



ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ACESSOS DE *Conyza sp* COLETADOS EM DIFERENTES MUNICÍPIOS DO PARANÁ

Tauana Gibim Eisele (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Sandra Aparecida de Oliveira Collet (Orientadora), e-mail: tauanagibim@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas /Maringá, PR

Genética- Genética Vegetal

Palavras-chave: *conyza sp*, microssatélite, diversidade genética

Resumo:

O gênero *Conyza* contém aproximadamente 50 espécies conhecidas, as quais se distribuem em quase todo o mundo, as espécies que mais se destacam, por seu caráter negativo são *Conyza bonariensis*, *sumatrensis*, e *canadensis*. Esse gênero é, evidentemente, propenso para evoluir genótipos que apresentam resistência a diferentes tipos de herbicidas. O conhecimento da diversidade genética pode orientar o manejo diferencial e o desenvolvimento de métodos efetivos de controle das espécies de *Conyza* aumentando a eficiência e diminuindo a aplicação de herbicidas, determinando assim menores danos ao meio ambiente, e um controle acertado destas plantas garantirá uma maior produção. O presente estudo teve como objetivo estimar a diversidade genética de diferentes acessos de *Conyza sp* coletados em diferentes municípios do estado do Paraná, utilizando microssatélites como marcadores moleculares. As análises dos dez locos de microssatélites em 350 amostras de plântulas de *Conyza spp* de diferentes localidades resultaram na amplificação de 41 alelos, com uma média de 4,1 alelos por loco polimórfico. O polimorfismo entre as amostras variou entre 30% a 100%. E para os resultados de FIS, o loco *HW29*, apresentou valor negativo (-0,8835), indicando um excesso de heterozigotos. Os demais locos apresentaram valores positivos e a média para o FIS foi de 0,3887. O alto valor do FST (0,3741) das 35 amostras de *Conyza spp* coletadas no estado do Paraná indicou uma alta divergência genética.

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 e 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.

A alta variabilidade genética dentro de populações de plantas daninhas pode indicar uma significativa quantidade de variação para escapar dos efeitos do agente de controle, e também pode favorecer a seleção de genótipos resistentes (Allendorf e Luikart, 2007).

Os microssatélites, ou locos SSR, têm sido usados para avaliar polimorfismos de DNA, em estudos com finalidades diferentes, e em diversas espécies de plantas, incluindo espécies de plantas daninhas (GOULART et al., 2011).

Materiais e métodos

As sementes de *Conyza* sp foram coletadas em janeiro de 2014 nos municípios de Luiziana (amostra 1), Janiópolis (amostra 2), Goioerê (amostra 3), Mariluz (amostra 4), Rancho Alegre D'Oeste (amostra 5), São João do Ivaí (amostra 6), Quinta do Sol (amostra 7), Alto Piquiri (amostra 8), Toledo (amostra 9), Marechal Candido Rondon (amostra 10), Guaíra (amostras 11 e 12), Palotina (amostras 13 e 14), Brasilândia do Sul (amostra 15), Francisco Alves (amostra 16), Maringá (amostra 17), Céu Azul (amostra 18), Ouro Verde do Oeste (amostras 19 e 20), Lindoeste (amostra 21), Londrina (amostras 22 e 23), Sertãozinho (amostra 24), Bela Vista do Paraíso (amostra 25), Cambé (amostra 26), Mamborê (amostras 27 e 28), Pato Branco (amostra 29), Cambira (amostra 30), Francisco Beltrão (amostra 31), Santa Helena (amostra 32), Tamboara (amostra 33), Assaí (amostra 34) e Rolândia (amostra 35) no estado do Paraná. E as mesmas sementes foram semeadas em vasos separados de 500 mL contendo solo estéril e mantidas à temperatura ambiente em casa de vegetação no CTI (Centro de Treinamento e Irrigação) da Universidade Estadual de Maringá e irrigadas diariamente, após 30 dias de germinação as plantas foram coletadas, congeladas com nitrogênio líquido e mantidas em ultra freezer a -80°C.

Para a extração de DNA 50 mg de folha foram trituradas utilizando nitrogênio líquido. A etapa de extração de DNA seguiu o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações (Cullings, 1992). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro UV-visível modelo Picodrop®.

