

SELEÇÃO DE PRIMERS DE RAPD PARA ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Conyza sp.*

BASSI¹, D.; SOARES², A. A. F.; OLIVEIRA-COLLET³, S. A.; OLIVEIRA JR⁴, R.S.; FREGONEZI⁵, A. M. D. T. MANGOLIN⁶, C. A.

- 1 Universidade Estadual de Maringá (DBC); 3253-6984; denis_bassi16@hotmail.com;
- 2 Universidade Estadual de Maringá (DBC); 3028-3424; professortoid@bol.com.br;
- 3 Universidade Estadual de Maringá (DBC); 3011-4681; saocollet@uem.br;
- 4 Universidade Estadual de Maringá (DAG); 3261-4316; rsojunior@uem.br;
- 5 Universidade Estadual de Maringá (DBC); 3011-4681; angelkil8@hotmail.com;
- 6 Universidade Estadual de Maringá (DBC); 3011-4681; camangolin@uem.br

Resumo

Com aproximadamente 50 espécies de *Conyza* descritas, *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* são consideradas as de maior impacto negativo na agricultura. Conhecidas como “buva”, essas duas espécies infestam áreas abandonadas, culturas perenes e lavouras anuais. Enquanto *C. bonariensis* apresenta folhas de margens inteiras (não-denteadas) e presença de ramos laterais que ultrapassam a inflorescência, a *C. canadensis* apresenta ampla panícula terminal no ramo principal e as margens das folhas são finamente denticulada. O número cromossômico encontrado em *C. canadensis* foi $2n=18$, enquanto as demais espécies são polipóides. A dificuldade na diferenciação e a ocorrência de biótipos resistentes aos herbicidas indicam que o conhecimento da variabilidade genética parece ser um aspecto importante para orientar o manejo diferencial e o desenvolvimento de métodos efetivos de controle destas espécies de plantas daninhas. O uso de marcadores genéticos baseados na análise direta da molécula de DNA detecta alto nível de polimorfismo e permite acesso a uma ampla região do genoma. Estes marcadores são poderosas ferramentas para discriminar variações intra-específicas e para estudar a relação evolutiva. O primeiro passo para o emprego destes marcadores é a seleção dos *primers* mais adequados. Foram testados 93 *primers*, destes, 44 apresentaram boa amplificação, destes 18 foram selecionados, por apresentarem maior número de fragmentos e serão utilizados para estudo de diversidade genética em *Conyza*.

Palavras-Chave: Primers, *Conyza*, Buva, Diversidade Genética.

Abstract

With approximately 50 described species of *Conyza*, *Conyza canadensis* and *Conyza bonariensis* are considered of biggest negative impact in agriculture. Known as “buva”, these two species infest abandoned areas, perennial crops and annual farmings. While *C. bonariensis* presents leaves of margins entire (not-denticulate) and presence of lateral branches exceeding the inflorescence, the *C. canadensis* presents ample panicle terminal in the main branch and the margin of the leaves are finely denticulate. The chromosome number found in *C. canadensis* was $2n=18$, while the others species are polyploids. The difficulty in the differentiation and the occurrence of resistant biotypes to herbicides indicates that the knowledge of the genetic variability seems to be an aspect important to guide the differential management and the development of effective methods of control of these species of weeds. The use of genetic markers based on direct analysis of the DNA molecule detects high level of polymorphism and allows access to a wide region of the genome. These markers are powerful tools to discriminate intra-specific variations and to study the evolutionary relationship. The first step in the use of these markers is selection of appropriate primers. 83 *primers* were tested, of these, 44 showed good amplification and 18 were selected due to their larger number of fragments and will be used for the study of genetic diversity in *Conyza*.

Key Words: Primers, *Conyza*, Buva, Genetic Diversity.

