; Bini et al., 1999; Bini e Thomaz, 2005).

Em reservatórios de usinas hidrelétricas são freqüentes os prejuízos provocados pelo crescimento excessivo de *E. densa*, considerada uma potencial daninha neotropical (Barreto et al., 2001; Tanaka et al., 2002; Negrisoli et al., 2003; Correa et al., 2004; Velini et al., 2004; Carvalho et al., 2005). É crescente o número de reservatórios povoados com *E. najas*, contudo, esta ainda não atingiu patamares considerados nocivos aos usos dos ambientes aquáticos, como ocorre com *E. densa* (Martins et al., 2003; Borges Neto et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Nascimento et al., 2008).

No reservatório de Itaipu, *E. najas* é a espécie submersa com maior freqüência de ocorrência e pode oferecer riscos aos usos em determinados locais desse ecossistema (Thomaz e Bini, 2003). Essa espécie é afetada negativamente por distúrbios como depleções de níveis de água, no entanto, se recupera com sucesso, seguindo dinâmica de metapopulação (Bini e Thomaz, 2005), conforme demonstrado por modelos matemáticos (Gubiani, 2004) e análise genética de suas populações (Lucio, 2005).

Egeria densa, muito semelhante morfológicamente a *E. najas*, sempre foi incipiente no reservatório de Itaipu, contudo, a partir de 2004 sua abundância aumentou consideravelmente (Fuem/Nupélia, 2007). O incremento na ocupação do reservatório por essa espécie provavelmente foi resultado de alterações limnológicas, como o aumento na transparência da água e da condutividade elétrica (Bini, 2001; Thomaz et al., 2003a; Fuem/Nupélia, 2005; Bini e Thomaz, 2005). A rápida expansão de *E. densa* é esperada, já que a espécie possui grande potencial infestante. Além disso, tanto ela quanto *E. najas*, reproduzem-se, principalmente, por propagação vegetativa que proporciona rápida colonização, sendo a reprodução por sementes muito rara nessas espécies (Cook e Urmi-König, 1984; Bowmer et al., 1995; Rodella et al., 2006; Silveira et al., 2009).

Estudos de dinâmica de populações e da ocorrência de metapopulações, fornecendo informações sobre processos de colonização e re-colonização de bancos de macrófitas

aquáticas, são importantes no reconhecimento das fontes de dispersão dos propágulos e podem subsidiar medidas de manejo (Thomaz e Bini, 1999; Thomaz, 2005). Embora tenha sido sugerido que a recuperação de bancos de *E. najas* diante de distúrbios segue uma dinâmica de metapopulações (Lucio, 2005), não se sabe se a ocupação espacial e temporal de *E. densa* possui a mesma dinâmica.

A biologia molecular fornece ferramentas úteis para o estudo da variabilidade genética em populações naturais, inclusive, de macrófitas aquáticas (Li et al., 2004; Chen et al., 2007). Os marcadores de DNA são vantajosos para a caracterização de recursos genéticos porque representam somente a variabilidade genética, não estando, portanto, sujeitos a influência ambiental (Sodré et al., 2002). A análise com marcadores moleculares RAPD de populações de *E. densa*, não nativas, na Califórnia (USA), revelou pequenas diferenças genéticas entre as populações (Weiss, 1997). Martins et al. (2003) caracterizaram populações de *E. densa* e *E. najas*, de reservatórios do estado de São Paulo, com marcadores RAPD e observaram maior variabilidade genética quando comparados a populações não nativas.

Os marcadores moleculares RAPD e ISSR têm sido utilizados com sucesso na determinação de DNA *fingerprinting* (Moreno et al., 1998; Blair et al., 1999; Divaret et al., 1999; Gilbert et al., 1999), incluindo investigações sobre diversidade clonal de macrófitas aquáticas (Ren et al., 2005; Li et al., 2006; Ren e Zhang, 2007) e estudos de genética de populações (Wolfe et al., 1998; Nebauer et al., 1999; Li et al., 2005). A natureza hipervariável dos marcadores ISSR e o seu potencial para avaliar a diversidade genética da vegetação aquática, incluindo as clonais, têm sido revelados em diversos trabalhos (Chen et al., 2005, 2006; Han et al., 2007).

A homogeneidade genética dos marcadores RAPD e ISSR, encontrada nas populações de *E. najas* no reservatório de Itaipu (Lucio, 2005), permitiu estabelecer a estratégia de ocupação desta espécie por dinâmica de metapopulações, a qual está correlacionada com a dispersão da espécie através de propágulos vegetativos. Além disso, os resultados sugeriram que a provável origem para as populações está em ecossistemas adjacentes.

O presente estudo tem como objetivos caracterizar geneticamente, com marcadores RAPD e ISSR, as populações de *E. densa* do reservatório de Itaipu e inferir sobre sua provável estratégia de ocupação do reservatório. Pretende-se, também, ampliar a caracterização por RAPD e ISSR das populações de *E. densa* e *E. najas* de ecossistemas adjacentes, procurando identificar as relações genéticas e os prováveis locais de origem das populações que colonizam o reservatório.

2. Material e métodos

2.1. Área de estudo e amostragem

Foram amostrados 124 indivíduos de *E. najas* distribuídos em 59 bancos de oito ecossistemas da bacia do alto rio Paraná (Fig. 1). No reservatório de Itaipu (margem esquerda) 27 bancos foram amostrados, em Porto Primavera apenas um, cinco em Jupiá, dois em Ilha Solteira (rio Paraná) e Rosana (rio Paranapanema), cinco bancos em Três Irmãos (rio Tietê) e 14 na planície alagável do alto rio Paraná.

Para *E. densa* foram amostrados 87 indivíduos distribuídos em 27 bancos do reservatório de Itaipu e oito bancos em Jupiá, Rosana e Salto Grande (os dois últimos no rio Paranapanema). Estes bancos (*patches*) constituem subpopulações que compõe a população de ambas as espécies em cada ecossistema estudado.

Os exemplares foram levados em sacos plásticos com água local em caixa de isopor até o laboratório de Genética/Nupelia da Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR.

2.2. Extração e Quantificação do DNA

Precedendo o processo de extração do DNA, todas as amostras de *Egeria* foram lavadas com água destilada e detergente *Tween 20*, para remoção de microorganismos aderidos à superfície das macrófitas. O DNA total de cada exemplar foi isolado, conforme adaptações do protocolo de Lodhi et al. (1994). A quantificação dos mesmos foi estimada pela comparação com quantidades conhecidas de DNA do fago λ , por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

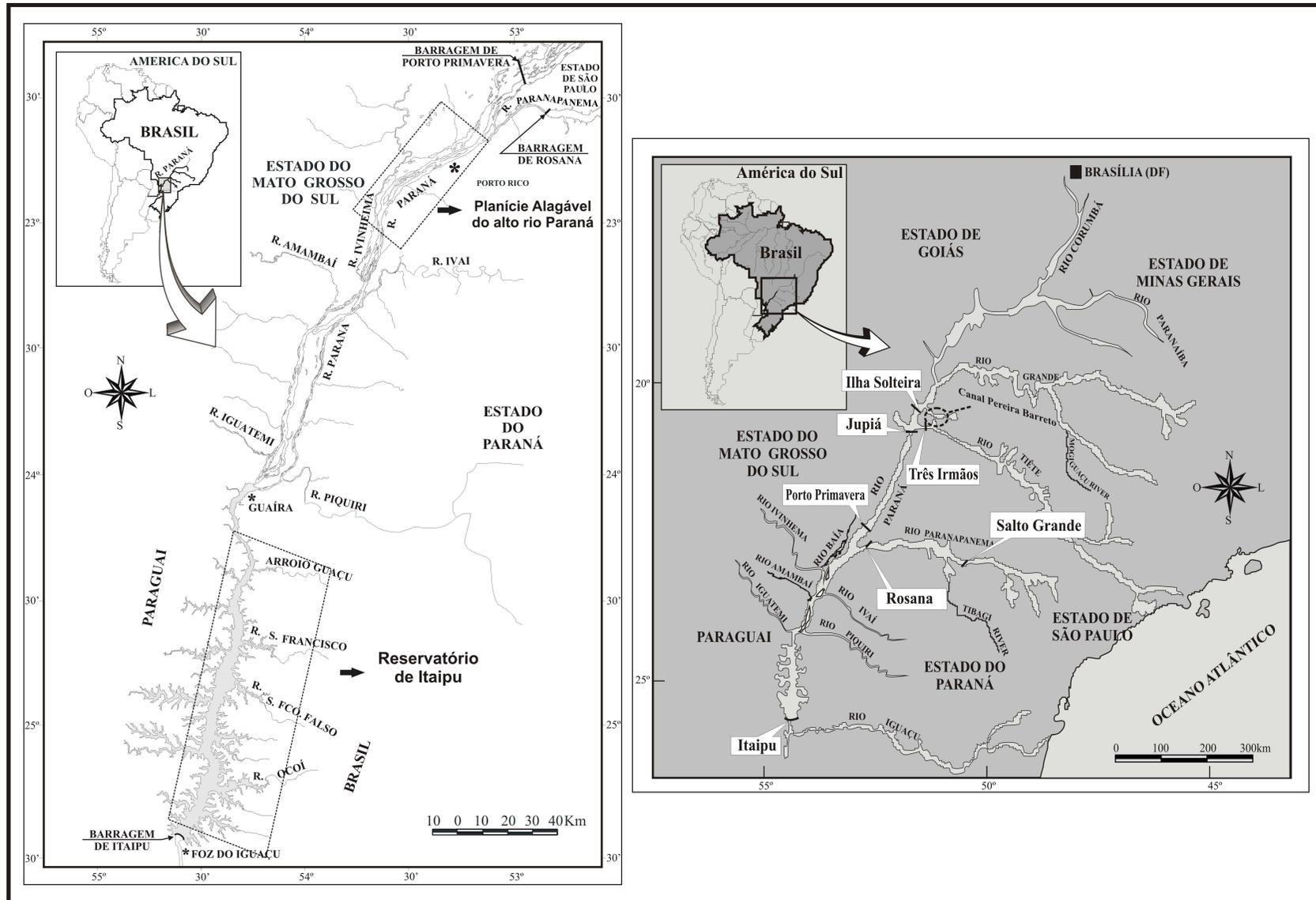


Fig.1. Mapa dos ecossistemas da bacia do alto rio Paraná, locais de coleta das espécies de *Egeria*.

2.3. Amplificação RAPD

O DNA total de cada indivíduo de *E. najas* e *E. densa* foi utilizado para amplificação de fragmentos via RAPD-PCR, baseando-se na metodologia de Willians et al. (1990). Dentre 35 primers testados em cada espécie, seis foram selecionados para cada uma delas (Tabela 1).

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação de marcadores RAPD de *Egeria densa* e *Egeria najas*.

Primers		<i>Egeria densa</i>	<i>Egeria najas</i>
Identificação	Seqüências		
OPA-19	CAAACGTCGG	x	x
OPK-14	CCCGCTACAC	x	x
OPX-6	ACGCCAGAGG	–	x
OPX-7	GAGCGAGGCT	x	x
OPX-11	GGAGCCTCAG	x	x
OPW-1	CTCAGTGTCC	x	x
OPW-3	GTCCGGAGTG	x	–

Para amplificação do DNA foi feita uma mistura de reação contendo tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 2 mM, primer 0,46 µM, dNTP 0,19 mM, 1 U/reação de *Taq* DNA-polimerase (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, U.S.A), DNA (15 ng) e água suficiente para completar o volume final de 13 µL para cada amostra. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador MJ Research PT 100, programado para um ciclo de 92°C por quatro minutos, seguido por mais 40 ciclos de um minuto a 92°C, um minuto e 30 segundos a 35°C e dois minutos a 72°C, e posterior extensão final a 72°C por cinco minutos.

Alíquotas do produto de reação de cada amostra foram fracionadas em gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL). O padrão de bandas produzido foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado. O tamanho de cada fragmento foi determinado por comparação com as bandas do marcador padrão (*Ladder* 100 pb – *Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, U.S.A).

2.4. Amplificação ISSR

A amplificação do DNA com a metodologia ISSR-PCR atendeu as condições recomendadas por Fernandes-Matioli (1999). Um total de 20 *primers* foram testados, no entanto, apenas três apresentaram bons resultados e assim selecionados: (GGAC)₄, (AACC)₄, e (AAGC)₄ (Lucio, 2005).

A mistura de reação de amplificação, com cada *primer* selecionado, consistiu de tampão Tris-HCl (Tris-HCl 20 mM pH8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 2 mM, *primer* 0,46 µM, dNTP 0,19 mM, 1 U/reação de *Taq* DNA-polimerase (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, U.S.A), DNA (15 ng) e água suficiente para completar o volume final de 13 µL. A amplificação dos fragmentos com *primers* tetranucleotídicos foi realizada em termociclador MJ Research PT 100, programado para um ciclo a 94° C por 45 segundos, um minuto a 51°C e um minuto a 72°C, seguindo de quatro ciclos de 45 segundos a 94°C, um minuto a 72°C. O passo seguinte é de 45 segundos a 94°C, um minuto a 48°C e um minuto a 72°C, que é repetido por mais 29 vezes.

Da mesma forma que para o RAPD, alíquotas do produto de reação de cada amostra foram fracionadas em gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídeo (20 µL/100 mL). O padrão de bandas produzido foi visualizado sob luz ultravioleta, fotodocumentado e os seus tamanhos determinados por comparação com as bandas de um marcador padrão (*Ladder* 100 pb – *Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, U.S.A).

2.5. Análise dos dados de RAPD e ISSR

Para os marcadores RAPD e ISSR cada indivíduo produziu um perfil eletroforético com determinado *primer*. Este padrão é determinado pela ausência (0) ou presença (1) das bandas no gel, que correspondem aos fragmentos de locos RAPD específicos. Posteriormente, os resultados foram tabulados em matrizes de dados binários. A partir das matrizes foram estimados, com o programa PopGene 1.32 (Yeh et al., 1999), o número de locos polimórficos (*LP*) e o Índice de Shannon (*I*), para determinação da diversidade genética dentro e entre as populações de *E. najas* e *E. densa* dos ecossistemas da bacia do rio Paraná.

As matrizes também foram empregadas para determinar o coeficiente de similaridade de Jaccard e construção de dendrogramas *neighbor-joining*, utilizando os programas FreeTree (Pavlicek et al., 1999) e Mega 4.1 (Saitou e Nei, 1987), dentro e entre as localidades com amostragem múltipla. Foi realizado o teste de Mantel utilizando o programa MANTEL-STRUCT (Miller, 1999), para verificar se houve relação entre distância geográfica e

diferenciação genética das populações estudadas. A partir da similaridade de Jaccard, também foi construído com o programa FAMD (Schlüter e Harris, 2006) um gráfico de dispersão dos indivíduos das populações de *E. najas* e *E. densa*, separadamente. Assim como no RAPD, seguiram-se as análises dos marcadores ISSR. Além disso, neste trabalho propõe-se confrontar os resultados obtidos com os marcadores RAPD com os resultados dos ISSR para as populações do gênero *Egeria*.

3. Resultados

3.1. Perfil RAPD nas espécies de *Egeria*

Egeria najas

O número de bandas nítidas e reproduzíveis obtidas com os *primers* selecionados variou de quatro a oito, totalizando 39 locos estudados nos 124 indivíduos de *E. najas*. Os fragmentos amplificados distribuíram-se entre 350 e 1800 pb (pares de bases) e nove locos revelaram-se polimórficos (23,08%).

A percentagem de locos polimórficos (PPL) e os valores de índice de Shannon (*I*) determinados dentro de cada população foram baixos. O ecossistema correspondente à planície alagável do alto rio Paraná apresentou a maior percentagem de locos polimórficos (10,26%) e o maior índice de Shannon, $I = 0,0579 \pm 0,1846$. As populações de *E. najas* do reservatório de Itaipu e Três Irmãos mostraram valores de PPL = 5,13% e $I = 0,0304 \pm 0,1337$ e PPL = 7,69% e $I = 0,0368 \pm 0,1344$, respectivamente. Nas populações dos reservatórios de Porto Primavera, Rosana, Jupiá e Ilha Solteira, não foram detectados polimorfismo e o índice de Shannon foi nulo.

A Tabela 2 mostra a percentagem de locos polimórficos e os valores de índice de Shannon entre as populações de *E. najas*. Os maiores valores para locos polimórficos foram observados entre a planície alagável do alto rio Paraná e o reservatório de Três Irmãos, entre a planície e Jupiá e, entre a planície e Porto Primavera (PPL = 23,08%). A amplitude de variação do índice de Shannon foi de zero a $0,106 \pm 0,210$, com os extremos encontrados entre Jupiá e Porto Primavera e entre Jupiá e a planície, respectivamente.

Tabela 2 – Percentagem de locos RAPD polimórficos (PPL) (abaixo da diagonal) e Índice de Shannon (*I*) entre as populações (acima da diagonal) e dentro de populações (diagonal) de *E. najas* dos sete ecossistemas^{a/} da bacia do alto rio Paraná.

PPL <i>I</i>	Planície	Itaipu	Rosana	Ilha Solteira	Três Irmãos	Jupia	Porto Primavera
Planície	0,058±0,185	0,049±0,166	0,061±0,188	0,067±0,186	0,097±0,200	0,106±0,210	0,072±0,183
Itaipu	10,26	0,03±0,134	0,036±0,140	0,038±0,138	0,061±0,154	0,069±0,164	0,040±0,135
Rosana	10,26	7,69	0,0	0,034±0,150	0,087±0,230	0,082±0,215	0,072±0,190
Ilha Solteira	15,38	10,26	5,13	0,0	0,053±0,186	0,045±0,155	0,052±0,176
Irmãos	23,08	17,95	12,82	7,69	0,037±0,134	0,024±0,092	0,034±0,126
Jupia	23,08	17,95	12,82	7,69	7,69	0,0	0,0
Porto Primavera	23,08	17,95	12,82	7,69	7,69	0,0	0,0

^{a/} **Planície** = Planície alagável do alto rio Paraná; **Itaipu** = Reservatório de Itaipu; **Rosana** = Reservatório de Rosana; **Ilha Solteira** = Reservatório de Ilha Solteira; **Três Irmãos** = Reservatório de Três Irmãos; **Jupia** = Reservatório de Jupia; **Porto Primavera** = Reservatório de Porto Primavera.

Apesar da diversidade genética, representada pelo número de locos polimórficos e pelo índice de Shannon, ter atingido valores maiores entre as populações do que dentro delas, os mesmos são valores muito baixos para diferenciar geneticamente as populações da bacia do alto rio Paraná.

Com base no coeficiente de Similaridade de Jaccard foi construído um dendrograma com algoritmo *neighbor-joining*, que representou as relações genéticas entre os 124 indivíduos de *E. najas* (Fig. 2). No dendrograma os indivíduos pertencentes à mesma população foram agrupados juntos ou muito próximos, em função da presença de poucos locos polimórficos. A população da planície alagável do alto rio Paraná mostrou ser a mais variável quanto aos locos RAPD e, possui indivíduos agrupados junto às populações do reservatório de Itaipu e Rosana. Esta última está próxima, também, à população do reservatório de Ilha Solteira (Fig. 2).

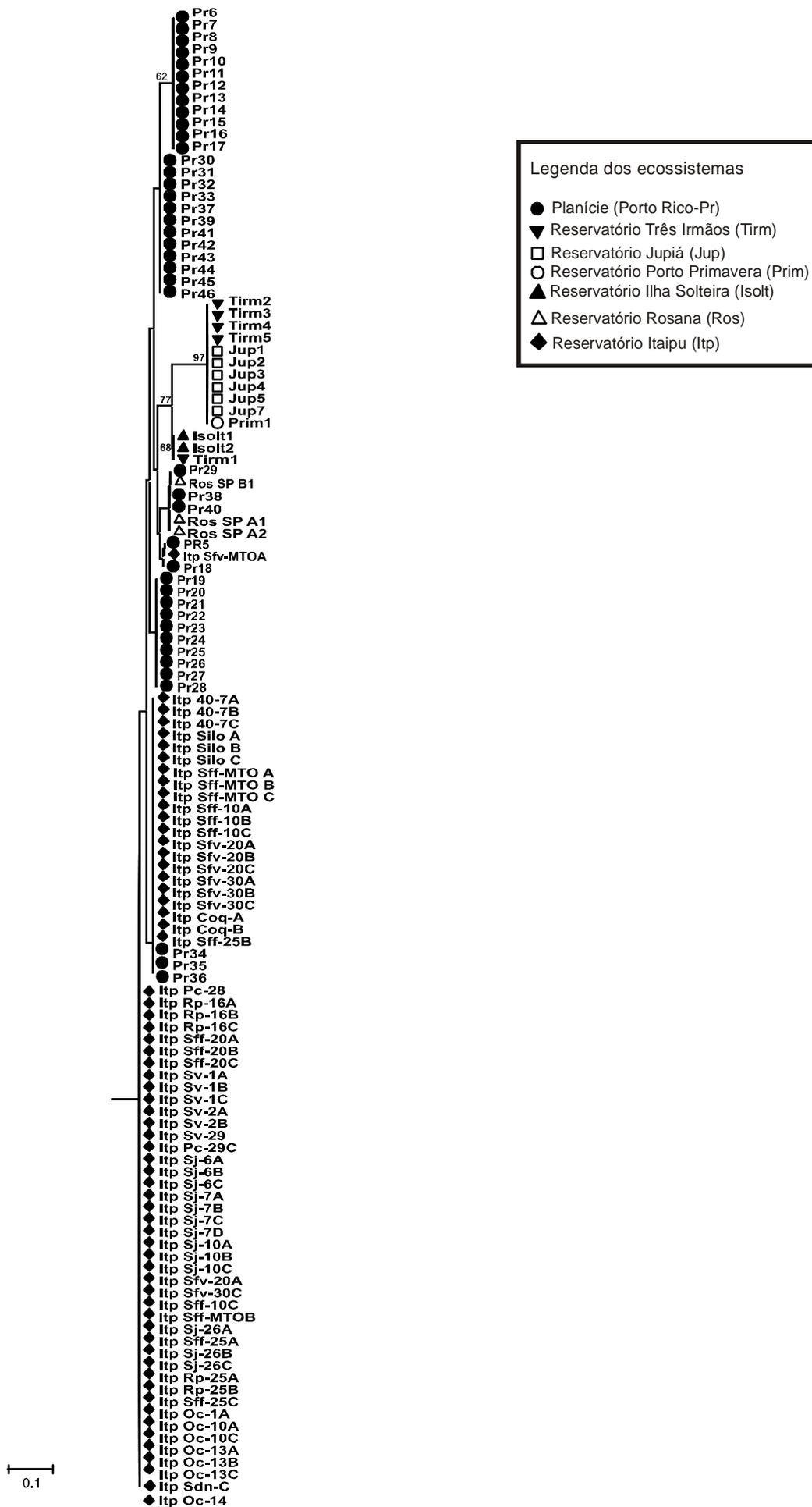


Fig. 2. Dendrograma *neighbor-joining*, baseado em marcadores RAPD, a partir da similaridade de Jaccard, dentro e entre sete populações de *E. najas* da bacia do alto rio Paraná.

