

## PRIMERS MICROSATÉLITES PARA ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DAS ESPÉCIES DANINHAS *Eleusine indica* (L) Gaertn E *Oryza sativa* L.

ROSO, A. C.<sup>1</sup>; VIDAL, R. A.<sup>1</sup>; MEROTTO Jr., A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS.

### Resumo

Marcadores microsatélites (SSR) são utilizados em análise genômica de plantas devido ao alto conteúdo informativo, serem co-dominantes e baseados em reação de PCR. Pouco se sabe a respeito do uso de marcadores moleculares para a análise da variabilidade genética das espécies daninhas *Eleusine indica* (L) Gaertn (ELEIN) e em biótipos de arroz vermelho (AV) provenientes dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de marcadores SSR em detectar a ocorrência de polimorfismos em ELEIN e AV. Foram testados oito pares de primers SSR em ambas as espécies. O primer RM 180 foi polimórfico apenas quando testado em populações de arroz vermelho oriundas de duas regiões diferentes do país. O restante dos marcadores não foram polimórficos em nenhuma das duas espécies. Nenhum dos primers SSR testados amplificou em ELEIN nas condições de reação de PCR testada. Estudos estão sendo realizados visando determinar primers SSR que amplifiquem em ELEIN e sejam capazes de detectar polimorfismo.

Palavras-chave: *Eleusine indica* (L) Gaertn, marcadores SSR, polimorfismo, variabilidade.

### Abstract

Microsatellite markers (SSR) are used in genomic analysis of plants due to high information content, co-dominance and based on the PCR reaction. Little is known about the use of molecular markers to analyze the genetic variability of weeds *Eleusine indica* (L) Gaertn and in red rice originated from the states Rio Grande do Sul and Santa Catarina. The objective of this study was to assess the SSR markers ability to detect the occurrence of polymorphisms in *Eleusine indica* (L) Gaertn and in red rice. Eight pairs of SSR primers were tested in both species. The primer RM 180 was polymorphic only when tested in populations of red rice collected in two different regions of the country. The rest of the markers were not polymorphic in neither of the species. None of the SSR primers tested amplified in ELEIN in the PCR reaction conditions tested. Studies are being conducted aiming to determine SSR primers that amplify in ELEIN and are able to detect polymorphism.

Key words: *Eleusine indica* (L) Gaertn, SSR markers, polymorphism, variability.

### Introdução

A gramínea *Eleusine indica* (L) Gaertn é considerada importante planta daninha C4 e produz mais de 140 mil sementes por planta (CHIN, 1979). Esta espécie possui ciclo de vida anual, autógama, diplóide, com genoma relativamente pequeno  $8,03 \times 10^8$  pb (Mysore & Baird, 1997). O arroz vermelho é uma espécie diplóide, autógama, possui genoma pequeno 2.02 pg e consiste em biótipos silvestres da espécie *Oryza sativa* L. e a tipos relativos como *O. nivara* e *O. rufipogon* (Vaughan *et al.*, 2001). Ambas as plantas são consideradas importantes plantas daninhas das culturas principalmente pelo fato de terem sido relatados biótipos resistentes aos herbicidas (Heap, 2010).

A resistência pode ocorrer espontaneamente dentro de populações de plantas daninhas como consequência da intensa pressão de seleção exercida pela falta de diversidade nas práticas de manejo de plantas daninhas (Gressel e Segel, 1978). A variabilidade genética dentro das populações é fundamental nesse contexto de evolução independente de resistência. A resistência aos herbicidas também pode se originar a partir de uma única planta pelo fluxo gênico. Por serem espécies autógamias, a hipótese da evolução da resistência pelo fluxo de

genes se torna dificultada. Mas há relatos na literatura que espécies mesmo sendo autógamas apresentam certa taxa de fecundação cruzada (Song *et al.*, 2003). Em arroz vermelho, por exemplo, no estado do Rio Grande do Sul, a análise de mais de 250 mil sementes indicou uma taxa de fecundação cruzada variando de 0,1 a 0,04 % (Magalhães Jr *et al.*, 2001).

