

<https://eventos.utfpr.edu.br/sei/sei2018>

Avaliação da variabilidade genética do lírio-do-brejo (*Hedychium coronarium*) para posteriores utilizações em seu controle

Evaluation of genetic variability of the white ginger lily (*Hedychium coronarium*) to posterior uses on its control

Paulo Henrique Claudino

claudinop05@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Nédia de Castilhos Ghisi (orientadora)

nediaghisi@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

RESUMO

Devido à relevância dos impactos ambientais causados pelas espécies exóticas invasoras, é cada vez mais comum se deparar com metodologias de combate a tais organismos para garantir a preservação de ecossistemas naturais. Um exemplo presente no Brasil é o lírio-do-brejo (*Hedychium coronarium*), uma macrófita aquática nativa da Ásia, que há anos vem causando prejuízos à biodiversidade brasileira, sem possuir qualquer meio de controle eficaz o suficiente para interromper o seu avanço pelas paisagens do território nacional. Nesse contexto, a Biologia Molecular pode ser usada para auxiliar na sua erradicação ao associar a variabilidade genética dos indivíduos com as chances de adaptação e resistência a mudanças ambientais e medidas de manejo aplicadas a suas populações. Para tal análise, neste trabalho foram coletadas amostras de plantas de diferentes municípios da região Sudoeste do Paraná, as quais posteriormente tiveram seu DNA genômico extraído e encaminhado a uma PCR com marcadores ISSR para amplificação de trechos do material. A visualização dos resultados ocorreu por meio de uma corrida eletroforética, onde se constatou que apesar do pouco êxito na PCR, os acessos da espécie apresentam certa variabilidade entre si, portanto, é possível que as respostas aos meios de controle sejam distintas ao longo das populações.

PALAVRAS-CHAVE: Espécies invasoras. Biologia molecular. ISSR. Biodiversidade.

ABSTRACT

Due to the relevance of environmental impacts caused by invasive alien species, it's been common to come across methodologies to combat such organisms to ensure the preservation of natural ecosystems. An example in Brazil is the white ginger lily (*Hedychium coronarium*), an aquatic macrophyte native to Asia, which has been causing damage to Brazilian biodiversity for years, without any effective control to avoid its progress through the Brazilian territory. In this scenario, Molecular Biology can be used to help on its eradication by associating the genetic variability of individuals with the chances of adaptation and resistance to environmental changes and control attempts to their populations. In stud samples were collected from different places of the Southwest region of Paraná, which later had their genomic DNA extracted and sent to a PCR with ISSR markers for amplification of stretches of the material. The visualization of the results occurred through an electrophoresis, where it was found that despite the poor success in the PCR, the accesses of the species present some variability among themselves, therefore, it is possible that the answers to the control methodologies can be distinct along the populations.

KEYWORDS: Invasive species. Molecular Biology. ISSR. Biodiversity.

Recebido: 30 ago. 2018.

Aprovado: 01 out. 2018.

Direito autoral:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Nos últimos tempos a perda de biodiversidade, bem como suas causas e efeitos sobre os ecossistemas, tem sido um tema recorrente na comunidade científica. Nesse contexto, destacam-se as **espécies exóticas invasoras**, definidas como qualquer forma de vida que, devido às atividades antrópicas, tenha alcançado novas áreas de distribuição (estas diferentes de sua original), e assim aumentado sua população de forma descontrolada graças a condições favoráveis encontradas no novo habitat (DISLICH, 2002).

O fenômeno ocasionado por tais situações é denominado **invasão biológica**, e é considerado relativamente comum na história da humanidade. Desde os anos 90, a proliferação de espécies invasoras é destacada como a segunda maior ameaça à biodiversidade do planeta, situando-se atrás somente da destruição direta de habitats pela mão do homem (DISLICH, 2002). A ocorrência de uma invasão biológica tem como consequência diversos malefícios ao funcionamento pleno de uma área natural: alterações de comportamento e crescimento de indivíduos, mortalidade, hibridização indesejada, e até mesmo mudanças nos ciclos de nutrientes (DISLICH, 2002).

Segundo Ziller (2001), dentre todas as espécies invasoras, as plantas apresentam características que potencializam invasões biológicas por elas protagonizadas. A frutificação, produção de grande quantidade de sementes, reprodução por brotação e a alelopatia, facilitam a predominância de uma única espécie em determinado local. Além disso, estes organismos comumente apresentam baixa exigência ambiental e não encontram concorrentes naturais, bem como parasitas e predadores, fatores de suma importância no controle de populações (RODOLFO et al., 2008).

