



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

ADRIAN CESAR DA SILVA

**Filogeografia como escopo para explorar a invasão em *Ludwigia*
(Onagraceae) de ambientes não nativos**

Maringá
2022

ADRIAN CESAR DA SILVA

**Filogeografia como escopo para explorar a invasão em *Ludwigia*
(Onagraceae) de ambientes não nativos**

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

Área de concentração: Ecologia e Limnologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karina Fidanza Rodrigues

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Alessandra Valéria de Oliveira

Maringá
2022

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

- S586f Silva, Adrian Cesar da, 1995-
Filogeografia como escopo para explorar a invasão em *Ludwigia* (Onagraceae) de ambientes não nativos / Adrian Cesar da Silva. -- Maringá, 2022.
29 f. : il. (algumas color.).
- Dissertação (mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--
Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2022.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Karina Fidanza Rodrigues.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Alessandra Valéria de Oliveira.
1. *Ludwigia* (Onagraceae) "cruz-de-malta" - Biogeografia - Marcadores moleculares.
2. *Ludwigia* (Onagraceae) "cruz-de-malta" - Filogeografia - Marcadores moleculares. 3. Macrófitas aquáticas invasoras - Filogeografia - Manejo. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

CDD 23. ed. -583.7619

ADRIAN CESAR DA SILVA

**Filogeografia como escopo para explorar a invasão em *Ludwigia*
(Onagraceae) de ambientes não nativos**

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

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Karina Fianza Rodrigues
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Mateus Arduvino Reck
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Prof.^a Dr.^a Léia Carolina Lucio
Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde/ Universidade Estadual do Oeste do
Paraná (Unioeste)

Aprovada em: 14 de abril de 2022.

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

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que ajudaram a realizar este trabalho.

Em especial aos meus pais, Silvana e Reinaldo, sempre presentes na minha vida e incentivando os estudos.

A minha esposa, Isabelle, pelo amor, compreensão e pelas dicas de escrita no manuscrito.

A Prof.^a Dr.^a Karina Fidanza Rodrigues, pela orientação deste os primeiros passos na iniciação científica.

A Prof.^a Dr.^a Alessandra Valéria de Oliveira, pela coorientação e pela paciência em ensinar as técnicas da biologia molecular desde as etapas iniciais.

Ao Prof. Dr. Sidnei Magela Thomaz por incentivar e acompanhar as saídas de campo, e pelas boas conversas.

A Dr.^a Aline Rosado por dispor-se a coletar nossos espécimes sempre que possível.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Mateus Arduvino Reck (UEM), Dr.^a Aline Rosado (UEM), Prof.^a Dr.^a Léia Carolina Lucio (UNIOESTE) e Prof.^a Dr.^a Sandra Pierini (UniCesumar) por aceitarem prontamente o convite para avaliação deste trabalho e pelas valiosas sugestões.

Aos meus amigos de orientação, Lorena e Abner, pelo apoio emocional e pela amizade que cultivamos ao longo dessa jornada.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular pela ajuda na rotina com os equipamentos e pelo companheirismo.

Ao Gustavo Alda, por ceder um cantinho para o café e para boas conversas.

Ao Nupélia, pela infraestrutura e recursos oferecidos para a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Filogeografia como escopo para explorar a invasão em *Ludwigia* (Onagraceae) de ambientes não nativos

RESUMO

Ludwigia possui algumas espécies de macrófitas invasoras que ainda não foram exploradas sob o escopo da filogeografia, uma promissora área para compreender a ecologia das invasões utilizando marcadores moleculares barcode sensíveis a variações intraespecíficas. Assim, testou-se quais marcadores barcode utilizados em espécies invasoras de *Ludwigia* ocorrentes em regiões não nativas seriam filogeograficamente informativos. Utilizou-se sequências dos marcadores moleculares *trnH-psbA*, *rbcL*, *matK* e *phyC* de populações invasoras de *L. peploides* e *L. grandiflora* por serem as únicas disponíveis no Genbank. Gerou-se uma árvore gênica pelo método *Neighbor-Joining* e uma rede haplotípica pelo método *Median-Joining* para cada espécie. O marcador *trnH-psbA* foi o único informativo filogeograficamente por detectar variações intraespecíficas nos táxons analisados. Detectou-se três haplótipos para *L. grandiflora* e dois haplótipos para *L. peploides*. Três populações fundadoras geograficamente distintas de *L. grandiflora* foram introduzidas na Europa, sendo Hg1 compartilhado com a população estadunidense, enquanto *L. peploides* possui uma população fundadora na Europa e outra nos EUA. O antigo histórico de introdução dessas espécies na Europa e a abrangência geográfica limitada da amostragem molecular demonstram que esses dados estão subestimados. Uma pesquisa feita na base de dados *Web of Science* expôs uma escassez de dados moleculares para espécies invasoras de *Ludwigia*, ressaltando a contribuição dos resultados quanto as informações sobre essas relações haplotípicas no contexto da biologia das invasões. Portanto, a detecção da diversidade haplotípica de espécies invasoras de *Ludwigia* mostrou-se promissora quando investigada pelo escopo filogeográfico, subsidiando o melhor entendimento sobre o manejo e a ecologia desses haplótipos em áreas não nativas.

Palavras-chave: Macrófitas. Marcadores moleculares. *trnH-psbA*. *L. grandiflora*. *L. peploides*.

Phylogeography as a scope to explore the invasion of *Ludwigia* (Onagraceae) from non-native environments

ABSTRACT

Ludwigia has some invasive macrophyte species that have not yet been explored under the scope of phylogeography, a promising area to understand the ecology of invasions using barcode molecular markers sensitive to intraspecific variations. Thus, it was theorized that barcode markers used in invasive species of *Ludwigia* occurring in non-native regions would be phylogeographically informative. Sequences of the molecular markers *trnH-psbA*, *rbcL*, *matK* and *phyC* from invasive populations of *L. peploides* and *L. grandiflora* were used as they are the only ones available in Genbank. A gene tree was generated by the Neighbor-Joining method and a haplotypic network by the Median-Joining method for each species. The *trnH-psbA* marker was the only phylogeographically informative marker for detecting intraspecific variations in the analyzed taxa. Three haplotypes were detected for *L. grandiflora* and two haplotypes for *L. peploides*. Three geographically distinct founder populations of *L. grandiflora* were introduced in Europe, with Hg1 shared with the US population, while *L. peploides* has a founder population in Europe and another in the US. The long history of the introduction of these species in Europe and the limited geographic scope of molecular sampling demonstrate that these data are underestimated. A search in the Web of Science database exposed a paucity of molecular data for invasive species of *Ludwigia*, highlighting the contribution of the results to the information on these haplotypic relationships in the context of invasive biology. Therefore, the detection of haplotypic diversity of invasive species of *Ludwigia* proved to be promising when investigated by the phylogeographic scope, supporting a better understanding of the management and ecology of these haplotypes in non-native areas.

Keywords: Macrophyte. Molecular marker. *trnH-psbA*. *L. grandiflora*. *L. peploides*.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da publicação científica *Aquatic Botany*. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/journals/aquatic-botany/0304-3770/guide-for-authors>>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1	Análises moleculares de espécimes em regiões não nativas	12
2.2	Revisão da literatura sobre estudos moleculares em espécies invasoras de <i>Ludwigia</i> ..	13
3	RESULTADOS	13
3.1	Análises moleculares de espécimes em regiões não nativas	13
3.2	Revisão da literatura sobre estudos moleculares em espécies invasoras de <i>Ludwigia</i> ..	18
4	DISCUSSÃO	20
5	CONCLUSÃO	23
	<u>REFERÊNCIAS</u>	24

1 INTRODUÇÃO

Uma espécie invasora é aquela que alcança, se estabelece e dispersa-se em um ambiente onde não ocorria previamente (Simberloff, 2010). A introdução de espécies invasoras nesses ambientes não nativos é uma das maiores ameaças para a biodiversidade, causando prejuízos ambientais, econômicos e para a saúde humana em todo o mundo (Pejchar e Mooney, 2009; Strecker et al., 2011; Vilà et al., 2011; Fleming e Dibble, 2015; Li et al., 2015). Ademais, os efeitos deletérios da introdução de espécies invasoras são maiores em ambientes aquáticos do que em ambientes terrestres devido ao maior número de vetores e de espécies endêmicas (Strayer e Dudgeon, 2010; Moorhouse e Macdonald, 2015).

Ludwigia L. (Onagraceae), é um gênero de macrófitas aquáticas formado por cerca de 82 espécies, tradicionalmente conhecido por apresentar diversas espécies invasoras em regiões não nativas (Cook, 1985; Ruaux et al., 2009; Thouvenot et al., 2013). Esse gênero é nativo da América do Sul (Munz, 1942; Wagner et al., 2007), cuja distribuição geográfica concentra-se na região Sul do Brasil, e nos países do Paraguai, Argentina e Uruguai (Vieira, 2015). Nesses ambientes, *Ludwigia* forma pequenas populações na margem de lagos e rios, tendo um hábito de vida geralmente anfíbio ou emergente (Crivelari, 2017). Todavia, em regiões não nativas como os Estados Unidos e diversos países da Europa, onde espécies desse gênero foram introduzidas, *Ludwigia* forma grandes populações, levando a perda da diversidade de plantas locais, contribuindo com a proliferação de vetores de doenças, facilitando o estabelecimento de outras espécies invasoras e interrompendo canais de navegação (Riaux et al., 2009; Thouvenot et al., 2013).