A maioria dos indivíduos da população do reservatório de Itaipu está agrupada num só cluster ou muito próxima, junto à população da planície (Fig. 2). As populações do reservatório de Três Irmãos, Jupιά e Porto Primavera reuniram-se, devido a grande similaridade entre os marcadores RAPD e índice de Shannon baixo (0,024; 0,034 e zero). Um único indivíduo da população de Três Irmãos (Tirm1) agrupou-se separado e junto à população de Ilha Solteira, dentre os quais apresenta o mesmo perfil de marcadores revelados.

A Tabela 3 mostra os resultados do Teste de Mantel, a partir da dissimilaridade de Jaccard (1- S_j) e da correlação (*r*), entre as populações de *E. najas* da bacia do alto rio Paraná. O teste mostrou-se estatisticamente significativo para a maioria das distâncias e das correlações. As quatro maiores distâncias genéticas foram observadas entre as populações de Itaipu e Jupιά (0,156), planície e Jupιά (0,149), Itaipu e Três Irmãos (0,140) e entre Rosana e Jupιά (0,137). Para as correlações, mesmo que significativas, as poucas diferenças entre as populações não permitiram concluir que a distância geográfica influencia a diferenciação genética de *E. najas*.

Tabela 3. Médias da dissimilaridade de Jaccard (1-S_j) (abaixo da diagonal) e da correlação (*r*) (acima da diagonal), obtidas com marcadores RAPD, entre as populações de *E. najas* de seis ecossistemas^{a/} amostrados na bacia do alto rio Paraná.

<i>r</i> \ (1-S _j)	Planície	Itaipu	Rosana	Ilha Solteira	Três Irmãos	Jupιά
Planície	0,034	0,608**	0,126ns	0,424**	0,834**	0,910**
Itaipu	0,055	0,016	0,694**	0,639**	0,8995**	0,950**
Rosana	0,043	0,076	0,0	0,999ns	0,8069*	0,999*
Ilha Solteira	0,072	0,077	0,058	0,0	0,4404ns	1,0ns
Três Irmãos	0,134	0,140	0,122	0,066	0,033	0,052ns
Jupιά	0,149	0,156	0,137	0,083	0,01	0,0

a/ Planície = Planície alagável do alto rio Paraná; Itaipu = Reservatório de Itaipu; Rosana = Reservatório de Rosana; Ilha Solteira = Reservatório de Ilha Solteira; Três Irmãos = Reservatório de Três Irmãos; Jupιά = Reservatório de Jupιά.

** (p<0,01); * (p<0,05); ns (não significativo)

A Figura 3 mostra o gráfico de dispersão gerado a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard, entre os indivíduos das populações de *E. najas* da bacia do alto rio Paraná. O gráfico apresenta pouca dispersão entre os indivíduos das populações da planície, Itaipu e Rosana. E, maior dispersão entre estas populações e àquelas do reservatório de Ilha Solteira, Três Irmãos e Jupιά. Estes resultados são verificados, também, no dendrograma da Figura 2.

Este padrão de gráfico estabelece uma correlação de similaridade genética e corrobora o dendrograma da Figura 2. As populações mais próximas como a planície, Itaipu e Rosana estão mais dispersas em relação às populações de Ilha Solteira, Jupιά, Três Irmãos e Porto

Primavera, embora, mais distantes no gráfico, as divergências são pequenas para estruturar geneticamente as populações.

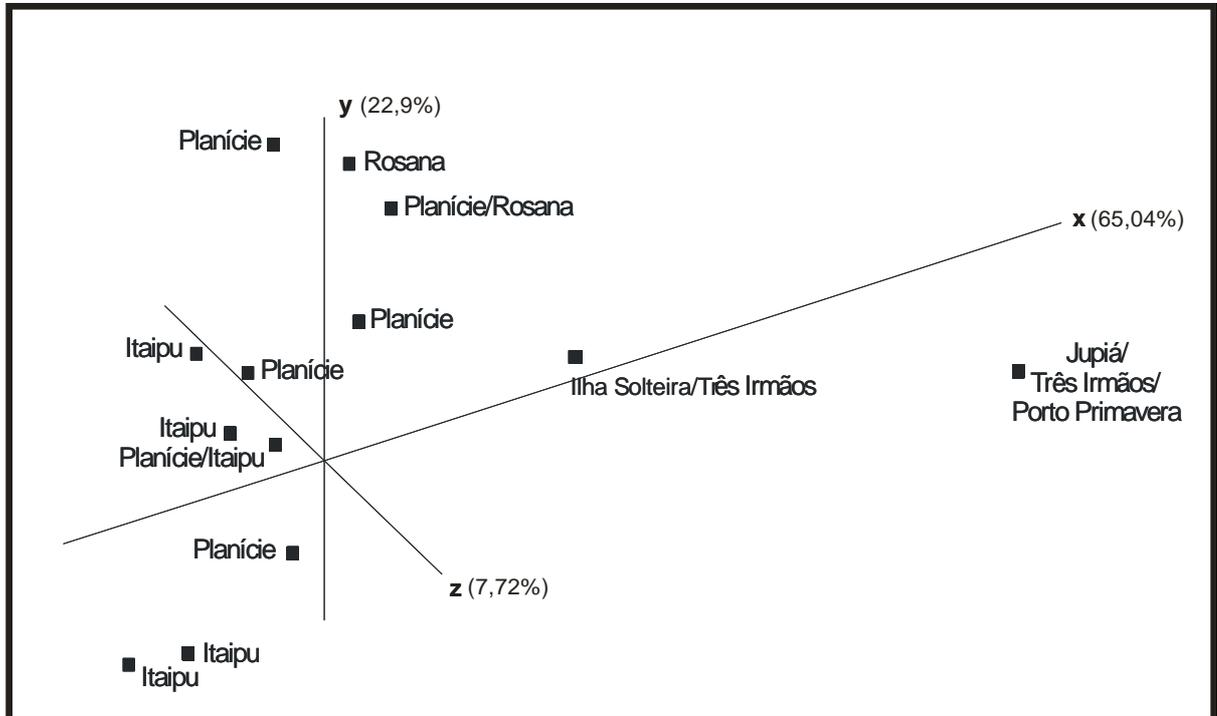


Fig. 3. Gráfico de dispersão em coordenadas principais, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard, obtidos com marcadores RAPD, entre os indivíduos das populações de *E. najas* dos sete ecossistemas da bacia do alto rio Paraná. **Planície** = Planície alagável do alto rio Paraná; **Itaipu** = Reservatório de Itaipu; **Rosana** = Reservatório de Rosana; **Ilha Solteira** = Reservatório de Ilha Solteira; **Três Irmãos** = Reservatório de Três Irmãos; **Jupia** = Reservatório de Jupia.

Egeria densa

Os *primers* RAPD produziram um total de 31 bandas (*locos*) nítidas e reproduzíveis com média de cinco locos por *primer*. Os fragmentos amplificados variaram de 350 a 1700 pb nos 87 indivíduos de *E. densa*. Entre estes foram observados, apenas, seis locos polimórficos (19,35%).

Dentro das populações de *E. densa* a percentagem de locos polimórficos (PPL) e o índice de Shannon (*I*) foram iguais a zero, exceto para a população do reservatório de Itaipu com 6,45% e $0,048 \pm 0,179$, respectivamente. Entre as populações a maior percentagem de locos polimórficos foi observada tanto entre Itaipu e Salto Grande quanto entre Itaipu e Jupia, com 19,35% (Tabela 4). A amplitude do índice de Shannon variou de zero a $0,096 \pm 0,209$, indicando ausência de divergências genéticas entre Salto Grande e Jupia, e maiores diferenças entre Itaipu e Jupia. Embora, estas diferenças sejam consistentes, elas são pequenas e

implicam em não discriminar totalmente as populações de *E. densa* da bacia do alto rio Paraná.

Tabela 4. Percentagem de locos RAPD polimórficos (PPL) (abaixo da diagonal) e Índice de Shannon (*I*) entre as populações (acima da diagonal) e dentro de populações (diagonal) de *E.densa* dos ecossistemas da bacia do alto rio Paraná.

PPL <i>I</i>	Itaipu	Rosana	Salto Grande	Jupia
Itaipu	0,048±0,179	0,047 ±0,177	0,078 ±0,187	0,096 ±0,209
Rosana	6,45	0,0	0,073 ±0,192	0,087 ±0,229
Salto Grande	19,35	12,9	0,0	0,0
Jupia	19,35	12,9	0,0	0,0

a/ **Itaipu** = Reservatório de Itaipu; **Rosana** = Reservatório de Rosana; **Salto Grande** = Reservatório de Salto Grande; **Jupia** = Reservatório de Jupia.

A figura 4 mostra o dendrograma *neighbor-joining*, construído a partir do coeficiente de Similaridade de Jaccard, representando as relações genéticas entre os 87 exemplares de *E. densa* da bacia do alto rio Paraná. No gráfico os indivíduos pertencentes à mesma população foram agrupados no mesmo clado. A população de Rosana está no mesmo clado de Itaipu, que está próximo de Salto Grande e Jupia agrupados em outro clado. O dendrograma indica grande similaridade genética entre as populações de *E. densa* da bacia, em função da presença de poucos locos polimórficos e da homogeneidade revelada pelos marcadores RAPD dentro e entre as populações de *E. densa*.

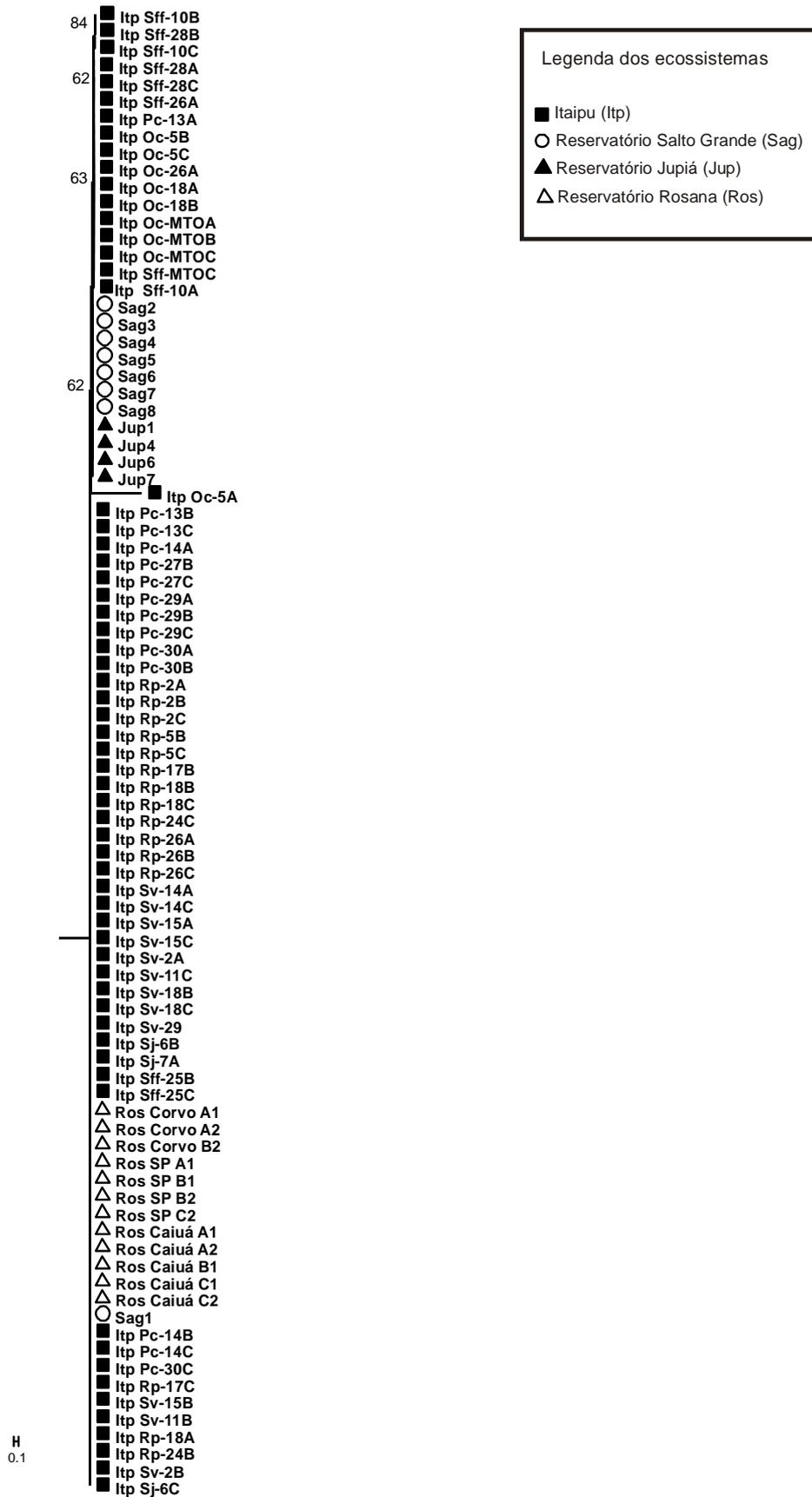


Fig. 4. Dendrograma *neighbor-joining*, baseado em marcadores RAPD, a partir da similaridade de Jaccard, dentro e entre as populações de *E. densa* da bacia do alto rio Paraná.

A Tabela 5 mostra os resultados do Teste de Mantel, a partir da dissimilaridade de Jaccard ($1 - S_j$) e da correlação (r), entre as populações de *E. densa*. O teste apresentou distâncias genéticas estatisticamente significativas entre as populações de Itaipu e Rosana, Itaipu e Salto Grande, Itaipu e Jupιά e, entre Rosana e Salto Grande. Para as populações de Jupιά e Salto Grande a distância foi igual a zero, indicando identidade genética entre elas. Embora, o teste de Mantel tenha fornecido distâncias genéticas acima de zero, estas também são baixas para concluir que as populações se diferem. Além disso, o agrupamento das populações verificado no dendrograma (Figura 4) indica similaridade entre elas, provavelmente, decorrente da homogeneidade dos marcadores RAPD. Apesar de correlações significativas entre os ecossistemas, os valores não são suficientes para discriminá-las geneticamente.

O gráfico de dispersão baseado na similaridade de Jaccard apresenta a distribuição das populações de *E. densa*. Este gráfico demonstra agrupamentos semelhantes ao dendrograma (Figura 4), Rosana junto a Itaipu, Salto Grande a Jupιά, no entanto, não separa estas duas últimas de Itaipu. A dispersão observada no gráfico, especialmente, dos indivíduos de Itaipu sugere, também, que as populações não estão separadas e que há similaridade ou homogeneidade entre os indivíduos e as populações de *E. densa* nos ecossistemas da bacia do alto rio Paraná.

Tabela 5. Matriz de médias da dissimilaridade de Jacard ($1 - S_j$) (diagonal inferior) e da correlação (r) (diagonal superior), obtidas com marcadores RAPD, entre as populações de *E. densa* dos ecossistemas mostrados na bacia do alto rio Paraná.

r \ ($1 - S_j$)	Itaipu	Rosana	Salto Grande	Jupιά
Itaipu	0,032	-0,1214ns	0,0761ns *	0,0224ns
Rosana	0,020	0,0	0,8809**	0,8018**
Salto Grande	0,042	0,035	0,0	0,0
Jupιά	0,035	0,030	0,0	0,0

a/ **Itaipu** = Reservatório de Itaipu; **Rosana** = Reservatório de Rosana; **Salto Grande** = Reservatório de Salto Grande; **Jupιά** = Reservatório de Jupιά.

** ($p < 0,01$); * ($p < 0,05$); ns (não significativo)

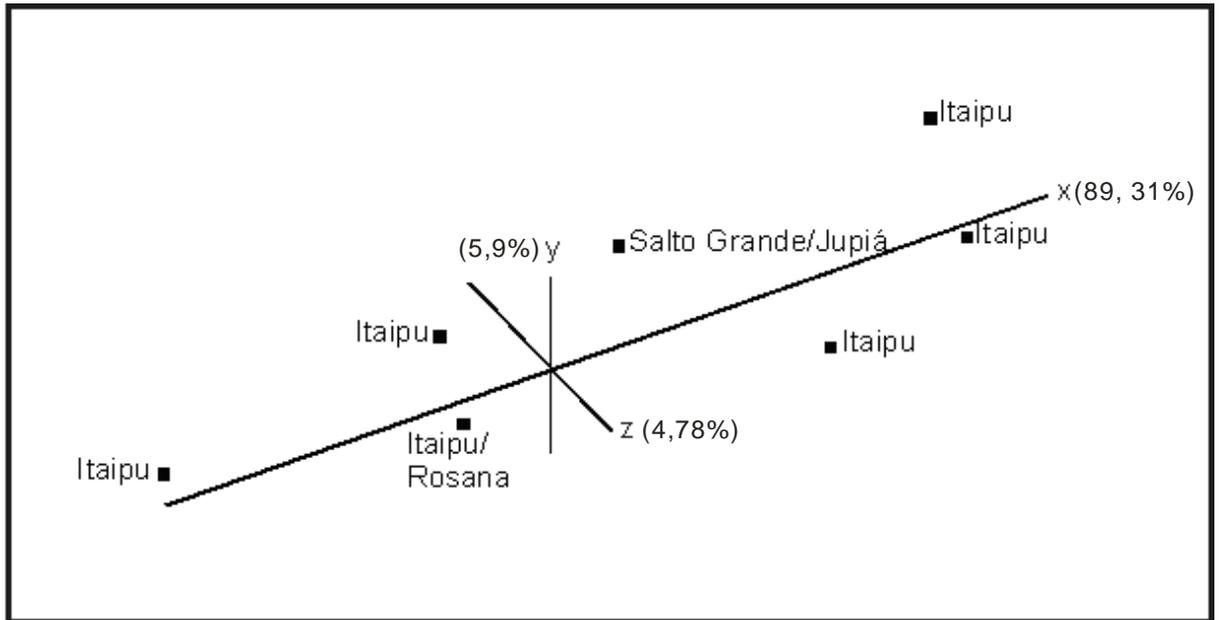


Fig. 5- Gráfico de dispersão em coordenadas principais, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard, obtido com marcadores RAPD, entre os indivíduos das populações de *E. densa* da bacia do alto rio Paraná.

3.2. Perfil ISSR de *E. najas* e *E. densa*

O DNA dos indivíduos de ambas as espécies foi amplificado com os mesmos três *primers* ISSR. Nas populações de *E. najas* da bacia foram obtidos dez locos gênicos. O tamanho dos fragmentos (bandas) amplificados variou de 500 a 1700pb e, todos os 123 indivíduos apresentaram os mesmos locos. Para *E. densa* os *primers* identificaram 11 locos gênicos, com fragmentos de 700 a 1800 pb de tamanho. Da mesma forma que em *E. najas*, todos os 87 indivíduos de *E. densa* não apresentaram locos polimórficos.

A ausência de polimorfismo e índice de Shannon igual a zero, indica homogeneidade dos marcadores ISSR dentro e entre as populações de *E. najas* e de *E. densa*. Além disso, os padrões eletroforéticos ISSR demonstram que os locos observados, a partir do *primers* utilizados, não são comuns às espécie *E.densa* e *E. najas*. (Fig. 6).

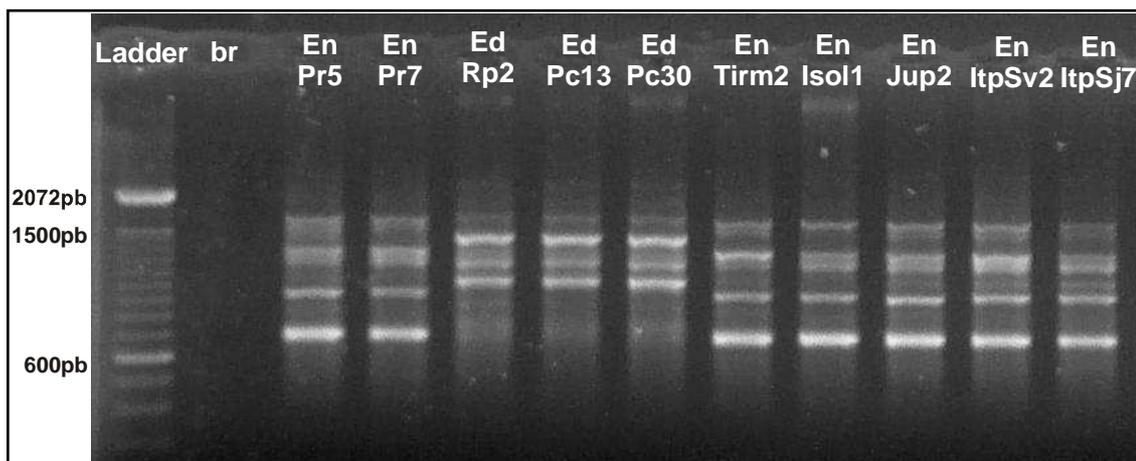


Fig. 6. Padrão de marcadores ISSR, obtidos com o *primer* AACC₄, caracterizando as espécies *E. najas* e *E. densa*, da bacia do alto rio Paraná. En: *E. najas*; Ed: *E. densa*. (Ladder - marcador padrão; br - controle positivo, reação de PCR sem DNA).

