

ESTIMATIVA DA DIVERSIDADE GENÉTICA E ANÁLISE DA ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DE *Conyza* sp.

MAROCHIO, C. A. (DBC - UEM, Maringá/PR – carlosalexandre87@hotmail.com), BEVILAQUA, M. R. R. (DBC – UEM, Maringá/PR – maycon.bevilaqua@gmail.com), OLIVEIRA JR., R. S. (NAPD - UEM, Maringá/PR – rsojunior@uem.br), MACHADO, M. F. P. S. (DBC – UEM, Maringá/PR - mfpsmachado@uem.br) JASIENIUK, M. (Department of Plant Sciences - University of California – mjasien@ucdavis.edu)

RESUMO: A proposta no presente estudo foi investigar a variabilidade genética em nível molecular, e verificar a forma como estão geneticamente estruturadas as espécies de *Conyza canadensis*, *C. bonariensis*, e *C. sumatrensis*, analisando o polimorfismo em locos de sequências simples repetidas (locos SSR) de DNA, também denominados locos de microsatélites. Foram analisadas amostras de *C. canadensis*, sensíveis e resistentes ao glifosato, e *C. bonariensis* resistentes e com múltipla resistência, coletadas no Vale Central da Califórnia (EUA), e amostras de *C. sumatrensis* sensíveis e resistentes coletadas em seis municípios do Estado do Paraná (Brasil), usando os *primers* HW02, HW06, HW07, HW09, HW14, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR07, HWSSR09, e HWSSR11 para analisar o polimorfismo nos 12 locos microsatélites. O maior número de alelos (26) foi encontrado em *C. sumatrensis*. A maior proporção de locos microsatélites polimórficos (91,67%) foi observada nas plantas da espécie *C. bonariensis*, mas o número de alelos por locos ($N_a = 2,1667$), número efetivo de alelos ($N_e = 1,9388$), e heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,4291$), também foi maior nas amostras de *C. sumatrensis*, indicando que a diversidade genética é maior na espécie *C. sumatrensis*. As amostras de *C. sumatrensis* formaram populações geneticamente estruturadas ($F_{ST} = 0,4822$). Nos municípios de Campo Mourão e Cafelândia há exemplares de *Conyza* com características em nível molecular, para locos microsatélites, de *C. canadensis*, *C. bonariensis*, e *C. sumatrensis*, e exemplares que compartilham alelos característicos das três espécies, sugerindo que há troca de alelos entre as três espécies de *Conyza* na referida região.

Palavras-chave: Microsatélites, SSR, Plantas Daninhas.

INTRODUÇÃO

As plantas daninhas agrícolas, selecionadas pela manutenção das culturas feitas pelo homem, são hoje um fenômeno ecológico e evolutivo relativamente recente (NEVE et al., 2009). Dentro do grupo das plantas daninhas o gênero *Conyza* contém aproximadamente 50 espécies conhecidas, as quais se distribuem em quase todo o mundo

(KISSMANN; GROTH, 1999). As espécies que mais se destacam, por seu caráter negativo são: *Conyza bonariensis*, *Conyza sumatrensis*, e *Conyza canadensis*, sendo as duas primeiras originárias da América do Sul e a terceira originária da América do Norte. Segundo Thebaud e Abbott (1995), a espécie considerada como a mais difundida em todo o mundo é *C. canadensis*. Isso se deve a algumas características reprodutivas associadas ao alto potencial invasivo dessa espécie, entre as quais a grande produção de sementes, germinação rápida e a alta capacidade de dispersão dos aquênios (HAO et al., 2009).

Os autores Ferreira e Gattapaglia (1995) definem marcador molecular como sendo qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como por exemplo, as isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas, ou não expressas, do genoma.

Os microssatélites são uma categoria de marcadores moleculares definidos por Litt e Luty (1989), como sequências simples repetitivas (SSR) em genomas eucariotos. Os microssatélites, ou locos SSR, têm sido usados como marcadores moleculares para avaliar polimorfismos de DNA, em estudos com finalidades diferentes, e em diversas espécies de plantas (DEMORE, 2008) incluindo espécies de plantas daninhas (GOULART et al., 2011).

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de *C. sumatrensis* foram coletadas nos municípios de Campo Mourão, Floresta, Cascavel, Cafelândia, Peabiru e Toledo no estado do Paraná em Janeiro de 2011 e a semeadura foi realizada no mês de Maio de 2011 no CTI (Centro de Treinamento de Irrigação) da Universidade Estadual de Maringá – UEM. As sementes de *C. canadensis* e *C. bonariensis* foram coletas em 4 locais diferentes dentro do Vale Central do estado da Califórnia, Estados Unidos, o experimento foi realizado em casa de vegetação na University of California, Davis, CA. no mês de Janeiro de 2013.

