



CARACTERIZAÇÃO DE 12 LOCI MICROSSATÉLITES PARA A ESPÉCIE *HYPOCHAERIS CHILLENSIS* (ASTERACEAE) E A SUA TRANSFERÊNCIA EM 10 ESPÉCIES SUL-AMERICANAS E UMA ESPÉCIE EUROPÉIA

Carina C. F. Lucio^{1,2}, *Eduardo A. Ruas*^{1,3}, *Luana A. Rodrigues*^{1,4}, *Thiago Vidotto*^{1,5},
Claudete F. Ruas^{1,6}

RESUMO: O gênero herbáceo *Hypochaeris* apresenta características que o permitem ser um interessante modelo para o estudo da evolução e biogeografia em plantas. O gênero exibe uma distribuição disjunta, com mais de 15 representantes na região Mediterrânea e aproximadamente 50 na América do Sul. A irradiação do gênero *Hypochaeris* aparentemente ocorreu a partir de uma única espécie ancestral, através de eventos de dispersão a longa distância. Neste trabalho, foram desenvolvidos e caracterizados um conjunto de 12 loci de microssatélites através de uma biblioteca enriquecida utilizando o método de captura e hibridização para a espécie *H. chillensis* para avaliar a variabilidade genética e os padrões da estrutura populacional entre as áreas de distribuição dessa espécie no Brasil. A genotipagem de 50 indivíduos dessa espécie revelou um nível moderado de polimorfismo, com um total de 32 alelos. O número de alelos variou de um até cinco, com uma média de 1.29 alelos por locus. Todos os pares de *primers* foram testados para transferência em outras dez espécies adicionais do gênero e para o possível ancestral do grupo, *H. angustifolia*. A transferência teve sucesso na maioria das espécies sul-americanas, bem como para alguns *primers* na espécie ancestral. Os loci microssatélites caracterizados podem ser utilizados para a avaliação da estrutura genética de populações em *H. chillensis* e a sua aplicação em outras espécies focará na compreensão dos processos evolutivos de irradiação adaptativa do gênero desde a sua colonização na América do Sul.

PALAVRAS-CHAVE: Estrutura de Populações, *Hypochaeris*, Microssatélites, Polimorfismo.

1 INTRODUÇÃO

O Gênero *Hypochaeris* apresenta características que o fazem um interessante modelo para o estudo da evolução e biogeografia de plantas. O gênero exibe uma distribuição disjunta, com mais de 15 representantes na região Mediterrânea e aproximadamente 50 na América do Sul (Tremetsberger *et al.*, 2005, 2006). Estudos sugerem que o gênero originou na região Mediterrânea e irradiou na América do Sul após um evento de dispersão à longa distância de uma espécie ancestral do noroeste da África (Tremetsberger *et al.*, 2005).

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

² Mestra em Genética pela Universidade Estadual de Londrina.

³ Doutor em Agronomia pela Universidade Estadual de Londrina.

⁴ Doutoranda pelo programa de pós-graduação da Agronomia – UEL, bolsista da CAPES.

⁵ Graduando em Ciências Biológicas pela UEL, bolsista da CNPq.

⁶ Professora Doutora em Agronomia pela ESALQ – Piracicaba.

Estudos moleculares e citogenéticos recentes identificaram características similares àquelas encontradas no grupo de espécies sul-americanas e na espécie marroquina *H. angustifolia*, considerada a ancestral mais próxima das espécies sul-americanas (Tremetsberger *et al.*, 2005, 2006, Weiss-Schenneweiss, 2007).

Hypochaeris chillensis (Kunth) Britton, uma erva perene, nativa da América do Sul, exibe uma diversidade ecológica e morfológica extensiva através da sua escala de distribuição. Contrastando com as outras espécies sul-americanas, a espécie se difunde desde o sudeste ao sul do Brasil, assim como na Argentina, Uruguai, Paraguai, Equador, Peru, Bolívia e Colômbia (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007).