Possivelmente, a introdução de *Ludwigia* em regiões não nativas tenha ocorrido pelo seu uso frequente como planta ornamental em aquários, e o cenário de mudanças climáticas tem sido apontado como um dos importantes fatores que colaboram para a sua expansão, principalmente em regiões de clima temperado (Thouvenot et al., 2013; Gillard et al., 2017). Ademais, a grande parte dos táxons de *Ludwigia* são altamente polimórficos, levando a identificações imprecisas e causando desacordo em vários estudos taxonômicos (Munz, 1942; Hara, 1953; Ramamoorthy, 1979; Ravene Tai, 1979; Wagner et al., 2007; Liu et al., 2017; Liu et al., 2018). No contexto da biologia das invasões, essa extensa variação morfológica é uma problemática evidente a ser desvendada, pois a identificação incorreta de táxons invasores contribui para a sua introdução em ambientes não nativos (Armstrong e Ball, 2005; Coetzee et al., 2011; Pyšek et al., 2013).

A utilização de dados moleculares para auxiliar na identificação de táxons problemáticos ou com circunscrição imprecisa tem sido importante para diversos grupos (Fazekas et al., 2009; Pang et al., 2011; Alves et al., 2014; Liu et al., 2017). Nesse contexto, a técnica DNA barcode, que consiste na identificação molecular de espécies utilizando fragmentos-padrão de DNA, têm se mostrado eficaz para sobrepujar a dificuldade imposta pelas variações morfológicas (Hebert et al., 2003). No entanto, outros autores alertam que a alta frequência de hibridização e poliploidia em plantas pode levar a identificações moleculares inconsistentes, sendo necessário cautela na escolha dos marcadores moleculares barcode (Kress et al., 2005; Rieseberg et al., 2006; Fazekas et al., 2009; Hollingsworth et al., 2011).

As seqüências de DNA barcode mais recomendadas em plantas incluem as regiões plastidiais codificantes *rbcL* (ribulose-1,5-bifosfato) e *matK* (maturase K) além de duas regiões não codificantes: o espaçador intergênico plastidial *trnH-psbA* e o espaçador ribossomal *ITS* (espaçador interno transcrito ribossomal) (CBOL Plant Working Group, 2009; Hollingsworth et al., 2011; Li et al., 2015). O barcode *rbcL* é facilmente amplificado e possui uma boa resolução, mas mostra-se conservado em níveis taxonômicos específicos, ao passo que os barcodes *ITS*, *trnH-psbA* e *matK* são mais polimórficos e recomendados para estudar táxons proximamente relacionados (Kress et al., 2005; Kress e Erickson, 2007; Li et al., 2011; Hollingsworth et al., 2011; Kress, 2017). Por outro lado, estudos apontam que a eficiência desses marcadores barcode em detectar polimorfismos pode variar entre diferentes grupos taxonômicos, sendo recomendado qualificar os marcadores barcode especificamente para cada grupo de plantas (Ashfaq et al., 2013; Xu et al., 2015; Alves et al., 2014; Chen et al., 2015).

Além de auxiliar na correta identificação, os marcadores moleculares têm permitido explorar outras questões pertinentes a invasão biológica baseadas no escopo da filogeografia. Essa área da biologia molecular objetiva estudar a demografia e a história natural na perspectiva da evolução intraespecífica analisando dados de sequenciamento (Avice, 2009). Com base nesse polimorfismo intraespecífico, alguns assuntos que necessitam de alinhamento na biologia das invasões vem sendo discutidos, como determinar a origem de uma população fundadora, estruturar a distribuição haplotípica da população invasora e testar hipóteses a respeito da invasibilidade de espécies não nativas, fornecendo informações importantes para estratégias de manejo mais assertivas, como determinar a origem do haplótipo mais agressivo (Bossdorf et al., 2005; Fitzpatrick et al., 2012; Cristescu, 2015; Dlugosch et al., 2015; Tho et al., 2016; Estoup et al., 2016; Shang et al., 2019; Kaňuchet al., 2021; Canavan et al., 2022). Por essa razão, os marcadores moleculares utilizados para essa finalidade precisam ser sensíveis às variações intraespecíficas (Schaal et al., 1998; Petit et al., 2005; Beheregaray, 2008).

Embora *Ludwigia* possua algumas das espécies de macrófitas aquáticas invasoras mais agressivas do mundo, o conhecimento genético a respeito dessas populações é escasso (Thouvenot et al., 2013). O uso de marcadores moleculares em espécies invasoras de *Ludwigia* restringe-se a identificação molecular (Armitage et al., 2013; Ghahramanzadeh et al., 2013) e a genética de populações (Okada et al., 2009; Genitoni et al., 2020). No entanto, apesar do uso de marcadores moleculares para estudos filogeográficos fornecer valiosas informações para a biologia das invasões, essa abordagem ainda não foi aplicada para compreender o cenário de invasão de *Ludwigia*. Portanto, o objetivo deste estudo foi testar a aplicabilidade dos marcadores moleculares publicados no Genbank referentes a sequências de populações invasoras não-nativas de *Ludwigia* para estudos filogeográficos, sendo a qualificação desses marcadores condicionadas a sensibilidade em detectar polimorfismos intraespecíficos. Complementarmente, foi realizado uma busca por artigos científicos que utilizaram marcadores moleculares em espécies invasoras de *Ludwigia*, cujo intuito foi alertar para a escassez de dados moleculares a respeito desses táxons problemáticos (Thouvenot et al., 2013).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Análises moleculares de espécimes em regiões não nativas

Para testar a aplicabilidade dos marcadores moleculares utilizados em populações invasoras de *Ludwigia*, foram selecionadas as espécies *L. grandiflora* (Michx.) Greuter & Burdet e *L. peploides* (Kunth) P. H. Ravenpor serem as únicas que possuem sequências depositadas no Genbank referentes a populações em regiões não nativas, cujos dados são oriundos dos trabalhos de Armitage et al. (2013) e Ghahramanzadeh et al. (2013). A quantidade de sequências para cada marcador está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidade de sequências e tamanho dos fragmentos de DNA expressos em pb (pares de base) para cada marcador molecular disponíveis no Genbank oriundas de populações em ambientes não nativos de *L. grandiflora* e *L. peploides*.

Marcadores (pb)	Espécies	
	<i>L. grandiflora</i>	<i>L. peploides</i>
<i>trnH-psbA</i> (498 pb)	32	15
<i>rbcL</i> (522 pb)	30	15
<i>matK</i> (817 pb)	16	8
<i>phyC</i> (583 pb)	16	8

A construção da árvore gênica foi realizada pelo método de *Neighbor-Joining* e submetida ao teste de suporte dos ramos (*bootstrap*) em 1000 réplicas utilizando o programa MEGA7 (Kumar et al., 2016), sendo enraizada com *Circaea alpina* L. (acesso ao Genbank pelo

voucher JX100576.1), um táxon representante do gênero irmão de *Ludwigia* (Liu et al., 2017). Foram, também, calculados os valores de distância genética e selecionado o melhor modelo de substituição nucleotídica, sendo este Kimura-2-parâmetros (K2P), pelo MEGA7 (Kumar et al., 2016). Consecutivamente, foi construído uma rede de haplótipos pelo programa POPARTv1.7 pelo método *Median Joining* (Bandelt et al., 1999). A distribuição haplotípica das populações de *L. grandiflora* e *L. peploides* foi georreferenciada pelo *software* QGIS v3.10.2.

2.2 Revisão da literatura sobre estudos moleculares em espécies invasoras de *Ludwigia*

Complementarmente às análises genéticas, a fim de ressaltar a necessidade de estudos moleculares em espécies invasoras de *Ludwigia*, foi realizada uma pesquisa de artigos na base de dados *Web of Science* (WoS), utilizando os termos “*Ludwigia*” and “*invasion*”, resultando em uma amostra inicial de 50 artigos, que abrangeram o intervalo temporal de 2003 (artigo de base, Doyle et al., (2003)) à 2021 (artigo mais recente, Renault et al. (2021)). A triagem consistiu na análise do título, palavras-chave e resumo, no intuito de averiguar se o artigo realmente tratava-se de um estudo com espécies de *Ludwigia* invasoras. Dessa forma, foram removidos 8 artigos, pois eram trabalhos que exploravam espécies de *Ludwigia* em regiões nativas (por exemplo, o artigo de Zhang et al., 2021, que testou a capacidade competitiva de *L. peploides*, nativa na China, em relação a espécie invasora *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb). Assim, a amostra parcial consistiu em 42 artigos.