Os marcadores moleculares do tipo SSR são úteis em diagnosticar a variabilidade genética dentro de populações e ao mesmo tempo também permitem a análise da ocorrência de fluxo gênico. Estes marcadores também são amplamente utilizados em análise genômica pelo seu alto conteúdo informativo, por serem co-dominantes e baseados na reação de PCR (*polymerase chain reaction*). Pouco se sabe a respeito do uso de marcadores moleculares para a análise da variabilidade genética da espécie *ELEIN*. Marcadores do tipo microsátélites foram utilizados para geração de mapa genético da espécie tetraplóide *Eleusine coracana* subsp. *Coracana*, com genoma  $2n = 4x = 36$  (Dida *et al.*, 2007).

No caso do arroz, os primers SSR ganham interesse especial, pois já se têm disponíveis mais de 2.000 marcadores (McCouch *et al.*, 2002). Por serem altamente informativos, estes marcadores permitem detectar polimorfismo molecular com grande eficácia. Por exemplo, estudos de diversidade alélica têm documentado mais de 25 alelos por loco entre diferentes acessos de arroz cultivado (McCouch *et al.*, 1997). Seis marcadores SSR foram suficientes para discriminar 71 linhagens de arroz com baixa diversidade genética (Olufowote *et al.*, 1997). Além de diagnosticar a variabilidade genética entre linhagens e/ou populações naturais este tipo de marcador também é útil na análise de fluxo gênico entre espécies. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de marcadores SSR em detectar a ocorrência de polimorfismos em *Eleusine indica* (L) Gaertn através da utilização de SSR de arroz.

## Material e métodos

O material vegetal do presente estudo consistiu de plantas de arroz vermelho originários dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e de plantas da espécie daninha *Eleusine indica* (L) Gaertn oriundas do estado de São Paulo. As plantas foram cultivadas no Laboratório da Flora Ruderal da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

A coleta do material para a extração de DNA ocorreu quando as plantas atingiram o estágio de três folhas completamente expandidas. As folhas jovens coletadas foram imediatamente congeladas em N<sub>2</sub> líquido. No total foram obtidas três amostras de cada material vegetal descrito anteriormente. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Plantas de Lavoura da Faculdade de Agronomia da UFRGS, e a extração de DNA seguiu as etapas descritas no protocolo de Haberer *et al.* (1996).

As reações de PCR, para a análise de marcadores SSR, foram conduzidas em volume final de 15 µL, contendo: 6,3 µL de H<sub>2</sub>O estéril; 1,5 µL de tampão 10x; 0,5 µL de dNTP 10 mM; 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 1,3 µL de DMSO 90% (dimetil-sulfoxido); 1,0 µL de primer (5,0 µM); 0,2 µL de enzima Taq polimerase (5 unidades.µL<sup>-1</sup>); e 2,0 µL de DNA (25 ng.µL<sup>-1</sup>). As reações foram conduzidas em termociclador PTC- 100 (MJ Research) utilizando o seguinte perfil de temperaturas: um ciclo inicial de 95°C por dois minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos; 57°C, por 45 segundos; 72°C, por um minuto; e uma extensão final de 72°C por cinco minutos. Foram testados oito diferentes primers SSR (Tabela 1). Os produtos da reação de PCR foram separados em gel de agarose (3 %) corado com brometo de etídeo na proporção de 0,02 µL ml<sup>-1</sup>, por 120 minutos a 110 V em tampão TBE 0,5X (40 mM Tris, 1mM EDTA, pH=8,0). Após, cada gel foi fotografado com auxílio do programa KODAK DIGITAL SCIENCE 1D.

Tabela 1. Descrição dos marcadores SSR utilizados para identificação de polimorfismos em *Eleusine indica* (L) Gaertn (P.B.: tamanho em pares de base; T.A.: temperatura de anelamento; Crom.: localização cromossômica em arroz).