Tais características associadas fazem com que ao contrário de outros tipos de impactos ambientais, os quais tendem a ser atenuados e absorvidos pelo tempo, as invasões biológicas se perpetuem e agravem seus efeitos sobre os ecossistemas colocando espécies nativas em tamanho perigo a ponto de levá-las à extinção (MORMUL, 2010).

Um exemplo muito presente no Brasil, ainda que pouco estudado, é o **lírio-do-brejo** (*Hedychium coronarium*). Esta planta, nativa das nações que circundam a cordilheira do Himalaia na Ásia, foi trazida para o país com o objetivo ornamentar praças e jardins. Entretanto, sua agressividade e capacidade reprodutiva acabaram levando os exemplares a se estabelecerem de forma crescente na natureza brasileira, alcançando o status de exótica invasora (MACIEL, 2011).

1.1 LÍRIO-DO-BREJO (*Hedychium coronarium*)

Originário da Índia e da China, o lírio-do-brejo se caracteriza por ser uma planta perene extremamente adaptada a áreas alagadas e solos úmidos e pelo fato de ter sua vida associada à água é considerada uma macrófita aquática (ALMEIDA, 2015).

Com uma inconfundível inflorescência branca e um caule que pode chegar a 2,0m de altura, sua principal forma de dispersão é o brotamento de rizomas, os

quais são extremamente desenvolvidos e resistentes, assim como a dispersão de sementes através da frutificação (ALMEIDA, 2015).

A exemplo de outras macrófitas invasoras, o lírio-do-brejo se aproveita das conexões hídras entre diferentes ambientes para dispersar suas sementes e propágulos, e dessa forma, proporcionar o surgimento de novas populações (ALMEIDA, 2015). Plantas associadas à habitats aquáticos, quando categorizadas como invasoras, possuem entre outros efeitos danosos a fragilização do ecossistema, a exterminação da vegetação local e a diminuição de peixes e outros vertebrados nativos (SCHULTZ, 2012). Ademais, devido à reprodução excessiva dessas plantas, ocorre um acúmulo exagerado de matéria orgânica, que quando em decomposição consome consideravelmente o oxigênio dissolvido na água e promove sedimentação demasiada (ALMEIDA, 2015).

Estudos em particular com essa espécie demonstram que o lírio forma grandes touceiras, densas e difíceis de serem erradicadas (ALMEIDA, 2015), cujos efeitos são o sombreamento de ervas e plântulas, bem como a competição por nutrientes com plantas nativas e a obstrução de corpos hídricos, sendo que muitas áreas invadidas tratam-se de unidades de conservação protegidas (MACIEL, 2011).

Devido às características de sua invasão, com frequência são implantadas políticas de combate ao lírio-do-brejo. Uma das principais é a retirada mecânica das plantas, assim como suas raízes e brotos. No entanto, esta metodologia é ineficiente e trabalhosa, já que o mínimo fragmento de rizoma restante no solo pode regenerar os aglomerados de lírio no futuro (MACIEL, 2011). O controle utilizando produtos químicos é considerado inviável, pois a espécie cresce em ambientes sensíveis às contaminações por herbicida, e, portanto sua utilização seria ambientalmente desastrosa (SOARES; BARRETO, 2008).

1.2 BIOLOGIA MOLECULAR NO MANEJO DE ESPÉCIES INVASORAS

Os estudos de Biologia Molecular vêm ganhando relevância no combate de espécies exóticas invasoras. A partir de técnicas dessa área é possível, entre outros aspectos, identificar a origem de dispersão e colonização de plantas indesejadas, bem como fornecer dados fundamentais para o seu manejo integrado (VIEIRA et al., 2007).

Analisando a variabilidade genética de uma planta daninha é possível associar a inconstância genética entre os indivíduos com a sua suscetibilidade a um determinado método de controle, levando em conta que do ponto de vista da biologia, indivíduos geneticamente parecidos tendem a compartilhar vulnerabilidades a mudanças ambientais, quando o oposto também é válido (CÍCERO et al., 2007).