Dentre os 42 artigos resultantes da triagem, foram selecionados aqueles que utilizaram métodos moleculares para estudar espécies de *Ludwigia* invasoras, o que sucedeu em 4 artigos. Dessa forma, o resultado definitivo da amostragem deu-se em 38 artigos que não utilizaram métodos moleculares, e 4 artigos que utilizaram métodos moleculares. A partir desses artigos, foram extraídas as seguintes informações a respeito do conhecimento sobre espécies invasoras de *Ludwigia*: (i) quais são as espécies invasoras mais estudadas; (ii) dentre essas espécies, quais foram exploradas com técnicas moleculares; (iii) quais marcadores moleculares foram utilizados e para quais finalidades. As informações extraídas dessa revisão foram sumarizadas em gráficos construídos pelo *software* Excel.

3 RESULTADOS

3.1 Análises moleculares de espécimes em regiões não-nativas

Dentre os marcadores moleculares disponíveis no Genbank, somente o *trnH-psbA* detectou variações genéticas intraespecíficas para as populações de *L. grandiflora* e *L.*

peploides. Os demais marcadores *rbcL*, *matK*, e *phyC* não foram filogeograficamente informativos por se mostrarem conservados intraespecificamente.

As sequências das populações de *L. grandiflora* não nativas disponíveis no Genbank para o marcador *trnH-psbA* são oriundas de três países europeus (França, Países Baixos e Inglaterra), e dos Estados Unidos. As sequências das populações de *L. peploides* não nativas originam-se dos países da França, Países Baixos e dos Estados Unidos.

A análise do espaçador intergênico plastidial *trnH-psbA* permitiu detectar diferenças genéticas entre as populações de *L. grandiflora* não nativas. Foram identificados quatro sítios variáveis e três haplótipos diferentes (Hg1, Hg2 e Hg3), sendo que desses, o haplótipo Hg1 foi o mais frequente, compartilhado por 17 indivíduos, seguido de 14 indivíduos de Hg2 e um indivíduo de Hg3 (rede haplotípica à esquerda na Figura 1). Em relação à *L. peploides*, o marcador *trnH-psbA* apresentou seis sítios variáveis e dois haplótipos diferentes (Hp1 e Hp2). A distribuição dos haplótipos foi quase equivalente, sendo Hp1 compartilhado por oito indivíduos e Hp2 compartilhado por sete indivíduos (rede haplotípica à direita na Figura 1).

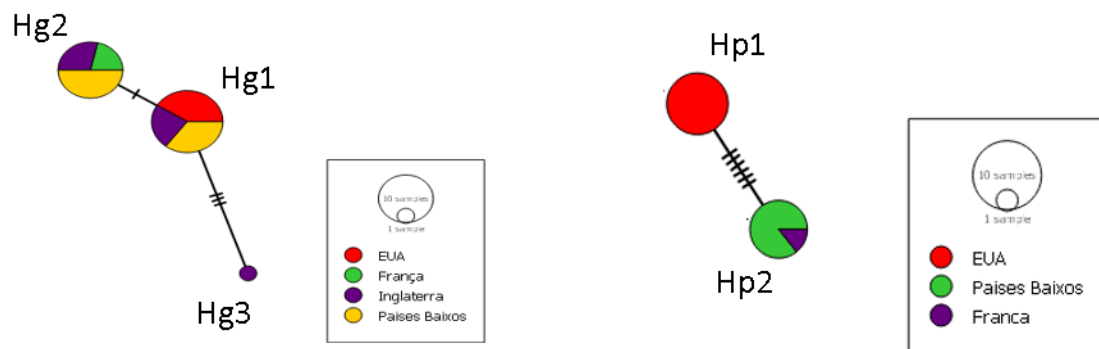


Figura 1. Rede de haplótipos das populações não nativas de *L. grandiflora* (esquerda) e *L. peploides* (direita) construída no software POPART v1.7 pelo método *Median-Joining*. Hg= Haplótipo de *L. grandiflora*; Hp= Haplótipo de *L. peploides*.

Os valores de distância genética K2P para as populações invasoras de *L. grandiflora* e *L. peploides* estão demonstrados na Tabela 2. *L. grandiflora* ocorre nos Estados Unidos, França, Inglaterra e Países Baixos, e os valores de K2P variaram entre 0,1% e 0,2%. Para *L. peploides*, os valores de K2P foram nulos entre as populações dos Países Baixos e da França, indicando serem geneticamente idênticas, e divergindo em 1,4% da população de *L. peploides* dos EUA.

Tabela 2. Matriz de distância genética K2P, calculada pelo *software* MEGA7, para as populações invasoras de *L. grandiflora* e *L. peploides* em diferentes regiões não nativas para o marcador *trnH-psbA*. PB = Países Baixos, FR = França, IN = Inglaterra, EUA = Estados Unidos.

Países		K2P			
		<i>L. grandiflora</i>			
		PB	FR	IN	EUA
PB					
FR		0,001			
IN		0,002	0,002		
EUA		0,001	0,002	0,002	
		<i>L. peploides</i>			
		EUA	PB	FR	-
EUA					
PB		0,014			
FR		0,014	0		
-		-	-	-	-

A partir da árvore gênica construída para o marcador *trnH-psbA* (Figura 2), é possível visualizar que as sequências de *L. grandiflora* obtidas foram reunidas em três agrupamentos diferentes. Apenas o indivíduo da sequência KC996839.1, classificado como haplótipo Hg3, é separado do grande agrupamento formado por Hg1 e Hg2 por um valor significativo no teste *bootstrap*.

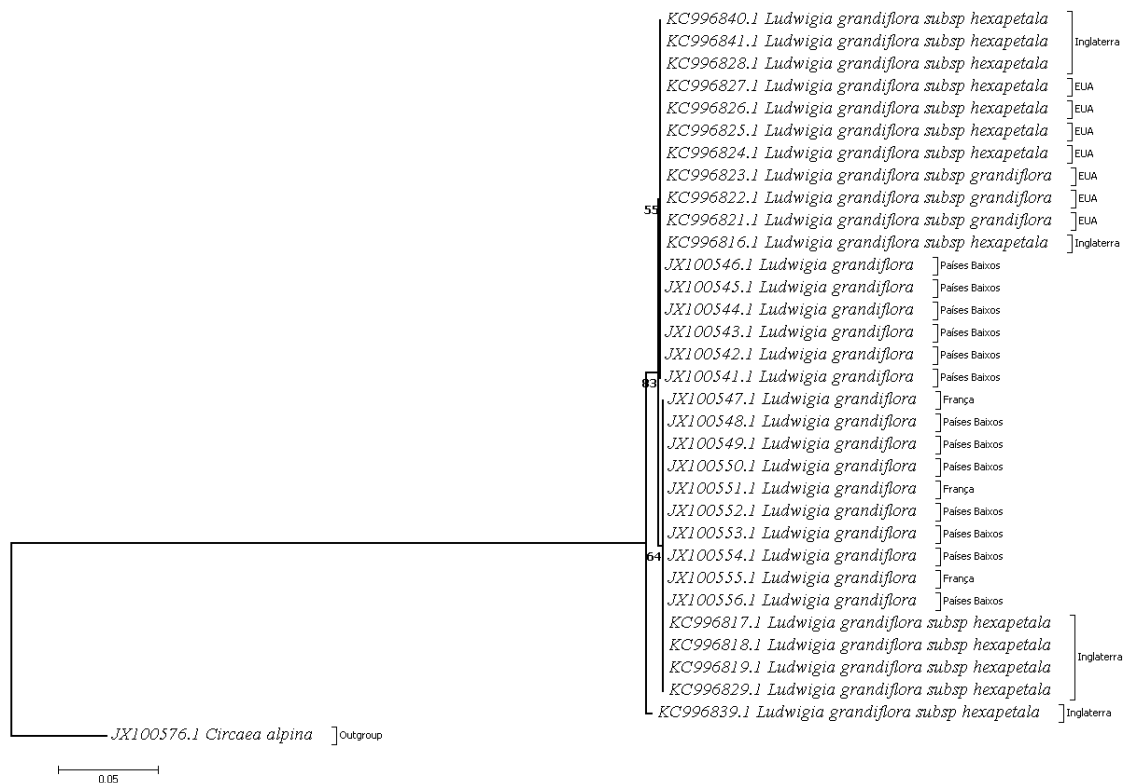


Figura 2. Árvore gênica construída no programa MEGA7 por meio do método de Neighbor-Joining, de sequências do marcador *trnH-psbA* para *L. grandiflora*, utilizando o modelo de

substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros e enraizado com *Circaea alpina*. Os números à direita de cada nó são os valores de *bootstrap*.

A árvore gênica construída para *L. peploides* utilizando sequências do marcador *trnH-psbA* (Figura 3) resultou na separação nítida de dois agrupamentos representados por Hp1 e Hp2. Nota-se que Hp1 é compartilhado exclusivamente pelos indivíduos da população estadunidense, enquanto Hp2 encontra-se nos indivíduos da população europeia, sendo apenas um representante na França e seis nos Países Baixos. Ainda, a separação desses dois clados foi bem suportada.

