

**SHAMYRA GEORGIA DE AZEVEDO E SILVA**

**ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA E EFEITO  
INIBITÓRIO DO LÁTEX DE *Calotropis procera* EM  
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

**MOSSORÓ – RN**

**2015**

SHAMYRA GEORGIA DE AZEVEDO E SILVA

**ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA E EFEITO  
INIBITÓRIO DO LÁTEX DE *Calotropis procera* EM  
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal Rural do  
Semiárido, como parte das exigências  
para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia: Fitotecnia.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. D.Sc. RUI SALES JUNIOR

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. D.Sc. IONÁ SANTOS ARAÚJO HOLANDA

MOSSORÓ – RN

2015

SHAMYRA GEORGIA DE AZEVEDO E SILVA

**ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA E EFEITO  
INIBITÓRIO DO LÁTEX DE *Calotropis procera* EM  
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal Rural do  
Semiárido, como parte das exigências  
para obtenção do título de Mestre em  
Agronomia: Fitotecnia.

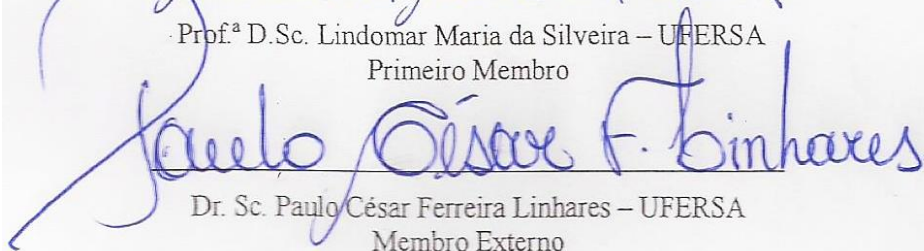
Aprovada em: 27/02/2015



Prof.ª D.Sc. Ioná Santos Araújo Holanda – UFERSA  
Coorientadora



Prof.ª D.Sc. Lindomar Maria da Silveira – UFERSA  
Primeiro Membro



Dr. Sc. Paulo César Ferreira Linhares – UFERSA  
Membro Externo

Catálogo na Fonte

Catálogo de Publicação na Fonte. UFERSA - BIBLIOTECA CENTRAL ORLANDO TEIXEIRA - CAMPUS MOSSORÓ

Silva, Shamyra Georgia de Azevedo e.

Estudo de diversidade genética e efeito inibitório do látex de  
Calotropis procera em fungos fitopatogênicos / Shamyra Georgia de  
Azevedo e Silva. - Mossoró, 2015.

94f: il.

1. Calotropis procera. 2. Fungos fitopatogênicos. 3. Variabilidade  
genética. I. Título

RN/UFERSA/BCOT/404  
S586e

CDD 635.54

“Talvez eu não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que eu deveria ser, mas sou o que irei ser e graças a Deus não sou o que eu era”.

(Martin Luther King)

À minha família, em agradecimento ao esforço,  
paciência e perseverança que tiveram me  
fazendo chegar até aqui.

Dedico

Aos meus pais Salete Azevedo e  
Geovah Pereira por terem me dado à vida.

Ofereço

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado à vida, por operar maravilhas em mim e sempre dar forças para lutar nos momentos difíceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa para realização deste trabalho, a UFERSA pela acolhida, tornando-se então o meu lar durante minha trajetória e ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, por ter acrescentado muito em termos de conhecimento por meio dos professores.

Aos meus pais por todo amor, carinho, dedicação, apoio incondicional, paciência, companheirismo, por serem os melhores pais do mundo e nunca me deixarem fraquejar diante das dificuldades, e pela confiança que sempre depositaram em mim.

Agradeço à minha família, em especial ao meu querido irmão Godofredo, minha cunhada Angélica, meus sobrinhos, e Nalva, pelo apoio, amparo, carinho e amor que sempre me foi dado.

