



Conteúdo disponível em: <https://www.ifgoiano.edu.br/periodicos/>

## Multi-Science Journal

Website do periódico: <https://www.ifgoiano.edu.br/periodicos/index.php/multiscience>



Artigo Original

# Caracterização e seleção de marcadores moleculares em *Croton linearifolius* Mull. Arg. como subsídio para estudos genéticos

Thalana Souza Santos Silva<sup>1,3</sup>; Janaína Silva Freitas<sup>2,3</sup>; Elisa Susilene Lisboa dos Santos<sup>2,3</sup>; Tarcísio dos Santos Cardoso<sup>3</sup>; Carlos Bernard Moreno Cerqueira-Silva<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000;

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 45700-000;

<sup>3</sup>Laboratório de Genética Molecular Aplicada, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA \*Autor para correspondência:

[csilva@uesb.edu.br](mailto:csilva@uesb.edu.br)

### INFO ARTIGO

Histórico do artigo

Recebido: 10 janeiro 2017

Aceito: 11 abril 2017

Palavras chaves:

Caatinga

*Croton* spp.

ISSR; RGA

*Velame pimenta*

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar o padrão de amplificação e selecionar iniciadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) para subsidiar estudos genéticos em *Croton linearifolius*. Para tanto, foram realizados testes de amplificação em indivíduos de *C. linearifolius* com o uso de 24 combinações de pares de iniciadores RGA e 23 iniciadores ISSR. As reações de amplificação com as combinações de RGA produziram 73 marcas, sendo que 14 combinações apresentaram marcas polimórficas. As reações com os iniciadores ISSR produziram 136 marcas com 16 iniciadores apresentando marcas polimórficas. Os resultados obtidos atestam que os marcadores avaliados são potencialmente úteis para subsidiar estimativas genéticas para a espécie em estudo. Os iniciadores selecionados contribuirão para análises de estrutura e diversidade genética de populações naturais de *C. linearifolius*.

### 1. Introdução

O gênero *Croton* L. é o segundo maior e mais diverso da família Euphorbiaceae, possuindo aproximadamente 1.200 espécies distribuídas em sua maioria nas regiões tropicais do mundo (Berry et al., 2005). Com cerca de 350 espécies, o Brasil é um dos principais centros de diversidade do gênero, que está representado nos mais variados ambientes, havendo predominância de espécies nas regiões Sudeste e Nordeste do país (Carneiro-Torres, 2009, Cordeiro et al., 2015).

Diversas espécies de *Croton* são conhecidas por possuírem propriedades medicinais e/ou inseticidas, a exemplo de *C. linearifolius*, conhecida popularmente como velame pimenta. Esta espécie é endêmica do Brasil e apresenta potencial larvicida comprovado contra o *Aedes aegypti*, vetor de doenças emergentes como a Zika e chikungunya, além da dengue (Silva et al., 2014).

Em detrimento da importância ecológica e do seu potencial uso, os estudos sobre *C. linearifolius* são incipientes, principalmente quando relacionados a dados genético-moleculares. Contudo, o conhecimento da diversidade e estrutura genética é uma prerrogativa para elaboração de estratégias de manejo sustentável e de conservação dos recursos genéticos.

Notadamente, os marcadores moleculares têm sido empregados para identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos (Rocha et al., 2016; Chagas et al., 2015; Borém & Caixeta, 2009). Dentre os inúmeros marcadores disponíveis, estão os marcadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) que são amplamente utilizados, especialmente por não requererem informações prévias sobre o genoma das espécies a serem avaliadas (Borém & Caixeta, 2009). Além disso, devido ao tamanho dos iniciadores (aproximadamente 20 bases) possuem maior reprodutibilidade potencial que outros marcadores dominantes, a exemplo dos marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

A seleção de iniciadores (também conhecida como *screening*) consiste em uma etapa preliminar importante nos estudos genéticos baseados em marcadores moleculares, uma vez que, reduz custos e otimiza o tempo empregados antes da avaliação de toda uma população, evitando, por meio da análise dos perfis de amplificação, o uso de iniciadores inadequados para a espécie alvo.