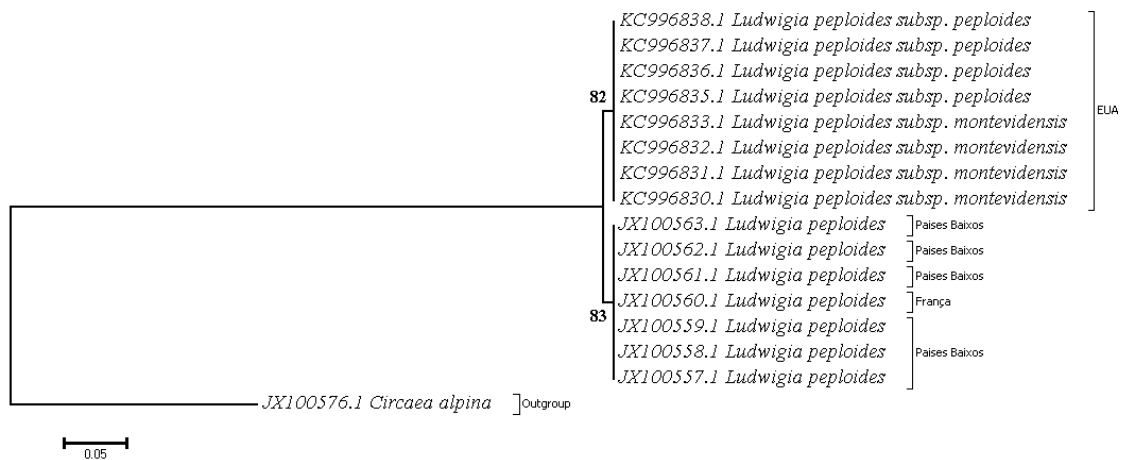


Figura 3. Árvore gênica construída no programa MEGA7 por meio do método de *Neighbor-Joining*, de sequências do marcador *trnH-psbA* para *L. peploides*, utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros e enraizado com *Circaea alpina*. Os números à direita de cada nó são os valores de *bootstrap*.

Para observar a distribuição geográfica dos haplótipos de *L. grandiflora* nas regiões não-nativas da Europa e dos Estados Unidos, foram elaborados mapas representados pelas Figura 4 e 5. Na Europa (Figura 4), nota-se que Hg2 predomina na Inglaterra em relação aos demais haplótipos, e que a ocorrência do único indivíduo de Hg3 se dá mais ao norte, sendo o ponto mais distante do restante da população. Nos Países Baixos, a população de *L. grandiflora* amostrada abrange uma pequena extensão geográfica, cuja proporção entre os haplótipos Hg1 e Hg2 é equivalente. A França é o país menos amostrado em relação aos outros, constando apenas três ocorrências de Hg2.

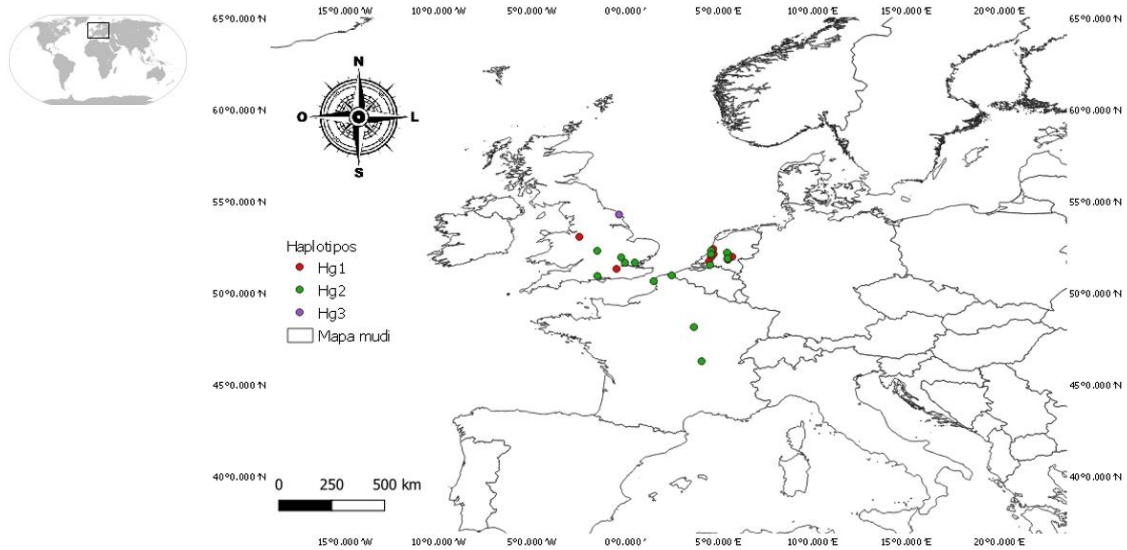


Figura 4. Mapa elaborado no *software* QGISv.3.10.2 mostrando a distribuição dos haplótipos de *L. grandiflora* nos ambientes não nativos da Europa, com sequências do marcador *trnH-psbA* provenientes do Genbank.

Os Estados Unidos, por sua vez, são representados apenas pelo haplótipo Hg1 (Figura 5). Os pontos de ocorrência referem-se a *San Diego River* (ponto mais ao Sul, consistindo em três indivíduos amostrados) e a *Russian River at Wohler* (ponto mais ao Norte, consistindo em quatro indivíduos), ambos no estado da Califórnia.

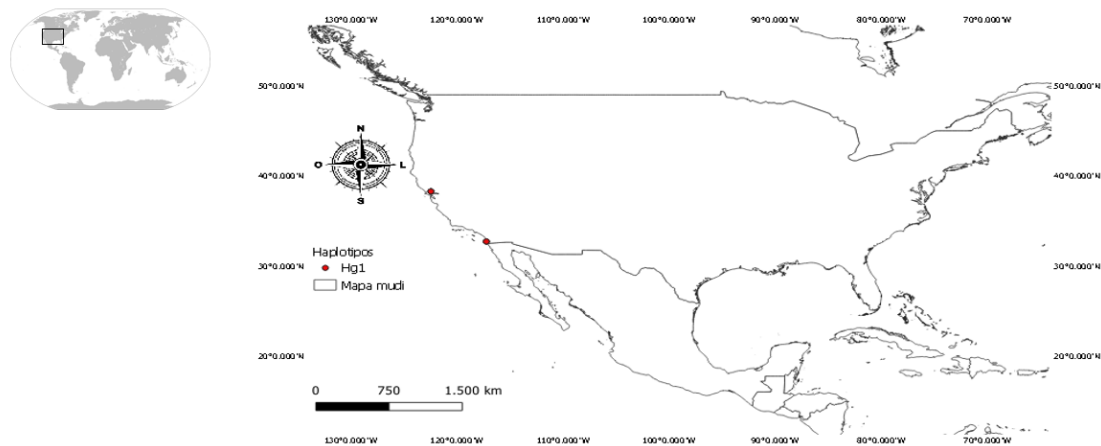


Figura 5. Mapa elaborado no *software* QGISv.3.10.2 mostrando a distribuição dos haplótipos de *L. grandiflora* nos ambientes não nativos dos Estados Unidos, com sequências do marcador *trnH-psbA* provenientes do Genbank.

A distribuição geográfica dos haplótipos de *L. peploides* restringem-se aos países europeus França e Países Baixos (Figura 6) e nos Estados Unidos (Figura 7). Na França, apenas um indivíduo dessa espécie foi amostrado para as análises genéticas, enquanto os Países Baixos possuem quatro pontos de amostragem representando cinco indivíduos, sendo ambas as

populações agrupadas como haplótipo Hp2. Neste caso, diferentemente de *L. grandiflora*, não há indivíduos de *L. peploides* oriundos da Inglaterra.

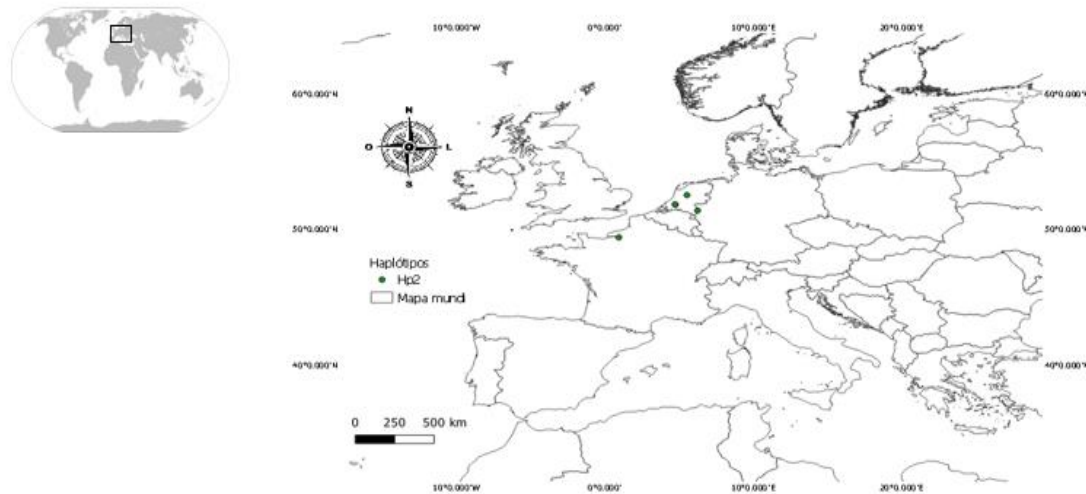


Figura 6. Mapa elaborado no *software* QGISv.3.10.2 mostrando a distribuição dos haplótipos de *L. peploides* nos ambientes não nativos da Europa, com sequências do marcador *trnH-psbA* provenientes do Genbank.

