

AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *ERAGROSTIS PLANA* NEES (CAPIM-ANNONI-2) EM POPULAÇÕES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL – RESULTADOS PARCIAIS

GENETIC VARIABILITY EVALUATION OF *ERAGROSTIS PLANA* NEES (GRASS ANNONI-2) IN RIO GRANDE DO SUL POPULATIONS - PARTIAL RESULTS

Larissa Luisa Schumacher², Juliana Schaefer³, Solange Tedesco⁴, Naylor Bastiani Perez⁴ e Liliana Essi⁴

²Aluna de Graduação do Curso de Zootecnia–Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail larischumacher@hotmail.com

³ Mestranda do Programa de Pós -Graduação em Botânica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, e-mail: julianaschaeferbio@gmail.com

⁴ Professora, doutora e pesquisadora Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Biologia. Av. Roraima, 1000, prédio 16, sala 3255. Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS. CEP 97105-900, e-mail:solatedesco@yahoo.com.br

⁴Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Pecuária Sul). Rodovia BR-153, Km 603, Vila Industrial, Zona Rural, Caixa Postal 242, Bagé, RS CEP 96401-970, e-mail:naylor.perez@embrapa.br

⁴Professora, doutora e pesquisadora da Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Biologia. Av. Roraima, 1000, prédio 16, sala 3255. Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS. CEP 97105-900, e-mail: lili.essi@gmail.com

Resumo: *Eragrostis plana* Nees é um gênero africano de gramínea, o qual apresenta graves problemas por comportar-se uma planta invasora, de fácil disseminação, além de ser uma gramínea que demonstra competição com as espécies campestres nativas, contribuindo com a perda da biodiversidade do Bioma Pampa. O presente estudo tem por objetivo compreender a estrutura genética e determinar sua variabilidade intra e inter-populacional. Para isso, estão sendo utilizados marcadores de DNA denominados ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) que detectam polimorfismo genético. Foram testados 11 *primers*, e incluídos no estudo 100 indivíduos de 5 populações do Rio Grande do Sul. Destes, 3 *primers* foram selecionados até o momento, os quais apresentaram polimorfismo e repetibilidade. Em média, para os indivíduos analisados até agora, os *primers* geraram 3 bandas distintas. Dois *primers* apresentaram 100% de loci polimórficos, enquanto um apresentou 80% de polimorfismo.

Palavras-chave: gramíneas, invasoras, polimorfismo, ISSR, marcador molecular

Abstract: *Eragrostis plana* Nees is an African genus of grass, which presents serious problems for behaving an invasive plant, easy to spread, and is a grass that demonstrates competition with native species, contributing to the loss of Pampa biome biodiversity. This study aims to understand the genetic structure and determine its intra- and inter-population variability. For this, they are being used DNA markers called ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) that detect genetic polymorphism. They tested 11 primers, and included in the study 100 individuals from four Rio Grande do Sul populations. Of these, 3 primers were selected until now, which showed polymorphism and repeatability. On average, for individuals analyzed so far, the primers generated three distinct bands. Two primers showed 100% of polymorphic loci, while one showed 80% polymorphism.

Keyword: grass, weeds, polymorphism, ISSR, molecular marker

Introdução

O capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees, *Poaceae*) é uma gramínea exótica e invasora, introduzida acidentalmente da África para o estado do Rio Grande do Sul (RS) na década de 1950 juntamente com remessas de sementes de *capim-rhodes* (*Chloris gayana*) ou *capim-chorão* (*E. curvula*). Mais tarde, foi encontrada na Estação Experimental de Tupaciretã e na fazenda Sarandí no município de Santa Maria.

Com o passar dos anos, foi sendo considerada uma “praga” nos campos sul-brasileiros, por apresentar características de alta prolificidade, uma grande rusticidade, elevada resistência à tração mecânica, baixo valor bromatológico, índice inferior de digestibilidade por apresentar altos teores de lignina na sua estrutura, afetando negativamente a vida útil da arcada dentária e a produção animal. Além disso, seu impacto negativo na dificuldade do seu controle, na perda da riqueza de espécies, na diminuição da biodiversidade do Bioma Pampa vem causando impactos ambientais, sociais e econômicos.

NITER (1965) & ROBERTS (1973), ambos da África do Sul, descreveram aspectos botânicos desta espécie perene: colmos com 30 a 100 cm de altura, eretos ou suberetos, agrupados em densas e fortes touceiras, e com inflorescência em panícula interrompida com as glumas muito separadas, as sementes são lateralmente comprimidas (1,4 a 1,5 mm), de cor marrom-escura, com superfície intumescida quando maduras. Esta gramínea possui a capacidade de resistir a pastejos e pisoteios, e apresenta grande poder de disseminação. Estima-se, segundo Medeiros et al. (2004), que aproximadamente 20% da vegetação campestre do Rio Grande do Sul encontra-se infestada com capim-annoni-2, o que corresponde a uma área de 3,1 milhões de hectares.

Diversos estudos passaram a ser conduzidos visando ao controle dessa espécie, mas ainda não há estudos sobre a genética e estrutura populacional da espécie no Brasil. Devido a estes problemas, o presente estudo tem como objetivo compreender a estrutura genética de populações de capim-annoni-2 no estado do Rio Grande do Sul, avaliando a variabilidade genética intra e inter-populacional através do uso de marcadores moleculares do tipo ISSR.