Neste contexto, objetivou-se caracterizar o padrão de amplificação e selecionar iniciadores RGA (*Resistance Gene Analogs*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) para subsidiar a realização de estudos genéticos em *C. linearifolius*.

## 2. Material e métodos

O estudo foi conduzido a partir de amostras de DNA depositadas no banco de DNA genômico do Laboratório de Genética Molecular Aplicada (LGMA), na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Itapetinga – Bahia (Rocha, 2015). Testes de amplificação foram realizados em oito indivíduos de *C. linearifolius* com o uso de 24 combinações de pares de iniciadores RGA (a partir de 23 iniciadores, Tabela 1) e em cinco indivíduos com 23 iniciadores ISSR (Tabela 1).

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 16 µL, contendo 12 ng de DNA, 1,7 µL de tampão de PCR 10X (LGC biotecnologia), 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM (LGC Biotecnologia), 1 µL de dNTP mix 2,5mM (LGC biotecnologia), 1 unidade de Taq DNA polimerase (LGC biotecnologia), água Milli-Q e 1 µL de cada iniciador. Nas reações de amplificação foram adotados os seguintes programas de amplificação para os iniciadores RGA: 5 minutos a 95°C; seguido de 34 ciclos (30 segundos a 95°C, 1 minuto a 37°C, 1 minuto e 20 segundos a 72°C); e extensão final de 10 minutos a 72°C. Para os iniciadores ISSR: 95 °C por 5 minutos; seguido de 34 ciclos (94 °C por 50 segundos, 48°C por 50 segundos, 72°C por 1 minuto); e uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

Alíquotas (5 µL) dos produtos de amplificação foram visualizados em corrida eletroforética em gel de agarose a 2% (m/v) e solução de corrida TBE 1x, por aproximadamente 2 horas a 110V. A visualização do resultado da corrida eletroforética foi observada com a utilização de fotodocumentador Kodak, sob incidência de luz ultravioleta.

As imagens dos géis foram analisadas por dois pesquisadores, visando aumentar a confiabilidade e a reprodutibilidade das leituras/interpretações dos padrões de amplificação.

## 3. Resultados e discussão

A estratégia de caracterização e seleção de iniciadores como etapa preliminar em estudos genéticos, tem sido adotada em estudos com diferentes espécies, a exemplo da caracterização da diversidade genética em populações naturais de *C. heliotropiifolius* (Rocha et al., 2016), de *Sinopodophyllum hexandrum* (Liu et al., 2016) e de *Maytenus truncata* (Simplicio et al., 2015). Para *Croton linearifolius* são escassos os estudos genético moleculares e apenas caracterizações iniciais foram disponibilizadas por Rocha (2015) envolvendo marcadores RAPD e ISSR. Diante desse contexto, os resultados obtidos na presente pesquisa deverão subsidiar futuros estudos genético populacionais de *C. linearifolius*.

De um total de 24 combinações de iniciadores RGA testadas, 20 (83,3%) geraram produtos de amplificação com nítida visualização, sendo que 14 (58,3%) apresentaram marcas polimórficas (Tabela 1). Essas combinações de RGA produziram 73 marcas com um número médio de três marcas por combinação. Os números de marcas geradas variaram de uma (RGA1F + RGA8R e RGA1R + RGA1F) a sete (S1 + AS2). A porcentagem de bandas polimórficas variou de 33% (RGA2R + RGA5F) a 100% (NBSF1 + AS1, S1 + NBSR1, RGA7R + RGA1F, RGA4R + RGA4F, RGA5R + RGA5F, RGA1R + RGA4F E RGA2R + RGA4F).