Contudo, a população de *L. peploides* amostrada nos Estados Unidos é semelhante à de *L. grandiflora*, pois há dois pontos de coleta situados no estado da Califórnia, havendo um total de 8 indivíduos reunido sem apenas um haplótipo Hp1 (Figura 7).

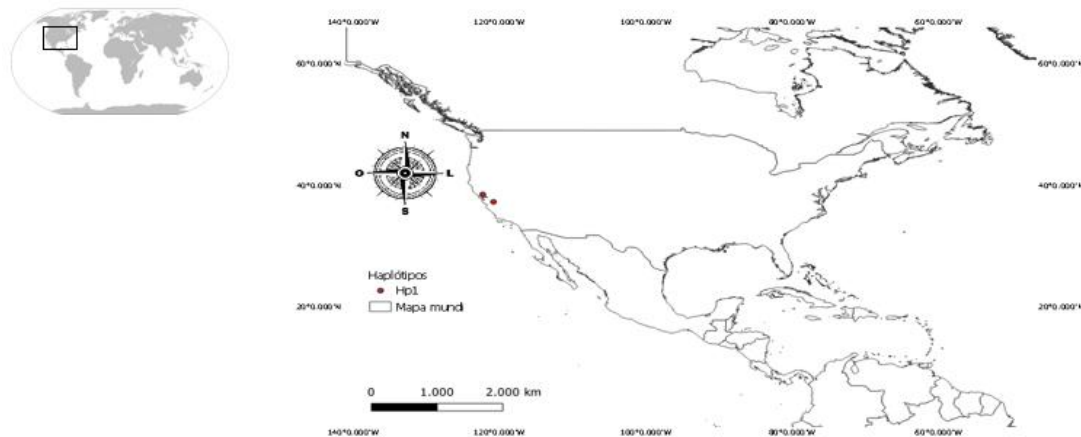


Figura 7. Mapa elaborado no *software* QGISv.3.10.2 mostrando a distribuição dos haplótipos de *L. peploides* nos ambientes não nativos dos Estados Unidos, com sequências do marcador *trnH-psbA* provenientes do Genbank

3.2 Revisão da literatura sobre estudos moleculares em espécies invasoras de *Ludwigia*

A relação publicação/citação por ano mostra que a maioria das publicações de trabalhos com foco em espécies de *Ludwigia* invasoras ocorre a partir de 2010, representando 90% das

publicações (Figura 8). Esse aumento foi acompanhado de um crescimento nas citações. O ano em que houve o maior número de citações foi em 2021, contendo 133 registros.

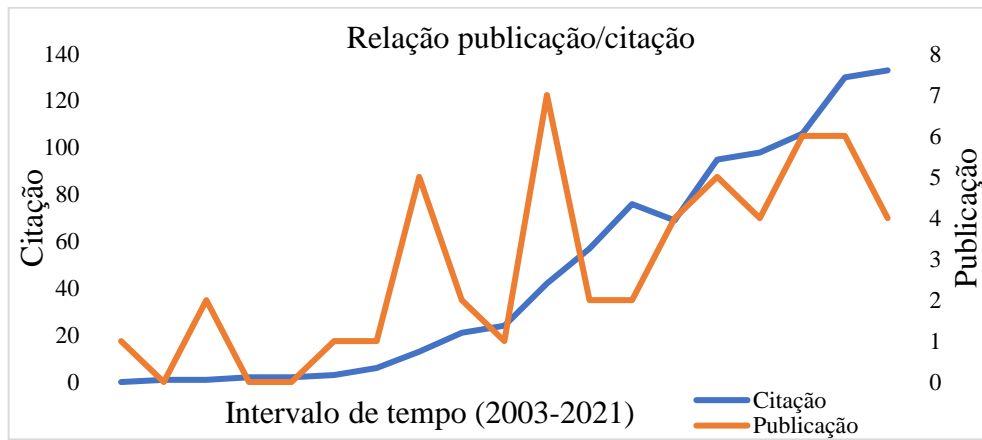


Figura 8. Relação entre citação e publicação de artigos sobre espécies invasoras de *Ludwigia* no período entre os anos de 2003 e 2021, em um total de 42 artigos analisados.

O levantamento das espécies de *Ludwigia* invasoras estudadas resultou, em ordem decrescente, em: *L. grandiflora* (26 artigos), *L. peploides* (17 artigos), *L. hexapetala* (Hook & Arn.) Zardini, H. Y. Gu & P. H. Raven, (11 artigos), *L. peruviana* (L.) Hara (quatro artigos), *L. palustris* (L.) Elliott (um artigo), *L. hyssopifolia* (G. Don) Exell (um artigo) e *L. octovalvis* (Jacq.) Raven (um artigo). A Tabela 3 mostra a quantidade de artigos em que cada espécie foi estudada, e a proporção entre estudos com técnicas moleculares e sem técnicas moleculares. Pode-se observar que as três espécies de *Ludwigia* invasoras com mais trabalhos publicados são as únicas que possuem artigos com foco molecular, sendo *L. grandiflora* (quatro artigos), *L. hexapetala* (dois artigos) e *L. peploides* (um artigo).

Tabela 3. Espécies classificadas como invasoras em *Ludwigia* na amostra e a proporção entre artigos sem abordagem molecular e com abordagem molecular para cada espécie, num total de 42 artigos analisados.

Espécie	Artigos sem abordagem molecular	Artigos com abordagem molecular
<i>L. grandiflora</i>	22	4
<i>L. peploides</i>	16	1
<i>L. hexapetala</i>	9	2
<i>L. peruviana</i>	4	0
<i>L. palustris</i>	1	0
<i>L. hyssopifolia</i>	1	0
<i>L. octovalvis</i>	1	0

Dentre os trabalhos de cunho molecular, a classe de marcador mais utilizado é o cpDNA (DNA cloroplastidial), seguido do SNP (*Single nucleotide polymorphism*) e AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*). A Figura 8 mostra os marcadores moleculares especificamente, evidenciando que dentre os marcadores do cpDNA, *rbcL* e *trnH-psbA* foram os mais utilizados, seguidos do *phyC* e do *matK*.

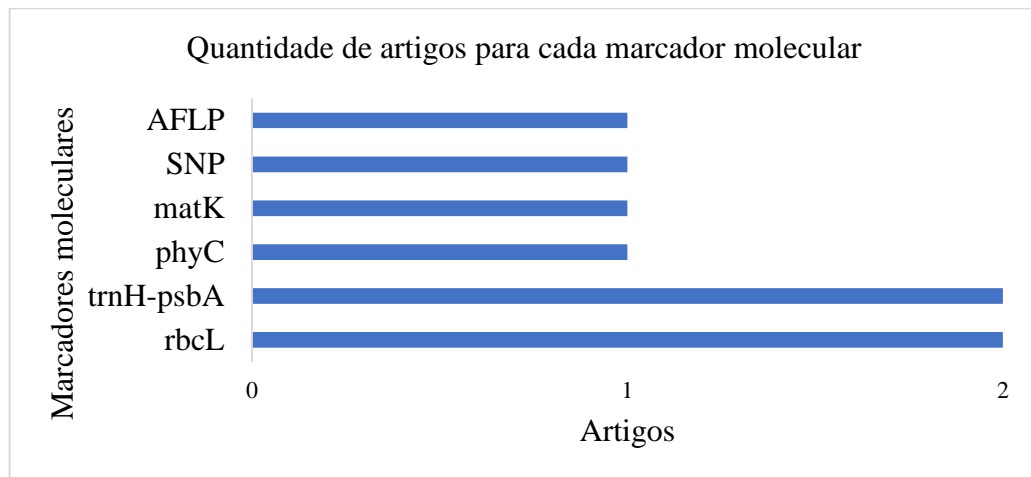


Figura 8. Marcadores moleculares utilizados em populações invasoras de *Ludwigia*, encontrados nos 42 artigos filtrados na base de dados *Web of Science*.

Foram detectados apenas dois objetivos para a aplicação desses marcadores moleculares nos artigos com espécies invasoras de *Ludwigia*, descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Marcadores moleculares utilizados para cada um dos objetivos identificados na amostra de 4 artigos sobre estudos moleculares em espécies invasoras de *Ludwigia*, dentre o total de 42 artigos analisados.