Os resultados obtidos com os marcadores ISSR não contribuíram para caracterizar possíveis diferenças entre as populações de *E. najas* e de *E. densa* da bacia do alto rio Paraná. No entanto, mostraram-se eficientes em separar as espécies de *Egeria*, com perfis de marcadores ISSR exclusivos para cada uma.

4. Discussão

Os marcadores moleculares RAPD e os ISSR têm sido muito utilizados para estudos de genética de populações e na determinação da diversidade clonal de plantas aquáticas (Li & Ge, 2001; Chen et al., 2006). Pesquisas comparando as técnicas RAPD e ISSR, mencionam que os marcadores ISSR exibem maiores níveis de polimorfismo genético se comparados ao RAPD (Esselman et al., 1999; Qian et al., 2001). De acordo com Chen et al. (2006), os marcadores ISSR não são mais informativos que os marcadores RAPD, ambos foram eficientes em identificar clones nas populações da macrófita aquática *Caldesia grandis*. A mesma avaliação e eficiência entre os marcadores são encontradas no presente estudo.

4.1. *Egeria najas*

As populações de *E. najas* da bacia do alto rio Paraná estudadas neste trabalho apresentaram maior diversidade genética que as de *E. densa*. No entanto, para ambas as espécies os valores de diversidade foram diminutos, indicando poucos genótipos diferentes colonizando os ecossistemas. Entre as populações de *E. najas*, a população geneticamente mais variável foi a da planície alagável do alto rio Paraná (PPL= 10,26%; $I=0,0579$).

Presume-se que a menor variabilidade de *E. densa* deve-se, ao menos em parte, ao fato de a mesma não ter sido encontrada na planície de inundação do rio Paraná.

As espécies de *Egeria* se propagam por fragmentos do caule, e ocasionalmente, por sementes (Cook e Urmi-König, 1984; Lorenzi, 2000; Silveira et al., 2009). Essa característica reprodutiva permite a dispersão dos propágulos vegetativos a longas distâncias (Pysek, 1997). No ambiente aquático estes propágulos são dispersos dentro e entre as populações através do fluxo da corrente de água, das inundações e de animais (Figuerola e Green, 2002; Boedeltje et al., 2003; Thomas et al. 2005). No entanto, a hidrocoria é certamente a principal forma de dispersão entre os ambientes investigados, pois todos são diretamente conectados pelo rio Paraná (Thomaz et al., 2009).

Embora a diversidade genética de *E. najas* na planície do rio Paraná tenha se apresentado maior, esta pode ser considerada baixa, o que sugere haver propagação vegetativa de poucos genótipos nesta população. Além disso, há elevada capacidade de dispersão dos propágulos, pois os habitats da planície são conectados principalmente durante as grandes cheias. A planície também recebe propágulos de outros ambientes e, possivelmente o reservatório de Rosana, a montante pode ser uma fonte doadora, apresentando-se agrupado a planície no dendrograma (Fig. 2). É importante salientar que dentre os ambientes estudados a planície alagável do alto rio Paraná é o único remanescente não represado com características originais do rio e da diversidade de espécies (Agostinho e Zalewski, 1996), onde *E. najas* é nativa e pode concentrar maior valor de diversidade genética.

Os reservatórios de Três Irmãos e Itaipu, a montante e a jusante respectivamente, também apresentaram diversidade genética, porém, inferior à observada na planície em função de poucos locos polimórficos (PPL = 7,69% e $I = 0,0368$; PPL = 5,13% e $I = 0,0304$, respectivamente). Estes ambientes assim como Ilha Solteira, Jupia, Porto Primavera e Rosana que não apresentaram polimorfismo dentro da população, são colonizados por um ou poucos genótipos diferentes mantidos, assexuadamente. O dendrograma (Fig. 2) agrupa Itaipu junto à população da planície, mas não junto a Rosana, indicando a presença de genótipos comuns destes ecossistemas com a planície, mas não entre eles.

Em conjunto, esses resultados apontam para a importância da manutenção deste ecossistema, ainda relativamente íntegro, para a preservação da diversidade genética de *E. najas*, diferentemente dos reservatórios, que são ecossistemas mais jovens e onde a diversidade genética é mínima ou ausente. Tais diferenças são esperadas, pois a conectividade entre as populações dentro de um mesmo reservatório deve ser maior do que entre populações

dentro da planície, que contem habitats variados e com diferentes graus de conexão com o rio principal (Thomaz et al., 2004).

A capacidade de dispersão dos propágulos vegetativos, especialmente através do fluxo da corrente de água, pode explicar o agrupamento de Três Irmãos, Jupia e Porto Primavera, presentes em seqüência na cascata de reservatórios do rio Tiete ao rio Paraná. A mesma interpretação justifica a separação deste clado do que inclui o reservatório de Rosana, no entanto, não se aplica a Ilha Solteira. A explicação pode ser feita por duas hipóteses, ou a dispersão de propágulos vegetativos entre Ilha Solteira e Três Irmãos ocorreu por animais (Figuerola e Green, 2002), ou há dispersão de propágulos através do canal Pereira Barreto que comunica os rios Tietê e São José dos Dourados. Este canal foi projeto com o propósito de comunicar as usinas hidrelétricas de Três Irmãos e Ilha Solteira, para isso, necessariamente o rio São José do Dourados deságua no rio Paraná e a montante do reservatório de Ilha Solteira.

Segundo Martins et al. (2003) a alta similaridade genética de populações de *E. najas* entre estes ambientes indicou provável colonização ocorrida pelo canal. Da mesma forma, a comunicação através do canal Pereira Barreto é a hipótese mais plausível e que justifica o agrupamento de parte dos indivíduos de Três Irmãos também a Ilha Solteira.

Embora no trabalho de Martins et al. (2003) foi verificado maior distância genética entre Três Irmãos e Jupia, o mesmo não foi observado neste trabalho. O agrupamento no mesmo clado de ambos os reservatório é mais um indício que há intenso fluxo de propágulos de Três Irmãos em direção a Ilha Solteira e de parte destes para Jupia.

A distância genética e a correlação, obtidas com o teste de Mantel, foram em sua maioria significativas, porém diminutas e não permitem diferenciar geneticamente as populações. Além disso, os dois tipos de gráficos gerados a partir do coeficiente de similaridade de Jaccard apresentaram o mesmo padrão de agrupamentos e dispersões pouco acentuado. Considerando a comunicação entre os ambientes da bacia do Paraná, por migrações de propágulos de *E. najas* seguindo o fluxo dos rios, e a grande homogeneidade de marcadores RAPD observada dentro e entre as populações, pode-se inferir que as populações dos ecossistemas estudados não estão estruturadas geneticamente.

4.2. *Egeria densa*

Dos quatro ecossistemas amostrados para espécie *E. densa*, o reservatório de Itaipu foi o único onde a espécie mostrou-se variável, mas com diversidade genética muito baixa, inclusive inferior a maior diversidade encontrada para *E. najas*. Madeira et al. (2003), também

encontraram maior variabilidade genética para *E. najas* do que para *E. densa*. No entanto, os autores encontraram maior distância genética entre as populações de *E. densa* de Salto Grande e Jupiá. No presente estudo estas populações mostraram-se similares geneticamente e, agrupadas no mesmo clado.

As duas espécies do gênero *Egeria*, apesar de possuírem particularidades físico-químicas na ocupação do ambiente aquático (Bini e Thomaz, 2005), apresentam as mesmas características reprodutivas e de dispersão (Cook e Urmi-König, 1984; Lorenzi, 2000). Carter e Sytsma (2001) verificaram, a partir de marcadores RAPD, baixa variabilidade genética entre populações de *E. densa*, introduzidas em locais geográficos distantes (Chile e Oregon - Canadá). A semelhança entre Salto Grande e Jupiá, separados geograficamente, pode ser decorrente da dispersão de clones de *E. densa* por animais, ou da alta similaridade desta em toda a bacia.

A ocupação de *E. densa* em Itaipu deixou de ser incipiente a partir de 2004, período com altos níveis de transparência da água. Esta condição aumenta a taxa fotossintética de *E. densa* e permite o acúmulo de biomassa (Fuem/Nupélia, 2007). A maior variabilidade em Itaipu quando comparada aos outros ambientes, pode ser decorrente de raros eventos de reprodução sexuada ou de mutações. Como a espécie colonizou rápida e intensamente o reservatório, ambos os eventos não são descartados. Além disso, tanto o reservatório de Jupiá quanto o de Salto Grande, ambos a montante de Itaipu, pesquisados neste trabalho, podem fornecer propágulos com genótipos diferentes dos encontrados, mas que não foram amostrados no presente estudo e que poderiam ser com a ampliação das amostras.

A não ocorrência de *E. densa* na planície alagável do alto rio Paraná, local de maior variabilidade para *E. najas*, provavelmente se deve a fatores limnológicos. A maior velocidade da água, o acúmulo de matéria orgânica, e menor transparência da água, provavelmente são os fatores limitantes para fixação e para o crescimento da espécie na planície (Gantes e Caro, 2001, Bini e Thomaz, 2005).

As correlações obtidas com o teste de Mantel foram baixas e mostram-se irrelevantes para mensurar separação genética das populações pela distância geográfica. O padrão quase homogêneo de marcadores RAPD, agrupa os indivíduos das populações de *E. densa* em clados muito próximos. O mesmo comportamento de *E. najas* deve valer para *E. densa*, no que se refere à dispersão. A grande conectividade mantida entre os ambientes explica a pouca diversidade genética entre os mesmos e impede a estruturação genética das populações.

4.3. Variantes genotípicos

Apesar de baixa, há diversidade genética para o gênero *Egeria* na bacia do alto rio Paraná, que pode ser compreendida pela ocorrência de genótipos diferentes originados de reproduções sexuadas ou de mutações somáticas. Para a primeira hipótese, sabe-se que as espécies do gênero são dióicas, com flores semelhantes e, provavelmente, com mecanismos de polinização (Cook e Urmi-Koning, 1984). Em populações naturais, ambos os sexos convivem em simpatria, no entanto, são raros os registros de sementes (Cook e Urmi-Koning, 1984). Na bacia do Paraná foram observadas flores, possivelmente em época reprodutiva (observação pessoal), contudo, não há registro de ocorrência de sementes neste ambiente, o que não descarta a hipótese de reprodução sexual. A outra explicação para variabilidade genética observada seria a ocorrência de mutações somáticas. As plantas que se propagam por clones, como *E. densa* e *E. najas*, possuem maior longevidade, o que aumenta a vulnerabilidades de eventuais mutações somáticas (Persson e Gustavsson, 2001). Pesquisadores têm considerado os marcadores RAPD representativos de segmentos de regiões do DNA não codificantes com seletividade neutra (Bachamann, 1997; Landergott et al., 2001), outros mencionam que esses marcadores, espalhados ao longo do genoma, podem estar relacionados a locos funcionalmente importantes (Penner, 1996). Pouca informação indica que os marcadores ISSR são funcionalmente importantes, conseqüentemente, possuem taxa evolutiva mais rápida, podendo resultar em marcadores mais variáveis comparados ao RAPD (Esselman et al., 1999).

Os resultados deste trabalho são muito semelhantes aos encontrados por Chen et al. (2006) e indicam baixa variação dos marcadores moleculares RAPD e, ausência de variação para os ISSR dentro de cada espécie. Contudo, este último mostrou-se eficiente em gerar padrões exclusivos de marcadores ISSR espécie-específicos para *Egeria*. Além disso, o polimorfismo de locos RAPD específicos encontrados em *E. najas* e *E. densa*, menos suscetíveis a mutações que os ISSR, sugere que os perfis genotípicos encontrados podem estar mais precisamente relacionados a recombinações gênicas do que as mutações somáticas.

4.4. Caso de dinâmica de metapopulações

O conceito de metapopulação é extremamente utilizado nos estudos de populações animais, embora ainda seja controversa sua aplicação às populações de plantas prevalece o conceito de dinâmica de metapopulações (Hanski, 1999; Ehrle'n e Eriksson, 2003; Pannel & Obbard, 2003). A principal crítica feita à aplicabilidade da teoria de metapopulação em

plantas se refere, muitas vezes, ao fato delas não ocuparem habitats discretos ou manchas (Obbard et al., 2006). Além disso, é difícil saber se a regeneração de uma mancha de vegetação decorre da dispersão de propágulos (ou taxas de imigração, básica em modelos metapopulacionais) ou de sementes e outras estruturas de resistência (Husband e Barret, 1998).

Entretanto, esta crítica não se estende às espécies de *Egeria*, as quais estão exatamente distribuídas em manchas (bancos) ou *patches* (subpopulações) em cada ecossistema estudado da bacia do alto rio Paraná, e sabidamente possuem elevado potencial para regeneração por propágulos vegetativos (Silveira et al., 2009). Para Hanski (1999), o conjunto de subpopulações (*patches*) deve estar conectado por imigrações e emigrações, através da movimentação de indivíduos (Gilpin e Hanski, 1991; Gotelli, 1995), promovendo o fluxo gênico entre eles (Hanski, 1991; 1997). As populações de *Egeria* estudadas na bacia apresentam conexão por eventos de migrações, que inclusive, proporciona a colonização de novos locais e a recolonização após distúrbios (Thomaz, 2005), outro pressuposto da dinâmica de metapopulações.

No modelo original de metapopulações (Levins, 1969), as populações que possuem dinâmica metapopulacional são levadas à extinção por eventos estocásticos. As alterações nos níveis de água do reservatório, como a depleção ocorrida em Itaipu no ano de 1999, foi um distúrbio que provocou a extinção quase completa dos *patches* (subpopulações) que compõe a população de *E. najas* de Itaipu. No entanto, a persistência de poucos bancos (*patches* ou subpopulações) foi suficiente para repovoar o ambiente pela disseminação de propágulos vegetativos (Thomaz, 2005). Alterações na transparência da água (Bini et al., 1999; Tavecchio e Thomaz, 2003) ou na velocidade (Willians et al., 1996; Gantes e Caro, 2001), fatores determinantes à fixação de *E. densa*, podem ser distúrbios estocásticos que provoquem a extinção de *patches* (subpopulações) localmente, promovendo dinâmica assíncrona destes em um mesmo ecossistema (Bini e Thomaz; Thomaz, 2005). A recuperação dessas subpopulações, como de *E. najas*, também ocorre por propágulos vegetativos.

Oliveira et al. (2005) testaram a capacidade de regeneração de *E. densa* e verificaram que a recolonização da espécie aconteceu por fragmentos do caule, transportados pelo fluxo de água e não por sementes. A colonização de *E. densa* em Itaipu, atingindo patamares consideráveis, tornou-se evidente a partir de 2004, quando especialmente a transparência do reservatório favoreceu seu crescimento. A sua distribuição em manchas (*patches*) semelhante a *E. najas*, proporcionou uma estratégia de ocupação do ambiente por dinâmica de

metapopulações. Ambas as espécies se reproduzem, predominantemente, por propágulos vegetativos, o que implicaria em baixa ou ausência de variabilidade genética dentro e entre os *patches*.

Os resultados apresentados neste trabalho confirmam a baixa variabilidade dentro e entre as populações de todos os ecossistemas amostrados para as duas espécies. O fluxo gênico, pressuposto necessário à teoria de metapopulação (Hanski, 1998), dentro e entre *patches* de cada população, e entre as populações de cada ecossistema, deu lugar ao fluxo de indivíduos, praticamente clones. Consequentemente, embora emigrações e imigrações entre estes locais aconteçam, se houvesse reprodução sexuada entre indivíduos migrantes e residentes (fluxo gênico) isso proporcionaria um aumento da variabilidade genética dentro dos *patches* (subpopulações). Contudo, de acordo com a predominância da reprodução assexuada em *Egeria*, a baixa diferenciação genética era esperada e se confirmou, dentro e entre os ecossistemas, com os marcadores RAPD. A migração periódica e unidirecional (rio abaixo) de propágulos entre reservatórios é uma possibilidade real. Entretanto, deve ocorrer com frequência muito mais baixa do que a migração de propágulos entre bancos de mesmo reservatório. Portanto, este trabalho sugere que dentro de cada ecossistema estudado, a ocupação pelas espécies de *Egeria* segue estratégia correspondente a dinâmica de metapopulações.

Referências

- Agostinho, A.A, Zalewski, M., 1996. A planície alagável do alto rio Paraná: importância e preservação. Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Bachmann, K., 1997. Nuclear DNA markers in plant biosystematic research. *Opera. Bot.* 132, 137-148.
- Barreto, R., Charudattan, R., Pomilla, A., Hanada, R., 2000. Biological control of neotropical aquatic weeds with fungi. *Crop Prot.*, 19, 697-703.
- Bini, L.M., 2001. Dinâmica populacional de *Egeria najas* Planchon (Hydrocharitaceae): sobrevivência de uma espécie submersa em um ambiente subtropical com elevada turbidez (reservatório de Itaipu Binacional, Brasil Paraguai). Tese (Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Bini, L.M., Thomaz, S.M. 2005. Prediction of *Egeria najas* and *Egeria densa* occurrence in a large subtropical reservoir (Itaipu Reservoir, Brasil – Paraguay). *Aquat. Bot.* 83, 227-238.
- Bini, L.M., Thomaz, S.M., Murphy, K. J., Camargo, A.F.M., 1999. Aquatic macrophyte distribution in relation to water and sediment conditions in the Itaipu Reservoir, Brazil. *Hydrobiologia* 415, 147-154.

- Blair, M.W., Panaud, O., Mccouch, S.R., 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98, 780–792.
- Boedeltje, G., Bakker, J.P., Bekker, R.M., Van Groenendael, J.M., Soesbergen, M., 2003. Plant dispersal in a lowland stream in relation to occurrence and three specific life-history traits of the species in the species pool. *J. Ecol.* 91, 855–866.
- Bowmer, K.H., Jacobs, S.W.L., Sainty, G.R., 1995. Identification, biology and management of *Elodea canadensis*. *Hydrocharitaceae. J. Aquatic Plant Manag.* 33, 13-19.
- Carter, M.C., Sytsma, M.D., 2001. Comparasion of the genetic structure of North and South American populations of clonal aquatic plant. *Biol. Invas.* 3, 113-118.
- Carvalho, F.T., Velini, E.D., Cavenaghi, A.L., Negrisoli, E., Castro, R.M., 2005. Influência da turbidez da água do rio Tietê na ocorrência de plantas aquáticas. *Planta Daninha* 20, 359-362.
- Chen, J.H., Sun, A.Z., Wang, X.F., 2006. Genetic diversity and population differentiation of *Sagittaria potamogetifolia*. *Acta Hydrobiol. Sin.* 5, 570–576.
- Chen, J.M., Gituru, W.R., Wang, Q.F., 2007. A comparison of the extent of genetic variation in the endangered *Sagittaria natans* and its widespread congener *S. trifolia*. *Aquat. Bot.* 87, 1–6.
- Chen, J.M., Gituru, W.R., Wang, Y.H., Wang, Q.F., 2006. The extent of clonality and genetic diversity in the rare *Caldesia grandis* (Alismataceae): comparative results for RAPD and ISSR markers. *Aquat. Bot.* 84, 301–307.
- Cook, C.D.K., Urmi-konig, K., 1984. A revision of the genus *Egeria* (Hydrocharitaceae). *Aquat. Bot.* 19, 73-96.
- Correa, M.R., Velini, E.D., Bravin, L.F.N., 2004. Utilização de GPS para monitoramento de infestação de macrófitas aquáticas em reservatórios de hidrelétricas. In: Congresso Brasileiro da Ciência das plantas daninhas, São Pedro, pp. 108.
- Divaret, I., Margale, E., Thomas, G., 1999. RAPD markers on seed bulks efficiently assess the genetic diversity of a *Brassica oleracea* L. collection. *Theor. Appl. Genet.* 98, 1029–1035.
- Ehrle'n, J., Eriksson, O., 2003. Large-scale spatial dynamics of plants: a response to Freckleton & Watkinson. *J. Ecol.* 91, 316–320.
- Esselman, E.J., Li, J.Q., Crawford, D., Winduss, J.L., Wolfe, A.D., 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol. Ecol.* 8, 443–451.
- Esteves, F.A., 1998. Ecologia das lagoas costeiras do parque nacional da restinga de Jurubatiba e do município de Macaé (RJ). Universidade federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Fernandes-Matioli, F.M.C., 1999. Evolução e estrutura de populações no gênero *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes). Tese (Doutorado Biologia/Genética) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Figuerola, J., Green, A.J., 2002. Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshw. Biol.* 47, 483–494.

- Fundação Universidade Estadual de Maringá. Nupélia/Itaipu Binacional, 2005. Estudos das macrófitas aquáticas no reservatório de Itaipu: relatório (5ª etapa: 2003-2005). Maringá, Relatório técnico.
- Fundação Universidade Estadual de Maringá. Nupélia/Itaipu Binacional, 2007. Estudos das macrófitas aquáticas no reservatório de Itaipu: relatório (6ª etapa: 2005-2007). Maringá, Relatório técnico.
- Gantes, H.P., Caro, A.S., 2001. Environmental heterogeneity and spatial distribution of macrophytes in plain streams. *Aquat. Bot.* 70, 225-236.
- Gilbert, J.E., Lewis, R.V., Wilkinson, M.J., Caligari, P.D.S., 1999. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collection. *Theor. Appl. Genet.* 98, 1125–1131.
- Gilpin, M., Hanski I., 1991. *Metapopulation Dynamics: Empirical and Theoretical Investigations*. Academic Press, New York.
- Gotelli, N.J., 1995. *A Primer of Ecology*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Gubiani, E.A., 2004. O pulso de inundação e a assembléia de peixes sobre a perspectiva de metapopulações. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Han, Y.C., Teng, C.Z., Zhong, S., Zhou, M.Q., Hu, Z.L., Song, Y.C., 2007. Genetic variation and clonal diversity in populations of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) in Central China detected by ISSR markers. *Aquat. Bot.* 86, 69–75.
- Hanski, I. 1998. Metapopulation dynamics. *Nature* 396, 41-49.
- Hanski, I., 1997. Predictive and practical metapopulation models: the incidence function approach. In: Tilman, D., Kareiva, P. (Ed.), *Spatial ecology: the role of space in population dynamics and interspecific interactions*. Princeton University Press, New Jersey, p. 21-45.
- Hanski, I., 1999. *Metapopulation Ecology*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Harrison, S., 1991. Local extinction in a metapopulation context: An empirical evaluation. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.*, 42, 73-88.
- Husband, B.C., Barrett, S.C.H., 1998. Spatial and temporal variation in population size in *Eichhornia paniculata* in ephemeral habitats: implications for metapopulation dynamics. *J.Ecol.* 86, 1021-1031.
- Jin-Ming C., Xing, L., Jing-Yuan W., Gituru W.R., Qing-Feng W., 2005. Genetic variation within the endangered quillwort *Isoetes hypsophila* (Isoetaceae) in China as evidenced by ISSR analysis. *Aquat. Bot.* 82, 89–98
- Landergott, U., Holderegger, R., Kozłowski, G., Schneller, J.J., 2001. Historical bottlenecks decrease genetic diversity in natural populations of *Dryopteris cristata*. *Heredity* 87, 344–355.
- Levins, R., 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bull. Entomol. Soc. Am.*, 15, 237–240.
- Li, A., Ge, S., 2001. Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. *Ann. Bot.* 87, 585–590.
- Li, W., Li, Q.X., Li, J.Q., Wang, G.X., 2004. Genetic diversity of *Potamogeton maackianus* in the Yangtze River. *Aquat. Bot.* 80, 227–240.