Estudos com marcadores moleculares também são capazes de contribuir no manejo integrado de plantas com esse perfil no sentido de evitar a pressão seletiva sobre acessos da espécie que sejam geneticamente diversos prevenindo, por exemplo, o surgimento de populações resistentes, assim como torna possível a identificação de sequências e/ou genes específicos com potencial para conferir adaptações aos indivíduos (VIEIRA et al., 2007).

Sendo assim, um estudo genético sobre o lírio-do-brejo pode guiar um combate eficaz e preciso à invasão biológica propiciada por ele.

MÉTODOS

Folhas de lírio-do-brejo foram coletadas em dez municípios diferentes, todos da região Sudoeste do Paraná. Os locais específicos para a coleta foram escolhidos de forma a garantir casualidade na origem do material. Os municípios em questão foram: Itapejara d'Oeste (ITA), Verê (VER), São João (SJ), Coronel Vivida (CV), Enéas Marques (ENM), Nova Esperança do Sudoeste (NESP), Dois Vizinhos (DV), Cruzeiro do Iguaçu (CRUZ), Boa Esperança do Iguaçu (BES) e Francisco Beltrão (FCB).

O DNA genômico foi extraído das folhas utilizando um kit/protocolo comercial *Promega*[®], e após todas as amostras serem devidamente identificadas, a presença e quantidade de material genético contidas em cada uma foram atestadas através de uma eletroforese em gel de agarose 2%, posteriormente visualizado sob luz UV.

A partir deste ponto, tiveram início as tentativas de amplificação do DNA através da **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. Os reagentes consistiram em um *Master Mix* para PCR *Ludwig*[®] e dez *primers* randômicos do tipo *ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)*, categoria considerada muito eficiente para avaliar variabilidade genética de plantas (PARIDA, 2013). As sequências dos primers se encontram na Tabela 1.

Tabela 1- *Primers* utilizados e suas sequências

Primer	Sequência (5'-3')
ISSR-1	CTTCACTTCACTTCA
ISSR-2	CACACACACACAAC
ISSR-3	CACACACACACAGT
ISSR-4	ACACACACACACACAA
ISSR-5	ACACACACACACAGGA
ISSR-6	ACTCACTCACTCACTC
ISSR-7	ACACACACACACACCA
ISSR-8	GACAGACAGACAGACA
ISSR-9	CTCTCTCTCTCTCTT
ISSR-10	TTATTATTATTACA

Fonte: Autoria própria (2017).

O conteúdo de cada amostra preparada para o processo de amplificação foi determinado com base no manual de instruções comercial do *Master Mix* citado anteriormente. Cada microtubo recebeu 22,5 µL de *Master Mix*, 0,5 µL de solução contendo *primers* e por fim 2 µL de DNA genômico, totalizando 25 µL por microtubo.

A PCR foi realizada em um termociclador modelo Sure Cyclor 8800 (Agilent Technologies[®]) de acordo com o programa de Parida (2013). Este, por sua vez,

compreende uma desnaturação inicial do DNA *template* a 94°C por 5 minutos, seguida de 42 ciclos de três etapas: Desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento em uma faixa de temperatura entre 36°C e 38°C por 1 minuto, e 72°C por 2 minutos para a polimerização. Os ciclos são então, seguidos por uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

Após o processamento na PCR, o material passou por uma eletroforese em gel de agarose 2%, durante 80 minutos com corrente elétrica de 60 V (PARIDA, 2013). A preparação das amostras para a corrida eletroforética se deu adicionando 1 µL de *Loading Buffer* e 2 µL de GelRed® a 5 µL de amostra, sendo que o montante total de 8 µL foi pipetado no gel logo a seguir. Como um padrão para avaliação do peso e tamanho molecular dos fragmentos amplificados foi usado um *Ladder* comercial preparado e pipetado nas mesmas circunstâncias das amostras.