Objetivo	Marcadores moleculares	Referências	Sequências publicadas no Genbank
Identificação de espécie	<i>rbcL</i> , <i>trnH-psbA</i> , <i>matK</i> , <i>phyC</i>	Armitage et al. (2013); Ghahramanzadeh et al. (2013).	Sim
Genética de populações	SNP, AFLP	Okada et al. (2009); Genitoni et al. (2020).	Não

4 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi testar a aplicabilidade dos marcadores moleculares publicados no Genbank para estudos filogeográficos em populações invasoras não-nativas de *Ludwigia*. Devido a disponibilidade de dados de sequenciamento publicados, as análises foram restritas aos marcadores moleculares barcoder *rbcL*, *trnH-psbA*, *matK* e *phyC*. Dentre esses marcadores, apenas o espaçador intergênico *trnH-psbA* foi elencado como informativo para

análises filogeográficas por detectar variações intraespecíficas. A escassez de dados moleculares foi um impeditivo para fazer análises moleculares mais robustas. Ademais, a revisão bibliográfica mostrou que o gênero possui ao menos sete espécies invasoras, mas somente duas detêm dados moleculares disponíveis que permitem fazer inferências filogeográficas. A revisão também apontou que a aplicação dos marcadores *trnH-psbA*, *rbcL*, *matK* e *phyC* nessas populações invasoras objetivaram realizar identificação molecular, portanto, os insights filogeográficos fornecidos neste artigo são inéditos para *L. grandiflora* e *L. peplodes*.

A variação genética intraespecífica detectada pelo *trnH-psbA* era esperado devido ao fato deste tratar-se de um espaçador intergênico, ou seja, é uma região do DNA cloroplastidial (cpDNA) que não expressa características fenotípicas, e por isso, é mais suscetível para acumular mutações ao longo das gerações (Kress e Erickson, 2007; Hollingsworth et al., 2011; Morris e Shaw, 2018). Em contraposto, os marcadores *rbcL*, *matK* e *phyC* não detectaram polimorfismos intraespecífico. Isso se deve porque a região *rbcL* é responsável por expressar proteínas relacionadas à RuBisCO, uma enzima importante para o ciclo de Calvin, a região *matK* expressa a maturas e K, cuja função é promover o processamento do RNA mensageiro por meio do *splicing* (Hollingsworth et al., 2011), e o *phyC* é um marcador do DNA nuclear que faz parte da família de multigenes responsáveis por produzir proteínas do tipo fitocromos (*PHY*), que atuam na absorção da luz infravermelha (Samuel et al., 2005). Assim, por influenciarem diretamente na sobrevivência dos indivíduos, quaisquer mudanças nas sequências nucleotídicas dessas regiões podem ser suprimidas pela seleção natural (Kress e Erickson, 2007; Hollingsworth et al., 2011).

Contudo, apesar de *matK* tratar-se de uma região codificante, ele tem sido considerado um dos marcadores plastidiais mais variáveis juntamente com o *trnH-psbA* e os mais recomendados para distinguir táxons proximalmente aparentados (Starr et al., 2009; Yu et al., 2011; Shneyer e Rodionov, 2019). Ranqueando a variabilidade intraespecífica de *matK* e outras 107 regiões não codificantes do cpDNA, Shaw et al. (2014) mostraram que o marcador codificante *matK* situou-se em 12º lugar, ou seja, a região gênica da maturas e K pode ser tão polimórfica quanto outras regiões que não expressam características fenotípicas. Porém, os resultados demonstraram que *matK* não é recomendado para detectar polimorfismos genéticos intraespecíficos em populações de *L. grandiflora* e *L. peplodes*.

De fato, o espaçador *trnH-psbA* tem se mostrado útil em outros estudos filogeográficos (Byrne e Hankinson, 2012.; Pang et al., 2012; Honorio-Coronaro et al., 2014; Honorio-Coronado et al., 2019). Contudo, embora este seja o marcador não codificante mais comum em

estudos filogeográficos, outras regiões não-codificantes do cpDNA mais informativas, como o *ndhF-rpl32* e o *ndhC-trnV* são utilizados com menos frequência (Morris e Shaw, 2018). Portanto, recomenda-se explorar mais o marcador *trnH-psbA*, bem como utilizar outros marcadores não codificantes, para desvendar o cenário de invasão de *Ludwigia* em ambientes não nativos.

O marcador *trnH-psbA* detectou para *L. grandiflora* apenas o haplótipo Hg1 nos Estados Unidos e todos os três haplótipos (Hg1, Hg2 e Hg3) na Europa, ao passo que *L. peploides* apresentou apenas um haplótipo nos Estados Unidos (Hp1) e um haplótipo na Europa (Hp2). Essa diferença na estrutura haplotípica pode ser um indicativo de que o histórico de introdução entre ambas as espécies seja diferente (Dlugosch e Parker, 2008; Cristecu, 2015; Zhu et al., 2017). Isso é devido ao modo de reprodução de *L. grandiflora* e *L. peploides* ser majoritariamente vegetativo em ambientes não nativos (Dandelot, 2004; Ruaux et al., 2009; Okada et al., 2009; Thouvenot et al., 2013). Logo, a variabilidade genética dessas populações é limitada, como demonstrado por Okada et al. (2009) ao encontrarem um único genótipo em populações invasoras de *L. grandiflora* na Califórnia utilizando marcadores microssatélite.

Haja vista que a reprodução vegetativa impera em populações invasoras, a tendência é que não ocorra eventos de hibridização, mantendo esses haplótipos conservados ao longo do tempo, e isso reforça a probabilidade de ter ocorrido ao menos três eventos de introdução para *L. grandiflora* e dois eventos de introdução para *L. peploides* de populações provenientes de diferentes regiões geográficas (Frankham, 2004; Facon et al., 2008; Besnard et al., 2014; Benazzo et al., 2015). Contudo, para determinar a origem exata desses haplótipos, é necessário sequenciar indivíduos de *L. grandiflora* provenientes de regiões nativas e analisar se há o compartilhamento de haplótipos com populações de regiões não nativas (Marsico et al., 2011; Zhu et al., 2016), gerando informações importantes para ações de manejo, por exemplo, ao determinar a origem geográfica do haplótipo mais agressivo (Canavan et al., 2022).

É possível, ainda, que a diversidade haplotípica de *L. grandiflora* e *L. peploides* esteja subestimada. Os dados de ocorrência do GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*) mostram 7211 registros de *L. grandiflora* e 4278 registros de *L. peploides* na França (GBIF, 2022, acesso em <https://www.gbif.org/>), enquanto apenas três indivíduos de *L. grandiflora* e um indivíduo de *L. peploides* tinham sequências disponíveis para as análises moleculares nesse país. Registros históricos sugerem que a França tenha sido o primeiro país europeu a importar essas espécies por volta de 1820-1830 para fins de aquicultura no *Montpellier Botanical Garden* (Dandelot, 2004), dispersando-se para outros países cujas populações ainda não foram amostradas geneticamente, como na Alemanha (Nehring e Kolthoff, 2011), Itália (Celesti-

Grapow et al., 2009); Bélgica (Bauchau et al., 1984), Espanha (Andreu e Vilà, 2009) e Suíça (Vauthey et al., 2003). Por esse motivo, a França pode ser a chave para entender quando e como *L. grandiflora* e *L. peploides* tornaram-se invasoras e se dispersaram pela Europa por meio da filogeografia.

Essa escassez de informações moleculares sobre populações invasoras de *Ludwigia* é evidenciada pela revisão bibliográfica da seção 3.2. Embora os impactos ecológicos decorrentes da introdução de *L. grandiflora* e *L. peploides* sejam conhecidos, outras espécies desse gênero também são relatadas como invasoras e recebem menos atenção, conforme demonstra a Tabela 3. É possível notar, também, que há um crescente interesse por espécies invasoras de *Ludwigia*, entretanto, a proporção de artigos que utilizam técnicas moleculares é ínfima, sendo quatro dos 42 artigos amostrados, aplicados em três de sete espécies levantadas na revisão. Thouvenot et al. (2013) alertaram sobre a falta de conhecimento da genética das populações de *Ludwigia* na França, e dada a importância das abordagens moleculares em prevenir a introdução e o estabelecimento de espécies invasoras, este é um dado preocupante e merece atenção da comunidade científica (Chown et al., 2008; Strong e Ayres, 2013; Simberloff, 2015).