Introdução

O gênero *Conyza* inclui aproximadamente 50 espécies, distribuídas em quase todo o mundo (Kissmann e Groth, 1999). As espécies que mais se destacam, por seu caráter negativo, são a *Conyza bonariensis* (L.) (ERIBO, buva) e *Conyza canadensis* (L.) (ERICA, buva), ambas são espécies da família Asteraceae. No Brasil estas duas espécies são conhecidas popularmente como buva ou voadeira. A primeira espécie é nativa da América do Sul e ocorre em abundância na Argentina, no Uruguai, no Paraguai e no Brasil, ela ocupa mais intensamente as regiões Sul, Suldeste e Centro-Oeste. Esta espécie também está presente na Colômbia e na Venezuela infestando as lavouras de café (Kissmann e Groth, 1999). A *Conyza canadensis*, porém, é nativa da América do Norte (Frankton e Mulligan, 1987), sendo uma das espécies mais amplamente distribuída no mundo (Thebaud e Abbott, 1995). Esta é uma espécie cosmopolita, sendo encontrada em regiões temperadas do hemisfério sul, mas é pouco freqüente em regiões tropicais (Kissmann e Groth, 1999); ela está presente em quase todas as regiões do Canadá (Rouleau e Lamoureux, 1992), Estados Unidos (USDA, 1970), oeste da Europa e planície Mediterrânea (Thebaud e Abbott, 1995), Austrália e Japão (Holm et al., 1997). No Brasil, sua presença é significativa em campos nativos e em lavouras, especialmente da região sul (Kissmann e Groth, 1999).

Segundo Bhowmik e Bekech, (1993), *C. bonariensis* e *C. canadensis* são espécies extremamente prolíficas, formando densas infestações devido a uma elevada produção de sementes. O número de sementes viáveis produzidas por plantas pode variar de 110.000 para *C. bonariensis* até 200.000 para a *C. canadensis* (Wu e Walker, 2006). Estas espécies se estabelecem em diversas condições climáticas. São plantas que apresentam boa adaptabilidade em sistemas conservacionistas de solo, como: plantio direto, cultivo mínimo e área de fruticultura. As espécies *C. bonariensis* e *C. canadensis* destacam-se por infestarem áreas abandonadas (terrenos baldios e margens de estradas), pastagens, culturas perenes (citros e café) e lavouras anuais (algodão, milho, soja e trigo) (Thebaud e Abbott, 1995). Em termos mundiais, estas espécies daninhas infestam mais de 40 culturas (Holm et al. 1997). Bruce e Kells (1990) relataram que uma população de *C. canadensis*, com uma densidade de 150 plantas m², reduziu em até 90% a produtividade de grãos de soja em semeadura direta. Mas a identificação correta das duas espécies é importante para que seja feita a escolha da melhor estratégia de controle, diminuir a seleção de biótipos resistentes através do uso repetitivo de herbicidas detentores do mesmo mecanismo de ação e identificar o mecanismo de resistência que está envolvido em cada espécie.

Devido a dificuldade em controlar estas espécies, especialmente através do método químico, e devido ao aparecimento de populações de biótipos resistentes aos herbicidas, as práticas de manejo de buva requerem a combinação de múltiplas ações, como: aumento da intensidade de manejo do solo, uso rotineiro de rotação de culturas e adoção de técnicas culturais apropriadas (Lazaroto et al 2008). A resistência das plantas daninhas aos herbicidas é definida pela FAO, como a ocorrência de biótipos com habilidade de sobreviver e se reproduzir após a aplicação de doses destes compostos químicos (herbicidas), que seriam letais para a população original (suscetível) da mesma espécie (LeBaron e Gressel, 1982; Christoffoleti e López-Ovejero 2004). A resistência de plantas daninhas aos herbicidas é um fenômeno natural que ocorre espontaneamente em suas populações, não sendo, portanto, o herbicida o agente causador, mas sim o selecionador de indivíduos resistentes que se encontram em baixa freqüência inicial (Christoffoleti et al., 1994). No Brasil vários autores já relataram biótipos resistentes ao glifosato para ambas as espécies (Christoffoleti et al., 2006; Montezuma et al., 2006; Moreira et al., 2006), e só para *Conyza bonariensis* (Vargas et al., 2007). No Rio Grande do Sul, Lamego e Vidal (2008) confirmaram a presença de biótipos das duas espécies que são resistentes ao glifosato. Por isso, a proposta do presente estudo é padronizar os procedimentos de análise de seqüências genômicas utilizando marcadores RAPD para posterior estimativa da diversidade genética e o nível de diferenciação entre as populações de *Conyza bonariensis* e *C. canadensis* distribuídas em diferentes regiões do estado do Paraná. Estas informações poderão orientar o manejo e o controle das populações destas duas espécies de plantas daninhas que crescem em culturas de importância econômica.