À professora e coorientadora Ioná, que se mostrou disponível em todos os momentos, e mais do que professora, sempre foi uma amiga. Ela acreditou em mim, quando nem eu acreditava mais, me dando a oportunidade de trabalhar naquilo que eu gostava. Agradeço pelos puxões de orelha, pelas sugestões de melhoria e pelo vínculo que foi formado.

Ao meu orientador, Rui Sales Junior, por aceitar me orientar e sempre ter se mostrado generoso e solícito.

Ao professor Manoel Abílio de Queiroz, estando pouco tempo sob sua orientação, sempre se mostrou gentil, atencioso e preocupado. Obrigado por em tão pouco tempo, me ensinar tanto, contribuindo para minha formação profissional com sua paciência, humildade e simplicidade.

Ao professor Glauber por todo apoio, ajuda, conselhos e generosidade, que fizeram toda a diferença nessa reta final para minha formação.

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia Vegetal: Moacéria, Elisângela, Rhut, Leidianne, Carol, Karla, Jorge, Tallison, Rose, Mariana, Erika e Isabela. Muito obrigada pela ajuda, pois sem vocês esse trabalho com certeza não seria o mesmo.

Aos colegas do laboratório de Fitopatologia II: Naama, Cláudia, Andréa, Deyse, Jacqueline, Ana Paula e todos que fazem parte do grupo de Fitopatologia II, por terem me acolhido de maneira tão calorosa no laboratório, e um agradecimento especial ao meu querido amigo Hailton, pelo carinho, apoio, dedicação, generosidade, paciência, ajuda e horas de sono perdidas para poder me ajudar. Muito obrigada!

Pelo pessoal do Departamento de Ciências Vegetais (DCV), aos técnicos, o pessoal da secretaria e da limpeza, pela ajuda e por todos os momentos que passamos juntos.

Agradeço também aos amigos Luiz Henrique, Sherman, Otaciana, Jeiza, Gidalto, Monique, Ricardo e Conceição (que mesmo estando distante, nunca me abandonou, nem deixou de acreditar em mim!), que me acompanharam nessa trajetória, sempre aconselhando, ouvindo, ajudando, enfim, participando de forma ativa de todos os momentos. Obrigada por serem quem vocês são.

Ao tão especial companheiro Gianni Guerra, pelos conselhos, compreensão, ajuda, força, companheirismo e carinho que sempre estiveram presentes nos momentos mais oportunos.

Enfim, a todos àqueles que torceram por mim, me apoiaram e me incentivaram de alguma maneira, tornando hoje, esse sonho possível. Todos, à sua maneira, foram essenciais durante a minha trajetória, e me auxiliaram fazendo com que eu me tornasse o que sou.

Muito Obrigada!



## RESUMO

SILVA, Shamyra Georgia de Azevedo e. **Estudo de diversidade genética e efeito inibitório do látex de *Calotropis procera* em fungos fitopatogênicos**, 2015. 94f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitotecnia/Melhoramento Genético) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, 2015.

Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton] é uma planta que tem recebido destaque por se tratar de uma espécie que possui diversas funcionalidades como alimentação animal, medicina tradicional, agricultura, meio ambiente, indústria cosmética e têxtil, podendo também atuar no combate à pragas, fungos e vírus através de mecanismos de defesa associados ao seu látex. Objetivou-se nesse estudo avaliar fluidos laticíferos da Flor de Seda na inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos de *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *Monosporascus cannonballus* e estudar a divergência genética de genótipos de Flor de Seda por meio de marcadores moleculares RAPD e ISSR. Vinte amostras de folhas da espécie foram coletadas na cidade de Grossos/RN e na cidade de Mossoró/RN no Campus Leste da UFERSA (dez plantas para cada local de coleta). O látex das plantas foram testados em quatro diferentes tipos de fungos fitopatogênicos, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *Monosporascus cannonballus* com duas diferentes metodologias (adicionando o látex ao meio de cultura antes e após a polimerização do meio) e com dois níveis diferentes de concentração (puro e diluído 1:1). Para as análises moleculares, o DNA de cada uma das plantas foi extraído com 11 *primers* RAPD e 10 *primers* ISSR. Para as análises do látex, foi observado que não houve efeito inibitório para nenhum dos isolados de *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *Monosporascus cannonballus* em nenhuma das concentrações testadas nas condições estudadas. Os resultados moleculares obtidos revelaram um bom padrão de amplificação para ambos os marcadores de DNA, mostrando a formação de grupos distintos, tendo sido detectada a presença de variabilidade genética. Para as análises com os marcadores RAPD houve a formação de quatro grupos distintos, e para o marcador ISSR foi possível observar a formação de seis grupos. Quando se analisou os dois marcadores de forma correlacionada foi possível detectar a formação de sete grupos distintos demonstrando a existência de variabilidade. A diferença encontrada nos resultados de ambos marcadores pode ser explicada por se tratar de dois marcadores que cobriram diferentes regiões do genoma.

**Palavras-chave:** Flor de Seda, látex, fungos fitopatogênicos, variabilidade genética, RAPD, ISSR.

## ABSTRACT

SILVA, Shamyra Georgia de Azevedo e. **Genetic diversity study and inhibitory effect of *Calotropis procera* latex in pathogenic fungi**, 2015. 94f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fitotecnia/Melhoramento Genético) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró-RN, 2015.

Silk Flower [*Calotropis procera* (Aiton) W.T. Aiton] is a plant that has been highlighted by the case of a species that has several features such as animal feed, traditional medicine, agriculture, environment, cosmetics and textile industry, and may also act to combat pests, fungi and viruses through mechanisms defense associated with your latex. This study aimed to evaluate latex fluid from Silk Flower in inhibiting the development of pathogenic fungi of *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* and *Monosporascus cannonballus* and study the genetic diversity from Silk Flower genotypes using the RAPD and ISSR molecular markers. Twenty samples of species of leaves were collected in the Grossos/RN and Mossoró/RN cities (ten plants from each city). The plants latex were tested on four different types of phytopathogenic fungi, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* and *Monosporascus cannonballus* with two different methods (adding latex to the culture medium before and after polymerization middle), and with two different concentration level (neat and diluted 1:1). For molecular analysis, DNA of each plant was extracted with 11 RAPD primers and 10 ISSR primers. For latex analyzes, it was observed that there was no inhibitory effect for any of *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* and *Monosporascus cannonballus* isolates in any of the concentrations tested under the conditions studied. Molecular results showed a good standard for both amplification of DNA markers, showing the formation of different groups, and the presence of genetic variability has been detected. For the analysis with molecular markers there was the formation of the four distinct groups, and in the ISSR marker was observed the formation of six groups. When it was analyzed the two markers in a corresponding manner it was possible to detect the formation of seven distinct groups showing the existence of variability. The difference in the results of both markers can be explained by the case of two markers that covered different regions of the genome.