**Tabela 1.** Caracterização da amplificação de regiões genômicas de *Croton linearifolius* a partir de 24 combinações de pares de iniciadores RGA (*Resistance Gene Analogs*).

Combinação	Código	Sequência	Total de Bandas	Número de bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
1	S1	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG	5	3	60
	AS1	CAA CGC TAG TGG CAA TCC			
2	S1	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG	7	5	71
	AS2	IAA IGC IAG IGG IAA ICC			
3	S1	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG	5	2	40
	AS3	IAG IGC IAG IGG IAG ICC			
4	AS1	CAA CGC TAG TGG CAA TCC	0	0	0
	AS2	IAA IGC IAG IGG IAA ICC			
5	AS1	CAA CGC TAG TGG CAA TCC	0	0	0
	AS3	IAG IGC IAG IGG IAG ICC			
6	NBSF1	GGA ATG GGI GGI GIF GGI AAR AC	2	2	100
	AS1	CAA CGC TAG TGG CAA TCC			
7	NBSF1	GGA ATG GGI GGI GIF GGI AAR AC	2	0	0
	AS2	IAA IGC IAG IGG IAA ICC			
8	NBSF1	GGA ATG GGI GGI GIF GGI AAR AC	2	0	0
	AS3	IAG IGC IAG IGG IAG ICC			
9	S1	GGT GGG GTT GGG AAG ACA ACG	6	6	100
	NBSR1	YCT ACT TGT RAY DAT DAY YYT RC			
10	RGA1F	AGT TTA TAA TTY EAT TGCT T	1	0	0
	RGA8R	AGC CAC TTT TGA CAA CTG C			

**Tabela 1.** Continuação.

Combinação	Código	Sequência	Total de Bandas	Número de bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
11	NBSF1	GGA ATG GGI GGI GIF GGI AAR AC	0	0	0
	NBSR1	YCT ACT TGT RAY DAT DAY YYT RC			
12	RGA8F	AGC GAC GAG AGT TGT ATT TAA G	4	3	75
	RGA8R	AGC CAC TTT TGA CAA CTG C			
13	RGA1R	ACT ACG ATT CAA GAC GTC CT	1	0	0
	RGA1F	AGT TTA TAA TTY EAT TGC T			
14	RGA2R	CAC ACG GTT TAA AAT TCT CA	7	3	43
	RGA1F	AGT TTA TAA TTY EAT TGC T			
15	RGA7R	CCG AAG CAT AAG TTG GTG	3	3	100
	RGA1F	AGT TTA TAA TTY EAT TGC T			
16	RGA4R	TAC ATC ATG TGT TAC CTC T	3	3	100
	RGA4F	TGT TAC TGC TTT GTT TGG TA			
17	RGA5R	TCA ATC ATT TCT TTG CAC AA	5	5	100
	RGA5F	TGC TAG AAA AGT CTA TGA AG			
18	RGA6R	AAC TAC ATT TCT TGC AAG T	5	3	60
	RGA 6F	AGC CAA AGC CAT CTA CAG T			
19	RGA1R	ACT ACG ATT CAA GAC GTC CT	6	6	100
	RGA 4F	TGT TAC TGC TTT GTT TGG TA			
20	RGA4R	TAC ATC ATG TGT TAC CTC T	0	0	0
	RGA 1F	AGT TTA TAA TTY EAT TGC T			
21	RGA2R	CAC ACG GTT TAA AAT TCT CA	2	2	100
	RGA 4F	TGT TAC TGC TTT GTT TGG TA			
22	RGA2R	CAC ACG GTT TAA AAT TCT CA	3	1	33
	RGA 5F	TGC TAG AAA AGT CTA TGA AG			
23	RGA2R	CAC ACG GTT TAA AAT TCT CA	2	0	0
	RGA 6F	AGC CAA AGC CAT CTA CAG T			
24	RGA6R	AAC TAC ATT TCT TGC AAG T	2	0	0
	RGA 5F	TGC TAG AAA AGT CTA TGA AG			
Média			3,0	2,4	54,1