Para a extração de DNA das plantas de *C. sumatrensis* foi utilizada a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990). Para a extração de DNA das plantas de *C. canadensis* e *C. bonariensis* foi utilizado o protocolo elaborado por Soltis Lab. (2002) com referências de Doyle e Doyle (1990) e Cullings (1992).

A padronização das condições de amplificação do DNA das diferentes amostras de *Conyza* (*C. canadensis*, *C. bonariensis*, e *C. sumatrensis*) foi realizada no Jasieniuk Lab, Departament of Plant Science da University of California, Davis, CA. Foram selecionados os *primers* desenvolvidos para *Conyza*: HW02, HW06, HW07, HW09, HW14, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR07, HWSSR09, e HWSSR11.

Para a análise do produto amplificado para cada *primer* de microssatélite e para cada amostra analisada foram utilizados os programas POPGENE 1.32 (YEH et al., 1999) e STRUCTURE *software 2.0* (PRITCHARD; WEN, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para estudar a diversidade genética das 88 amostras selecionadas das espécies de *C. canadensis*, *C. bonariensis* e *C. sumatrensis* foram utilizados os pares de *primers*: HW02, HW06, HW07, HW14, HW17, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR07, HWSSR09, HWSS11. *C. sumatrensis* apresentou o número máximo de 4 alelos usando o *primer* HWSSR01, sendo este o maior número alelos encontrado para todas as amostras de *Conyza*. Na espécie *C. sumatrensis* foi observado maior número de alelos (26), *C. bonariensis* (24) e *C. canadensis* (20), nos 12 locos analisados.

A maior proporção de locos microssatélites polimórficos (91,67%) foi observada nas plantas da espécie *C. bonariensis*, mas o número de alelos por locos ($N_a = 2,1667$), número efetivo de alelos ($N_e = 1,9388$) e heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,4291$) também foi maior nas amostras de *C. sumatrensis* indicando que a diversidade genética é maior na espécie *C. sumatrensis*, por outro lado, as amostras de *C. canadensis* apresentaram a menor diversidade genética.

A maior diversidade de alelos e de valores de heterozigosidade esperada nas espécies *C. sumatrensis* e *C. bonariensis*, indica que estas duas espécies tem maior diversidade genética do que a espécie *C. canadensis*, e que o controle destas deve mais difícil, e deve requerer estratégias adicionais ao controle usado para *C. canadensis*. Isto porque, em amostras com maior diversidade genética há maior chance de se encontrar exemplares (plantas) que respondem diferentemente às alterações ou pressões (ação de herbicidas) exercidas pelo ambiente.

De acordo com as premissas de Allendorf e Luikart (2007), a existência de variabilidade genética em amostras de uma população aumenta a chance de algumas amostras para responder diferentemente frente a alterações do meio ambiente, de modo que isto possa garantir a preservação da espécie. No que se refere às plantas daninhas com maior diversidade genética, há uma chance maior de serem selecionadas plantas que não sofrem os efeitos deletérios de aplicações de herbicidas, garantindo a preservação destes exemplares.

A divergência genética mensurada pelo valor de F_{ST} foi maior no loco HW29 ($F_{ST} = 0,5366$), indicando que o *primer* HW29 parece ser o mais adequado para diferenciar amostras das três espécies de *Conyza* (*C. canadensis*, *C. bonariensis*, e *C. sumatrensis*). A diferenciação genética entre as amostras de *C. canadensis* e *C. bonariensis* coletadas no mesmo continente (América do Norte) também foi alta ($F_{ST} = 0,2861$), indicando que estas duas espécies estão geneticamente bem estruturadas e devem requerer estratégias de controle diferencial. A análise conjunta dos locos microssatélites das três espécies mostrou que o valor maior de identidade genética ($I = 0,8293$) foi observado entre as espécies *C.*

canadensis e *C. sumatrensis* e que as espécies mais divergentes ($I = 0,6303$) foram *C. canadensis* e *C. bonariensis*.

O agrupamento das duas amostras de plantas de *C. canadensis* e *C. bonariensis*, e das 10 amostras de *C. sumatrensis*, de acordo com modelo baseado no algoritmo Bayesiano (Figura 1), evidenciou que a maior diversidade genética dentro das amostras é decorrente de maior diversidade dentro da espécie *C. sumatrensis*.