**Keywords:** Silk flower, latex, pathogenic fungi, genetic variability, RAPD, ISSR.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Georreferenciamento e localização dos 20 genótipos de Flor de Seda [ <i>Calotropis procera</i> (Aiton) R.Br.] coletados nas cidades de Mossoró-RN e Grossos-RN. UFERSA, Mossoró, 2015.....	69
Tabela 2	<i>Primers Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD) selecionados para amplificação de genótipos de Flor de Seda [ <i>Calotropis procera</i> (Aiton) R.Br.], com respectivas sequências, temperatura de anelamento (T <sub>m</sub> ), número total de fragmentos (NTF), número total de fragmentos polimórficos (NFP) e percentagem de polimorfismo (%). UFERSA, Mossoró/RN, 2015....	76
Tabela 3	Coefficientes de correlação linear avaliados em genótipos de Flor de Seda [ <i>Calotropis procera</i> (Aiton) R.Br.] com base no uso de <i>Primers Random Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD). UFERSA, Mossoró/RN, 2015.....	77
Tabela 4	Iniciadores <i>Inter Simple Sequence Repeat</i> (ISSR) selecionados para amplificação de genótipos de Flor de Seda [ <i>Calotropis procera</i> (Aiton) R.Br.], com respectivas sequências, temperatura de anelamento (T <sub>m</sub> ), número total de fragmentos (NTF). UFERSA, Mossoró/RN, 2015.....	81
Tabela 5	Coefficientes de correlação linear avaliados em genótipos de Flor de Seda [ <i>Calotropis procera</i> (Aiton) R.Br.] com base no uso de marcadores ISSR. UFERSA, Mossoró/RN, 2015.....	82
Tabela 6	Coefficientes de correlação linear avaliados em genótipos de Flor de Seda [ <i>Calotropis procera</i> , (Aiton) R.Br.] com base no uso de marcadores ISSR+RAPD. UFERSA, Mossoró/RN, 2015.....	84

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Comparação entre o crescimento das colônias entre a testemunha e os tratamentos para *Macrophomina phaseolina* utilizando o látex da Flor de Seda; A - T/M: Testemunha *Macrophomina*; B – M/P: *Macrophomina* Pura (corresponde a utilização do látex puro); C – M/D: *Macrophomina* Diluída (corresponde a utilização do látex diluído 1:1). Mossoró, 2014..... 58
- Figura 2 Comparação entre o crescimento das colônias entre a testemunha e os tratamentos para *Rhizoctonia solani* utilizando o látex da Flor de Seda; A - T/M: Testemunha *Rhizoctonia*; B – M/P: *Rhizoctonia* Pura (corresponde a utilização do látex puro); C – M/D: *Rhizoctonia* Diluída (corresponde a utilização do látex diluído 1:1). Mossoró, 2014..... 59
- Figura 3 Plantas de Flor de Seda coletadas nos municípios de Mossoró-RN e Grossos-RN. UFERSA, Mossoró, 2015..... 69
- Figura 4 Padrão eletroforético de 20 genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] obtidos pelo marcador molecular *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (OPA-04); 1: CP01; 2: CP02; 3: CP03; 4: CP04; 5: CP05; 6: CP06; 7: CP07; 8: CP08; 9: CP09; 10: CP10; 11: CP11; 12: CP12; 13: CP13; 14: CP14; 15: CP15; 16: CP16; 17: CP17; 18: CP18; 19: CP19; 20: CP20. UFERSA, Mossoró/RN, 2015. 75
- Figura 5 Dendrograma UPGMA de vinte acessos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] obtidos pelo complemento do índice de Jaccard calculado com dados de marcadores RAPD. ( $r=0,86^{**}$ ). r: correlação cofenética..... 78
- Figura 6 Padrão eletroforético de 20 genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] obtidos pelo marcador molecular *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) (DiGA3" T); 1: CP01; 2: CP02; 3: CP03; 4: CP04; 5: CP05; 6: CP06; 7: CP07; 8: CP08; 9: CP09; 10: CP10; 11: CP11; 12: CP12; 13: CP13; 14: CP14; 15: CP15; 16: CP16; 17: CP17; 18: CP18; 19: CP19; 20: CP20. UFERSA, Mossoró/RN, 2015..... 80
- Figura 7 Dendrograma UPGMA de vinte acessos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] obtidos pelo complemento do índice de Jaccard calculado com dados de marcadores ISSR. ( $r=0,81$ ). r: correlação cofenética..... 83
- Figura 8 Dendrograma UPGMA de vinte acessos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] obtidos pelo complemento do índice de Jaccard calculado com dados de marcadores (ISSR+RAPD). ( $r=0,86$ ). r: correlação cofenética..... 85