Primer	Sequência Forward (3'-5')	Sequência reverse (3'-5')	P.B.	T.A. (°C)	Crom.
RM 251	GAATGGCAATGGCGCTAG	ATGCGGTTCAAGATTGATC	147	55	3
RM 4797	GGAGAAGGCAATGCAACACG	GCCATTGCCGCCAAGTACTA	119	56	4
RM 341	CAAGAAACCTCAATCCGAGC	CTCCTCCCGATCCCAATC	150	55	2
RM 180	CTACATCGGCTTAGGTGTAGCAACACG	ACTTGCTCTACTTGTGGTGAGGGACTG	110	55	7
RM 152	GAAACCACCACACCTCACCG	CCGTAGACCTTCTTGAAGTAG	151	55	8
RM 475	CCTCACGATTTTCTCCAAC	ACGGTGGGATTAGACTGTGC	190	56	4
RM 106	CGTCTTCATCATCGTCGCCCG	GGCCCATCCCGTCGTGGATCTC	137	55	2
RM 220	GGAAGGTAAGTGTTCCTCCAAC	GAAATGCTTCCCACATGTCT	127	55	1

### Resultados e discussão

Do total de oito primers SSR avaliados apenas cinco (RM 251, RM341, RM 180, RM 4797 e RM 475) amplificaram em arroz, sendo que apenas o primer RM 180 mostrou polimorfismo entre as plantas de arroz vermelho, analisadas oriundas de diferentes regiões do país. Nenhum destes marcadores que foram testados amplificou em ELEIN. Os primers RM 152, RM 106 e RM 220 não amplificaram em nenhuma das amostras testadas tanto em arroz vermelho quanto em ELEIN (Figura 1). Uma provável justificativa para os resultados apresentados é que as condições de reação de PCR podem não estar adequadas de forma a garantir o sucesso da amplificação. Estudos posteriores estão sendo realizados com objetivo de promover condições mais específicas de reação de PCR.

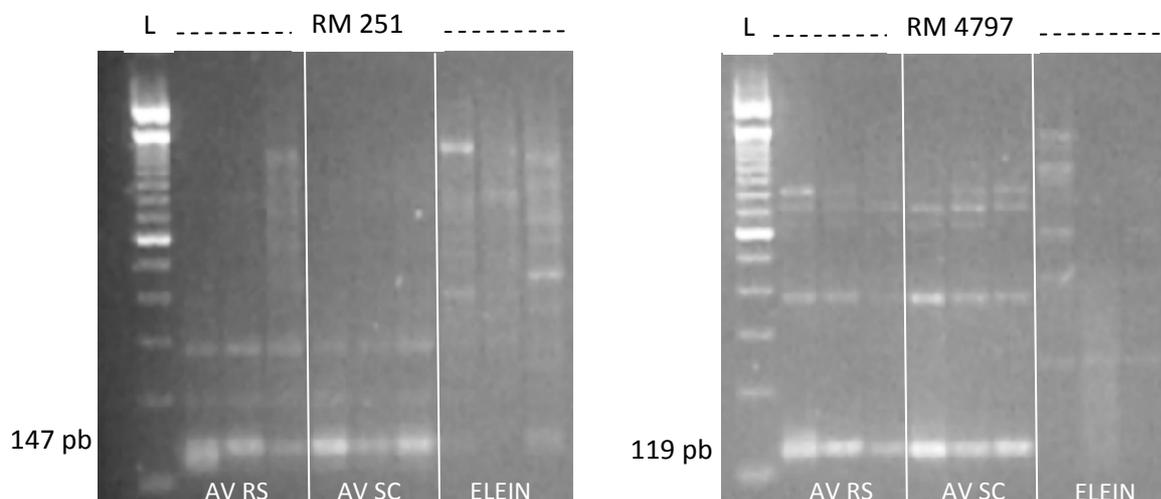


Figura 1. Marcadores moleculares SSR em arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) coletado no Rio Grande do Sul e Santa Catarina e em capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica* (L) Gaertn). L: marcador de peso molecular que amplifica de 100 em 100 pb; pb: Pares de Bases.