I= A/T/G/C; D= A/G/T; E=C/G; R= A/G; Y= C/T

Os 23 iniciadores ISSR testados geraram produtos de amplificação com nítida visualização, sendo que 16 (69,5%) apresentaram marcas polimórficas (Tabela2). As reações de amplificação com os iniciadores ISSR produziram 136 marcas, com um número médio de 5,9 marcas por iniciador. Os iniciadores DiCA3`YG e TriCAG3`RC produziram o menor (duas) e o maior (nove) número de marcas, respectivamente. A porcentagem de bandas polimórficas variou de 13% (TriGTG3`YC) a 100% (DiCA3`YG).

As variações no percentual de iniciadores RGA e ISSR identificados com padrões de amplificação polimórficos é também observado em outros estudos disponíveis na literatura, a exemplo dos resultados de Chagas et al. (2015) que selecionaram seis de 29 iniciadores ISSR testados em *Elaeis guineensis*, bem como dos resultados de Rocha et al.

(2014) que selecionaram 34 de 48 iniciadores testados em *Pilocarpus microphyllus*. A variação observada no percentual de iniciadores selecionados, no número de marcas e no nível de polimorfismo decorre, entre outros fatores, da particularidade das espécies investigadas, bem como do número de indivíduos testados.

Além dos iniciadores que já apresentaram perfil de amplificação polimórfico (e portanto podem ser priorizado em futuros estudos) é importante destacar que os marcadores com perfil monomórfico, nessa análise, podem apresentar polimorfismo em outras amostras, não devendo ser portanto descartados, embora possam ser preteridos. Esta discussão mostra a importância de estudos para se conhecer o padrão de amplificação dos iniciadores disponíveis para as espécies de interesse, antes da genotipagem da população a ser estudada.

**Tabela 2.** Caracterização da amplificação de regiões genômicas de *Croton linearifolius* a partir de 23 iniciadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

Código	Sequência de bases	Total de Bandas	Número de bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
DiCA3`G	5`- CAC ACA CAC ACA CAC AG- 3`	7	3	43
DiCA3`RG	5`- CAC ACA CAC ACA CAC ARG- 3`	7	2	29
DiCA3`YG	5`- CAC ACA CAC ACA CAC AYG-3`	2	2	100
DiGA3`C	5`- GAG AGA GAG AGA GAG AC- 3`	6	4	67
DiGA3` RC	5`- GAG AGA GAG AGA GAG ARC- 3`	8	2	25
DiGA3`T	5`- GAG AGA GAG AGA GAG AT- 3`	7	3	43
TriCAC3`RC	5`- CAC CACCACCACCAC RC-3`	8	2	25
TriCAC3`YC	5`- CAC CACCACCACCAC YC-3`	7	2	29
TriCAC5`CY	5`- CAC CACCACCACCAC CY-3`	3	0	0
TriCAG3`RC	5`- CAC CACCACCACCAC RC-3`	9	2	22
TriGTG3`YC	5`- GTG GTGGTGGTGGTG YC-3`	8	1	13
TriTGT3`YC	5`- TGT TGTGTGTGTGT YC-3`	7	0	0
TriAAC3`RC	5`- AAC AACAACAACAAC RC-3`	8	1	13
TriAAG3`RC	5`-AAG AAG AAGAAGAAG RC3`	7	2	29
TriACG3`RC	5`- ACG ACGACGACGACG RC-3`	5	0	0
TriAGA3`RC	5`-AGA AGA AGA AGA AGA RC-3`	8	2	25
TriTGG3`RC	5`- TGG TGGTGGTGGTGG RC-3`	4	0	0
TriCGA3`RC	5`- CGA CGA CGA CGA CGA RC-3`	4	0	0
TriCGC3`RC	5`- CGC CGC CGC CGC CGC RC-3`	4	1	25
TriGAC3`RC	5`- GAC GACGACGACGAC RC-3`	5	1	20
TriGCA3`RC	5`- GCA GCA GCA GCA GCA RC-3`	4	0	0
TriGCC3`RC	5`- GCC GCC GCC GCC GCC RC-3`	3	0	0
TriGGA3`RC	5`- GGA GGA GGA GGA GGA RC-3`	5	1	20
Média		5,9	1,3	22,8