- Li, W.G., Shen, J.J., Wang, J.B., 2005. Genetic diversity of the annual weed *Monochoria vaginalis* in southern China detected by random amplified polymorphic DNA and inter-simple sequence repeat analyses. *Weed Res.* 45, 424–430.
- Li, W.G., Wang, B.R., Wang, J.B., 2006. Lack of genetic variation of an invasive clonal plant *Eichhornia crassipes* in China revealed by RAPD and ISSR markers. *Aquat. Bot.* 84, 176–180.
- Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Reisch, B.I., 1994. A simple and efficient method for DNA extractions from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant. Mol. Biol.*, 12, 6-13.
- Lorenzi, H., 2000. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. Instituto Platanarum, Nova Odessa.
- Lucio, L.C., 2005. Análise genética, com marcadores moleculares RAPD e SPAR, de populações de *Egeria najas* Planchon (Hydrocharitaceae) do reservatório de Itaipu, Brasil. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Martins, D., Cardoso, L.R., Mori, E.S., Tanaka, R.H., 2003. Caracterização genética de acessos de Egéria (*Egeria* spp.) coletados no Estado de São Paulo utilizando RAPD. *Planta Daninha*, 21, 1-6.
- Miller, M.P., 1999. MANTEL-STRUCT: A program for the detection of population structure via Mantel tests. *J. Hered.*, 90, 258–259.
- Moreno, S., Martin, J.P., Ortiz, G., 1998. Inter-simple sequence repeat PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. *Euphytica* 101, 117–125.
- Nascimento, P.R.F., Pereira, S.M.B., Sampaio, E.V.S.B., 2008. Biomassa de *Egeria densa* nos reservatórios da hidroelétrica de Paulo Afonso-Bahia. *Planta Daninha* 26, 481-486.
- Nebauer, S.G., Castillo, D., Agudo, L., Segura, J., 1999. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved foxglove (*Digitalis obscura* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98, 985–994.
- Negrisoli, E., Martins, D., Velini, D.E., Ferreira, W.L.B., 2003. Degradação de diquat em condições de caixa d'água com e sem plantas de egéria. *Planta Daninha* 21, 93-100.
- Obbard, D., Harris, S.A., Pannell, J.R., 2006. Sexual systems and populations genetic structure in an annual plant: testing the metapopulation model. *Am. Nat.*, 167, 354-366.
- Oliveira, N.M.B., Sampaio, E.V.S.B., Pereira, S.M.B., Moura-Junior, A.M., 2005. Capacidade de regeneração de *Egeria densa* nos reservatórios de Paulo Afonso, BA. *Planta Daninha* 23, 363-369.
- Pannell, J.R., Obbard, D.J., 2003. Probing the primacy of the patch: what makes a metapopulation? *J.Ecol.*, 91, 485-488.
- Pavlicek, A., Hrda, S., Flegr, J., 1999. FreeTree - Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biologica* 45, 97-99.
- Penner, G.A., 1996. RAPD analysis of plant genomes. In: Jauhar, P.P. (Ed.), *Methods of Genome Analysis in Plants*. CRC Press, Boca Raton, pp. 251–268.

- Persson, H.A., Gustavsson, B.A., 2001. The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf-shape analysis. *Mol. Ecol.* 10, 1385–1397.
- Pys̆ek, P., 1997. Clonality and plant invasions: can a trait make a difference? In: De Kroon, H., van Groenendael, J. (Ed.), *The Ecology and Evolution of Clonal Plants*. Backbuys Publishers, Leiden, pp. 405–427.
- Qian, W., Ge, S., Hong, D.Y., 2001. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 102, 440–449.
- Ren, M.X., Zhang, Q.G., 2007. Clonal diversity and structure of the invasive aquatic plant *Eichhornia crassipes* in China. *Aquat. Bot.* 87, 242–246.
- Ren, M.X., Zhang, Q.G., Zhang, D.Y., 2005. RAPD markers reveal low genetic variation and monodominance of one genotype in *Eichhornia crassipes* populations throughout China. *Weed Res.* 45, 236–244.
- Rodella, R.A., Costa, N.V., Costa, L.D.N.C., Martins, D., 2006. Diferenciação entre *Egeria densa* e *Egeria najas* pelos caracteres anatômicos foliares. *Planta Daninha* 24, 211-220.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Silveira, M.J., Thomaz, S.M., Mormul, R.P., Camacho, F.P., 2009. Effects of desiccation and sediment type on early regeneration of plant fragments of three species of aquatic macrophytes *Internat. Rev. Hydrobiol.*, 94, 169-178.
- Sodré, L.M.K., Almeida, F.S., Chiari, L., 2002. Estudos sobre a variabilidade genética de peixes do rio Tibagi através de marcadores moleculares. In: Medri, M.E., Bianchini, E., Shibatta, O.A., Pimenta, J.A. (Ed.), *A bacia do Rio Tibagi*. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, pp. 531-550.
- Schlüter, P.M., Harris, S.A., 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes.* 6, 569-572.
- Tanaka, R.H., Cardoso, L.R., Martins, D., Marcondes, D.A.S., Mustafá, A.L., 2002. Ocorrência de plantas nos reservatórios da Companhia Energética de São Paulo. *Planta Daninha* 20, 99-111.
- Tanaka, R.H., Cardoso, L.R., Martins, D., Marcondes, D.A.S. ; Mustafá, A.L., 2002. Ocorrência de plantas aquáticas nos reservatórios da Companhia Energética de São Paulo. *Planta Daninha* 20,1-5.
- Tavechio, W.L.G., Thomaz, S.M., 2003. The effects of light on the growth and photosynthesis of *Egeria densa* Planchon. *Brazil. Arch. Biol. Technol.* 46, 203-209.
- Thomas, J.R., Gibson, D.J., Middleton, B.A., 2005. Water dispersal of vegetative bulbils of the invasive exotic *Dioscorea oppositifolia* L. in southern Illinois. *J. Torrey Bot. Soc.* 132, 187–196.
- Thomaz, S.M., 1998. Explosões populacionais de plantas aquáticas: sintoma de um problema. In: *Workshop de controle de plantas aquáticas*, Brasília.
- Thomaz, S. M., 2005. Fatores que afetam a distribuição e diversidade de macrófitas aquáticas em reservatórios. In: Nogueira M., Henry, R., (Org.). *Ecologia de reservatório: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. Editora Rima, São Carlos, pp, 165-182.

- Thomaz, S.M., Bini, L. M., 2003. Análise crítica dos estudos sobre macrófitas aquáticas desenvolvidos no Brasil. In: Thomaz, S. M., Bini, L.M. (Ed.), Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas. Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, pp. 19-38.
- Thomaz, S.M., Bini, L.M., Pagioro, T.A. 2003a. Macrófitas aquáticas em Itaipu: ecologia e perspectivas para o manejo. In: Thomaz, S.M., Bini, L.M. (Ed.), Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, pp. 319-341.
- Thomaz, S.M., Pagioro, T.A., Bini, L.M., Roberto, M.C., Rocha, R.R.A., 2004. Limnological characterization of the aquatic environments and the influence of hydrometric levels. In: Thomaz, S.M., Agostinho, A.A., Hahn, N.S. (Org.), The Upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation. Leiden, Backhuys Publishers, pp. 75-112.
- Thomaz, S.M., Carvalho, P., Mormul, R.O., Ferreira, F.A., Silveira, M.J., Michelan, T.S., 2009. Temporal trends and effects of diversity on occurrence of exotic macrophytes in a large reservoir. *Acta Oecologica*, *in press*.
- Weiss, A., 1997. Survey of *Egeria densa* accessions for genetic similarity by Random Amplified Polymorphic DNA analysis (RAPDs). Aquatic Weed Control Investigations. Annual Report, 69-73.
- Wetzel, R.G., 2001. Limnology: Lake and river ecosystems. Academic Press, San Diego.
- Willians, H.C., Schwarz, A.M., Reid, V., 1996. Patterns of aquatic weed growth following mechanical harvesting in New Zealand hydro-lakes. *Hydrobiologia* 340, 229-234.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R.K., Livak, J.L., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
- Wolfe, A.D., Xiang, Q.Y., Kephart, S.R., 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. *Mol. Ecol.* 7, 1107–1125.
- Yeh, F.C., Boyle, T., Ye, Z., Xiyang, J.M., 1999. Popgene version 1.31: microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research, Canadá.

CAPÍTULO 2

Caracterização molecular de duas espécies nativas de *Egeria* da bacia do alto rio Paraná

Caracterização molecular de duas espécies nativas de *Egeria* da bacia do alto rio Paraná

Resumo

As populações de *Egeria* da bacia do alto rio Paraná foram estudadas com marcadores moleculares, correspondentes a sequência parcial do *trnL* e do espaçador intergênico *trnL-trnF* do cpDNA e, referente a região ITS do rDNA. O objeto do trabalho foi utilizar estes marcadores na caracterização molecular de *E. densa* e *E. najas*. Dez haplótipos foram identificados, seis para *E. densa* e quatro para *E. najas*, destes metade são para região do cpDNA e a outra metade para o ITS, em cada espécie. Parte dos haplótipos reconhecidos com o marcador do DNA do cloroplasto agruparam-se em clados comuns para as duas espécies. Por outro lado, o marcador ITS mostrou-se eficiente em caracterizar e discriminar as sequências nucleotídicas observadas tanto em *E. densa* e *E. najas* quanto entre elas. Além disso, os espaçadores transcritos internos 1 e 2, respectivamente ITS-1 e ITS-2, comparados ao genes ribossomais 5,8 S e 26 S, apresentaram maior polimorfismo nucleotídico. Dentre estes o ITS-1 mostrou-se, ainda, mais variável que o ITS-2. Os resultados do presente trabalho, portanto, permitem inferir que os segmentos da região ITS do rDNA são mais eficientes em caracterizar e discriminar espécies próximas, como as do gênero *Egeria*, do que a região estudada do cpDNA.

Palavras-chave: cpDNA, *Egeria*, região ITS, haplótipos.

Molecular characterization of two native *Egeria* species from the Upper Paraná River Basin

Abstract

Native populations of *Egeria* in the Upper Paraná River were studied using molecular markers corresponding to the *trnL* partial sequence and to *trnL-trnF* intergenic spacer from the cpDNA and ITS region of rDNA. The goal of this study was to use these markers to molecularly characterize *E. densa* and *E. najas* populations. Ten haplotypes were identified, six for *E. densa* and four for *E. najas*. Half of these haplotypes were identified for cpDNA and the other half for ITS region, considering each species. Part of the haplotypes recognized using the cpDNA marker was grouped in common clades for the two species. On the other hand, ITS marker was suitable to characterize the nucleotidic sequences of each species and to discriminate them. Furthermore, the internal transcribed spacers 1 and 2 (ITS-1 and ITS-2, respectively) presented higher nucleotide polymorphism than ribosomal genes 5.8S and 26S. ITS-1 was even more variable than ITS-2. These results suggest that the sequences of ITS region from rDNA are more appropriate than the cpDNA region to characterize and discriminate closely related species, such as species from *Egeria* genus.

Keywords: *Egeria*, cpDNA, ITS region, haplotypes.

1. Introdução

Egeria densa e *Egeria najas* são espécies submersas enraizadas nativas e amplamente distribuídas em ecossistemas aquáticos da América do Sul (Cook e Urmi-Konig, 1984). No Brasil, ambas as espécies colonizam com sucesso ambientes naturais (Pott e Pott, 2000; Camargo et al., 2006), e artificiais, como os grandes reservatórios de usinas hidrelétricas (Martins et al., 2005; Rodella et al., 2006; Nascimento et al., 2008).

O reservatório de Itaipu, pertencente à bacia do rio Paraná, é colonizado por essas duas espécies. No entanto, estudos realizados nos períodos pré e pós-represamento, indicam registros destas espécies somente no período posterior à construção da barragem, pois antes de sua construção, o rio corria em um cânion e suas águas tinham elevada velocidade, impedindo a colonização por plantas aquáticas (FUEM/Itaipu Binacional, 2005). A rápida e eficiente capacidade de colonizar ambientes lênticos como Itaipu, pode estar associada à estratégia reprodutiva, predominantemente vegetativa, já que não há indícios de reprodução sexuada destas macrófitas neste ambiente (Cook e Urmi-Konig, 1984; Lucio, 2005).

Martins et al. (2003) analisaram populações de *E. densa* e *E. najas* de alguns reservatórios da Companhia de Energia Elétrica de São Paulo e observaram polimorfismo genético entre as populações. Lucio (2005) caracterizou populações de *E. najas* do reservatório de Itaipu, utilizando marcadores moleculares e demonstrou haver uma reduzida variação dentro e entre as populações. Em plantas, a diversidade genética e a distribuição espacial são influenciadas por diferentes fatores que incluem a forma de vida, o sistema reprodutivo e o mecanismo de dispersão de sementes (Hamrick e Godt 1989; 1996). O tipo de reprodução é de fundamental importância, já que a reprodução sexuada acompanha a recombinação genética e a assexuada não (Hangelbroek, 2002).

Para *E. najas* que se reproduz predominante por propagação vegetativa e segue estratégia de ocupação do reservatório de Itaipu por dinâmica de metapopulações (FUEM/Itaipu Binacional, 2005), a ausência de variabilidade genética pode ser determinada pelo fluxo entre indivíduos que possuem grande homogeneidade genética, conectados por migrações entre populações locais. Estudos de dinâmica de populações e ocorrência de metapopulações fornecem informações sobre os processos de colonização, dispersão e recolonização dos bancos de macrófitas aquáticas e, são extremamente importantes na determinação das fontes doadoras e dispersoras de propágulos (Lucio, 2005).

Com o rápido desenvolvimento da biotecnologia e da análise de sequências nucleotídicas do DNA nuclear, do DNA do cloroplasto (cpDNA) e do DNA mitocondrial

(mtDNA) tornou-se possível caracterizar e estabelecer filogenia de espécies vegetais (Bsorsch et al., 2003; Madeira et al., 2007; Guillemin et al., 2008; Zangh et al., 2008). Dentre os marcadores nucleares, os espaçadores nucleares internos transcritos do DNA ribossômico (ITS) têm sido amplamente utilizados em estudos de caracterização molecular, filogenia e filogeografia de uma variedade de organismos (Baldwin et al., 1995). Estas sequências nucleotídicas são altamente conservadas dentro da mesma espécie, mas são relativamente variáveis entre diferentes táxons, permitindo a abordagem de questões filogenéticas interespecíficas (Fouly, 2004; Yan-Chuang Han, 2007).

O DNA do cloroplasto também tem sido amplamente utilizado para investigar relações filéticas (Yoo et al., 2001; Machado et al., 2008), presença de híbridos e fluxo gênico (Soltis et al., 1992). Os genes cloroplastídicos possuem herança uniparental e baixa taxa de substituição nucleotídica (Wolfe et al., 1987; Zurawski e Clegg, 1987). No entanto, as regiões não codificantes do cpDNA apresentam elevadas taxas de mutação, e são frequentemente úteis para o levantamento da variabilidade genética e de padrões filogeográficos de populações de plantas (Huang et al., 2005; Su et al., 2004; 2005). A sequência correspondente ao íntron *tRNA^L* (Leu) do cpDNA, região não codificadora, demonstrou ser eficaz na detecção de variação interespecífica (Taberlet et al., 1991; Ferris et al., 1993; Gielly e Taberlet, 1994). O estabelecimento de relações filogenéticas da invasora *Hydrilla verticillata* tem sido determinada com sucesso a partir da região *trnL-trnF* do cpDNA (Madeira et al., 2007; Lucio, L.C., dados não publicados).

As relações filogenéticas da família Hydrocharitaceae foram estabelecidas utilizando genes *rbcL* e *matK* do cp DNA (Tanaka et al., 1997). No entanto, não há informações sobre a caracterização molecular a partir de sequências de DNA das populações de *Egeria* da bacia do alto rio Paraná. Embora as espécies *E. najas* e *E. densa* registradas em reservatórios a montante de Itaipu apresentem variabilidade genética (Martins et al., 2003), a relação genética destes com as populações de Itaipu e de áreas naturais associadas ao rio Paraná, ainda estão sendo determinadas (Lucio, 2005; Lucio, L.C., dados não publicados).

Assim, marcadores nucleares ITS do rDNA, o íntron *tRNA^L* e a região *trnL-trnF* do cpDNA são ferramentas importantes na caracterização molecular e para determinar relações filogenéticas e filogeográficas das espécies, inclusive de macrófitas aquáticas (Madeira et al., 2007; Yan-Chuang Han, 2007; Machado, 2008). Este estudo teve como objetivo caracterizar as populações de *E. densa* e *E. najas* da bacia do alto rio Paraná, utilizando marcadores moleculares ITS do DNA nuclear e sequências do DNA do cloroplasto. Além disso, pretende-se verificar qual destes marcadores é mais adequado para a caracterização do gênero.

2. Material e métodos

2.1. Área de estudo e amostragem

Para as populações de *Egeria najas* foram coletados 49 indivíduos distribuídos em ecossistemas na bacia do alto rio Paraná (Fig. 1). Neste rio as coletas foram realizadas na margem esquerda do reservatório de Itaipu, lagoas da planície alagável do alto rio Paraná, região de Porto Rico, reservatórios de Porto Primavera, Jupia e Ilha Solteira. No rio Paranapanema foram amostrados os reservatórios de Rosana e Salto Grande e, no rio Tietê, o reservatório de Três Irmãos. Já para *E. densa* 51 exemplares foram amostradas nas populações dos seguintes ecossistemas: Itaipu e Jupia no rio Paraná e Rosana e Salto Grande no rio Paranapanema.

Após coletadas e identificadas, as amostras foram transportadas em sacos plásticos com água, dentro de caixa de isopor até o Laboratório de Genética do Nupelia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR e, posteriormente foi feita a extração do DNA.

2.2. Extração e Quantificação do DNA

Antecedendo o processo de extração do DNA, todas as amostras de *Egeria* foram lavadas com água destilada e detergente *Tween 20*, para remoção de microrganismos aderidos à superfície das macrófitas. O DNA total de cada exemplar foi isolado conforme adaptações do protocolo de Lodhi et al. (1994). A quantificação dos mesmos foi estimada pela comparação com quantidades conhecidas de DNA do fago λ , por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

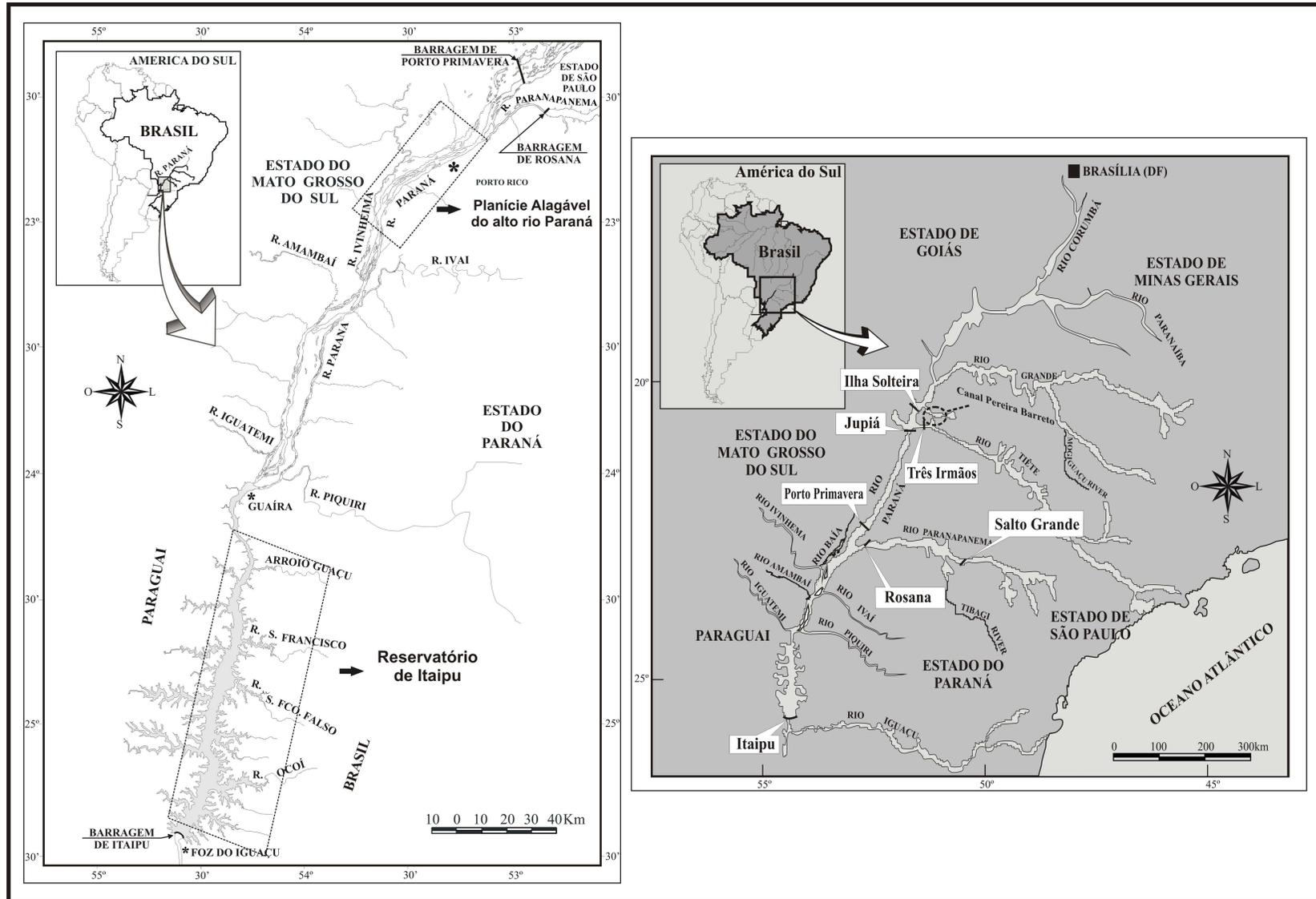


Fig.1. Mapa dos ecossistemas da bacia do alto rio Paraná, locais de coleta das espécies de *Egeria*

2.3. Amplificação de Sequências de cpDNA, ITS do rDNA e Sequenciamento

Em cada exemplar de *E. densa* e *E. najas* foi amplificado um segmento do cpDNA, correspondente à sequência parcial do gene *tRNA^L*, a sequência completa do espaçador intergênico não codificador e sequência parcial do gene *tRNA^F*. Para amplificação desse fragmento, foram utilizados os *primers* trn-c-F (5'GGAAATCGGTAGACGCTACG-3') e trn-f-R (5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3').