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA.....	Deoxyribonucleic Acid
BDA.....	Batata Dextrose Ágar
BOD.....	Biochemical Oxygen Demand
CCC.....	Coefficiente de Correlação Cofenética
CIA.....	Clorofómio-Álcool-Isoamílico
CTAB.....	Cetyl trimethylammonium bromide
dNTP.....	Deoxynucleotid
ISSR.....	Inter Simple Sequence Repeat
PCR.....	Reaction Chain Polymerase
PIC.....	Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial
RAPD.....	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA.....	Ribonucleic Acid
RNase.....	Enzima que catalisa a ação do RNA
TBE.....	Tris, Ácido Bórico, EDTA
UPGMA.....	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
<b>1.2.1 Potencial da Caatinga.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.2 Flor de Seda [<i>Calotropis procera</i> (Aiton) R.Br.].....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.3 Utilização da Flor de Seda.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.4 Flor de Seda e o látex.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.5 Fungos e proteínas antifúngicas.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2.6 <i>Macrophomina phaseolina</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2.7 <i>Rhizoctonia solani</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>1.2.8 <i>Colletotrichum musae</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>1.2.9 <i>Monosporascus cannonballus</i> .....</b>	<b>28</b>
<b>1.2.10 Estudo de diversidade genética no melhoramento de plantas.....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.11 Caracterização molecular.....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.12 Marcadores Moleculares.....</b>	<b>32</b>
<b>1.2.13 Marcadores RAPD.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2.14 Marcadores ISSR.....</b>	<b>34</b>
1.3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	36
<b>CAPÍTULO 2 – ESTUDO DO EFEITO INIBITÓRIO DE FLUIDOS LATICÍFEROS DE FLOR DE SEDA [<i>Calotropis procera</i> (AIT.) R.Br.] EM FUNGOS DE IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA.....</b>	<b>52</b>
2.1 RESUMO.....	52
2.2 ABSTRACT.....	53
2.3 INTRODUÇÃO.....	54
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
<b>2.4.1 Local da Pesquisa.....</b>	<b>56</b>
<b>2.4.2 Espécies fúngicas utilizadas.....</b>	<b>56</b>
<b>2.4.3 Coleta do material vegetal e fracionamento do látex.....</b>	<b>56</b>
<b>2.4.4 Instalação e condução do experimento.....</b>	<b>57</b>
<b>2.4.5 Avaliações e análises dos dados.....</b>	<b>57</b>
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58

2.6	CONCLUSÕES.....	61
2.7	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	62
<b>CAPÍTULO 3 - ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DE FLOR DE SEDA [<i>Calotropis procera</i> (AIT.) R.Br.]POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD E ISSR.....</b>		
3.1	RESUMO.....	65
3.2	ABSTRACT.....	66
3.3	INTRODUÇÃO.....	67
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	68
<b>3.4.1</b>	<b>Material Genético.....</b>	<b>68</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Caracterização Molecular.....</b>	<b>70</b>
3.4.2.1	Coleta e preparo do material vegetal.....	70
3.4.2.2	Extração de DNA vegetal.....	71
3.4.2.3	Seleção de <i>primers</i> RAPD amplificação e eletroforese.....	72
3.4.2.4	Seleção de <i>primers</i> ISSR.....	73
3.4.2.5	Leitura dos dados moleculares e análise estatística.....	74
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
<b>3.5.1</b>	<b>Marcador Molecular RAPD.....</b>	<b>75</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Marcador Molecular ISSR.....</b>	<b>79</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Correlação entre as análises moleculares RAPD e ISSR.....</b>	<b>84</b>
3.6	CONCLUSÕES.....	88
3.7	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	89

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

#### 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

O melhoramento genético tem influenciado de maneira decisiva no incremento da adaptabilidade e produtividade de cultivos; entretanto, para a eficiente obtenção de ganhos genéticos no melhoramento é necessário um conhecimento detalhado da constituição genética das espécies.