Material e Métodos

➤ Extração do DNA

As folhas de *Conyza* foram coletadas em Floresta, Iguatemi, Ourizona e São Jorge do Ivaí no Paraná, foram identificadas, armazenadas em sacos de sombrite e mantidas em gelo desde a coleta até

o laboratório, onde foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -80°C até o momento de extração de DNA. Para a extração de DNA, foram utilizadas folhas de 56 plantas. A extração foi realizada seguindo o procedimento descrito por Doyle e Doyle (1991).

Para quantificar o DNA extraído e avaliar a sua integridade, os DNAs das amostras de *Conyza* e soluções de DNA de fago λ de concentrações conhecida (50, 100, 150, 200 e 250 ng), foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8 % preparado com tampão TAE com concentração 1X pH 8,0 (0,04 M Tris-acetato e 0,001 M EDTA) (Hoisington et al., 1994), sob voltagem de 80 V. Para a visualização, o gel foi corado em banho de Brometo de Etídio preparado com 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em seguida, o gel foi fotografado sob luz UV, utilizando o programa KODAK 1D 3.5.

➤ Teste de primers

Como base para a amplificação, foi utilizado o protocolo original descrito por Williams et al. (1990). As reações de amplificação para os ensaios de RAPD foram realizadas em um termociclador Techne TC-512 e preparadas em microtubos de 0,2 mL para um volume final de reação de 20 μL . Para a reação, foram utilizados 20 ng de DNA genômico, 2,5 mM de MgCl_2 , com 0,2 μM de *primer*, 1 U de *Taq-DNA polimerase* (Invitrogen), tampão de reação (Invitrogen) 1 X, 0,1 mM de cada dNTP e água mili-Q autoclavada qsp. A desnaturação do DNA foi feita em 96°C por cinco minutos, seguida por 45 ciclos de amplificação (94°C por 45 s, 35°C por 60 s, 72°C por 90 s). Após os 45 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 min em 72°C . Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose 2% usando tampão TBE 0,5X pH 8,0 (0,045 M Tris-borato, 0,001 M EDTA). A eletroforese foi realizada por aproximadamente 5 horas com 60 Volts. Os géis foram corados com banho de brometo de etídio e a imagem capturada com *Ultraviolet Transilluminador High Performance-Edas 290*, utilizando o programa Kodak 1D 3.5. Para definir o tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular 1Kb DNA *Ladder* (Invitrogen). Para a seleção dos marcadores foram avaliados 83 *primers* para RAPD pertencentes a diferentes Kits: A (1-20), B (1-20), C (1-20), F (5, 9, 13), I (5), L (11), M (1-10) e P (2, 4, 7-11 e 17), desenvolvidos pela *Operon Technologies Inc.* Dentre eles, foram selecionados aqueles que apresentaram bandas bem fracionadas e nítidas no gel de agarose após as amplificações realizadas com uma amostra de cada variedade.

Resultados e Discussão

A análise em gel de agarose 0,8% (Figura 01), permitiu a verificação da integridade e a determinação da quantidade de DNA extraído para cada uma das amostras das plantas de *Conyza*. A quantificação foi realizada através de comparação das bandas das diferentes plantas coletadas com as do DNA fago λ , de concentrações já conhecidas.

