

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES SSR DE BUVA (*Conyza canadensis*) PARA CAPIM-AMARGOSO (*Digitaria insularis*)

Guilherme Ferreira Sirtoli¹, Paula da Silva Mendel Soares¹, Fernanda
Ianuxauskas Dechechi¹, Matheus Montozo Correa Silva¹, Franciele Barros de
Souza Sobreira², Leandro Pin Dalvi¹, Taís Cristina Bastos Soares²

¹Universidade Federal do Espírito Santo/, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto
Universitário, s/n, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, guilhermeferreirasirtoli@gmail.com,
paula.mendel@hotmail.com, fernandadechechi@hotmail.com, theusmontozo@gmail.com,
leandropin@yahoo.com.br

²Universidade Federal do Espírito Santo/ Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde, Alto
Universitário, s/n, Guararema – 29500-000 – Alegre - ES, Brasil, francielesouzza@gmail.com,
tcbsoares@gmail.com

Resumo

Digitaria insularis (L.) Fedde é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae, o qual apresenta uma enorme capacidade adaptativa e grande produção de propágulos, fazendo com que seja uma das principais plantas daninhas do Brasil. Estudos com marcadores moleculares eliminam algumas dificuldades encontradas quando se trabalha com marcadores morfológicos, porém, o desenvolvimento de *primers* específicos para uma espécie requer um longo e oneroso trabalho. Considerando que os SSRs encontrados em determinadas espécies podem ser transferidos para espécies correlatas, neste trabalho foram testados 19 pares de *primers* desenvolvidos para *Conyza canadensis* em *D. insularis*. A transferibilidade destes *primers* foi de 89,47%.

Palavras-chave: *Primers*. Polimorfismos. Microsatélites. Amplificação heteróloga.

Área do Conhecimento: Ciências agrárias.

Introdução

O capim amargoso (*Digitaria insularis* (L.) Fedde) é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae, o qual apresenta uma enorme capacidade adaptativa e grande produção de propágulos, fazendo com que seja uma das principais plantas daninhas do Brasil (LORENZI, 2008; MACHADO *et al.*, 2008; GEMELLI *et al.*, 2012).

Marcadores moleculares desempenham um papel de destaque em diversas análises genéticas, sendo aplicados para uma variedade de objetivos, tais como identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, estimativas de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco, construção de mapas genéticos (BUSO *et al.*, 2003).

Em meio aos marcadores, os microsatélites ou SSR (*Sequências Simples Repetidas*) são frequentemente utilizados, consistindo em sequências de 1 a 6 nucleotídeos, chamados de motivos, repetidos em tandem (LITT; LUTY, 1989). Todavia, não se tem estudos moleculares de sequenciamento do genoma do capim amargoso, tampouco *primers* desenvolvidos, e sua análise e fabricação demanda elevado tempo além de ser de alto custo.

A transferência de microsatélites entre espécies vem sendo estudada, uma vez que existem inúmeras espécies que ainda não possuem marcadores microsatélites desenvolvidos. Nesse contexto, objetivou-se com este trabalho avaliar a transferibilidade de *primers* SSR desenvolvidos para a buva (*Conyza canadensis*) no capim amargoso (*D. insularis*).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Metodologia

O trabalho foi realizado no laboratório de bioquímica e biologia molecular (BqMol) da Universidade Federal do Espírito Santo – Campus Alegre, onde utilizou-se 19 marcadores SSR (Tabela 1), testados em 6 indivíduos, coletados em pontos diferentes dentro da cidade de Alegre -ES e Vargem Alta -ES.

A extração do DNA foi realizada de acordo com o método descrito por King *et al.* (2014). A concentração do DNA nas amostras foi verificada por espectrofotômetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific) e a integridade foi confirmada em eletroforese em gel de agarose 0,8% aplicando-se 3 µL da amostra de DNA e 3 µL do reagente intercalante Gelred. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 40 ng de DNA, 0,4 µM de cada *primer* (F + R), 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1X de tampão (10 mM Tris HCl - pH 8,5, 50 mM KCl), 2,75 mM de MgCl₂ e 0,8 mM de dNTPs, com o volume final da reação de 15 µL. As reações foram submetidas à desnaturação inicial por 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 1 min a x °C (variável conforme o *primer*) e 1 min a 72 °C, com uma extensão final de 8 min a 72 °C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel vertical de poliacrilamida 10%, com tampão 1X TBE (Tris HCl/ácido bórico/EDTA), corados com GelRed biotium e fotografados com sistema de fotodocumentação (ChemiDocXRS + System– Bio-Rad™).

Os dados foram tabulados a partir das bandas detectadas nos genótipos com base na leitura dos géis de poliacrilamida 10%, sendo identificado amplificação e a presença ou ausência de polimorfismo.