A região semiárida do Nordeste brasileiro é rica em espécies vegetais e apresenta inúmeras espécies com grande potencial econômico, porém ainda pouco estudadas pela maioria da classe científica, entre estas plantas destaca-se a Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.]. A Flor de Seda pertencente à família Asclepiadaceae, possui teores significativos de nutrientes, bem como adaptabilidade às condições edafoclimáticas da região semiárida. Sendo uma planta sempre verde durante todo ano, esta, pode ser utilizada como alimento para caprinos, ovinos e bovinos, e apresentar diversas propriedades como a presença de substâncias ativas permitindo seu uso farmacológico (COSTA; MEDEIROS; ALVES, 2009), além da utilização como cobertura vegetal em plantios e em recuperação de áreas degradadas. Planta nativa da África, Madagascar, Península Arábica e Sudoeste da Ásia, esta espécie possui ampla distribuição geográfica, atualmente aclimatada no Norte da Austrália, Tailândia, Vietnã e outros países (RAHMAN; WILCOCK, 1991; CSURSHES; EDWARDS, 1998) como é o caso do Brasil.

A Flor de Seda é uma planta que produz látex, um líquido de aspecto leitoso, presente em aproximadamente 20.000 espécies de plantas de 40 famílias (DOMSALLA; MELZIG, 2008). Plantas laticíferas vêm sendo largamente estudadas, devido às várias funções biológicas terem sido atribuídas aos laticíferos. Tem-se sugerido que a presença do látex neste tipo de planta esteja envolvida na sua defesa. Diante desse argumento, é crescente a pesquisa por proteínas vegetais que poderiam ser utilizadas como ferramentas biotecnológicas para tal fim, sendo assim, as plantas laticíferas têm um grande potencial, pois são reconhecidamente



fontes de proteínas relacionadas à defesa vegetal.

O látex de *Manihot glaziovii* Muell Arg. mostrou atividade antifúngica sobre o crescimento de *Colletotrichum gloesporioides* (Penz), *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid e *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.(PEREIRA et al, 1999). Contudo ainda são desconhecidos estudos sobre o envolvimento de fluidos laticíferos em atividades deletérias contra fungos fitopatogênicos.

Os fungos fitopatogênicos são microrganismos causadores de doenças em plantas, que podem atuar nestas, das mais diversas formas, sendo mais atuantes em estruturas como raízes, caules, folhas e frutos. Estes patógenos podem estar disseminados em vários tipos de ambientes, como na água, no solo, etc.

Dentre estes patógenos, os que se encontram naturalmente habitando o solo, representam um complicado grupo de controle, dado à dificuldade de aplicação de produtos antifúngicos neste ambiente, além de outras limitações. Entre estes patógenos, podem ser citados os fungos *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, *Rhizoctonia solani* Kuhn e *Monosporascus cannonbalus* Pollack & Uecker.

Outro grupo de difícil controle, diz respeito às espécies com atuação potencializada na fase pós-colheita, sendo *Colletotrichum musae* (Berk & Curt.) von Arx., um exemplo destes fitopatógenos.

A *Macrophomina phaseolina* é capaz de infectar centenas de espécies vegetais, tais como, milho, sorgo, amendoim, algodão e girassol, entre outras espécies botânicas (GHAFAR; ZENTMYER, 1968; FIGUEIREDO et al., 1969; MENDES et al., 1971; WYLLIE, 1984). A ocorrência desse patógeno foi relatada, pela primeira vez, no Brasil infectando raízes de feijão (BITANCOURT, 1935). A *Macrophomina phaseolina* produz picnídios marrom-escuros, solitários ou agregados, imersos, tornando-se irrompentes com 100-200µm de diâmetro, abrindo-se por ostíolo apical (HOLLIDAY; PUNITHALINGAM, 1970). A variação no tamanho dos picnídios parece estar associada ao substrato sobre o qual o fungo se desenvolve (DHINGRA; SINCLAIR, 1978).