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o uso do marcador molecular plastidial *trnH-psbA* é informativo para o escopo da filogeografia de *Ludwigia* invasora em ambientes não nativos por detectar variações intraespecíficas, devendo ser mais explorado intensificando a amostragem molecular dessas populações. Outro marcador plastidial também considerado muito polimórfico, o *matK*, mostrou-se conservado a nível intraespecífico para as populações de *Ludwigia*, reforçando a necessidade de qualificar os marcadores moleculares, de acordo com os objetivos desejados, para cada grupo de plantas especificamente. Assim, a detecção de diferentes haplótipos para *L. grandiflora* e *L. peploides* pode subsidiar um melhor entendimento sobre a ecologia e o manejo desses haplótipos em áreas não nativas. Portanto, encoraja-se o aproveitamento desses dados em trabalhos futuros, almejando: (i) aplicar o marcador *trnH-psbA* em populações de *L. grandiflora* e *L. peploides* oriundas de regiões nativas, objetivando detectar se há o compartilhamento de haplótipos com a população invasora, traçando assim a origem geográfica dos haplótipos mais agressivos; (ii) comparar a variabilidade genética intraespecífica do marcador *trnH-psbA* com outros marcadores plastidiais também recomendados para estudos filogeográficos em plantas, conforme mostram Morris e Shaw (2018); (iii) amostrar geneticamente as populações de *L. grandiflora* e *L. peploides* em regiões não nativas da Europa

e dos Estados Unidos que carecem dessas informações, no intuito de esclarecer o histórico de introdução e complementar o entendimento dos mecanismos de dispersão desses táxons.

REFERÊNCIAS

- Alves, S., Chauveau, T. L., Eggers, O. L., de Souza-Chies, T. T. 2014. Species discrimination in *Sisyrinchium* (Iridaceae): assessment of DNA barcodes in a taxonomically challenging genus. *Mol. Ecol. Resour.*, 14(2), 324-335.
- Andreu, J., Vila, M., Hulme, P. E. 2009. An assessment of stakeholder perceptions and management of noxious alien plants in Spain. *Environ. Manage.*, 43(6), 1244-1255.
- Armitage, J. D., Konyves, K., Bailey, J. P., David, J. C., Culham, A. 2013. A molecular, morphological and cytological investigation of the identity of non-native *Ludwigia* (Onagraceae) populations in Britain. *New J. Bot.*, 3(2), 88-95.
- Armstrong, K. F., Ball, S. L. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.*, 360(1462), 1813-1823.
- Ashfaq, M., Asif, M., Anjum, Z. I., Zafar, Y. 2013. Evaluating the capacity of plant DNA barcodes to discriminate species of cotton (*Gossypium*: Malvaceae). *Mol. Ecol. Resour.*, 13(4), 573-582.
- Avise, J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr.*, 36, 3-15.
- Bandelt, H.; Forster, P.; Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16(1), 37-48.
- Bauchau, V., Lejeune, A., Bouharmont, J. 1984. Maintien et expansion de *Ludwigia uruguayensis* (Camb.) Hara en Brabant. *Dumortiera*, 28, 8-9.
- Beheregaray, L. B. 2008 Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges of the Southern Hemisphere. *Mol. Ecol.* 17(17), 3754-3774.
- Benazzo, A., Ghirotto, S., Vilaça, S. T., Hoban, S. 2015. Using ABC and microsatellite data to detect multiple introductions of invasive species from a single source. *Heredity*, 115(3), 262-272.
- Besnard, G., Dupuy, J., Larter, M., Cuneo, P., Cooke, D., Chikhi, L. 2014. History of the invasive African olive tree in Australia and Hawaii: evidence for sequential bottlenecks and hybridization with the Mediterranean olive. *Evol. Appl.*, 7(2), 195-211.
- Bossdorf, O., Auge, H., Lafuma, L., Rogers, W. E., Siemann, E., Prati, D. 2005. Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia*, 144(1), 1-11.
- Byrne, M.; Hankinson, M. 2012., Testing the variability of chloroplast sequences for plant phylogeography. *Aust. J. Bot.*, 60, 569-574.

- Canavan, K., Magengelele, N. L., Paterson, I. D., Williams, D. A., Martin, G. D. 2022. Uncovering the phylogeography of *Schinusterebinthifolia* in South Africa to guide biological control. *AoB Plants*, 14(1), plab078.
- CBOL Plant Working Group 2009. A DNA barcode for land plants. *PNAS USA*, 106, 12794–12797.
- Celesti Grapow, L., Alessandrini, A., Arrigoni, P. V., Banfi, E., Bernardo, L., Bovio, M., et al., 2009. Inventory of the non native flora of Italy. *Plant Biosyst.*, 143(2), 386-430.
- Chen, J., Zhao, J., Erickson, D. L., Xia, N., Kress, W. J. 2015. Testing DNA barcodes in closely related species of *Curcuma* (Zingiberaceae) from Myanmar and China. *Mol. Eco. Resour.*, 15(2), 337-348.
- Chown, S. L., Sinclair, B. J., van Vuuren, B. J. 2008. DNA barcoding and the documentation of alien species establishment on sub-Antarctic Marion Island. *Polar Biol.*, 31(5), 651-655.
- Christina, V. L. P.; Annamalai, A. 2014. Nucleotide based validation of *Ocimum* species by evaluating three candidate barcodes of the chloroplast region. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 60-68.
- Coetzee, J. A., Martin, G. D., Bownes, A. 2011. Prospects for the biological control of submerged macrophytes in South Africa. *Afr. Entomol.*, 19(1), 469-487.
- Cook, C. D. K. 1985. Range extensions of aquatic vascular plant species. *J. Aquat.Plant Manag.* 23, 1-6.
- Cristescu, M. E. 2015. Genetic reconstructions of invasion history. *Mol. Ecol.*, (9), 2212-2225.
- Dandelot, S. 2004. Les *Ludwigia spp.* Invasives du Sud de la France: Historique, Biosystématique, Biologie et Ecologie (Tese de doutorado, Aix-Marseille 3).
- Dlugosch, K. M., Anderson, S. R., Braasch, J., Cang, F. A. et al., 2015. The devil is in the details: genetic variation in introduced populations and its contributions to invasion. *Mol. Ecol.*, 24(9), 2095-2111.
- Dlugosch, K. M., Parker, I. M. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol. Ecol.*, 17(1), 431-449.
- Doyle, R. D., Francis, M. D., Smart, R. M. 2003. Interference competition between *Ludwigia repens* and *Hygrophilapolysperma*: two morphologically similar aquatic plant species. *Aquat. Bot.*, 77(3), 223-234.
- Estoup, A., Ravigné, V., Hufbauer, R., Vitalis, R., Gautier, M., Facon, B. 2016. Is there a genetic paradoxo of biological invasion? *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 47, 51-72.
- Facon, B., Pointier, J. P., Jarne, P., Sarda, V., David, P. 2008. High genetic variance in life-history strategies within invasive populations by way of multiple introductions. *Curr. Biol.*, 18(5), 363-367.

Fazekas, A. J., Kesanakurti, P. R., Burgess, K. S., Percy, D. M., Graham, S. W., Barrett, S. C. et al. 2009. Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Mol. Eco. Resour.*, 9, 130-139.

Fitzpatrick B. M, Fordyce J. A, Niemiller M. L et al. 2012. What can DNA tell us about biological invasions? *Biol. Invasions*, 14, 245-253.

Fleming, J. P., Dibble, E. D. 2015. Ecological mechanisms of invasion success in aquatic macrophytes. *Hydrobiologia*, 746(1), 23-37.

Frankham, R. 2004. Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity*. 94(4), 385–385.

GBIF: The Global Biodiversity Information Facility (2022) Disponível em <https://www.gbif.org/>. Acessado em: 20/02/2022

Genitoni, J., Vassaux, D., Delaunay, A., Citerne, S., Portillo Lemus, L., Etienne, M. P. et al., 2020. Hypomethylation of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora* subsp. *hexapetala* mimics the adaptive transition into the terrestrial morphotype. *Physiol. Plant.*, 170(2), 280-298.

Ghahramanzadeh, R., Esselink, L. P., Kodde, H. et al. 2013. Efficient distinction of invasive aquatic plant species from non-invasive related species using DNA barcoding. *Mol. Eco. Resour.* 13: 21-31. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12020>.

Gillard, M., Thiébaud, G., Deleu, C., Leroy, B. 2017. Present and future distribution of three aquatic plants taxa across the world: decrease in native and increase in invasive ranges. *Biol. Invasions*, 19(7), 2159-2170.

Hara, H., 1953. *Ludwigia* versus *Jussiaea*. *J. Jap. Bot.* 28(10): 1-6.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., DeWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Royal Soc. B*, 270(1512), 313-321.

Hollingsworth, H. P. M., Graham, S. W., Little, D. P. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*. 6(5): e19254.

Honorio-Coronado, E. N., Dexter, K. G., Hart, M. L., Phillips, O. L., Pennington, R. T. 2019. Comparative phylogeography of five widespread tree species: insights into the history of western Amazonia. *Ecol. Evol.*, 9(12), 7333-7345.

Honorio-Coronado, E. N., Dexter, K. G., Poelchau, M. F., Hollingsworth, P. M., Phillips, O. L., Pennington, R. T. 2014. *Ficus insipida* subsp. *insipida* (Moraceae) reveals the role of ecology in the phylogeography of widespread Neotropical rain forest tree species. *J. Biogeogr.*, 41(9), 1697-1709.

Hoveka, L. N., Van der Bank, M., Boatwright, J. S., Bezeng, B. S., Yessoufou, K. 2016. The noncoding trnH-psbA spacer, as an effective DNA barcode for aquatic freshwater plants, reveals prohibited invasive species in aquarium trade in South Africa. *S. Afr. J. Bot.*, 102, 208-216.