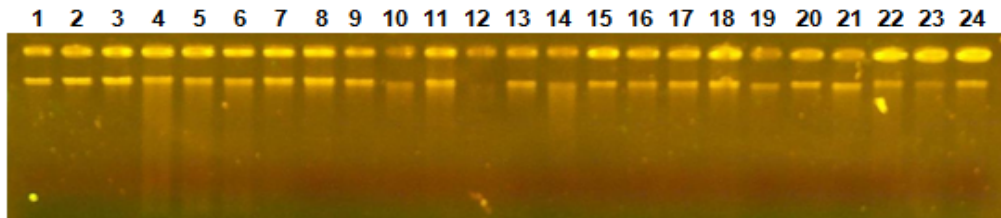


Figura 01. Gel de agarose 0,8%, utilizado para avaliar e quantificar as amostras de DNA. Amostras 1, 2 e 3 correspondem ao DNA fago λ , com concentrações conhecidas (50, 100 e 150 ng respectivamente). As amostras de 4 a 24 são DNAs extraídos de diferentes plantas *Conyza sp.* coletadas em diferentes propriedades, localizadas na região Noroeste do Paraná.

No total, 83 *primers* foram testados e destes 18 foram selecionados (OPA - 1, 4, 7, 11; OPB - 7, 8, 10, 12, 18; OPC - 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 19, 20). Estes *primers* foram selecionados para posterior análise do genoma das plantas de *Conyza*. A seleção foi realizada em função do maior número de fragmentos. Outro fator que influenciou na escolha dos primers, foi a reprodutibilidade dos fragmentos

amplificados. Carvalho e Vieira (2001) citam que a quantidade de DNA íntegro em relação ao *primer* é um dos fatores fundamentais para o sucesso da reação de PCR, uma vez que poderá não ocorrer amplificação se a sua quantidade for excessivamente baixa ou alta. Na figura 02 podemos visualizar o padrão de amplificação de 3 amostras de DNA de *Conyza*, esta amplificação foi realizada com 8 diferentes *primers* (OPA-01; OPA-02; OPA-03; OPA-09; OPA-05; OPA-06; OPA-07 e OPA-08). As amostras de DNA de 7 a 9 foram amplificadas com o *primer* OPA-03, e as amostras de 10 a 12 com o *primer* OPA-09. Estas amplificações produziram de 1 a 3 fragmentos, estes são pouco informativos, portanto estes *primers* não foram selecionados para a análise de diversidade genética. Os demais *primers* testados produziram até 10 fragmentos, portanto são bastante informativos.

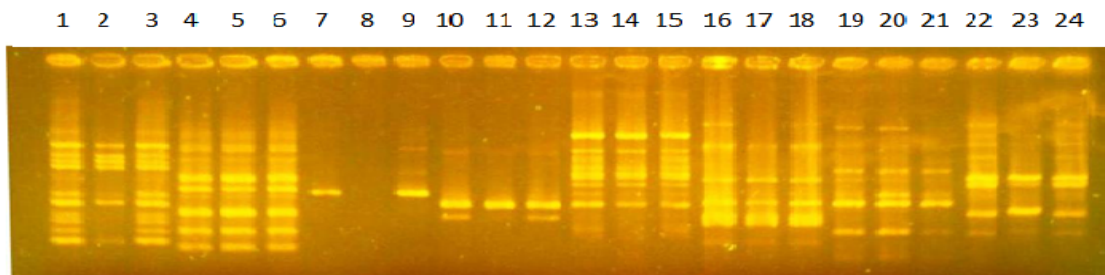


Figura 02. Gel de agarose 1,7%, utilizado para avaliar os *primers* OPA. As amostras de 1 a 3 correspondem ao DNA amplificado com o *primer* OPA-01; 4 a 6 DNA amplificado com o *primer* OPA-02; 7 a 9 DNA amplificado com o *primer* OPA-03; 10 a 12 DNA amplificado com o *primer* OPA-09; 13 a 15 DNA amplificado com o *primer* OPA-05; de 16 a 18 DNA amplificado com o *primer* OPA-06; de 19 a 21 DNA amplificado com o *primer* OPA-07 e de 22 a 24 são DNAs amplificados com o *primer* OPA-08.