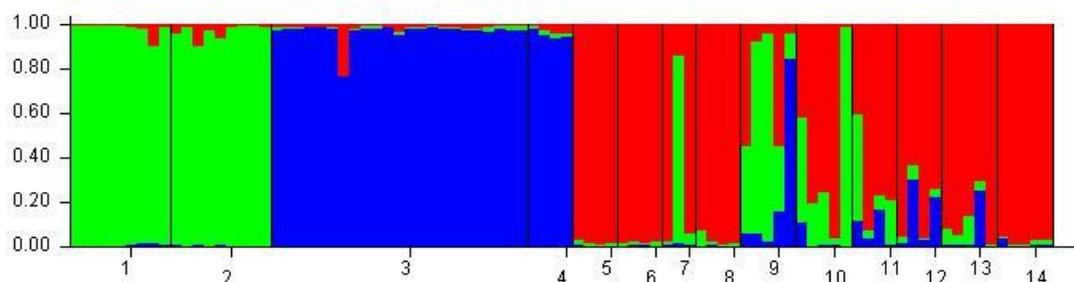


Figura 1. Gráfico *bar plot* obtido de acordo com modelo baseado no algoritmo Bayesiano, a partir da análise de locos microssatélites das amostras de plantas de *C. canadensis* (1-2), *C. bonariensis* (3-4), e *C. sumatrensis* (5-14). Cada planta está representada por uma barra vertical uniforme, ou dividida em K segmentos coloridos ($K = 3$), com tamanhos proporcionais para cada grupo K de alelos, inferido na análise. Cada cor (verde, azul, e vermelho) representa a proporção de alelos de cada grupo, ilustrado na barra vertical. Amostra (1): *C. canadenses*-S; (2): *C. canadenses*-R; (3): *C. bonariensis*-R; (4): *C. bonariensis*-RR; (5-14): *C. sumatrensis* [Campo Mourão¹-S (5); Floresta¹-S (6); Floresta²-S (7); Cascavel¹-R (8); Campo Mourão²-S (9); Cafelândia¹-S (10); Cafelândia²-S (11); Peabiru-S (12); Toledo-R (13); Cascavel²-S/R (14)].

O valor ótimo de K ($K = 3$; $\Delta K = 54,1987$), determinado pela análise Bayesiana foram consistentes com a evidência que os alelos estão misturados em várias amostras de *C. sumatrensis*, e que há pouca mistura de alelos de dois ou três grupos nas amostras de *C. canadensis* e de *C. bonariensis*.

CONCLUSÕES

A análise dos locos microssatélites mostrou que a diversidade genética é maior nas espécies de *C. sumatrensis* e *C. bonariensis*; a espécie de *C. canadensis* foi a que apresentou a menor diversidade genética.

A aplicação de herbicidas para o controle de *C. sumatrensis* nos municípios de Campo Mourão, Floresta, Cascavel, Cafelândia, Peabiru, e Toledo, do estado do Paraná tem selecionado amostras da espécie que são geneticamente divergentes.

As amostras de *C. sumatrensis* dos municípios de Campo Mourão, Cafelândia, Floresta, Peabiru, e Toledo, compartilham alelos característicos das espécies *C. canadensis* e *C. bonariensis*, indicando que há troca de alelos entre as três espécies de *Conyza* na referida região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. Conservation and the genetics of populations. **Blackwell Publishing Maden** Massachusetts, 2007, 642 p.
- CULLING, K.W. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. **Molecular Ecology** v.1, p. 233-240, 1992.
- DEMORE, P.S. Seleção assistida por marcadores moleculares microssatélites para resistência ao oídio em soja. Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Campus de Jaboticabal. Dissertação de mestrado, 2008. 45p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** v.12, p. 13-15, 1990.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.
- GOULART, I.C.G.R. et al. Otimização da utilização de marcadores moleculares microssatélites e sua aplicação em estudos com plantas daninhas. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 29, p. 1175-1181, 2011.
- HAO, J.H. et al. Reproductive traits associated with invasiveness in *Conyza sumatrensis*. **Journal of Systematics and Evolution** v. 3, p. 245-254, 2009.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. Plantas infestantes e nocivas. 2.ed. São Bernardo do Campo: Basf, p.152-156, 1999.
- LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 398-401, 1989.
- NEVE, P. et al. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. **New Phytologist** v. 184, p. 783-793, 2009.
- PRITCHARD J.K., WEN W. Documentation for *STRUCTURE software: Version 2*. Available from <http://pritch.bsd.uchicago.edu>. 2003.
- SOLTIS LAB CTAB DNA EXTRACTION PROTOCOL. The Soltis Lab, Florida Museum of Natural History, 2002.
- THEBAUD, C.; ABBOTT, R.J. Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. **American Journal of Botany** v.3, p. 360-368, 1995.
- YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta, 1999.