- Huan, H. V.; Trang, H. M.; Toan, N. V. 2018. Identification of DNA barcode sequence and genetic relationship among some species of *Magnolia* family. *Asian J. Plant Sci.*, 18, 56-64
- Kañuch, P., Berggren, Å., & Cassel-Lundhagen, A. 2021. A clue to invasion success: genetic diversity quickly rebounds after introduction bottlenecks. *Biol. Invasions.*, 23(4), 1141-1156.
- Kress, W. J., Erickson, D. L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*. 2(6): e508.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., Janzen, D. H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS*, 102(23), 8369-8374.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 33, 1870-1874.
- Li, D. Z., Liu, J. Q., Chen, Z. D., Wang, H., Ge, X. J., Zhou, S. L., et al. 2011. Plant DNA barcoding in China.
- Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y., Chen, S. 2015. Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biol. Rev.*, 90(1), 157-166.
- Liu, S. H., Edwards, C. E., Hoch, P. C., Raven, P. H., Barber, J. C. 2018. Genome skimming provides new insight into the relationships in *Ludwigia* section *Macrocarpon*, a polyploid complex. *Am. J. Bot.*, 105(5), 875-887.
- Liu, S. H., Hoch, P. C., Diazgranados, M., Raven, P. H., Barber, J. C., 2017. Multi-locus phylogeny of *Ludwigia* (Onagraceae): insights on infrageneric relationships and the current classification of the genus. *Taxon*. 66(5): 1112-1127
- Marsico, T. D., Wallace, L. E., Ervin, G. N., Brooks, C. P., McClure, J. E., Welch, M. E. 2011. Geographic patterns of genetic diversity from the native range of *Cactoblastis cactorum* (Berg) support the documented history of invasion and multiple introductions for invasive populations. *Biol. Invasions*, 13(4), 857-868.
- Moorhouse, T. P., Macdonald, D. W. 2015. Are invasives worse in freshwater than terrestrial ecosystems? *Wiley Interdiscip. Rev.: Water*, 2(1), 1-8.
- Morris, A. B., Shaw, J. 2018. Markers in time and space: a review of the last decade of plant phylogeographic approaches. *Mol. Ecol.*, 27(10), 2317-2333.
- Munz, P. A. 1942. Studies in Onagraceae XII: a revision of the New World species of *Jussiaea*. *Darwiniana* 4(2-3): 179-284.
- Nehring, S., Kolthoff, D. 2011. The invasive water primrose *Ludwigia grandiflora* (Michaux) Greuter&Burdet (Spermatophyta: Onagraceae) in Germany: First record and ecological risk assessment. *Aquat. Invasions*, 6(1), 83-89.
- Okada, M., Grewell, B. J., Jasieniuk, M. 2009. Clonal spread of invasive *Ludwigia hexapetala* and *L. grandiflora* in freshwater wetlands of California. *Aquat. Bot.*, 91(3), 123-129.

- Pang, X., Song, J., Zhu, Y., Xu, H., Huang, L., Chen, S. 2011. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification. *Cladistics*, 27(2), 165-170.
- Pang, X., Liu, C., Shi, L., Liu, R., Liang, D., Li, H. et al., 2012. Utility of the trnH-psbA intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: a meta-analysis. *PLoS One*, 7(11), e48833.
- Pejchar, L., Mooney, H. A. 2009. Invasive species, ecosystem services and human well-being. *Trends Ecol. Evol.*, 24(9), 497-504.
- Petit, R. J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, R., Salvini, D., Vendramin, G. G. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol. Ecol.* 14, 689-701.
- Pyšek, P., Hulme, P. E., Meyerson, L. A., Smith, G. F., Boatwright, J. S., Crouch, N. R., et al. 2013. Hitting the right target: taxonomic challenges for, and of, plant invasions. *AoB Plants*, 5.
- Ramamoorthy, T. P. 1979. A sectional revision of *Ludwigia* sect. *Myrtocarpus* s. lat.(Onagraceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 893-896.
- Raven, P. H.; Tai, W., 1979. Observations of chromosomes in *Ludwigia* (Onagraceae). *Ann. Missouri Bot. Gar.* 66(4): 862-879.
- Reddy, A. M., Pratt, P. D., Grewell, B. J., Harms, N. E., Cabrera Walsh, G., Hernández, M. C. et al., 2021. Biological control of invasive water primroses, *Ludwigia* spp., in the United States: A feasibility assessment. *J. Aquat. Plant. Manag.*
- Renault, D., Manfrini, E., Leroy, B., Diagne, C., Ballesteros-Mejia, L., Angulo, E., Courchamp, F. 2021. Biological invasions in France: Alarming costs and even more alarming knowledge gaps. *NeoBiota*, 67, 191.
- Rieseberg, L. H., Wood, T. E., Baack, E. J. 2006. The nature of plant species. *Nature*, 440(7083), 524-527.
- Ruau, B., Greulich, S., Haury, J., Berton, J-P. 2009. Sexual reproduction of two alien invasive *Ludwigia* (Onagraceae) on the middle Loire River, France. *Aquat. Bot.* 90, 143-148.
- Schaal, B. A., Hayworth, D. A., Olsen, K. M., Rauscher, J. T., Smith, W. A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol. Ecol.*, 7, 465-474.
- Shang, L., Li, L. F., Song, Z. P., Wang, Y., Yang, J., Wang, C. C., et al. 2019. High genetic diversity with weak phylogeographic structure of the invasive *Spartina alterniflora* (Poaceae) in China. *Front. Plant Sci.*, 10, 1467.
- Shneyer, V. S., Rodionov, A. V. 2019 Plant DNA barcodes. *Biol. Bull. Rev.*, 9(4), 295-300.
- Simberloff, D. 2010. Invasive species. *Conservation biology for all*, 131-152.
- Simberloff, D. 2015. Non-native invasive species and novel ecosystems. *F1000prime reports*, 7.

- Strayer, D. L., Dudgeon, D. 2010. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *North Am. Benthol. Soc.*, 29(1), 344-358.
- Starr, J. R., Naczi, R. F., Chouinard, B. N. 2009. Plant DNA barcodes and species resolution in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *Mol. Ecol. Resour.*, 9, 151-163.
- Strecker, A. L., Campbell, P. M., & Olden, J. D. (2011). The aquarium trade as an invasion pathway in the Pacific Northwest. *Fisheries*, 36(2), 74-85.
- Strong, D. R., & Ayres, D. R. 2013. Ecological and evolutionary misadventures of *Spartina*. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 44, 389-410.
- Tho, B. T., Sorrell, B. K., Lambertini, C., Eller, F., Brix, H. 2016. *Phragmites australis*: how do genotypes of different phylogeographic origins differ from their invasive genotypes in growth, nitrogen allocation and gas exchange? *Biol. Invasions*, 18(9), 2563-2576.
- Thouvenot, L.; Haury, J.; Thiebaut, G. 2013. A success story: water primroses, aquatic pests. *Aquat. Conserv.*, 23, 790-803.
- Vauthey, M., Jeanmonod, D., Charlier, P. 2003. La jussie - *Ludwigia grandiflora* (Michx.) Greuter&Burdet - une nouvelle espece pour la Suisse et un nouvel envahisseur. *Saussurea* 33, 109-117.
- Vilà, M., Espinar, J. L., Hejda, M., Hulme, P. E., Jarošík, V., Maron, J. L et al., 2011. Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems. *Ecol. Lett.* 7, 702-708.
- Vilà, M., Tessier, M., Suehs, C. M., Brundu, G., Carta, L., Galanidis, A. et al., 2006. Local and regional assessments of the impacts of plant invaders on vegetation structure and soil properties of Mediterranean islands. *J. Biogeogr.*, 33(5), 853-861.
- Wagner, L. W., Hoch, P. C., Raven, P. H. (2007). Revised classification of the Onagraceae. *Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard.*, 83, 1-240.
- Xu, S. Z., Li, Z. Y., Jin, X. H. 2018. DNA barcoding of invasive plants in China: A resource for identifying invasive plants. *Mol. Ecol. Resour.*, 18(1), 128-136.
- Xu, S., Li, D., Li, J., Xiang, X., Jin, W., Huang, W., et al. 2015. Evaluation of the DNA barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from mainland Asia. *PloSone*, 10(1), e0115168.
- Yu, J., Xue, J. H., Zhou, S. L. 2011. New universal matK primers for DNA barcoding angiosperms. *J. Syst. Evol.*, 49(3), 176-181.
- Zhang, X., Yu, H., Yu, H., Liu, C., Fan, S., Yu, D. 2021. Highly competitive native aquatic species could suppress the growth of invasive aquatic species with similar traits. *Biol. Invasions*, 23(1), 267-280.
- Zhu, B. R., Barrett, S. C., Zhang, D. Y., Liao, W. J. 2017. Invasion genetics of *Senecio vulgaris*: loss of genetic diversity characterizes the invasion of a selfing annual, despite multiple introductions. *Biol. Invasions*, 19(1), 255-267.