I= A/T/G/C; D= A/G/T; E=C/G; R= A/G; Y= C/T

#### 4. Conclusões

O sucesso na seleção das 14 combinações de iniciadores RGA e dos 16 iniciadores ISSR, tendo por critérios a resolução das marcas e os padrões polimórficos atesta que os marcadores RGA e ISSR são potencialmente úteis para subsidiar estimativas genéticas para *Croton linearifolius*. Os iniciadores selecionados, em conjunto com os métodos de estimativa de diversidade previamente caracterizados por Scaldaferrri et al. (2014) deverão potencializar a obtenção de informações populacionais associadas a diversidade e estrutura genética em populações naturais de *C. linearifolius*.

#### 5. Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao programa de pós-graduação em Ciências Ambientais (PPGCA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (IUESB) pela concessão da bolsa de estudo.

#### 6. Referências

Berry, P. E. Hipp, A. L., Wurdack, K. J., Van, E. E. B. & Riina, R. (2005). Molecular phylogenetics of the giants genus *Croton* and tribe Crotonae (Euphorbiaceae sensu strictu) using *ITS* and *trnL-trnF* DNA sequence data. *American Journal of Botany*, 9, 1520-1534.

Borém, A. & Caixeta, E. T. (2009). *Marcadores moleculares*. Viçosa: (2ª Ed). UFV.

Carneiro-Torres, D. S. (2009). *Diversidade de Croton L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga*. 296 f. Tese

(Doutorado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana.

Chagas, K. P. T., Sousa, R. F., Fajardo, C. G. & Vieira, F. A. (2015). Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 10(1), 147-152.

Cordeiro, I., et al. (2015). *Croton*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17497>>. Acesso em: 25/01/2016.

Liu, W., et al. (2016). Genetic diversity and structure of the threatened species *Sinopodophyllumhexandrum*(Royle) Ying. *Genetics and Molecular Research*, 15(3).

Rocha, J. A., et al. (2014). ISSR Primer Selection for Genetic Variability Analyses with Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew., Rutaceae). *Forest Research*, 3, 1-5.

Rocha T. O. (2015). Diversidade genética em *Croton* spp. (euphorbiaceae) com potencial fitoterápico e inseticida. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Rocha, T. O., et al. (2016). Estimate of diversity and structure genetic in cassutinga (*Croton heliotropiifolius*) based on molecular markers. *African Journal of Biotechnology*, 15, 518-523.

Scaldaferrri, M. M.; Freitas, J. S. ; Vieira J. G. P.; Gonçalves, Z.S. ; Souza, A. M.; Cerqueira-Silva, C.B.M. Comparison of methods for estimates of molecular genetic diversity in genus *Croton*: influence of coefficients, clustering

strategies and data projection. *Genetics and Molecular Research*, 13, 5566-5573, 2014.

Silva, S. L. C., Gualberto, S. A., Carvalho, K. S. & Fries, D. D. 2014. Avaliação da atividade larvicida de extratos obtidos do caule de *Croton linearifolius* Mull. Arg. (Euphorbiaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Biotemas*, 27(2), 79-85.

Simplicio, R. R., Waldschmidt, A. M., Amorim, M. B., Almeida, B. S. & Pereira, D. G. 2015. Genetic diversity and structure in natural populations of *Maytenustruncata* Reiss, 1861, a medicinal plant vulnerable to extractivism in Bahia State, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 18241-18248.