Para a amplificação dos locos de microssatélites foram utilizados 10 pares de *primers* de microssatélites: HW02, HW04, HW06, HW21, HW27, HW29, HWSSR01, HWSSR03, HWSSR04, HWSSR09. As reações foram preparadas em placas multiplex, sendo utilizado para a reação 2 ng de DNA, tampão de reação 1X (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM de KCl), 2 mM de MgCl₂, 1 mM de cada dNTP, 1U de Taq-DNA Polimerase, 0,4 µM de cada um dos primers Forward e Reverse específicos e água mili-Q para um volume final de 20 µL de solução.



Após a amplificação as amostras foram aplicadas em gel de agarose 4%. A revelação foi em Brometo de Etídio (0,5 $\mu\text{g/mL}$), em seguida, o gel foi fotografado sob luz UV, usando um fotodocumentador L-Pix HE (Loccus) utilizando o software L-Pix Image.

Para analisar o número de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade média observada (H_o) e esperada (H_e) foi utilizado o programa POPGENE 1.32.

Resultados e Discussão

A metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990) e modificado por Cullings (1992) foi eficiente para produzir DNA de qualidade para a amplificação com os primers de microssatélites, e os resultados destas amplificações foram reproduzíveis.

As análises de dez locos de microssatélites em 350 plântulas *Conyza* spp de trinta diferentes localidades resultaram na amplificação de 41 alelos, com uma média de 4,1 alelos por loco polimórfico. O primer HWSSR01 apresentou o maior número de alelos (6). Cinco alelos foram identificados usando os primers HW02, HW21, quatro alelos usando os primers HW04, HW06, HW27, HWSSR03 e HWSSR04, três alelos com o primer HWSSR09. O primer HW29 apresentou o menor número de alelos (2) Para o loco de microssatélite *HWSSR01* foi observado alelos nulos, isto é, após quatro tentativas de amplificação não foi observado o produto da amplificação. Esta ausência de amplificação deve ocorrer em função de alterações nas regiões complementares aos *primers* de microssatélite. Foram observados alelos nulos para plantas de 11 amostras sendo que a frequência deste alelo variou de 0,1000 (amostras 2, 9, 12, 18, 22, 35) a 0,7000 (amostra 29). A frequência global de alelos nulos para as 35 amostras foi de 0,0629.

O polimorfismo entre as 35 amostras analisadas variou de 30% a 100%. As amostras com maior polimorfismo foram: 2, 3, 4, 6, 10, 12, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 32 e 35 com 100% dos locos polimórficos. A amostra com menor polimorfismo foi a 27 com 30% de locos polimórficos. A média da heterozigosidade esperada estimada pelo índice de Nei, para todas as populações foi de 0,6012, e a média da heterozigosidade observada (H_e) foi de 0,2300.

O déficit de heterozigotos também foi indicado pelos valores positivos para o coeficiente de endogamia (FIS). O loco *HW29*, foi o único que apresentou FIS negativo (-0,8835), indicando um excesso de heterozigotos. Os demais locos apresentaram valores positivos e a média para o FIS foi de 0,3887. As amostras apresentaram uma alta divergência genética, evidenciado pelo elevado valor de F_{ST} (0,3741). De acordo com Wright (1978), valores de F_{ST} maiores do que 0,25 são encontrados quando as populações comparadas são altamente divergentes.



Conclusões

Os marcadores microssatélites foram adequados para a avaliação da diversidade genética em *Conyza* spp; revelando um polimorfismo entre 30 a 100% entre as amostras.

O nível relativamente elevado de diferenciação detectado entre as amostras de *Conyza* spp, sugere que estas formam populações geneticamente estruturadas.

Agradecimentos

A Deus por tudo. A minha orientadora Sandra Ap. de Oliveira Collet, pela dedicação e competência. Ao Maycon Bevilaqua pela colaboração na execução dos experimentos. E a Fundação Araucária pela bolsa concedida.

Referências

ALLENDORF, F.W. e LUIKART, G. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell. at Amazon, 2., 2007. p. 642

CULLING, K.W. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. **Molecular Ecology** 1, 1992. p. 233-240.

DOYLE, J.J. e DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, v. 12, n. 2, p. 13-15, 1990.

GOULART, I.C.G.R.; MEROTTO Jr., A.; NUNES, A.L. e BERED, F. Otimização da utilização de marcadores moleculares microssatélites e sua aplicação em estudos com plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 1175-1181, 2011.

KISSMANN, K. G. e GROTH, D. (1999) Plantas infestantes e nocivas. (2). São Bernardo do Campo: BASF.

WRIGHT, S. (1978). Evolution and Genetics of Populations. Chicago: **University of Chicago**, 1978. p. 511