Uma seleção prévia dos *primers* que deverão ser utilizados para a análise de diversidade genética de uma população é um passo importante. Como a seqüência de nucleotídeos dos *primers* de RAPD reconhecem seqüências arbitrárias a etapa de teste e seleção, torna-se essencial antes de utilizá-los para avaliar todas as amostras da população, evitando assim o uso de *primers* que não amplificam ou que geram poucos fragmentos e baixo polimorfismo, dificultando o estudo da variabilidade genética presente em determinada espécie.

Literatura Citada

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Dna polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic acids research**, v.18, n.22, p. 6531-6535, 1990.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Definições e situação da resistência de plantas daninhas aos herbicidas no Brasil e no mundo. In: CHRISTOFFOLETI, P. J. (Coord.). **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**. 2.ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a Resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), p. 3-22, 2004.

FRANKTON, C.; MULLIGAN, G.A. **Weeds of Canada** (revised). Toronto: NC, 1987. 217p.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo. Basf, 798p. 1992.

BHOWMIK, P. C.; BEKECH, N. N. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence, and distribution in no-tillage and conventional-tillage corn and conventional tillage corn (*Zea mays*), **Agron. Trends Agric. Sci.**, v. 1, p. 67-71, 1993.

- LAMEGO, F.P. e VIDAL, R.A. RESISTÊNCIA AO GLYPHOSATE EM BIÓTIPOS DE *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL. Resistance to Glyphosate in *Conyza bonariensis* and *Conyza canadensis* Biotypes in Rio Grande do Sul, Brazil. **Planta Daninha**, v. 26, p. 467-471, 2008.
- LEBARON, H. M.; GRESSEL, J. **Herbicide resistance in plants**. New York: Wiley-Interscience Publications, 1982. 401 p.
- MONTEZUMA, M. C. et al. Avaliação da suspeita de buva (*C. bonariensis* e *C. canadensis*) ao herbicida glyphosate em pomares de citros no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25., 2006, Brasília. **Resumos... Londrina: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**, p. 564, 2006.
- HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ-LÉON, D. Laboratory Protocols: **CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory**. Second Edition, Mexico, D.F.: CIMMYT, 50p. 1994.
- ROULEAU, E.; LAMOUREUX, G. **Atlas of the vascular plants of the island of Newfoundland and of the islands of Saint-Pierre-et-Miquelon**. Quebec: Groupe Fleurbec, 1992. 777p.
- WU, H.; WALKER, S. Fleabane: Fleabane biology and control. Disponível em: <<http://www.weeds.crc.org.au/documents/fleabane.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2006. BRUCE, J. A.; KELLS, J. J. **Horseweed (*Conyza canadensis*) control in no-tillage soybeans (*Glycine max*) with preplant and preemergence herbicides**. Weed Technology, Champaign, v.4, n.3, p.642-647, 1990.
- CARVALHO, A.O.R. **Análise da variabilidade genética e identificação de espécies do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) por meio de marcadores moleculares**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000. 134p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).
- HOLM, L. G. et al. **World weeds: natural histories and distribution**. Toronto: Wiley, 1997, p.226-235.
- LAZAROTO et al. **Biologia e ecofisiologia da buva (*Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*)**. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, p. 852-860, mai-jun, 2008.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- MOREIRA, M.S. et al. **Resistência da buva (*Conyza bonariensis*) ao herbicida glyphosate em pomares de citros do Estado de São Paulo**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25., 2006, Brasília. Resumos...Londrina: SBCPD, 2006. p.554-555.
- THEBAUD, C. ; ABBOTT, R. J. **Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europa: quantitative trait and isozyme analysis**. American Journal of Botany, Columbus, v.82, n.3, p. 360-368, 1995.
- VARGAS, L. et al. **Resistência de *Conyza bonariensis* ao herbicida glyphosate**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 25., 2006, Brasília. Resumos...Londrina: SBCPD, 2006. p540.