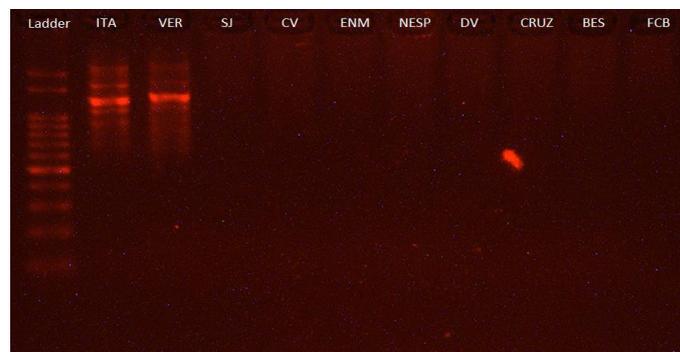
Posteriormente o gel foi levado até um transiluminador e exposto à luz UV para ser visualizado e fotografado com o auxílio de um software L-PIX- STi®. A fotografia do gel teve seu padrão de bandas analisado para que a semelhança/proximidade entre indivíduos fosse estimada de acordo com os resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Do total de 10 *primers* testados, apenas o ISSR-2 e o ISSR-4 apresentaram anelamento nos parâmetros de PCR utilizados. Além disso, das 10 amostras avaliadas e processadas sob as mesmas condições, somente duas resultaram em amplificação em ambos os casos.

O *primer* ISSR-2 de sequência 5'- CACACACACACAAC – 3', gerou o padrão de bandas apresentado na Figura 1.

Figura 1- Gel resultante do *primer* ISSR-2: *Ladder*: Padrão molecular; São João (SJ); Itapejara d'Oeste (ITA); e Verê (VER); Coronel Vivida (CV); Enéas Marques (ENM); Nova Esperança do Sudoeste (NESP); Dois Vizinhos (DV); Cruzeiro do Iguaçu (CRUZ); Boa Esperança do Iguaçu (BES); Francisco Beltrão (FCB).



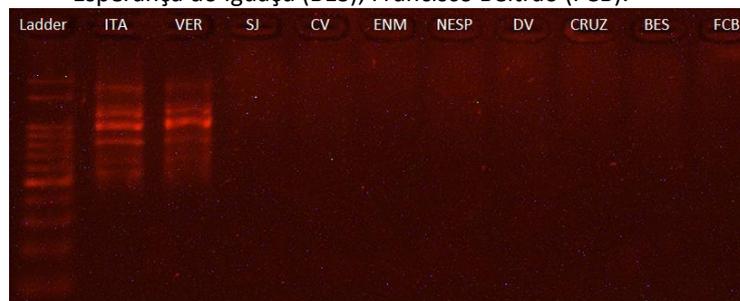
Fonte: Autor (2018).

Na primeira coluna se encontra o *Ladder* (padrão), enquanto as amostras que tiveram sucesso na amplificação se encontram ao lado: Itapejara d'Oeste

(ITA) e Verê (VER), sendo que as amostras de outros locais não obtiveram produtos de amplificação durante a metodologia. Analisando o gel, constata-se que apenas duas amostras geraram bandas visíveis, as quais por sua vez diferem ligeiramente quanto à distribuição e presença/ausência nos indivíduos testados.

O mesmo aconteceu com o *primer* ISSR-4, o qual possuía a seguinte sequência: 5' – ACACACACACACACAAA – 3', e cujas bandas podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2- Gel resultante do *primer* ISSR-4: *Ladder*: Padrão molecular; São João (SJ); Itapejara d'Oeste (ITA); e Verê (VER); Coronel Vivida (CV); Enéas Marques (ENM); Nova Esperança do Sudoeste (NESP); Dois Vizinhos (DV); Cruzeiro do Iguaçu (CRUZ); Boa Esperança do Iguaçu (BES); Francisco Beltrão (FCB).



Fonte: Autor (2018).

Semelhante à Figura 1, na primeira coluna se encontra o Ladder (padrão), e nas duas seguintes as amostras de Itapejara d'Oeste (ITA) e Verê (VER) e as demais amostras sem sucesso de amplificação. As amostras em que se obteve êxito no experimento são pertencentes aos municípios de Itapejara d'Oeste e Verê, respectivamente. Estas apresentam certo grau de distinção entre si, pois de acordo com a metodologia de Vieira et al. (2007), a proximidade de indivíduos, e por consequência a variabilidade genética, pode ser determinada pela padronagem de bandas no gel de agarose: quanto mais bandas em comum os indivíduos possuem, mais semelhança existe entre eles, sendo que o contrário também é válido.

A proximidade geográfica entre as localidades e a distinção entre as plantas analisadas demonstra que existe diversidade considerável na população de lírios da região Sudoeste do Paraná. Esta, mesmo que pequena pode resultar em empecilhos nas técnicas de controle, como resistência indesejada e adaptação ao ambiente e suas mudanças (VIEIRA et al., 2007).