A grande variabilidade morfológica encontrada em *H. chillensis* e a sua co-ocorrência simultânea com outras espécies do gênero facilitam a hibridização interespecífica. (Cabrera, 1976; Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007). Desde já, estudos populacionais nessa espécie podem ajudar a compreensão da conexão entre a dispersão à longa distância e a irradiação explosiva do gênero *Hypochaeris* na América do Sul.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O DNA genômico foi extraído a partir de folhas frescas de um único indivíduo utilizando o método CTAB, proposto por Doyle & Doyle, 1987. Uma biblioteca enriquecida em microssatélites foi construída utilizando o processo de hibridização e captura, seguindo o protocolo descrito por Billotte *et al.* (1999), com (CT)₈ e (GT)₈ marcados com biotina no passo de enriquecimento. Aproximadamente 5 µg de DNA genômico foi digerido com *RsaI* e os fragmentos foram ligados à adaptadores *Rsa*-21 e *Rsa*-25. Fragmentos contendo repetições foram selecionados por hibridização com oligonucleotídeos biotinilados e recuperados com esferas magnéticas revestidas com estreptavidina (Invitrogen).

Fragmentos ricos em microssatélites foram amplificados por PCR com o adaptador *Rsa*-21 como *primer*, clonados no pGEM[®]-T Easy (Promega) e transformados através de células supercompetentes de *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' (Stratagene). Após o aparecimento das colônias, os clones branco-positivos tiveram seus insertos amplificados por PCR (MJ Research PTC-200) usando o *primer* universal M13 direto e reverso. Plasmídeos de 280 clones positivos foram sequenciados utilizando BigDye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) com 5pM do *primer* M13 reverso ou direto, em reações de 10µL de volume. As sequências foram submetidas à eletroforese no sequenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems). Dos 280 insertos sequenciados, 40 (14.29%) clones continham microssatélites perfeitos e ininterruptos. No entanto, apenas 25 (8.93%) provaram ser adequados para o desenho de *primers*. Os *primers* foram construídos utilizando o programa PRIMER 3 versão 0.4.0 (Rozen e Skaletsky, 2000). A amplificação por PCR e a consistência de cada *primer* foi testada em uma amostra de cinco indivíduos da mesma população, utilizando amplificação em um ciclo de touch down de acordo com Ruas *et al.* (2009). A PCR foi realizada em reações de 10 µL, contendo 3.5 µL de *GoTaq* Green Master Mix (Promega), 0.25µL (5 pmol) de cada *primer* locus-específico direto e reverso e 2.0 µL (10ng) de DNA genômico, sendo o volume final ajustado com água estéril. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em um gel de poliacrilamida 7.0%, juntamente com um marcador de 50 pares de bases, que foi visualizado após ser corado com prata. 12 pares de *primers* foram selecionados para análises posteriores.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para caracterização dos 12 loci de microssatélites, DNA genômico foi extraído de 50 indivíduos, representando três populações nativas de *H. chillensis* do Brasil, consistidos de: 32 amostras de Lages LAG, 27° 31' S, 50° 53' W), rodovia entre São José

do Cerrito e Campos Novos, no estado de Santa Catarina; cinco amostras de Sapopema (SAP, 23°53' S, 50°36' W), no estado do Paraná; e 13 amostras de Itapetininga (ITA, 23°36' S 48°07' W), no Km 189 da rodovia Raposo Tavares, no estado de São Paulo. Exemplares de cada população foram depositados no Herbário FUEL da Universidade Estadual de Londrina seguindo a certificação LAG: FUEL 48681, SAP: FUEL 48680, e ITA: FUEL 48810. Para testes de transferência, foi extraído DNA de 22 indivíduos representando 10 espécies sul-americanas adicionais (duas amostras de cada) e *H. angustifolia*. Dos 12 pares de *primer* selecionados, 11 amplificaram com sucesso as regiões alvo dos 10 loci, demonstrando polimorfismo, enquanto um (Hchi211) foi monomórfico e outro (Hchi160) amplificou regiões não possíveis de identificação dos alelos e, portanto, foi excluído da análise de *H. chillensis*. A estatística avançada de genética de populações foi calculada utilizando Genepop versão 1.2 (Raymond and Rousset, 1995). A genotipagem dos 50 indivíduos de *H. chillensis* revelou um moderado nível de polimorfismo, com um número total de 32 alelos. O número de alelos variou de um (Hchi211) até cinco (Hchi274), com uma média de 2.91 alelos por locus. Conteúdo informático de polimorfismo (*PIC*) foi 0.323. Em média, a heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) para cada *locus* variou de 0.023 a 1.000 e de 0.063 a 0.640, respectivamente, com valores médios de 0.390 e 0.384. Cinco loci demonstraram frequências alélicas que desviaram significativamente das proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P \leq 0.001$), incluindo dois loci (Hchi36, Hchi159) com déficit de heterozigosidade e três (Hchi105, Hchi108, Hchi233) com excesso. Comparações par a par para testes múltiplos entre os 11 loci demonstraram um desequilíbrio de ligação significativo apenas entre Hchi36/Hchi75, Hchi36/Hchi274 e Hchi75/Hchi274 ($P \leq 0.05$). Os 12 SSR loci selecionados foram também testados para transferência em outras 10 espécies sul-americanas do gênero *Hypochoeris* e em *H. angustifolia*, o possível ancestral do grupo. Sete loci foram amplificados em todas as espécies sul-americanas testadas, produzindo alelos de tamanhos similares àqueles observados em *H. chillensis*. Três loci (Hchi75, Hchi105, Hchi159) falharam ao amplificar cada um em uma espécie, um (Hchi15) falhou em quatro espécies e outro (Hchi274) falhou em duas espécies. O sucesso da transferência foi previsto dada a similaridade genética entre as espécies sul-americanas, como um resultado de um processo recente de divergência nesse ambiente (Tremetsberger et al. 2006). A transferência também foi bem sucedida para cinco loci em *H. angustifolia*, indicando maior distância genética quando comparada às espécies sul-americanas do gênero.