A região ITS inclui o espaçador nuclear transcrito primário (ITS1), o gene ribossômico 5,8S, o espaçador transcrito secundário (ITS2) e parte do gene ribossomal 26S. A amplificação foi realizada com os *primers* ITS4 (5'- GGAAATCGGTAGACGCTACG -3') e ITS5 (5'- ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'), conforme White et al. (1990) e Fouly (2004).

A amplificação de ambos os fragmentos foram efetuadas com mistura de reação contendo tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ (1,5 mM), 2,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5µL de *Taq* DNA polimerase, 15 ng de DNA e água deionizada e filtrada em equipamento Mili-Q para completar o volume para 25µL. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador MJ Research PT 100, programado para um ciclo de quatro minutos a 92° C, 40 ciclos a 94° C por 15 segundos, 59° C por 30 segundos e 72° C por dois minutos, seguindo de uma extensão final de 72° C por dez minutos. Foram incluídos também, em cada conjunto de amplificações, controles negativos, isto é, misturas sem DNA.

Alíquotas do produto de reação de cada amostra foram fracionadas em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL). As bandas foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotodocumentadas, para análise posterior. O tamanho de cada fragmento obtido foi determinado através da comparação com bandas do marcador padrão *Ladder* 100 pb (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, U.S.A). Os produtos da PCR foram purificados de acordo com o protocolo de Rosenthal et al. (1993) e depois seqüenciados.

Para o sequenciamento do fragmento do cpDNA foram utilizados aproximadamente 110 ng de DNA do produto final de cada mix de PCR, como molde para reações com o *primer* trn-c-F. Para sequenciar o segmento ITS, uma quantidade equivalente a 85 ng de DNA do produto de cada reação de PCR serviu como molde para reações com o *primer* ITS4 e, separadamente, com o *primer* ITS5. O sequenciamento de ambas regiões foram realizadas em plataforma MegaBace (Amersham), segundo instruções do fabricante.

2.4. Análise dos dados das sequências do cpDNA e do ITS

As sequências, de ambos os marcadores, foram editadas manualmente com o programa BioEdit (Hall, 1999). Para a região correspondente ao cpDNA, o alinhamento múltiplo com o programa Clustal W (Thompson et al., 1994) foi realizado, tanto para *E. densa* quanto para *E. najas*, inicialmente com um *outgroup* (*Butomus umbellatus*, DQ786413.1) disponível no *Genbank*. Posteriormente, as sequências foram sendo alinhadas com as respectivas espécies recém editadas. Após o alinhamento, para proceder com as análises foi delimitado o mesmo segmento para todos os indivíduos.

O mesmo procedimento foi feito para ITS, contudo, o alinhamento múltiplo Clustal W, para ambas as espécies, foi realizado com acessos do *Genbank* correspondente a *E. densa* e *E. najas*, respectivamente, AY330707.1 e AY330708.1.

Para as duas regiões estudadas foram calculados o número de sítios nucleotídicos polimórficos e as distâncias-*p* (porcentagem de sítios polimórficos) com o programa MEGA 4.1 (Kumar et al., 2004) dentro e entre as populações de cada espécie, *E. densa* e *E. najas*. Dendrogramas *neighbor-joining* foram construídos a partir de matrizes de distância-*p*, para o agrupamento dos indivíduos de cada espécie. Os valores de *bootstrap* foram baseados em 10.000 reamostragens.

O programa PAUP*, version 4.0b10 (Swofford, 2002) e Modeltest 3.7 (Posada e Cranall, 1998) foram utilizados para selecionar o modelo evolutivo mais adequado para os ajustes dos dados da região ITS e do cpDNA. Os procedimentos de correção utilizados foram de *Akaike Information Criterion* corrigido (AICc) e *Bayesian Information Criterion* (BIC). Outros dendrogramas *neighbor-joining*, com *bootstrap* de 10.000 reamostragens, foram construídos a partir do modelo matemático selecionado para cada espécie, com o programa PAUP 4.0.

Foram estimadas distâncias genéticas de Tamura e Nei, além da distância-*p*, entre os haplótipos para ambas as regiões de *Egeria*. Também foram construídos dendrogramas *neighbor-joining* a partir das matrizes de distância-*p* e Tamura e Nei, para verificar o agrupamento e separação dos haplotipos de *Egeria*. Os valores de *bootstrap* foram baseados em 10.000 reamostragens.

3. Resultados

3.1. Sequências do DNA do cloroplasto

Nas duas espécies de *Egeria* foi amplificado um fragmento de aproximadamente 1100 pb do DNA do cloroplasto. No entanto, após criteriosa edição manual, uma sequência menor foi selecionada para as análises, de 404 e 411pb para *E. densa* e *E. najas*, respectivamente. Esta seleção foi necessária para obter uma região de melhor qualidade de seqüenciamento e suficiente para comparação entre os exemplares das espécies de *Egeria* das diferentes populações da bacia do alto rio Paraná. Portanto, o fragmento estudado corresponde a uma parte da região do gene *tRNA^L* e a sequência parcial do espaçador intergênico *trnL-trnF*.

A proporção de bases referente à região estudada do cpDNA para os 35 exemplares de *E. densa* foi de A = 39,2%, C = 11,8%, G = 15% e T = 34% e para os 47 de *E. najas* foi de A = 38,5%; C = 12,6%; G = 15,6% e T = 33,4%. O multialinhamento Clustal W das sequências de *E. densa* indicou presença de duas transições e quatro transversões, com relação $R (si/sv) = 0,325$, além de dois *indels*. Entre as sequências de *E. najas* constataram-se duas transições e cinco transversões, com relação $R (si/sv) = 0,332$ e ausência de *indel*. A presença de substituições de base e de poucos *indels* na região estudada do cpDNA permitiu o agrupamento das populações de *Egeria* da bacia do alto rio Paraná em cinco haplótipos, dois para *E. najas* e três haplótipos para *E. densa* (Fig. 2).

Os valores de distância-*p* para as populações de *E. densa* obtidos a partir das sequências do cpDNA foi nula para a maioria dos indivíduos. Estes foram denominados como haplótipo Hpl-Eds_TRN- I. Já, os exemplares SJ-6, SJ10, SJ-26, OC-1, OC-13, OC-14, SV-2 e PC-28 pertencentes apenas ao reservatório de Itaipu, tiveram valores de distância-*p* de 0,015 com relação aos demais e, estão agrupados no haplótipo Hpl-Eds_TRN- III. O haplótipo Hpl-Eds_TRN- II caracterizou, exclusivamente, os exemplares de *E. densa* do reservatório de Rosana, pela presença de dois *indels* exclusivos dessa população.

Para *E. najas* a distância-*p*, entre todos os exemplares quando comparados dois a dois, foi zero, exceto para os indivíduos SFF-20 e RP-16 (distância-*p* = 0,015). Entre os mesmos a distância-*p* foi nula. Dessa forma, SFF-20 e RP-16, pertencentes à população de Itaipu, constituem o haplótipo Hpl-Enj_TRN- II e, os outros 45 indivíduos o haplótipo Hpl-Enj_TRN- I. Os valores de distância-*p* mensurados em ambas as espécies estão dentro da amplitude ($0 \leq \text{distância-}p \leq 0,2$) (Nei, 1991) considerada eficaz na utilização desta medida para avaliar as diferenças entre sequências nucleotídicas (Matioli, 2001).

A seleção do modelo de substituição nucleotídica realizada com os procedimentos *Akaike Information Criterion* corrigido (AICc) e *Bayesian Information Criterion* (BIC) foram concordantes em selecionar o modelo F81 (Felsenstine, 1981) tanto para *E. densa* quanto para *E. najas*. Este é um modelo complexo, que considera diversos parâmetros e tem a maior

probabilidade de explicar as substituições nucleotídicas da região do DNA do cloroplasto, encontradas nas populações de *Egeria* na bacia.

```

HplEds-TRN-I      1 ---AGAAACCCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTTGGTTTGAAAAAAC
HplEds-TRN-II     1 ---.....
HplEds-TRN-III    1 ---.....
HplEnj-TRN-I      1 CAG.....
HplEnj-TRN-II     1 CAG.....
consensus         1 ...*****.*****.*****.*****.*****.*****

HplEds-TRN-I     58 AAATGTTTATTTTATTTTATATATAAATATATTTATTTTCATATATTTACGTATATATTTTA
HplEds-TRN-II    56 .....
HplEds-TRN-III   58 .....C.....
HplEnj-TRN-I     61 .....C.....
HplEnj-TRN-II    61 .....
consensus        61 *****.*****.*****.*****.*****.*****

HplEds-TRN-I    118 CATATATAAAAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTATTTCTAACGAATGGAGTT
HplEds-TRN-II   116 .....
HplEds-TRN-III  118 .....
HplEnj-TRN-I    121 .....
HplEnj-TRN-II   121 .....
consensus       121 *****.*****.*****.*****.*****.*****

HplEds-TRN-I    178 GGTTCGTTGCGTTGGTAGCAGGAATCTTTCTATCGAAATTACAGAAAGGAAGGATGACC
HplEds-TRN-II   176 .....
HplEds-TRN-III  178 .....
HplEnj-TRN-I    181 .....
HplEnj-TRN-II   181 .....
consensus       181 *****.*****.*****.*****.*****.*****

HplEds-TRN-I    238 TTATATACCTAATATAATACGTACGTATCCATACTGACATATCAAACGATTAATCATAAT
HplEds-TRN-II   236 .....
HplEds-TRN-III  238 .....
HplEnj-TRN-I    241 .....
HplEnj-TRN-II   241 .....
consensus       241 *****.*****.*****.*****.*****.*****

HplEds-TRN-I    298 CACAACCTTAATCTAGAATTGATATTTTATATAAAGAAATTTTAAATCTATGAAAAATT
HplEds-TRN-II   296 .....
HplEds-TRN-III  298 .....T.G.....C.A.....
HplEnj-TRN-I    301 .....T.G.....C.A.....
HplEnj-TRN-II   301 .....
consensus       301 *****.*****.*****.*****.*****.*****

HplEds-TRN-I    358 TAAGAATTATTGTAAATCTAAGTTTAAGGAAAAATTGGATATTC AAT----
HplEds-TRN-II   356 .....
HplEds-TRN-III  358 .....G.....
HplEnj-TRN-I    361 .....G.....GGTC
HplEnj-TRN-II   361 .....GGTC
consensus       361 *****.*****.*****.*****.*****.*****

```

Fig.2. Alinhamento das sequências nucleotídicas dos haplótipos de *E. densa* e *E. najas*. O segmento nucleotídico, corresponde, a sequência parcial do *tRNA^L* e do *trnL-trnF* do cpDNA. Os hífen representam deleções, os pontos são bases idênticas, e as demais substituições de base estão sombreadas.

Os dendrogramas construídos com o algoritmo *neighbor-joining* a partir da distância-*p* e da distância baseada no modelo F81, estão representados nas Figuras 3 e 4 para *E. densa* e *E. najas*, respectivamente. Os dois métodos geraram gráficos com a mesma topologia e o mesmo padrão de clados. Os valores de *bootstrap* foram aproximados em ambos os dendrogramas e, são consistentes à maioria dos clados. Contudo, para *E. densa* nos dois gráficos não foi possível separar o haplótipo Hpl-Eds_TRN- I do Hpl-Eds_TRN- II (Fig. 3),

demonstrando que a região estudada do cpDNA é muito conservada dentro e entre as espécies de *Egeria* quando comparadas (Fig. 3; Fig. 8A e 8B).

**Dendrograma *Neighbor-joining*,
Distância-p**

**Dendrograma *Neighbor-joining*,
Distância F81**

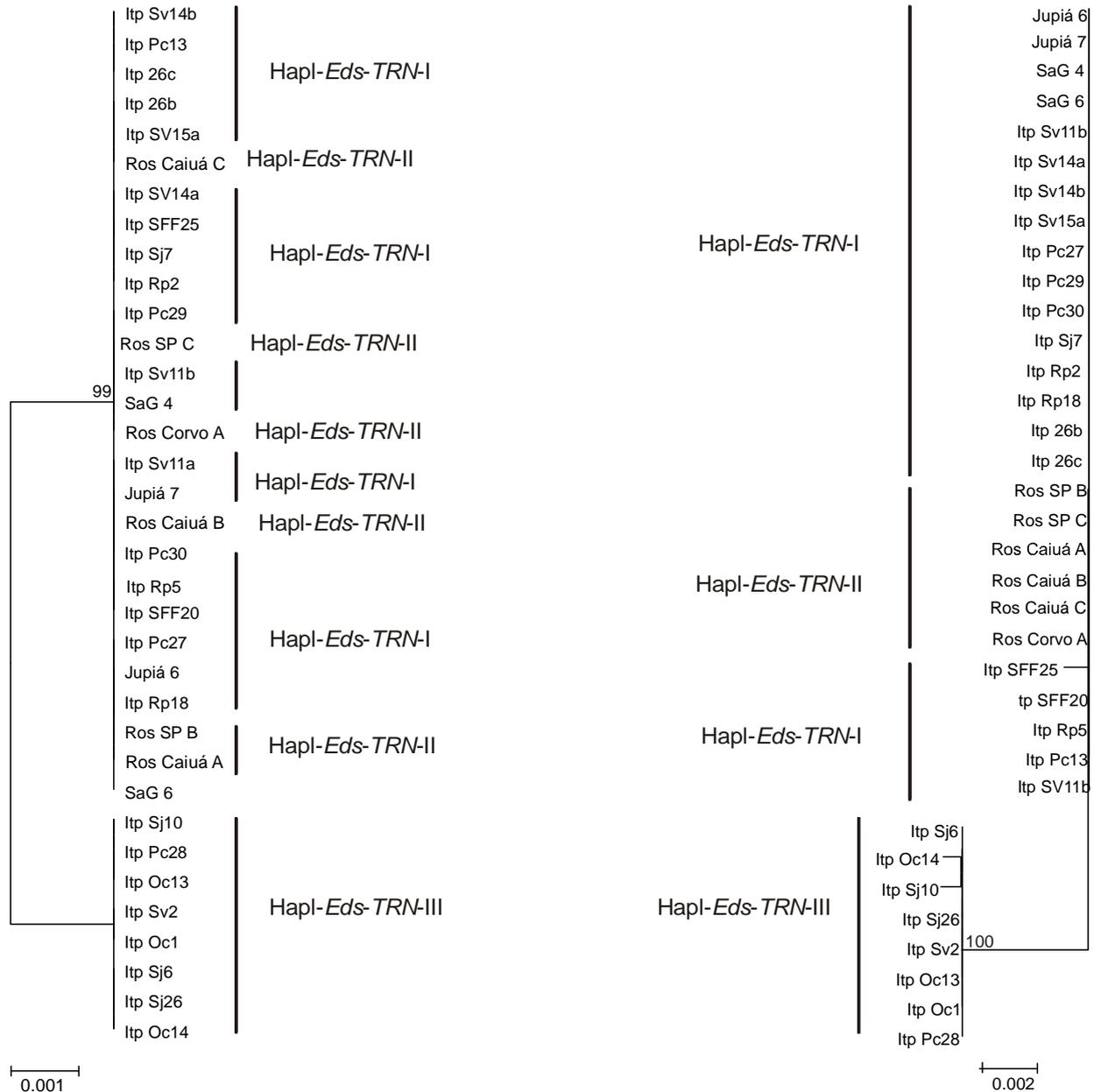


Fig. 3. Dendrogramas construídos com o algoritmo *neighbor-joining* baseados na distância-p (a esquerda) e no modelo evolutivo F81 (a direita), a partir das sequências nucleotídicas da região do cpDNA das populações de *E. densa* da bacia do alto rio Paraná. As análises de *bootstrap* foram baseadas em 10.000 reamostragens.

**Dendrograma *Neighbor-joining*,
Distância-*p***

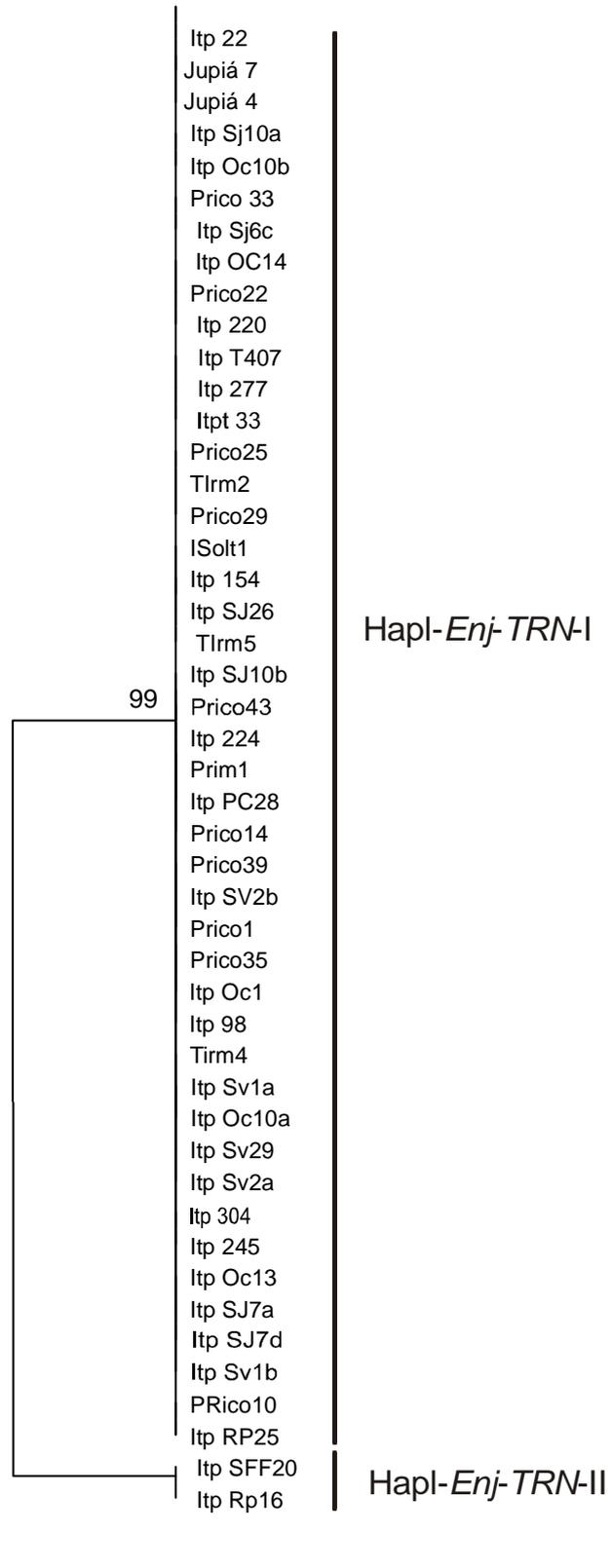


Fig. 4. Dendrograma construído com o algoritmo *neighbor-joining* baseados na distância-*p* (mesmo padrão de clados foi encontrado com a distância do modelo evolutivo F81) a partir das sequências nucleotídicas da região do cpDNA das populações de *E. najas* da bacia do alto rio Paraná. As análises de *bootstrap* foram baseadas em 10.000 reamostragens.

3.2 Região ITS do DNA ribossômico

A região ITS do rDNA amplificada nos exemplares de *Egeria* corresponde a um fragmento de aproximadamente 850 pb. Esta região inclui a sequência parcial do gene ribossomal 18S, o espaçador transcrito interno 1 (ITS-1), o gene ribossomal 5,8S, a sequência completa do espaçador transcrito interno 2 (ITS-2) e a sequência parcial do gene para RNA ribossômico 26S. Para as análises desta região, assim como no cpDNA, após minuciosa edição manual, foi selecionada uma sequência um pouco menor, de maneira a obter uma região de melhor qualidade de sequenciamento e suficiente para comparação entre as espécies.

Após a seleção os fragmentos passaram a ter 698 pb para *E. densa* e 695 pb para *E. najas*. Em seguida, as sequências de cada espécie foram alinhadas, separadamente, com seus respectivos acessos do *Genbank*, AY330707.1 de *E. densa* e AY330708.1 de *E. najas*. Este alinhamento resultou em 731 e 696 sítios nucleotídicos, decorrentes da identificação de *indels* em *E. densa* e *E. najas*, respectivamente.

A região ITS dos 36 exemplares de *E. densa* da bacia do alto rio Paraná com o acesso AY330707.1 apresentou a seguinte proporção de bases: A = 20,3%; C = 22,2%; G = 27,3% e T = 30,2%. O multialinhamento Clustal W das sequências indicou a presença de apenas uma transição e duas transversões, com a relação $R (si/sv) = 0,5$. Entre as sequências das populações dos ecossistemas da bacia do alto rio Paraná foram observadas somente duas substituições de base, sendo uma transição e uma transversão com ausência de *indel*.