Tabela 1: Sequência de *primers* de *C. canadensis* testados em *D. insularis*

Nome da Sequência	Sequência (5'-3')	Escala	T.°C anelamento
HW02 - F	AGTATTTGGCAATCAAAATTCG	25nmol	54
HW02 - R	TCACAATCACAACAACACAAA	25nmol	54
HW04 - F	GCCACCCTATTGTTTTGGTTAT	25nmol	54
HW04 - R	AACTTGCATGGTAGTCAACGTC	25nmol	54
HW06 - F	CTTGCATGGTAGTCAACGTCAT	25nmol	52
HW06 - R	CAGAGGTGGTCATGTGATGTG	25nmol	52
HW07 - F	GTGTGGCGCTACTCATTTC	25nmol	52
HW07 - R	TGATCACACCTGCGATTGT	25nmol	52
HW14 - F	AACTAAGGGTGATTGGGGAAT	25nmol	50
HW14 - R	TGGTAGCCAAAAGCTACAAA	25nmol	50
HW21 - F	ATAGTCGAATTGGTCACGATTTG	25nmol	52
HW21 - R	GCAGTTTTCACTCTTCTCTCGAA	25nmol	52
HW27 - F	TTTCATAGTCGAATTGGTCACG	25nmol	58
HW27 - R	CCGGTAGCAGTTTTCACTCTTC	25nmol	58
HW29 - F	CTACTTGTTCGAATTTATCCATAC	25nmol	48
HW29 - R	AACTGGTTACTTCTCTTCC	25nmol	48
HWSSR01 - F	TATGTTGTACGACTGACTGAGTC	25nmol	52
HWSSR01 - R	CCATTGACTGTAGACCAGTGTG	25nmol	52
HWSSR03 - F	TTGACTCCAACCTCGTAGTGTATG	25nmol	50
HWSSR03 - R	ACGTTAAATCTCTCGTGTCTTC	25nmol	50
HWSSR04 - F	GGAAACTCCTGTCATAGTATTAGC	25nmol	50
HWSSR04 - R	ATTAAAATCTAGCAAGGCCGAAC	25nmol	50
HWSSR09 - F	CATGAGTTTGAGTTATCCCAGAT	25nmol	54
HWSSR09 - R	CGAATACTTTCAATGCTTACGAC	25nmol	54

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

HWSSR11 - F	ATCGTTGACATCTGACTCTGC	25nmol	56
HWSSR11 -R	GATTCTTGCTCTGGTTCCTTG	25nmol	56
HWSSR12 - F	CATAACAAACGGATTAGTGGCG	25nmol	60
HWSSR12 - R	ATTATTGACGACCAACAACACC	25nmol	60
IUB 7- F	TATAAACTGCCCCTTCTCTCC	25nmol	52
IUB 7 -R	GAGGTTGAAGCATGCAGTTC	25nmol	52
OSU 1 - F	ACAAGTCGGCTGGTGAGC	25nmol	56
OSU 1 - R	ACATGAAACACGAGCTAAACCA	25nmol	56
OSU 2 - F	CACTTCTCACACTTTGGGCA	25nmol	52
OSU 2 - R	CCAAATAATTACCATCATGCCA	25nmol	52
OSU 4 - F	AGAACTGGCAGCTTGGA AAA	25nmol	56
OSU 4 - R	GTCCAAATGGTGGAAACTACC	25nmol	56
HNCA 1 - F	TTGGAGATGTGTTTGTGTTCTAGAG	25nmol	54
HNCA 1 R	ACCTACACCTTAGTTAAACCTTGCC	25nmol	54

Fonte: Os autores

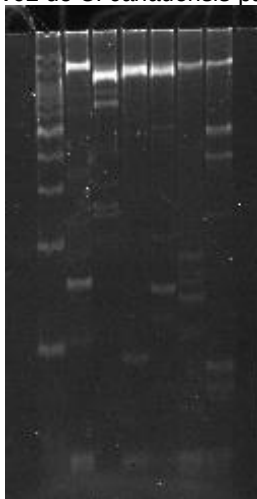
Resultados

Foram testados 19 pares de *primers* (Tabela 1), os quais a transferibilidade de 17 marcadores microssatélites desenvolvidos para buva (*C. canadensis*) amplificaram no capim-amargoso (*D. insularis*), onde apenas 2 pares de *primers* não amplificaram (HW04 – F, HW04 – R; HWSSR09 – F, HWSSR09 – R), apresentando uma taxa de 89,47% de transferência com estes *primers* testados. Todos os 17 pares de *primers* que amplificaram também apresentaram polimorfismo.

As temperaturas de anelamento utilizadas variaram de 48°C a 60°C. Nos pares de *primers* que não apresentaram amplificação (HW04 – F, HW04 – R; HWSSR09 – F, HWSSR09 – R), foram feitos testes com diferentes temperaturas, variando entre mais ou menos 6°C do valor informado na tabela 1.