Os marcadores ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*) são marcadores produzidos por amplificação por PCR (reação de Cadeia de Polimerase) com primers (iniciadores) que anelam em regiões de microssatélites (SSRs). Os ISSRs são marcadores ditos dominantes, que apresentam abundante polimorfismo e repetibilidade superior aos marcadores RAPD. Não requerem conhecimento prévio do genoma e seu custo é relativamente baixo, comparando-se com outras técnicas de Biologia Molecular. Através desses marcadores será possível verificar o grau de polimorfismo genético em populações de capim-annoni, e sua estruturação e distância genética, o que deverá contribuir na compreensão de sua biologia nas áreas invadidas por essa espécie.

Materias e Métodos

O projeto está sendo conduzido no Laboratório de Genética do Departamento de Biologia da UFSM, em parceria com a EMBRAPA/Bagé. Foram coletadas amostras a campo de folhas de *E. plana* de dois municípios da região central do RS (Santa Maria e São Pedro do Sul). As amostras foram desidratadas em sílica gel, e em laboratório foi extraído DNA total das amostras, utilizando o procedimento descrito em Doyle & Doyle (1987), adaptado para tubos de microcentrífuga. Também foram testadas extrações de DNA com plantas mantidas em casa de vegetação, coletadas em outros três municípios do estado (Mostardas, Bagé e Tupaciretã), utilizando o mesmo protocolo, porém com material fresco. Assim, totalizou-se a amostragem de cinco populações.

O DNA isolado foi dosado através de comparação com um padrão (diluições do DNA do fago lambda) em gel de agarose 0,8%, corado com GelRed e visualizado em transiluminador-UV. Para a amplificação dos ISSRs, foram realizadas reações em volumes finais de 25µl, contendo 20-25ng de DNA total, 0,25 µl Taq DNA Polimerase (5U/ul), 2,3 µl MgCl₂ (25mM), 2,5 µl de tampão 10×, 1 µl primer 10 pmol, 1 µl de mistura de dNTPs 40 mM (cada dNTP a 10mM), 1 µl DMSO (2%), e água ultra-pura esterilizada. A amplificação foi realizada em termociclador Minicycler, em 40 ciclos de 1 min. a 94°C, 45 seg. a 50°C e 2 min. a 72°C, precedidos de um ciclo de 5 min. a 92°C e completados com um ciclo de extensão final de 5 min. a 72°C. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,5%, visualizados em transiluminador-UV e fotografados com máquina digital, para posterior análise dos padrões.

A análise preliminar do polimorfismo e índices de diversidade foi realizada no software GenAlEx.

Resultado e discussão

O DNA total foi extraído com sucesso para 100 amostras de cinco populações distintas. Os indivíduos das populações de Tupaciretã e de Bagé foram os primeiros a ser incluídos nos ensaios. Foram testados 11 *primers*. Destes, três resultaram em bandas polimórficas e reprodutíveis para os indivíduos de Tupaciretã e Bagé: P₁ [(AC)₈T], P₂ [(GA)₈T] e P₄ [(CT)₈G]. Os tamanhos de banda obtidos variam de 600pb até 1200 pb. O número médio de bandas por *primer* foi 3.

O *primer* P₁ apresentou 100% de *loci polimórficos* para a população de Tupaciretã, com 20 acessos. O *primer* P₂ apresentou 100% de *loci polimórficos* para os 22 acessos de Tupaciretã e 27,27 % de *loci polimórficos* para os 2 acessos de Bagé. Já o *primer* P₄ apresentou 80% de polimorfismo, com 12 acessos de Tupaciretã testados.

O índice informação de Shannon (I) para o *primer* P₁ foi de 0,411% (Tupaciretã), para P₂ foi 0,569% (Tupaciretã) e 0,189% (Bagé), e para P₄ foi 0,422% (Tupaciretã).

Para o índice de diversidade (H), os valores obtidos foram: P₁ 0,254% (Tupaciretã), P₂ 0,354% (Tupaciretã) 0,136% (Bagé) e P₄ 0,283% (Tupaciretã). Tais valores indicam uma diversidade genética inferior à esperada para uma espécie tão amplamente disseminada. Tais valores podem mudar à medida que dados das demais populações vão sendo agregados.

Conclusão

A técnica ISSR vem demonstrando ser útil para a estudo da variabilidade de *E. plana*, apresentando polimorfismo para análise populacional (80 e 100%). Porém, os valores de diversidade mostraram-se inferiores ao esperado, sugerindo que a espécie pode ser geneticamente mais homogênea do que o esperado no Rio Grande do Sul. Cabe ressaltar, porém, que os resultados são parciais, e com a adição das populações restantes, bem como adição de novos *primers*, esses valores ainda podem ser alterados.

Literatura citada

- NITER, Ode. The grasses and pastures of South Africa. Africa do Sul, 0. Meredith, 1955. p.156-7.
- ROBERTS, B.R. Common grasses of the orange freeo state.
- MEDEIROS, R. B.; FOCHT, T. Invasão, prevenção, controle e utilização do capim-annoni-2 (*Eragrostis plana* Nees) no Rio Grande do Sul. Pesq. Agropec. Gaúcha, v. 13, n. 1-2, p. 105-114, 2007.
- DOYLE, J. D. & DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19: 11-15.