Entre os 22 exemplares de *E. najas* da bacia com o acesso AY330708.1 da espécie do *Genbank*, foi observada uma proporção de bases equivalente a 19,2% de A, 24,1% de C, de 28,5% G e 28,1% de T. A relação $R (si/sv)$ foi igual a zero, devido a ausência de transição e, apenas uma transversão. O multialinhamento Clustal W, também, indicou um único *indel* observado nos exemplares de *E. najas* da bacia quando comparados ao acesso AY330708.1.

Entre os indivíduos das diferentes populações de *Egeria* coletadas na bacia do alto rio Paraná, foi verificado somente uma transversão para duas espécies e apenas uma transição para *E. densa* e um *indel* para *E. najas*. Mesmo com baixo número de substituições de bases e, praticamente ausência de *indels*, foi possível reconhecer dois e três haplótipos para região ITS do rDNA em *E. najas* e *E. densa*, respectivamente (Fig. 5).

Os valores de distância- p , obtidos com a sequência selecionada da região ITS do rDNA, entre todos os exemplares de *E. densa* foi igual a zero, com exceção dos indivíduos PC-14 e SV-15. Para estes, a distância- p apresentou valor 0,001 quando comparados dois a dois aos demais exemplares de *E. densa* da bacia e, entre os mesmos, a distância foi de 0,003. Os valores de distância- p entre o acesso AY330707.1 do Genbank e os indivíduos de *E. densa* da bacia foi zero e, igual a 0,003 quando comparado aos exemplares SV-15 e PC-14, respectivos haplótipos Hpl-Eds_ITS- II e Hpl-Eds_ITS- III. Para *E. najas* os valores de distância- p foram de 0,001 entre os indivíduos agrupados nos seguintes haplótipos, Hpl-Enj_ITS- I e Hpl-Enj_ITS- II, e entre este último e o acesso do AY330708.1.

A seleção do modelo de substituição nucleotídica realizada com os procedimentos *Akaike Information Criterion* corrigido (AICc) e *Bayesian Information Criterion* (BIC), também, foram concordantes em selecionar o modelo F81 (Felsenstine, 1981) tanto para *E. najas* quanto para *E. densa*. Conforme mencionado, este modelo considera diversos parâmetros e tem a maior probabilidade de explicar as substituições nucleotídicas observadas entre os haplótipos da região ITS do rDNA da bacia do alto rio Paraná. As Figuras 6 e 7 mostram os dendrogramas construídos com o algoritmo *neighbor-joining* a partir da distância- p e da distância baseada no modelo F81, para *E. densa* e *E. najas* respectivamente. Os dois métodos geraram gráficos com a mesma topologia e o mesmo padrão de clados. Os valores de *bootstrap* foram aproximados em ambos os dendrogramas e mostram consistência na maioria dos clados. Os dendrogramas de *E. densa* com a região ITS do rDNA (Figura 6), diferentemente do gráfico da Figura 3, conseguiram separar todos os haplótipos de *E. densa*.

Dendrograma *Neighbor-joining*,
Distância-*p*

Dendrograma *Neighbor-joining*,
Distância F81

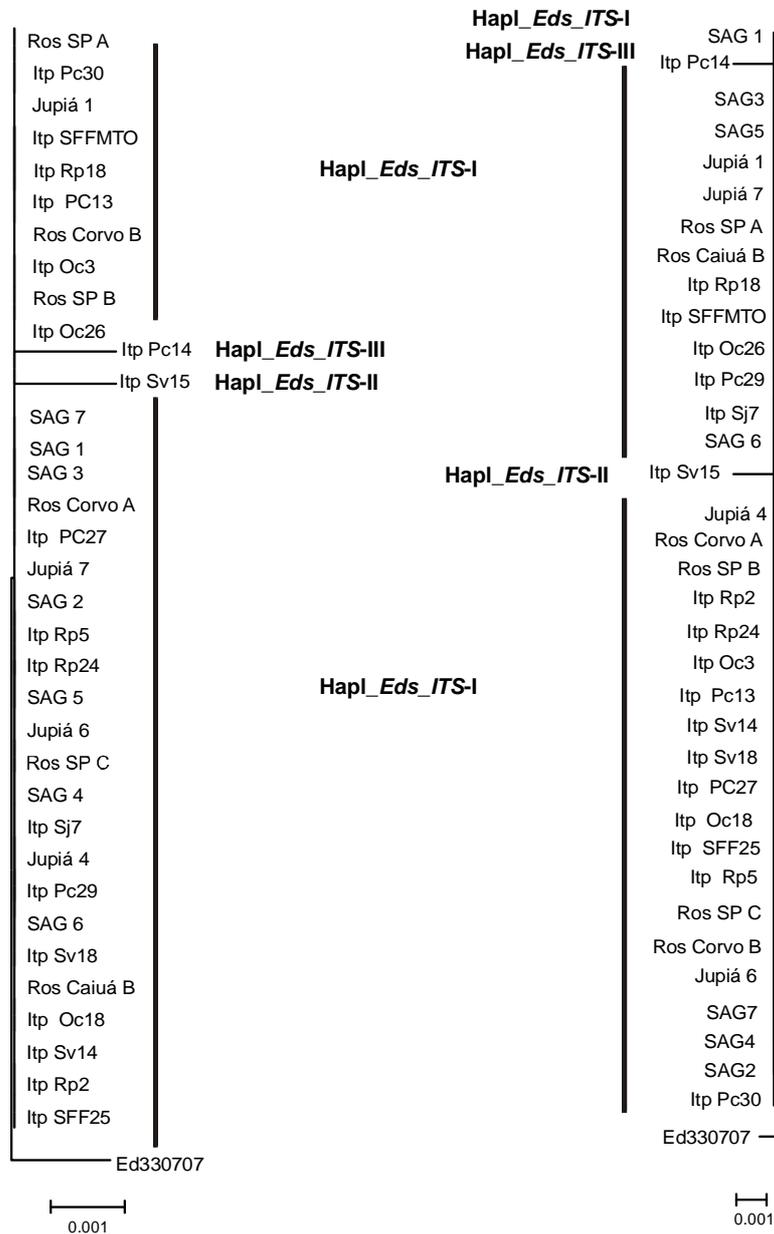


Fig. 6. Dendrogramas construídos com o algoritmo *neighbor-joining* baseados na distância-*p* (a esquerda) e no modelo evolutivo F81 (a direita) a partir das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA das populações de *E. densa* da bacia do alto rio Paraná e AY330707.1 acesso de *E. densa* do *Genbank*. As análises de *bootstrap* foram baseadas em 10.000 reamostragens.

Dendrograma *Neighbor-joining*,
Distância-*p*

Dendrograma *Neighbor-joining*,
Distância F81

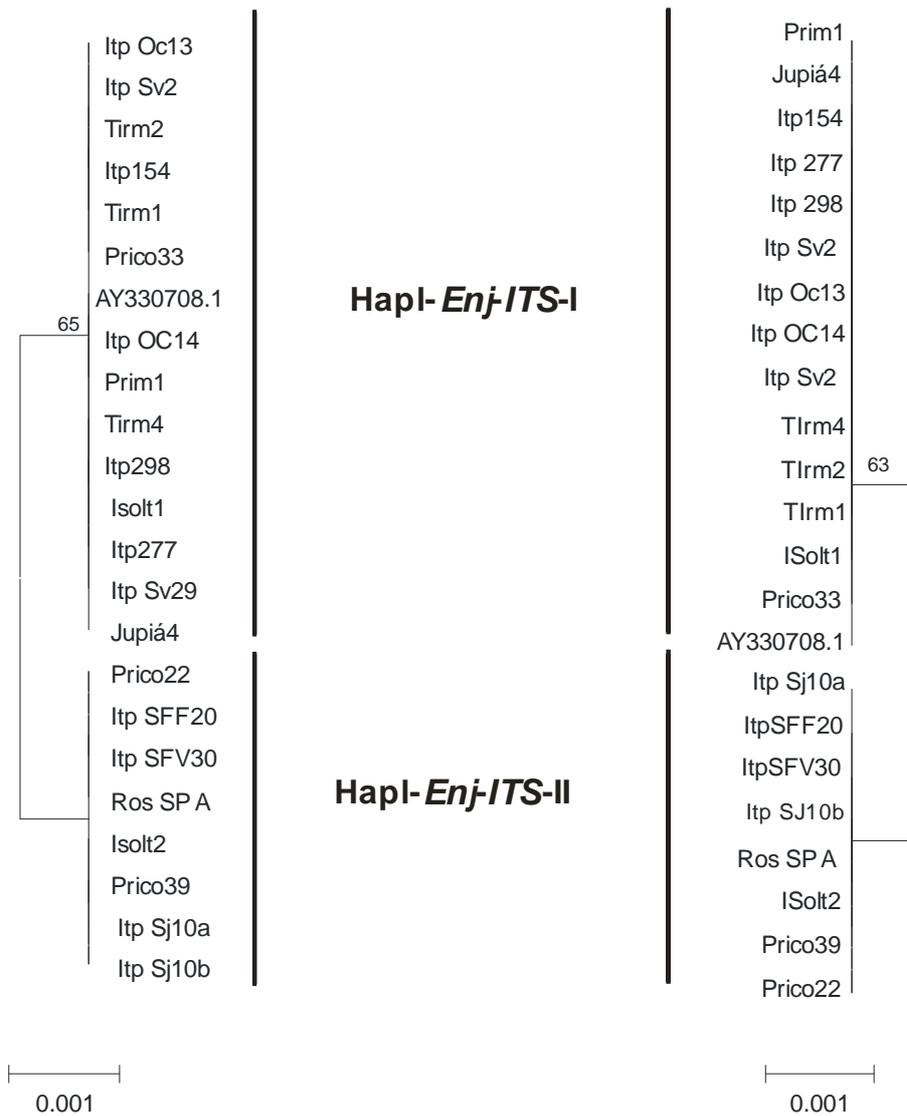


Fig. 7. Dendrogramas construídos com o algoritmo *neighbor-joining* baseados na distância-*p* (a esquerda) e no modelo evolutivo F81 (a direita) a partir das sequências nucleotídicas da região ITS do rDNA das populações de *E. najas* da bacia do alto rio Paraná e AY330787.1 acesso de *E. najas* do *Genbank*. As análises de *bootstrap* foram baseadas em 10.000 reamostragens.

3.3. Ocorrência de haplótipos nas populações de *E. densa* e *E. najas*

Nas populações de *Egeria*, estudadas na bacia do alto rio Paraná, foram reconhecidos dez haplótipos, tanto com o fragmento correspondente a parte do gene *tRNA^L* e sequência parcial do espaçador intergênico *trnL-trnF*, do DNA do cloroplasto quanto pela região ITS do rDNA.

A Tabela 1 mostra todos os indivíduos estudados de *E. densa* da bacia do Paraná e seus respectivos haplótipos: três para região do cpDNA e três para o ITS do rDNA. O haplótipo Hpl-Eds_TRN- I é o mais freqüente com 57,1%, Hpl-Eds_TRN- III possui 22,8% de freqüência e o Hpl-Eds_TRN-II 14,3%. Este último caracterizou exclusivamente a população do reservatório de Rosana, em função da presença de *indels*. Para a região ITS, aproximadamente 95% dos exemplares de *E. densa* pertencem ao haplótipo Hpl-Eds_ITS- I e, menos de 3% de freqüência deles foram observados constituindo os haplótipos: Hpl-Eds_ITS- II e Hpl-Eds_ITS- III.

As combinações entre o genoma nuclear e do cloroplasto que poderiam ser encontrados para *E. densa*, a partir dos haplótipos verificados neste trabalho, são nove. No entanto, somente duas foram identificadas, com base nas sequências das regiões do cpDNA e do ITS do mesmo indivíduo. A combinação predominante reúne o haplótipo I, referente ao cpDNA com o haplótipo I do ITS. Nesta estão incluídas as populações de *E. densa* do reservatório de Itaipu, de Jupia e do reservatório de Salto Grande. A segunda combinação evidente pertence, exclusivamente, à população do Reservatório de Rosana (Tabela 1). Da mesma forma, a Tabela 2 mostra todos os indivíduos estudados de *E. najas* da bacia do alto rio Paraná e seus respectivos haplótipos: dois para região do cpDNA e dois para o ITS do rDNA. Para a primeira região o haplótipo Hpl-Enj_TRN- I é o mais freqüente (95%) e o Hpl-Enj_TRN- II não atinge 5% de ocorrência. Já para a região ITS, das populações de *E. najas*, a discrepância nas ocorrências é menor: o haplótipo I possui aproximadamente 63,6% e o II 36,4%.

Com relação às combinações, entre genoma nuclear e cloroplastídico, das quatro possíveis, três podem ser observadas nas populações de *E. najas* dos ecossistemas amostrados. A mais freqüente é aquela que reúne haplótipos I de ambas as regiões estudadas e, estão presentes em todos os ecossistemas amostrados. A segunda combina o haplótipo I da região do cpDNA e o haplótipo II do ITS, presentes apenas no reservatório de Itaipu e na planície de inundação do alto rio Paraná. A terceira combinação, com ocorrência única e somente em Itaipu, une os haplótipos II tanto do cloroplasto quanto nuclear. Embora esta

combinação tenha frequência baixa, ela constitui um possível recombinante dentro das populações de *E. najas* da bacia, originado por eventual processo sexuado ou por mutação.

Tabela 1 – Combinações de haplótipos TRN e ITS encontrados entre os indivíduos das populações de *E. densa* da bacia do alto rio Paraná.

Local	Banco	Sub-banco	TRN			ITS		
			Hpl-Eds TRN- I	Hpl-Eds TRN- II	Hpl-Eds TRN-	Hpl-Eds_ITS- I	Hpl-Eds_ITS- II	Hpl-Eds_ITS- III
Itaipu	RP 2		+			+		
	RP 5		+			+		
	RP 18		+			+		
	RP 24					+		
	SFF25		+			+		
	SFFMTO					+		
	OC 3					+		
	OC 18					+		
	OC 26					+		
	PC 13		+			+		
	PC 14							+
	PC 27		+			+		
	PC 29		+			+		
	PC 30		+			+		
	SV 11	a		+				
	SV 11	b		+				
	SV 14	a		+			+	
	SV 14	b		+			+	
	SV 15							+
	SV 18						+	
	SJ 6					+		
	SJ 7			+			+	
	Itp26	b		+				
	Itp26	c		+				
	SJ 26					+		
	SFF20			+				
	OC 1					+		
	OC 13					+		
	OC 14					+		
	SJ 10					+		
SV2					+			
PC28					+			
Salto Grande	SAG 1					+		
	SAG 2					+		
	SAG 3					+		
	SAG 4		+			+		
	SAG 5					+		
	SAG 6		+			+		
	SAG 7					+		
Jupia	Jup 1					+		
	Jup 4					+		
	Jup 6		+			+		
	Jup 7		+			+		
Rosana	Paulista A					+		
	Paulista B			+		+		
	Paulista C			+		+		
	Corvo A			+		+		
	Corvo B					+		
	Caiuá A			+				
	Caiuá B			+		+		
Caiuá C			+					

Tabela 2 – Combinações de haplótipos TRN e ITS encontrados entre os indivíduos das populações de *E. najas* da bacia do alto rio Paraná.

Local	Banco	Sub-banco	TRN		ITS	
			Hpl-Enj_TRN- I	Hpl-Enj_TRN- II	Hpl-Enj_ITS- I	Hpl-Enj_ITS- II
Itaipu	SJ7	a	+			
	SJ7	d	+			
	SJ10	a	+			+
	SJ10	b	+			+
	OC10	a	+			
	OC10	b	+			
	OC13	a	+		+	
	OC13	b	+			
	SJ6		+			
	SJ26		+			
	SV1	a	+			
	SV1	b	+			
	SV2	a	+		+	
	SV2	b	+			
	SV29		+			
	SFF20			+		+
	OC1		+			
	OC14		+		+	
	PC28		+			
	RP25		+			
	RP16				+	
	SFV30					+
	T407		+			
	22		+			
	33		+			
	98		+			
	154		+		+	
	220		+			
	224		+			
	245		+			
277		+		+		
298				+		
304		+				
Porto Rico	PR1	a	+			
	PR10	a	+			
	PR14	a	+			
	PR22	a	+			+
	PR25	a	+			
	PR29	a	+			
	PR33	a	+		+	
	PR35	a	+			
	PR39	a	+			+
PR43	a	+				
Três Irmãos	Tirm 1				+	
	Tirm 2	a	+		+	
	Tirm 4	a	+		+	
	Tirm 5	a	+			
Jupia	Jup 4	a	+		+	
	Jup 7	a	+			
Ilha Solteira	ISolt 1	a	+		+	
	ISolt 2				+	
Rosana	RosSPA1					+
Res. Primavera	Prim 1	a	+		+	

3.4. Caracterização molecular de *Egeria densa* e *Egeria najas* pelo ITS do rDNA

No *Genbank* ainda não existem informações sobre a região do cpDNA estudada neste trabalho para o gênero *Egeria*. Além disso, pouca informação há a respeito da mesma região para a família Hydrocharitaceae, com exceção de *Hydrilla verticillata*. A região ITS, diferentemente, possui acessos de diversos representantes da Família Hydrocharitaceae no *Genbank*, inclusive de *E. densa* e *E. najas*.

A região do cpDNA foi eficiente em reconhecer mais de um haplótipo nas espécies de *Egeria*, no entanto, não conseguiu separar os haplótipos I e II de *E. densa* (Figs. 3, Figs. 8A e 8B). Ainda, com esta região não foi possível discriminar os haplótipos de *E. densa* dos de *E. najas* (Figs. 8A e 8B). As Tabelas 3 e 4 mostram os valores de distância-*p* e de Tamura e Nei entre os haplótipos das duas espécies, tanto para região do cpDNA quanto para o ITS, respectivamente.

Os valores para ambas as distância obtidos a partir do fragmento do cpDNA, dentro e entre os haplotipos de *Egeria*, variaram de 0 a 0,015. Entre os haplótipos de *E. najas* a distância-*p* foi de 0,015. Dentro de *E. densa* os haplótipos I e II apresentaram valores de distância iguais a zero e, somente o haplótipo III diferiu, com as duas médias, dos outros dois (Tabela 3).

A análise feita com as sequências da região ITS do rDNA permitiu discriminar haplótipos dentro e entre as espécies de *Egeria*, mesmo com diferença de uma única base. A Tabela 4 mostra os valores de distância-*p* e Tamura e Nei entre haplótipos de cada espécie e entre as espécies. Dentro de cada uma delas houve uma pequena variação entre as médias, de 0,001 a 0,003, mas que foi suficiente para separar os haplótipos. Entre *E. densa* e *E. najas*. O ITS discriminou todos os haplótipos com valores médios para distância-*p* e Tamura e Nei, de 0,129 e 0,144, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 3 – Matriz das médias das distâncias genéticas entre os haplótipos de *E. densa* e *E. najas* da bacia do alto rio Paraná, calculadas com a distância-*p* (abaixo da diagonal) e Tamura & Nei (acima da diagonal) a partir do fragmento do cpDNA, correspondente a parte do gene *tRNA^L* e a sequência parcial do espaçador intergênico *trnL-trnF*.

Distância- <i>p</i> \ Tamura & Nei	Hpl-Enj_	Hpl-Enj_	Hpl-Eds_	Hpl-Eds_	Hpl-Eds_
	<i>TRN</i> - I	<i>TRN</i> - II	<i>TRN</i> - I	<i>TRN</i> - II	<i>TRN</i> - III
Hpl-Enj_ <i>TRN</i> -I	-	0,015	0,015	0,015	0,0
Hpl-Enj_ <i>TRN</i> - II	0,015	-	0,0	0,0	0,015
Hpl-Eds_ <i>TRN</i> - I	0,015	0,0	-	0,015	0,001
Hpl-Eds_ <i>TRN</i> - II	0,015	0,0	0,0	-	0,0
Hpl-Eds_ <i>TRN</i> - III	0,0	0,015	0,015	0,015	-

Tabela 4 – Matriz das médias das distâncias genéticas entre os haplótipos de *E. densa* e *E. najas* da bacia do alto rio Paraná, calculadas com a distância-*p* (abaixo da diagonal) e Tamura e Nei (acima da diagonal) a partir do rDNA, correspondente a sequência parcial do ITS1, o gene 5,8S, a sequência completa do ITS2 e de 20pb do gene 26S.

Distância- <i>p</i> \ Tamura & Nei	Hpl-Enj_	Hpl-Enj_	Hpl-Eds_	Hpl-Eds_	Hpl-Eds_
	<i>ITS</i> -I	<i>ITS</i> - II	<i>ITS</i> - I	<i>ITS</i> - II	<i>ITS</i> - III
Hpl-Enj_ <i>ITS</i> -I	-	0,001	0,144	0,146	0,146
Hpl-Enj_ <i>ITS</i> - II	0,001	-	0,143	0,145	0,144
Hpl-Eds_ <i>ITS</i> - I	0,129	0,128	-	0,001	0,001
Hpl-Eds_ <i>ITS</i> - II	0,131	0,129	0,001	-	0,003
Hpl-Eds_ <i>ITS</i> - III	0,131	0,129	0,001	0,003	-

Os dendrogramas construídos com algoritmo *neighbor-joining*, a partir da distância-*p* e de Tamura e Nei (Figs. 8A e 8C) para as duas regiões, demonstram nítida separação entre os haplótipos de *E. densa* dos de *E. najas*, somente com a região ITS. A Figura 8, também, apresenta dendrogramas construídos com o algoritmo *neighbor-joining* a partir da distância baseada no modelo F81 (Fig. 8B), para os haplótipos da região do DNA do cloroplasto para *E. densa* e *E. najas*. Os dendrogramas construídos, também com algoritmo *neighbor-joining*,

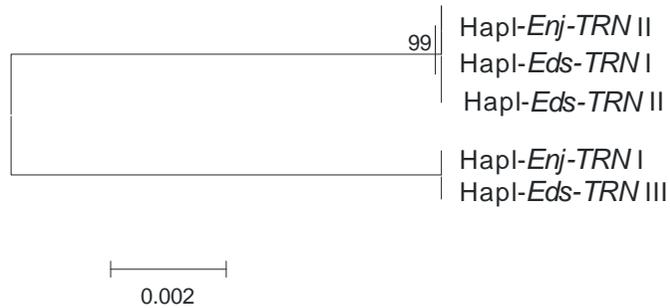
a partir de distâncias baseadas tanto no modelo K80 quanto no TrN, apresentaram padrões de clados idênticos e sumarizam a árvore da Figura 5D, para região ITS do rDNA.