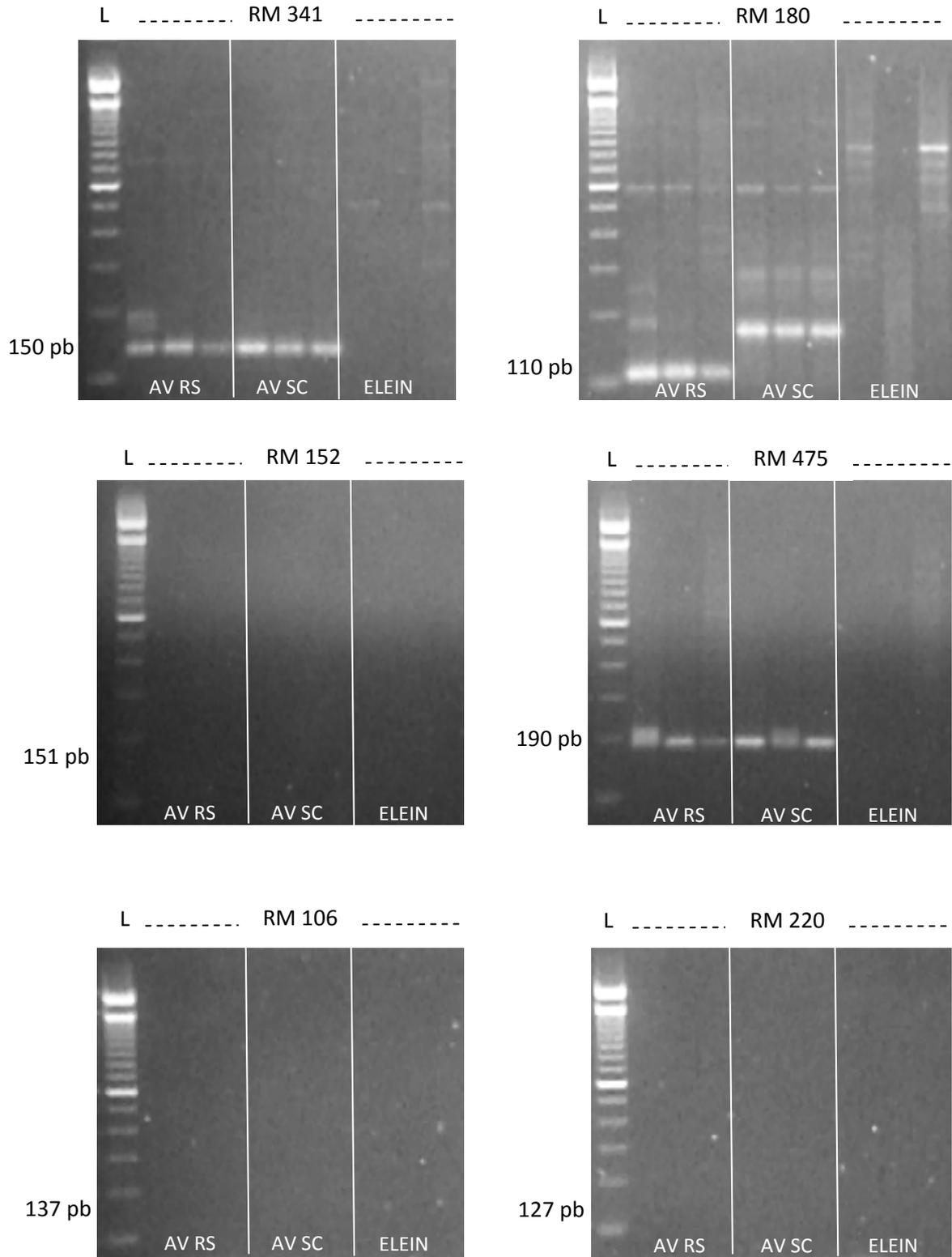


Figura 1. continuação. Marcadores moleculares SSR em arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) coletado no Rio Grande do Sul e Santa Catarina e em capim-pé-de-galinha (*Eleusine indica* (L) Gaertn). L: marcador de peso molecular que amplifica de 100 em 100 pb; pb: Pares de Bases.