4 CONCLUSÃO

Os 12 *primers* microssatélites aqui descritos são a primeira série de marcadores moleculares desenvolvidos para *H. chillensis* e possuem um alto nível para a investigação da diversidade genética e da estrutura genética de populações nessa espécie. Aplicada a outras espécies relacionadas, esses marcadores são úteis no entendimento da relação entre essas espécies, no processo de irradiação adaptativa e na especiação do gênero desde a sua chegada à América do Sul.

REFERÊNCIAS

AZEVÊDO-GONÇALVES, C.F. AND N. I. MATZENBACHER. 2007. O Gênero *Hypochoeris* L. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia Série Botânica* 62: 55-87.

BILLOTTE, N., LAGODA, P.J.R., A. M. RISTERUCCI, AND F. C. BAURENS. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.

CABRERA, A. L. 1976. Materiales para una revisión, del género *Hypochoeris*. I. *Hypochoeris chillensis* (H.B.K.) Hieron. *Darwiniana* 20 (3-4): 312-322.

DOYLE J. J., AND J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh laeftissue. *Photochemistry Bulletin* 19:11-15.

RAYMOND, M. AND F. ROUSSET. 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.

ROZEN, S., AND H. J. SKALETSKY. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In S. KRAWETZ AND S. MISENER [eds.], *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*, 365 – 386. Humana Press, Totowa, New York, USA.

RUAS, E.A., CONSON, A.R.O., B. F. COSTA, J. O. DAMASCENO, L. A. RODRIGUES, M. RECK, A. O. S. VIEIRA, P. M. RUAS, AND C. F. RUAS. 2009. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) and intergeneric transferability. *Conservation Genetic Resources* 1:245–248.

TREMETSBERGER, K., H. WEISS-SCHNEEWEISS, T. F. STUESSY, R. SAMUEL, G. KADLEC, M. A. ORTIZ, AND S. TALAVERA. 2005. Nuclear ribosomal DNA and karyotypes indicate a NW African origin of South American *Hypochoeris* (Asteraceae, Cichorieae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 102-116.

TREMETSBERGER, K., T. F. STUESSY, G. KADLEC, E. URTUBEY, C. M. BAEZA, S. G. BECK, H. A. VALDEBENITO, C. F. RUAS, AND N. I. MATZENBACHER. 2006. AFLP Phylogeny of South American Species of *Hypochoeris* (Asteraceae, Lactuceae) *Systematic Botany* 3: 610-626.

WEISS-SCHNEEWEISS H, T. F. STUESSY, K. TREMETSBERGER, E. URTUBEY, H. A. VALDEBENITO, S. G. BECK, AND C. M. BAEZA. 2007 Chromosome numbers and karyotypes of South American species and populations of *Hypochoeris* (Asteraceae) *Botanical Journal of the Linnean Society* 153:49-60.