Em todos os dendrogramas (Fig. 8), considerando as duas regiões estudadas, as metodologias geraram gráficos similares na topologia e no padrão de clados, com valores de *bootstrap* aproximados dando consistência aos mesmos.

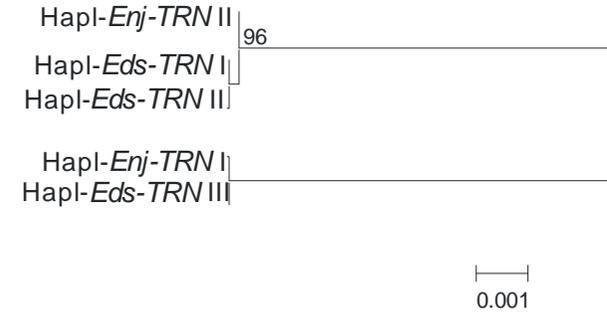
A Tabela 5 mostra as diferenças entre os sítios nucleotídicos dos haplótipos das populações de *E. densa* e *E. najas* da bacia do alto rio Paraná e, seus respectivos acessos do *Genbank*. No ITS-1 são verificadas 30 transições, 15 transversões e três *indels* entre *E. densa* e *E. najas*. Na sequência do ITS-2 22 transições, 14 transversões e dois *indels* diferenciaram as duas espécies. Embora, os espaçadores transcritos internos sejam regiões mais variáveis que os genes ribossomais, o 5,8S e o pequeno fragmento do 26S também apresentaram substituições de base entre as *Egeria*. Para o gene 5,8S foram verificadas oito transversões e uma transição. No pequeno fragmento, de apenas 30 pb, do gene 26S foram encontradas três transições e transversões, sendo uma delas a responsável pela caracterização do haplótipo III de *E. densa*.

Cada espaçador transcrito interno apresentou 48 e 38 sítios nucleotídicos polimórficos, respectivos aos ITS-1 e ITS-2, entre *E. densa* e *E. najas*. Embora, tenha ocorrido variação nos genes ribossomais 5,8S e 26S, estes são muito conservados. Logo, tanto o espaçador transcrito interno primário quanto o secundário do rDNA, foram eficientes em caracterizar e, conseqüentemente, discriminar as populações das espécies do gênero *Egeria* da bacia do alto rio Paraná.

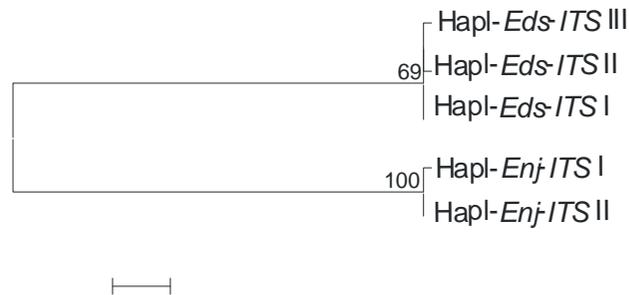
**A - Distância- p e Tamura & Nei
cpDNA**



**B - Distância F81
cpDNA**



**C - Distância- p e
Tamura & Nei
ITS**



**D - Distância do Modelo
K80 e TrN
ITS**

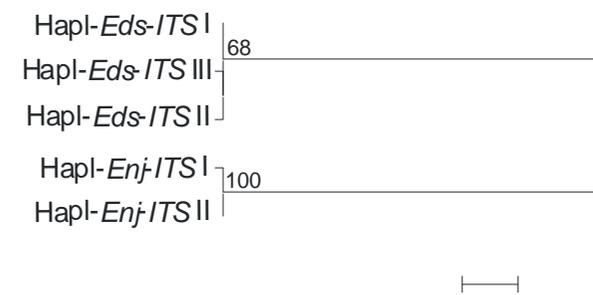


Fig. 8. Dendrogramas construídos com algoritmo *neighbor-joining* e *bootstrap* com 10.000 reamostragens com base na: distância- p e distância Tamura & Nei (A) e distância do modelo evolutivo F81 (B) a partir das sequências nucleotídicas da região do cpDNA dos haplótipos de *E. densa* e *E. najas*. E, distância- p e Tamura & Nei (C) e distância referentes aos modelos K80 e TrN (D) para região ITS dos haplótipos de *E. densa* e *E. najas*.

4. Discussão

Este trabalho é o primeiro a caracterizar e comparar, molecularmente, espécies do gênero *Egeria* (Hydrocharitaceae), a partir de sequências nucleotídicas de regiões do DNA do cloroplasto e da região ITS do DNA ribossômico. As sequências nucleotídicas não codificadoras do genoma têm sido muito utilizadas para estabelecer relações filogenéticas e filogeográficas de espécies de macrófitas aquáticas e possuem grande potencial para detectar variações interespecíficas (Maggini et al., 1998; Reid et al., 2006; Koga et al., 2008). Reid et al. (2006) confirmaram com êxito a divisão do gênero *Azolla* em dois clados, a partir da análise de regiões não codificantes do genoma cloroplastídico (*atpB-rbcL* e *trnL-trnF*) e do ITS do rDNA nuclear. No entanto, os resultados apresentados neste trabalho não demonstram a mesma eficiência, de ambos os marcadores, em caracterizar totalmente as espécies de *Egeria*.

4.1. Sequências parciais do tRNAL e *trnL-trnF* do cp DNA

A avaliação das populações de *E. densa* e *E. najas*, a partir do DNA do cloroplasto, estabeleceram três e dois haplótipos, respectivos às espécies. As diferenças haplotípicas estão representadas por duas deleções e seis substituições de base, em *E. densa*. As únicas deleções foram detectadas somente na população do reservatório de Rosana, haplótipo Hpl-Eds_TRN-II. Os outros haplótipos estão separados por demais mudanças de bases e correspondem aos haplótipos Hpl-Eds_TRN-I e Hpl-Eds_TRN-III, este último exclusivo de Itaipu. Embora tenham sido reconhecidas diferenças nas sequências de *E. densa*, estas não foram suficientes para separar o Haplótipo I e II (dendrograma, Fig.2). Com relação a *E. najas*, também, foram observados haplótipos distintos, Hpl-Enj_TRN-I e Hpl-Enj_TRN-II, em seis mudanças de base. O haplótipo Hpl-Enj_TRN-II, assim como o III de *E. densa*, reuniu exemplares apenas de Itaipu. Por outro lado, em *E. najas*, ambos os haplótipos apresentam-se separados.

Machado (2008) conseguiu discriminar as espécies de *Salvinia* da planície alagável do alto rio Paraná, utilizando o espaçador intergênico *trnL-trnF* do cp DNA. A variação intraespecífica nas espécies de *Egeria*, foi reconhecida por parte do gene tRNAL e parte da sequência do *trnL-trnF*, do genoma cloroplastídico. Contudo, essa variação não permitiu distinguir totalmente os haplótipos de *E. densa*. As variações nas sequências do DNA cloroplastídico são amplamente utilizadas para investigar relações interespecíficas dentro das angiospermas (Palmer et al., 1988; Clegg et al., 1991). Para Lee e Wen (2004), marcadores

moleculares do DNA do cloroplasto são extremamente vantajosos em estudos de baixos níveis taxonômicos, devido a sua herança uniparental materna.

Por outro lado, a baixa taxa evolutiva deste genoma tem limitado sua aplicação em estudos intraespecíficos (Taberlet et al., 1991). Reid et al. (2006) encontraram no gênero *Azolla*, para região *trnL-trnF*, uma taxa evolutiva 1,3 vezes mais rápida que a da região *atpB-rbcL*, no entanto, 2,1 vezes mais lenta que o espaçador transcrito interno (ITS) do rDNA nuclear.

A separação incompleta dos haplótipos de *E. densa*, bem como o agrupamento no mesmo cluster de haplótipos de *E. densa* e *E. najas* (Figs. 5A e 5B), sugere que a região referida do cpDNA neste estudo não é eficaz em caracterizar as espécies de *Egeria*. O tRNAL é um segmento menos variável, pois, tem propriedade catalítica e forma estruturas secundárias (Kuhnel et al., 1990). Logo, é uma região útil para estudos evolutivos de classes taxonômicas mais elevadas e não intraespecíficas ou entre espécies muito próximas, como *Egeria*.

4.2. Sequências ITS do rDNA nuclear

Para ambas as espécies foram identificadas, da mesma forma que para o cpDNA, variações intraespecíficas, com dois haplótipos característicos de *E. najas* e três de *E. densa*. No entanto, o número de mudanças de base foram mínimas em comparação ao cpDNA, mas permitiu, mesmo assim, discriminar haplótipos dentro das espécies. Fritz (1998) relata que os segmentos da região ITS não são bons marcadores para análises de variabilidade intraespecífica, porém, são muito aplicáveis para avaliar a diferenciação genética entre espécies.

Os haplótipos reconhecidos em *E. densa* demonstram variação nas sequências nucleotídicas somente dentro do reservatório de Itaipu. Maior variabilidade de marcadores RAPD também foi verificada em Itaipu só que para *E. najas* espécie (Lucio, L.C., dados não publicados). *Egeria najas* repetiu os resultados de *E. densa*, apresentando maiores variações haplotípicas e com marcadores RAPD (Lucio, 2005) para as populações da planície alagável do alto rio Paraná e de Itaipu. A maior variabilidade na planície indica a importância desse habitat natural na manutenção da variabilidade genética dessas espécies.

Marcadores nucleares ribossômicos ITS (ITS-1 e ITS-2) e sequências nrDNA (DNA ribossômico nuclear) têm sido nominados como futuras *target* para o DNA *barcoding* em plantas (Stoeckle, 2003; Kress et al., 2005). Embora, os genes ITS rDNA estejam repetidos ao

longo do genoma nuclear de plantas, a rápida taxa de evolução em concerto promove uniformidade das unidades repetidas (Gaut et al., 2000; Hughes et al., 2002). Além disso, as suas regiões caracterizam-se por altos níveis de polimorfismo nos menores níveis taxonômicos (Baldwin et al., 1995). Além disso, o tamanho da região ITS na maioria das angiospermas é menor que 700 pb, o que facilita a sua utilização como marcadores específicos para cada táxon (Talbot et al., 2006).

Pesquisas utilizando sequências de ITS do DNA nuclear e do cpDNA, conseguiram caracterizar dois táxons diferentes para o gênero *Salicomia*, demonstrando a eficiência dos marcadores (Kaligaric et al., 2008). Contudo, para *Egeria* apenas a região ITS mostrou-se eficaz na separação das espécies. Para esse gênero a região ITS estudada conseguiu agrupar os haplótipos respectivos às suas espécies num único clado e, conseqüentemente, discriminou *E. densa* de *E. najas*. Os resultados deste trabalho, relativos ao ITS do DNA ribossômico nuclear, tiveram maior sucesso quando comparados aos do cpDNA, em caracterizar as espécies *E. densa* e *E. najas*.

A combinação haplotípica em *Egeria* demonstra, que nas duas espécies o haplótipo I, tanto nuclear quanto cloroplastídico, é o mais freqüente. Além disso, o número de combinações distintas está evidente no ecossistema de Itaipu para *E. densa* e nos referentes à planície e a Itaipu para *E. najas*. Nesta, a presença de um possível recombinante, implica em ocorrência de reprodução sexuada ou mutação. Como discutido anteriormente (Lucio, L.C., dados não publicados), a baixa variabilidade de marcadores RAPD não descarta a possibilidade de recombinação genética. E, ao mesmo tempo, a região ITS possui vulnerabilidade à mutações maior que o cpDNA, podendo, então, justificar a presença de um único recombinante observado nas populações de *E. najas* na bacia do Paraná.

4.2.1. ITS na caracterização molecular de *Egeria*

Pesquisadores sugerem a utilização de dados ITS para estudos interespecíficos ou de gêneros relacionados, já que os espaçadores transcritos internos evoluem mais rapidamente que as regiões codificantes (Baldwin, 1992; SuH et al., 1993; Kim e Jansen, 1994). A análise mais detalhada desta região permitiu verificar que todos os segmentos nucleotídicos do ITS, apresentaram variações nas bases entre as espécies de *Egeria*. Embora os genes ribossomais 5,8S e 26S apresentem variações muito lentas devido à pressão seletiva (Dávila, 2002), entre *E. densa* e *E. najas* foram detectadas alterações intra e interespecíficas, capazes de discriminar não só espécies, mas, também, os haplótipos.

Por outro lado, entre as espécies de *Egeria*, foram os espaçadores ITS-1 e ITS-2 que concentraram maior polimorfismo nucleotídico. Apesar de pouca diferença entre eles, a sequência completa do ITS-1 apresentou mais sítios polimórficos que a sequência completa do ITS-2. Os marcadores gerados a partir do rDNA nuclear, utilizados para estimar relações filogenéticas, priorizam o espaçador transcrito interno1 (ITS-1), devido a alta taxa de variação de sequência nucleotídica (Harris e Crandall, 2000).

Os marcadores moleculares referentes ao ITS do rDNA nuclear foram mais eficientes na diferenciação entre as espécies *E. densa* e *E. najas*. Logo, esses marcadores poderão ser utilizados como ferramentas, e serão de grande valia, na caracterização molecular de espécies próximas como as estudadas no presente trabalho.

Referências

- Baldwin, B. G., 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the *Compositae*. *Molec. Phylogenet. Evol.*, 1, 3-16.
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., Donoghue, M.J., 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 82, 247–277.
- Bsorsch, T., Hilu, K.W., Quandt, D., Wilde, V., Neinhuis, C., Brathlott, W., 2003. Noncoding plastid trnT-trnF sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms. *J. Evol. Biol.* 16, 558–576.
- Camargo, A.F.M., Pezzato, M.M., Henry-Silva, G.G., Assumpção, A.M., 2006. Primary production of *Utricularia foliosa*, *Egeria densa* and *Cabomba furcata* from rivers of the coastal plain of the state of São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia* 570, 35–39.
- Clegg, M.T., Learn, G.H., Golenberg, E.M., 1991. Molecular evolution of chloroplast DNA. In: Selander, R.K., Clark, A.G., Whittam, T.S., (Eds.), *Evolution at the Molecular Level*. Sinauer Associates, Sunderland, pp. 135-149.
- Cook, C.D.K., Urmikönig, K., 1984. A revision of the genus *Egeria* (Hydrocharitaceae). *Aquat. Bot.* 19, 73-96.
- Dávila, A.M.R., 2002. Tripanosomose animal na América do Sul: Epizootiologia, evolução e tecnologias da informação. Tese Pós-Doutorado (Fiocruz, Instituto Oswaldo Cruz), Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Felsenstine, J., 1981. Evolutionary tree from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17, 368-376.
- Ferris, C., Oliver, R.P., Davy, A.J., Hewitt, G.M., 1993. Native oak chloroplast reveals an ancient divide across Europe. *Mol. Ecol.* 2, 337-344.
- Fouly, H.M., 2004. ITS ribosomal DNA phylogeny of *Gaeumannomyces graminis*. *Arab J. Biotech.*, 7, 45-52.

- Fritz, G.N., 1998. Sequence analysis of the rDNA internal transcribed spacer 2 of five species of South American human malaria mosquitoes. *DNA Seq.*, 8, 215-221.
- Fundação Universidade Estadual de Maringá. Nupélia/Itaipu Binacional, 2005. Estudos das macrófitas aquáticas no reservatório de Itaipu: relatório (5ª etapa: 2003-2005). Maringá, Relatório técnico.
- Gaut, B.S., Tredway, L.P., Kubik, C., Gaut, R.L., Meyer, W., 2000. Phylogenetic relationships and genetic diversity among members of the *Festuca-Lolium* complex (Poaceae) based on ITS sequence data. *Plant Syst. Evol.* 224, 33–53.
- Gielly, L., Taberlet, P., 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Mol. Biol. Evol.* 11, 769-777.
- Gubiani, E.A., 2004. O pulso de inundação e a assembléia de peixes sobre a perspectiva de metapopulações. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Guillemin, M.L., Ait Akki, S., Givernaud, T., Mouradi, A., Valero, M., Destombe, C. 2008. Molecular characterisation and development of rapid molecular methods to identify species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco. *Aquat Bot.*, 89, 324–330.
- Hall, T.A., 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41, 95-98.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L., Weir, B.S. (Eds.), *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Sinauer, Massachusetts, pp.43-63.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise, J.C., Hamrick, J.L. (Eds.), *Conservation Genetics*. Chapman and Hall, New York, pp. 281-304.
- Han, Y-C., Teng, C-Z., Zhong, S., Zhou, M-Q, Hu, Z-L., Song, Y-C., 2007. Genetic variation and clonal diversity in populations of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) in central China detected by ISSR markers. *Aquat Bot.*, 86, 69–75.
- Hangelbroek, H.H., Ouborg, N.J., Santamaría, L., Schwenk, K., 2002. Clonal diversity and structure within a population of pondweed *Potamogeton pectinatus* foraged by Bewick's Swans. *Mol. Ecol.* 11, 2137–2150.
- Harris, D.J., Crandall, K.A., 2002. Intragenomic Variation Within ITS1 and ITS2 of Freshwater Crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Mol. Biol. Evol.*, 17, 284–291.
- Huang, J.C., Wang, W.K., Peng, C.I., Chiang, T.Y., 2005. Phylogeography and conservation genetics of *Hygrophila pogonocalyx* (Acanthaceae) based on atpB-rbcL noncoding spacer cpDNA. *J. Plant Res.* 118, 1–11.
- Hughes, C.E., Bailey, C.D., Harris, S.A., 2002. Divergent and reticulate species relationships in *Leucaena* (Fabaceae) inferred from multiple data sources: insights into polyploidy origins and nrDNA polymorphism. *Am. J. Bot.* 89,1057–1073.
- Kaligarić, M., Bohanec, B., Simonovik, B., Šajna, M., 2008. Genetic and morphologic variability of annual glassworts (*Salicornia* L.) from the Gulf of Trieste (Northern Adriatic). *Aquat Bot.* 89, 275–282.

- Kim, K.J., Jansen, R.K., 1994. Comparisons of phylogenetic hypotheses among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*, Asteraceae): additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Pl. Syst. Evol.*, 190, 157-185.
- Koga, K., Kadono, Y., Setoguchi, H., 2008. Phylogeography of Japanese water crowfoot based on chloroplast DNA haplotypes. *Aquat Bot.*, 89, 1-8.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weight, L.A., Janzen, D.H., 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 8369-8374.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* 5, 150-163.
- Kuhnel, M.G., Strickland, R., Palmer, J.D., 1990. An ancient group I intron shared by eubacteria and chloroplasts. *Science* 250, 1570-1573.
- Lee, C., Wen, J., 2004. Phylogeny of *Panax* using chloroplast trnC-trnD intergenic region and the utility of trnC-trnD in interspecific studies of plants. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 31, 894-903.
- Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Reisch, B.I., 1994. A simple and efficient method for DNA extractions from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant. Mol. Biol.*, 12, 6-13.
- Lucio, L.C., 2005. Análise genética, com marcadores moleculares RAPD e SPAR, de populações de *Egeria najas* Planchon (Hydrocharitaceae) do reservatório de Itaipu, Brasil. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Machado, S.A., 2008. Caracterização molecular de espécies do gênero *Salvinia* (Salvinaceae) da planície alagável do alto rio Paraná. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Madeira P.T., Coetzee J.A., Center T.D., White E.E., Tipping P.W., 2007. The origin of *Hydrilla verticillata* recently discovered at a South African dam. *Aquat. Bot* 87, 176-180.
- Maggini, F., Marrocco, R., Gelati, M.T., Dominicis, R., 1998. Lengths and nucleotide sequences of the internal spacers of nuclear ribosomal DNA in gymnosperms and pteridophytes. *Pl. Syst. Evol.*, 213, 199-205.
- Martins, D., Cardoso, L.R., Mori, E.S., Tanaka, R.H., 2003. Caracterização genética de acessos de Egéria (*Egeria* spp.) coletados no Estado de São Paulo utilizando RAPD. *Planta Daninha*, 21, 1-6.
- Martins, D., Velini, E.D., Negrisoni, E., 2005. Controle de *Egeria densa* e *Egeria najas* em caixa-d'água utilizando o herbicida diquat. *Planta Daninha*, 23, 381-385.
- Matioli, S.R., 2001. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos, Ribeirão Preto, pp. 202.
- Nascimento, P.R.F., Pereira, S.M.B., Sampaio, E.V.S.B., 2008. Biomassa de *Egeria densa* nos reservatórios da hidroelétrica de Paulo Afonso-Bahia. *Planta Daninha* 26, 481-486.
- Nei, M., 1991. Relative efficiencies of different tree-making methods for molecular data. In: Miyamoto, M.M., Cracraft, J., (Ed.), *Phylogenetic analysis of DNA sequences*. Oxford University Press, New York, 90-128.
- Palmer, J.D., Jansen, R.K., Michaels, H.J., Chase, M.W., Manhart, J.R., 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Garden*. 75, 1180-1206.

- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Pott, V.J., Pott, A., 2000. Plantas aquáticas do Pantanal. Embrapa, Brasília, Distrito Federal, pp. 404.
- Reid, J.D., Plunkett, G.M., Peters, G.A., 2006. Phylogenetic relationships in the heterosporous fern genus *Azolla* (AZOLLACEAE) based on DNA sequence data from three noncoding regions. *Int. J. Plant. Sci.*, 167, 529-538.
- Rodella, R.A., Costa, N.V., Costa, L.D.N.C., Martins, D., 2006. Diferenciação entre *Egeria densa* e *Egeria najas* pelos caracteres anatômicos foliares. *Planta Daninha* 24, 211-220.
- Rosenthal, A., Coutelle, O., Craseton, M., 1993. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res.*, 21, 173-174.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Milligan B.G., 1992. Intraspecific chloroplast DNA variation: Systematic and phylogenetic implications, In: Soltis, D.E., Soltis, P.S., (Eds.), Sinauer, New York, pp. 117-150.
- Stoeckle, M., 2003. Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *Bioscience* 53, 2-3.
- Su, Y.J., Wang, T., Zheng, B., Jiang, Y., Chen, G.P., Gu, H.Y., 2004. Population genetic structure and phylogeographical pattern of a relict tree fern, *Alsophila spinulosa* (Cyatheaceae), inferred from cpDNA atpB–rbcL intergenic spacers. *Theor. Appl. Genet.* 109, 1459–1467.
- Su, Y.J., Wang, T., Zheng, B., Jiang, Y., Ouyang, P.Y., Chen, G.P., 2005. Genetic variation and phylogeographical patterns in *Alsophila podophylla* from Southern China based on cpDNA atpB–rbcL sequence data. *Am. Fern J.* 95, 68–79.
- SuH, Y.L., Tnien, L.B., Reeve, H.E., Zimmer, E. Z., 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in *Winteraceae*. *Amer. J. Bot.*, 80, 1042-1055.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17, 1105-1109.
- Talbot, S.L., Wyllie-Echeverria, S., Ward, D.H., Rearick, J.R., Sage, G.K., Chesney, B., Phillips, R.C., 2006. Genetic characterization of *Zostera asiatica* on the Pacific Coast of North America. *Aquat Bot.*, 85, 169–176.
- Tanaka, N., Setoguchi, H., Murata, J., 1997. Phylogeny of the family Hydrocharitaceae inferred from *rbcL* and *matK* gene sequence data. *J. Plant Res.* 110, 329-337.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequencing weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.*, 22, 4673-4680.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: Innis, N., Gelfand, D., Sninsky, J., White, J. (Eds.), PCR-Protocols and Applications-A Laboratory Manual. Academic Press, New York, pp. 315–322.

- Wolfe, K.H., Li, W.H., Sharp, P.M., 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Prot. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 9054–9058.
- Yoo, K.-O., Malla, K.J., Wen, J., 2001. Chloroplast DNA variation of *Panax* in Nepal and its taxonomic implications. *Brittonia* 53, 447-453.
- Zhang, T., Wang, Q., Li, W., Cheng, Y., Wang, J., 2008. Analysis of phylogenetic relationships of *Potamogeton* species in China based on chloroplast trnT-trnF sequences. *Aquat Bot.*, 89, 34-42.
- Zurawski, G., Clegg, M.T., 1987. Evolution of higher-plant chloroplast DNA-encoded genes: Implications for structure-function and phylogenetic studies. *Ann. Rev. Plant Phys.* 38, 391-418.

CAPÍTULO 3

**Desenvolvimento de marcadores microssatélites (*SSR*) para *Egeria densa*
(*Hydrocharitaceae*)**

Desenvolvimento de marcadores microssatélites (*SSR*) para *Egeria densa* (Hydrocharitaceae)

Resumo

O desenvolvimento de marcadores mais informativos, como os microssatélites, podem agregar informações mais conclusivas a respeito da estrutura genética do gênero *Egeria*. O isolamento de microssatélites para espécie *Egeria densa*, foi feito com construção de bibliotecas de DNA. O enriquecimento da biblioteca e a captura dos mesmos aconteceu por hibridizações destes com sondas (CT)₈ e (GT)₈. A seleção dos clones foi feito por triagem das colônias e 105 tiveram seus insertos sequenciados. Regiões microssatélites foram encontradas em 25 sequências, porém destas apenas oito demonstraram qualidade para desenho dos *primers*. Com isso oito pares de *primers* flanqueadores de regiões microssatélites, com motivos de dois a quatro nucleotídeos, foram construídos.

Palavras-chave: *Egeria densa*, microssatélite, biblioteca de DNA, *primers* microssatellite.

Development of microsatellite markers (SSR) for *Egeria densa*
(Hydrocharitaceae)

Abstract

The development of informative molecular markers such as microsatellites enhances information about the genetic structure of the genus *Egeria*. The isolation of microsatellites for *Egeria densa* was done by constructing DNA libraries. The enrichment of the library and the capture of microsatellites were done after the hybridization of microsatellites with the probes (CT)₈ and (GT)₈. Clones were selected by screening colonies and, 105 of them had their inserts properly sequenced. Microsatellite regions were found in 25 sequences, but only eight sequences had enough quality for the design of the primers. Thus, eight pairs of primers that flank microsatellite regions were built, with motifs from two to four nucleotides.

Keywords: *Egeria densa*, microsatellite, genomic library, primers.

1. Introdução

O gênero *Egeria* (Hydrocharitaceae) é formado por macrófitas aquáticas submersas com grande potencial para colonizar ambientes lênticos, como lagos e reservatórios de usinas hidrelétricas (Sculthorpe, 1985). Estudos correlacionando populações de plantas à teoria de metapopulações, ainda não são tão frequentes (Ge et al., 2005; Obbard et al., 2006). Entretanto, a estratégia de ocupação de *E. densa* e *E. najas* em ecossistemas da bacia do alto rio Paraná segue uma dinâmica, que tem sido caracterizada pela dinâmica de metapopulações (Lucio, L.C., dados não publicados). Essas espécies se reproduzem, predominantemente, por propagação vegetativa com intensa dispersão de indivíduos entre as subpopulações (*patches*). A constante migração de propágulos e o fluxo de poucos genótipos entre estas subpopulações ou *patches* vizinhos, implicam em baixa variabilidade genética entre e dentro delas (Lucio, L.C., dados não publicados). Pesquisadores têm encontrado variação genética em espécies de macrófitas aquáticas clonais, utilizando marcadores moleculares dominantes como RAPD, ISSR e AFLP (Ren e Zhang, 2007; Han et al., 2007; Okada et al., 2009). Larson (2007) encontrou a partir de marcadores moleculares microssatélites (*SSR*) genótipos diferentes em populações não nativas de *Nymphoides peltata*, onde a reprodução vegetativa é um fator a ser considerado na estruturação genética da espécie.

Os microssatélites ou *SSR* (*Simple Sequence Repeats*), são sequências simples de 1 a 6 nucleotídeos repetidas em *tandem* no genoma (Tautz e Renz 1984; Epplen et al., 1993). Estes marcadores conhecidos também como *STR* (*Short Tandem Repeat*) possuem elevado polimorfismo com extensiva variação alélica e altos níveis de heterozigosidade (Carvalho e Pitcher, 1995), além da abundância de locos *SSR* no genoma. Estas características fazem destes marcadores ferramentas amplamente utilizadas em estudos de análise genética de populações (Varshney et al., 2005).

A aplicação de marcadores microssatélites requer o desenvolvimento de *primers* específicos, sequências únicas do DNA, que flanqueiam cada um dos locos *SSR* do genoma de uma espécie. Uma vez disponível essa sequência de *primers* o trabalho de caracterização da diversidade genética torna-se mais fácil e possível de ser executado em laboratórios sem grandes recursos financeiros (Zaner, 2002).

Em plantas o uso de marcadores *SSR* tem sido fundamental no estabelecimento de relações filogenéticas, na determinação da variabilidade genética e para conservação da biodiversidade (Ruas et al., 2008; Novak et al., 2008; Yin et al., 2009). No entanto, poucos

marcadores microssatélites são encontrados para a vegetação aquática (Pan et al., 2007; Kubo, et al., 2009).

A variabilidade genética, nas populações de *Egeria* da bacia do rio Paraná, determinada por marcadores moleculares nucleares dominantes é baixa (Martins et al., 2003; Lucio, 2005). Entretanto, a caracterização pelo segmento ITS do rDNA identificou haplótipos diferentes dentro de *E. densa* e *E. najas* (Lucio, L.C., dados não publicados). Marcadores mais informativos, como os microssatélites, agregariam outras informações, talvez mais conclusivas a respeito da estrutura genética de *Egeria*. Apesar de ser uma técnica amplamente utilizada nos estudos populacionais, os microssatélites ainda não podem ser empregados em *Egeria* por falta de iniciadores (*primers*) de microssatélites específicos para o gênero.

O desenvolvimento de *primers* representa um importante avanço tecnológico, visto que ferramentas da biologia molecular têm auxiliado de forma extremamente eficaz estudos ecológicos e evolutivos (Avisé, 2004). Assim, esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de *primers* de microssatélites para a espécie *E. densa* para posterior caracterização dessas regiões.

2. Material e métodos

2.1. Extração e Quantificação do DNA

Amostras de cinco exemplares de *E. densa* tiveram seu DNA isolado seguindo adaptações do protocolo de Lodhi et al. (1994). Para quantificação dos mesmos foram feitas estimativas a partir de comparações com quantidades conhecidas de DNA do fago λ , por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O DNA de melhor qualidade de um único indivíduo foi utilizado para o desenvolvimento dos *primers* de regiões microssatélite.

2.2. Construção de Biblioteca de DNA enriquecida com SSR

Os microssatélites podem ser obtidos a partir de três tipos de bibliotecas: genômicas, de DNA complementar ou de bibliotecas enriquecidas para sequências microssatélites, ou ainda, a partir de sequências depositadas em bancos de dados (Gao et al., 2003). Nesse trabalho, o isolamento de microssatélites e o seu enriquecimento em bibliotecas de DNA seguiu a metodologia proposta por Billotte et al. (1999). Neste protocolo o enriquecimento da biblioteca e a captura dos microssatélites acontece por hibridizações destes com sondas (CT)₈ e (GT)₈. Aproximadamente, 5 μ g do DNA total de um único exemplar de *E. densa*, foi digerido com a enzima de restrição RsaI, por 18hrs a temperatura de 37° C. Os fragmentos

resultantes desta digestão foram ligados a adaptadores (RsaI-21 5'-TCTTGCTTACGCGTGGACTA-'3 e RsaI-25 5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-'3) para garantir que todos os fragmentos digeridos tivessem terminações comuns.

Os fragmentos contendo as repetições CT e GT, foram selecionados por hibridização com oligonucleotídeos biotinilados, complementares a sequência repetitiva e, posteriormente, estes foram reconhecidos por *beads* magnéticas revestidas de streptavidina (DynaI). Os fragmentos enriquecidos com microssatélites foram amplificados via PCR, com o *primer* RsaI-21 e, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (20 µL/100 mL). Os fragmentos, então enriquecidos com microssatélites, foram clonados em vetores pGEM-T *Easy Vector*. Depois de clonados, os vetores foram inseridos, por transformação, em células super competentes da cepa XL1 Blue (Stratagene) de *Escherichia coli* (Ruas et al., 2008).

As colônias positivas foram selecionadas, com antibiótico ampicilina, para crescer em meio líquido, e posteriormente, foi realizada a extração plasmidial de cada clone com o kit *Purelink Quick Plasmidial Miniprep* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A). O resultado da extração foi verificado também em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (20µL/100mL). Na etapa seguinte, foram feitas ampliações via PCR de cada DNA plasmidial isolado, para verificar a presença do inserto de *E. densa* com prováveis locos *SSR*. Para os insertos que apresentaram qualidade satisfatória foram montadas reações de sequenciamento em plataforma MegaBace (Amersham), segundo instruções do fabricante.

2.3. Análise dos dados

As sequências correspondentes aos insertos foram editadas manualmente com o programa Bioedit (Hall, 1999) e, em seguida, tiveram os blocos microssatélites reconhecidos pelo programa Gramene (Ware et al., 2002). Os pares de *primers* que flanqueiam as regiões repetitivas dos microssatélites, foram desenhados a partir do software *Primer 3 Plus* (Rozen e Skaletsk, 2000). Este programa fornece também a posição dos *primers* no fragmento sequenciado e suas temperaturas de anelamento, fundamental para o sucesso da PCR e amplificação dos locos de microssatélites.

3. Resultados e Discussão

Com as transformações foram obtidos 200 clones com prováveis locos microssatélites. Destes 105 apresentaram qualidade para serem montadas reações de sequenciamento. Após essas reações, dos 105 insertos, 25 sequências revelaram regiões repetitivas, ou de microssatélites. Esse baixo número de regiões repetitivas pode sugerir que, assim como outras espécies de plantas (Bory et al., 2007), o genoma da espécie *E. densa* apresenta poucas regiões microssatélites.

Entretanto, nem todas as sequências foram utilizadas para o desenho dos *primers*. Isto porque parte delas continham regiões de repetição localizadas nas extremidades do inserto, o que poderia comprometer futuramente a obtenção dos marcadores *SSR*. Assim, após as análises das 25 sequências, oito pares de *primers* flanqueadores de regiões microssatélites (Fig. 1) do genoma de *E. densa* foram isolados e desenhados.

As regiões *SSR* selecionadas são compostas por motivos que variam de dois a quatro nucleotídeos (Tabela 1). Embora tenham-se utilizado sondas dinucleotídicas foram encontradas regiões de repetição com motivos tri e tretranucleotídicas. As sequências dos oligonucleotídeos (Eds_01 a Eds_08), a temperatura de anelamento sugerida para os pares de *primers* estiveram entre 53,8 a 60,4°C, com média de 56,8 à 57,2°C, e o tamanho esperado do fragmento amplificado, que variou de 172 a 249 pares de bases, estão apresentados na Tabela 1.

Apesar do número de *primers* sintetizados ter sido satisfatório, existe a possibilidade de desenvolver um maior número de iniciadores para uma melhor cobertura do genoma e detecção de maior variabilidade genética em *E. densa*. Com a padronização na amplificação dos *primers* descritos neste trabalho será possível caracterizar as regiões microssatélites de *E. densa*, proporcionando maior robustez na análise da estrutura e da diversidade genética das populações dessa espécie. Além disso, diversos trabalhos tem mostrado a possibilidade de transferibilidade de *primers* de microssatélites entre espécies (Bory et al., 2008; Alves et al., 2006; Bravo et al., 2006) e, até mesmo, entre gêneros próximos (Pérez et al., 2006; Salywon e Dierig, 2006). Assim, existe grande probabilidade dos *primers* desenvolvidos no presente trabalho produzirem resultados positivos, através da amplificação cruzada, com *Egeria najas*, e também com outras espécies próximas da família Hydrocharitaceae.

Tabela 1 - Pares de *primers* SSR desenvolvidos para *E. densa* com as sequências, os motivos de repetição, a temperatura de anelamento e o tamanho médio esperado (pb) dos produtos de PCR.

	Pares de <i>primers</i>	Repetições	Temperatura média de anelamento (Ta°C)	Tamanho esperado do produto de PCR
Eds01	F: TGGGTGGTCTCCAACCTTTA R: TCCTGATTGCGTGAATGTAGA	(AT) ₃ (CA) ₄ (AG) ₃ (AT) ₄ (AC) ₆	57	244pb
Eds02	F: TGACACCAAGGAGGTTCAAA R: GGCAGCAGATGAAGTGAAT	(GT) ₇ (GA) ₁₅	57,1	172pb
Eds03	F: CGATGGCAATACCCAACAAT R: TGTGTTTGCCAATCATCTCC	(GA) ₁₄	57	247pb
Eds04	F: TTGCCTGAATAATGCACCAC R: CTCAAGCTATGCATCCAACG	(AT) ₈ (GT) ₇	59,1	240pb
Eds05	F: ACGCTCGCCTAAGAAAGTTG R: TTGCGACATCGAGATCTTTG	(ATT) ₅ (CA) ₃	57,1	211pb
Eds06	F: CACAGCGCCACAAATATGAC R: CGGAGTAGTGGAGGGTCTCA	(GA) ₂₁ (GAGG) ₄	56,8	184pb
Eds07	F: GGGTGATGGTGTCTGGAGAA R: TGAACAATATCTCCCGTGGAC	(GA) ₃ (GA) ₄ (GA) ₃ (GA) ₄ (GA) ₆ (GA) ₃ (GA) ₅	57,2	249pb
Eds08	F: TTTGGATCCACTAGCCAACA R: CCTCAAAAAGGAGAAACC	(GT) ₃ (TC) ₁₅ (CA) ₇	56,9	249pb

Referências

- Alves, R.M., Sebbenn, A.M., Artero, A.S.; Figueira, A., 2006. Microsatellite loci transferability from *Theobroma cacao* to *Theobroma grandiflorum*. Mol. Ecol. Notes 6, 1219-1221.
- Awise, J.C., 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., pp. 684.
- Billotte N., Lagoda P.J.R., Risterucci A.M., Baurens F.C., 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits, 54, 277–288.
- Bory, S., Da Silva, D., Risterucci, A.-M., Grisoni, M., Besse, P., Duval, M.-F., 2008a. Development of microsatellite markers in cultivated *Vanilla*: polymorphism and transferability to other *Vanilla* species. Sci. Hortic., 115, 420–425.

- Bravo, J.P., Hoshino, A.A., Angelici, C.M.L.C.D., Lopes, C.R., Gimenes, M.A., 2006. Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. *Genet. Mol. Biol.*, 29, 516-524.
- Epplen, C., Melmer, G., Siedlaczek, I., 1993. On the essence of 'meaningless' simple repetitive DNA in eukaryote genomes. In: Pena S.D.J., Chakraborty, R., Epplen, J.T., Jeffreys, A.J. (Ed.), *DNA fingerprinting: state of the science*. Birkh user Verlag, Basel Switzerland, pp. 29-45.
- Gao, L., Tang, J., Li, H., Jia, J., 2003. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. *Mol. Breed.*, 12, 245-261.
- Ge, X.J., Liu, M.H., Wang, W.K., Schaal, B.A., Chiang, T.Y., 2005. Population structure of wild bananas, *Musa balbisiana*, in China determined by SSR fingerprinting and cpDNA PCR-RFLP. *Mol. Ecol.* 14, 933-944.
- Hall, T.A., 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.*, 41, 95-98.
- Han, Y.C., Teng, C.Z., Zhong, S., Zhou, M.Q., Hu, Z.L., Song, Y.C., 2007. Genetic variation and clonal diversity in populations of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) in Central China detected by ISSR markers. *Aquat. Bot.* 86, 69-75.
- Kubo, N., Hirai, M., Kaneko, A., Tanaka, D., Kasumi, K., 2009. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers in the water lotus (*Nelumbo nucifera*). *Aquat Bot.*, 90, 191-194.
- Larson, D., 2007. Reproductive strategy in introduced *Nymphoides peltata* populations revealed by genetic markers. *Aquat. Bot.* 86, 402-406.
- Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Reisch, B.I., 1994. A simple and efficient method for DNA extractions from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant. Mol. Biol.*, 12, 6-13.
- Lucio, L.C., 2005. Análise genética, com marcadores moleculares RAPD e SPAR, de populações de *Egeria najas* Planchon (Hydrocharitaceae) do reservatório de Itaipu, Brasil. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Martins, D., Cardoso, L.R., Mori, E.S., Tanaka, R.H., 2003. Caracterização genética de acessos de Egéria (*Egeria* spp.) coletados no Estado de São Paulo utilizando RAPD. *Planta Daninha*, 21, 1-6.
- Novak, J., Lukas, B., Bolzer, K., Grausgruber-Groger, S., Degenhardt, J., 2008. Identification and characterization of simple sequence repeat markers from a glandular *Origanum vulgare* expressed sequence tag. *Mol Ecol Res.*, 8, 599-601.
- Obbard, D., Harris, S.A., Pannell, J.R., 2006. Sexual systems and populations genetic structure in an annual plant: testing the metapopulation model. *Am. Nat.*, 167, 354-366.
- Ocampo Perez, J.A., Dambier, D., Ollitrault, P., Coppens D'Eeckenbrugge, G., Brottier, P., Froelicher, Y., Risterucci, A.M., 2006. Microsatellite markers in *Carica papaya* L.: isolation, characterization and transferability to *Vasconcellea* species. *Mol. Ecol. Notes* 6, 212-217.
- Okada, M., Grewell, B.J., Jasieniuk, M., 2009. Clonal spread of invasive *Ludwigia hexapetala* and *L. grandiflora* in freshwater wetlands of California. *Aquat. Bot. in press*.

- Pan, L., Quan, Z., Li, S., Liu, H., Huang, X., Ke, W., Ding, Y., 2007. Isolation and characterization of microsatellite markers in the sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). *Mol. Ecol. Notes* 7, 1054–1056.
- Ren, M.X., Zhang, Q.G., 2007. Clonal diversity and structure of the invasive aquatic plant *Eichhornia crassipes* in China. *Aquat. Bot.* 87, 242–246.
- Rozen S., Skaletsky H.J., 2000. PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S., Krawetz S.A. (Ed.), *Bioinformatics methods and protocols*. Humana Press, Totowa.
- Ruas, C.F., Nakayama, T.J., Ortiz, M.Á., Kuroki, M.A., Stuessy, T., Tremetsberger, K., Ruas, E.A., Santos, M.O., Talavera, S., Ruas, P.M., 2008. Isolation and characterization of eight microsatellite loci from the endangered plant species *Hypochaeris salzmanniana* (Asteraceae). *Conserv Genet.*, <http://www.springerlink.com.w10066.dotlib.com.br/content/9u01812030173633/>.
- Salywon, A., Dierig, D.A., 2006. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Lesquerella fendleri* (Brassicaceae) and cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes* 6, 382–384.
- Sculthorpe, C.K., 1985. *The biology of aquatic vascular plants*. St. Martins Press, New York, pp. 610.
- Tautz, D., Renz, M., 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Res.* 25, 4127–4138.
- Varshney, R.K., Graner, A.; Sorrelis, M.E., 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.*, 23, 48–55.
- Ware D., Jaiswal P., Ni J., Pan X., Chang K., Clark K., Teytelman L., Schmidt S., Zhao W., Cartinhour S., McCouch S., Stein L., 2002. Gramene: a resource for comparative grass genomics. *Nucleic Acids Res.*, 30,103–105.
- Yin, T.M., Zangh, X.Y., Gunter, L.E., Li, S.X, Wullschleger, S.D., Huang, M.R., Tuskan, G.A., 2009. Microsatellite primer resource for *Populus* developed from the mapped sequence scaffolds of the Nisqually-1 genome. *New Phytol.*, 181, 498–503.
- Zaner, L., Bargelloni, L., Patarnello, T., 2002. A review: Strategies for microsatellite isolation. *Molec. Ecol.* v.11, 1–16.