A figura 1 apresenta o polimorfismo no teste com os pares de *primers* HW02 – F, HW02 – R em genes de *D. insularis*, testado a temperatura de anelamento de 54°C com bandas de aproximadamente 1500pb.

Figura 1: Eletroforese em gel vertical de poliacrilamida 10% do teste de transferibilidade e polimorfismo com o par de *primers* HW02 de *C. canadensis* para *D. Insularis*.



Fonte: Os autores

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Discussão

No presente estudo, a espécie *D. insularis* apresentou bons resultados na transferibilidade, com 17 dos 19 *primers* heterólogos testados, exibindo amplificação satisfatória. SUN *et al.* (2012) relataram que a amplificação cruzada de locus microsatélites tem relação direta com a distância filogenética entre as espécies, sendo menos eficiente entre famílias ou gêneros diferentes, o que é inconsistente com os nossos resultados, uma vez que as espécies em estudo não pertencem ao mesmo gênero e família e mesmo assim foi obtido uma amplificação com excelentes resultados.

Quanto aos *primers* que não conseguiram realizar a amplificação, sua incapacidade pode estar associada aos pares de *primers* não apresentarem sequências com capacidade de capacidade de anelamento no DNA da espécie em estudo, o que pode acontecer, uma vez que são de gênero e famílias diferentes.

Com relação a temperatura de anelamento dos *primers*, esta pode variar bastante em relação ao par de *primer* utilizado e a espécie em estudo. Em espécies de palmeiras da família Arecaceae mostram a variação de temperatura de anelamento dentro de uma mesma espécie, enquanto em outras da mesma família como *Syagrus romanzoffiana* a temperatura de anelamento de 51°C foi eficiente para todos os marcadores testados (LAINDORF *et al.*, 2019). Em trabalhos realizados com *Syagrus coronata* tiveram temperaturas relatadas como ideais variam entre 58 a 60°C (BARBOSA e ALMEIDA, 2018). Portanto, a temperatura ótima para realizar uma reação de amplificação específica pode variar conforme a espécie ou gênero investigado, bem como a técnica empregada (FORTES *et al.*, 2016).

Conclusão

Foi apresentado uma taxa de 89,47% de transferência dos *primers* desenvolvidos para *C. canadenses* em *D. insularis*. Todos os pares de *primers* que amplificaram apresentaram polimorfismo.

Referências

BARBOSA, S. N.; ALMEIDA, C. Genome survey and development of 15 microsatellite molecular markers in *Syagrus coronata* (Martius) Beccari (Arecaceae) by next-generation sequencing. **Brazilian J Bot**, v. 42, n. 1, 195–200. 2018.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y. C.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores microsatélites em espécies vegetais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, 2003.

FORTES, A. C.; OLIVEIRA, M. D. S. P.; OLIVEIRA, N. P.; SANCHES, E. D. N. M.; CUNHA, E. F. M. Transferibilidade de locos microsatélites desenvolvidos em outras espécies de palmeiras para *Astrocaryum vulgare* Mart. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 59, n. 1, p. 80-86. 2016.

Gemelli, A., Oliveira Júnior, R. S., Constantin, J., Braz, G. B. P., Campos Jumes, T. M., de Oliveira Neto, A. M., ... & Biffe, D. F. (2012). Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e implicações para o seu controle. **Revista Brasileira de Herbicidas**, 11(2), 231-240.

KING, Z. *et al.* Non-toxic and efficient DNA extractions for soybean leaf and seed chips for highthroughput and large-scale genotyping. **Biotechn. Letters**, v. 36, n. 9, p. 1875–1879, 2014.

LAINDORF, B. L.; METZ, G. F.; KÜSTER, M. C. T.; LUCINI, F.; FREITAS, K. E. J.; VICTÓRIA, F. C.; Pereira, A. B. Transfer of microsatellite markers from other Arecaceae species to *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae). **Genet Mol Res**, v.18, p. 1–10.2019

LITT, M.; LUTY, J. A. A. Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 397–401, 1989.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Lorenzi, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. (4th ed.). **Plantarum**. 2008.

Machado, A. F. L., Meira, R. M. S., Ferreira, L. R., Ferreira, F. A., Tuffi Santos, L. D., Fialho, C. M. T., & Machado, M. S. (2008). Anatomical characterization of the leaf, stem and rhizome of *Digitaria insularis*. **Planta Daninha**, 26(1), 1-8.

SUN, D.Q. LI, H.Y. XU, T.J. WANG, R.X. Development of microsatellite markers for the small yellow croaker *Larimichthys polyactis* (Sciaenidae) by cross-species amplification. **Genetics and Molecular Research**. v. 11, n. 2, p. 1469-1474, 2012.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelas bolsas e suporte financeiro. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade em pesquisa da coordenadora deste estudo. À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) por possibilitar a realização dessa pesquisa.