É possível que indivíduos que provenham de locais mais afastados apresentem uma variabilidade maior ainda, e, portanto estudos mais detalhados sobre a espécie devem ser feitos com o objetivo de padronizar resultados, e é claro, abranger áreas mais distantes para caracterizar as populações invasoras do ponto de vista genético, e por consequência relacionar as conclusões do estudo com a suscetibilidade da planta a metodologias de manejo.

É importante ressaltar que além do programa de Parida (2013), outras seis programações de PCR foram testadas durante os experimentos, porém nenhuma delas foi bem-sucedida. Tal fato demonstra que existe a necessidade de se continuar pesquisas para que seja possível uniformizar os protocolos de trabalho

e obter resultados mais relevantes com esta espécie, já que a planta apresenta aplicações em outras áreas também, a exemplo da medicina e tratamento de efluentes, as quais podem ter trabalhos potencializados com o uso da Biologia Molecular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O projeto possui potencial para obter melhores resultados e assim alavancar novas abordagens às invasões promovidas pelo lírio-do-brejo auxiliando na proteção e conservação de biodiversidade nativa. No entanto, o êxito da metodologia é dependente de novos testes nos experimentos referente à padronização de parâmetros de PCR e dos *primers* utilizados. Dessa forma, este estudo pode ser considerado apenas um parecer preliminar sobre o assunto, já que se deve levar em conta até mesmo o fato de não haverem estudos significativos sobre a espécie.

É esperado que nas próximas tentativas a técnica seja bem-sucedida, pois os resultados disponíveis até o momento indicam a aproximação do ponto ótimo das condições do experimento.

AGRADECIMENTOS

À UTFPR pela concessão de bolsas e pelo espaço cedido para pesquisa e aprendizagem.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Renata Vilar de. **Invasividade de *Hedychium Coronarium* J. Koenig (Zingiberaceae) em diferentes umidades de solo**. 2015. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/2131>>. Acesso em: 26 ago. 2018.

CÍCERO, E.a.s. et al. Variabilidade genética e sensibilidade de acessos de *Pistia stratiotes* ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, v. 25, n. 3, p.579-587, set. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582007000300018>.

DISLICH, Ricardo; KISSER, Nabor; PIVELLO, Vânia R. A invasão de um fragmento florestal em São Paulo (SP) pela palmeira australiana *Archontophoenix cunninghamiana* H. Wendl. & Drude. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 1, p.55-64, mar. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbb/v25n1/a08v25n1>>. Acesso em: 26 ago. 2018.

MACIEL, L. A. Controle mecânico da herbácea exótica lírio-do-brejo (*Hedychium coronarium* Koenig) no Parque Estadual Turístico Alto do Ribeira- PETAR, SP, Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

MORMUL, R. P. et al. Espécies exóticas e invasoras no Brasil: a grande preocupação com macrófitas aquáticas, 2010.

PARIDA, R.; MOHANTY, S.; NAYAK, S. In vitro propagation of *Hedychium coronarium* Koen. through axillary bud proliferation. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing With All Aspects Of Plant Biology**, v. 147, n. 4, p.905-912, 20 mar. 2013. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.1080/11263504.2012.748102>

RODOLFO, Allyne Mayumi et al. *Citrus aurantium* L. (laranja-apepu) e *Hovenia dulcis* Thunb. (uva-do-japão): espécies exóticas invasoras da trilha do Poço Preto no Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 1, p.16-18, set. 2008. Disponível em:
<<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/1076/794>>. Acesso em: 12 maio 2018.

SCHULTZ, Rachel; DIBBLE, Eric. Effects of invasive macrophytes on freshwater fish and macroinvertebrate communities: the role of invasive plant traits. *Hydrobiologia*, v. 684, n. 1, p. 1-14, 2012.

Soares, D.J. and Barreto, R.W. (2008). Fungal pathogens of the invasive riparian weed *Hedychium coronarium* from Brazil and their potential for biological control. *Fungal Diversity* 28: 85-96

VIEIRA, Viviane Cristina et al. **Variabilidade genética em acessos de trapoeraba (*Commelina Benghalensis*)**. 2007. Disponível em:
<http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v74_4/vieira.pdf>. Acesso em: 26 ago. 201

ZILLER, S. R. Plantas exóticas invasoras: A ameaça da contaminação biológica, *Ciência Hoje*, p. 77-79, dezembro de 2001.