Os marcadores SSR testados em ELEIN não resultaram em variabilidade genética. Porém, em trabalho de seleção de marcadores SSR para análise de fluxo gênico realizado a

partir de 51 marcadores SSR, foram selecionados quatro marcadores que detectaram polimorfismo entre arroz vermelho e arroz cultivado (Brunes *et al.*, 2007). Marcadores SSR são capazes de identificar fluxo gênico. De fato, a distância máxima encontrada entre a planta de arroz vermelho doadora de pólen e uma planta de arroz cultivado que produziu sementes híbridas foi de 10 m.

Para o acesso da variabilidade genética nas espécies estudadas é necessário o teste com maior número de marcadores ou ainda, maior número de biótipos de diferentes regiões. Este tipo de marcadores poderiam ser empregados para melhorar a precisão das estimativas de polinização cruzada em plantas daninhas autógamas bem como auxiliar a descoberta de mecanismos de resistência aos herbicidas.

#### Literatura citada

BAERSON, S. R.; RODRIGUEZ, D. J.; TRAN, M.; FENG, Y.; BIEST, N. A.; DILL, G. M. Glyphosate-Resistant Goosegrass. Identification of a Mutation in the Target Enzyme 5-Enolpyruvylshikimate-3- Phosphate Synthase. **Plant Physiology**, v.129, p. 1265, 2002.

BRUNES, T. O.; RANGEL, P. H. N.; BRONDANI, R. P. V.; MOURA NETO, F.; NEVES, P. C. F.; BRONDANI, C. Fluxo gênico entre arroz vermelho e arroz cultivado estimado por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, 37, n.2, p.86-92, 2007.

CHIN, H. F. Weed seed a potential source of danger. In L.T. Kwee, ed. **Proceedings of the Plant Protection Seminar**. Kuala Lumpur, Malaysia: Malaysian Plant Protection Society, p.115-119, 1979.

DIDA, M. M. *et al.* The genetic map of finger millet, *Eleusine coracana*. **Theor. Appl. Genet.**, v.114, p.321–332, 2007.

GRESSEL, J.; SEGEL, L.A. The paucity of plants evolving genetic resistance to herbicides: possible reasons and implications. **Journal Theor. Biol.**, v.75, p.349–371, 1978.

HABERER, G.; FISCHER, T. C.; TORRES-RUIZ, R. A. Mapping of the Nucleolus Organizer Region on Chromosome 4 in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular and General Genetics**, v. 250, n.1, p.123-128, 1996.

HEAP, I. (2010) **International Survey of Herbicide-resistant Weeds**. Disponível em: <<http://www.weed science.org>>. Acesso em 12 fev. 2010.

MAGALHÃES Jr., A. M. *et al.* Avaliação do fluxo gênico entre arroz transgênico, cultivado e arroz-vermelho. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO**, v.24, 2001, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: SOSBAI, 2001. p. 768-771

McCOUCH, S.R. *et al.* Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, v.35, p.89-99, 1997.

McCOUCH, S.R. *et al.* Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Research**, v.9, p.199-207, 2002.

MYSORE, K. S.; BAIRD, V. Nuclear DNA content in species of Eleusine (Graminae): a critical re-evaluation using laser flow cytometry. **Plant Syst. Evol.**, v.207, p.1–11,1997.

OLUFOWOTE, J. O. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.). **Genome**, v.40, p.370-378, 1997.

VAUGHAN, L. K.; OTTIS, B. V.; PRAZAK-HAVEY, A. M.; SNELLER, C.; CHANDLER, J. M.; PARK, W. D. Is all red rice found in commercial rice really *Oryza sativa*? **Weed Science**, Champaign, v.9, n.4, p.468-479, 2001.