O fungo *Rhizoctonia solani* ocorre em diversas culturas de importância econômica, como a batata, o feijão, o fumo, o milho e a soja, causando podridões radiculares no início do desenvolvimento da plântula e provocando redução no vigor e na germinação da semente. A incidência e a severidade do ataque estão associadas às condições do solo e a sequência de culturas cultivadas na área.

*Colletotrichum musae* é um fungo que apresenta diversas formas e tamanhos de esporos, características culturais, bem como de patogenicidade. Além

disso, é responsável pela antracnose em banana (*Musa spp.*), doença importante presente tanto na pré-colheita quanto na pós-colheita dos frutos. Os sintomas caracterizam-se pela formação de lesões escuras e deprimidas sobre as quais, em condições de alta umidade, surgem as frutificações rosadas do patógeno, sendo que normalmente a polpa não é afetada, exceto quando exposta a condições de alta temperatura ou quando o fruto está em estágio avançado de maturação (CORDEIRO; KIMATI, 1997).

*Monosporascus cannonballus* trata-se de um fitopatógeno habitante natural do solo, termófilo e bem adaptado às condições áridas e semiáridas, e por isso, responsável por grandes perdas, limitando o cultivo de melão em diversas regiões do mundo. Inúmeras medidas de controle têm sido estudadas, entretanto, estas ainda são pouco eficazes. Algumas estratégias de controle têm sido utilizadas, porém, devido ao fungo ser considerado termófilo e bem adaptado ao clima árido e semiárido, estas têm sido pouco eficientes. No Brasil, apesar de algumas medidas estarem sendo estudadas, estas ainda são pouco eficazes e ainda não são muito bem estabelecidas devido à falta de informações sobre a epidemiologia desta doença, além disso, o Nordeste brasileiro dispõe de excelentes condições edafoclimáticas que garantem o bom desenvolvimento deste patógeno.

Quando se analisa o uso de plantas da caatinga ou de espécies exóticas adaptadas às condições edafoclimáticas deste bioma, sejam estas plantas xerófilas e/ou forrageiras, os trabalhos relatam o uso das mesmas como se todos os indivíduos de uma determinada espécie fossem iguais, sendo ainda escassos estudos que consideram a diversidade dentro das espécies. Sampaio et al. (2006) faz um alerta ao destacar que estas espécies não foram alvo de estudos de diversidade genética e de melhoramento, dando-se, quase sempre, prioridade às espécies frutíferas. Aliás, é o estudo da diversidade dentro das espécies, uma das condições essenciais para se considerar os recursos genéticos das mesmas e, por conseguinte, analisar a vantagem de possíveis variantes que possam ser encontrados, sendo, desse modo, uma das condições fundamentais para que se processe a domesticação dessas espécies com vistas a torná-las mais apropriadas para uso nos diversos fins a que se destinam.

A biotecnologia tem contribuído para caracterização e conservação de germoplasma mediante a utilização de marcadores moleculares. Estes marcadores permitem estudar e avaliar a variabilidade genética existente entre populações naturais para conservação *in situ* (COSTA; MEDEIROS; ALVES, 2009). Trata-se,

portanto, de uma ferramenta importante que gradualmente está sendo adotada no estudo de bancos de recursos genéticos, com a finalidade de avaliar o grau de diversidade das coleções, até então, avaliadas somente por descritores fenotípicos, baseados em características fisiológicas e morfoagronômicas (VAN BEUNING; BUSCH, 1997; HARRISON et al., 2000).

Os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) têm sido largamente utilizados em estudos de filogenia, diversidade genética e seleção assistida por marcadores (BENZAQUEM et al., 2009). A caracterização genotípica por marcadores moleculares pode auxiliar o melhorista na escolha entre genótipos divergentes e promissores com alto potencial produtivo (GOUVÊA et al., 2010). O marcador RAPD é uma ferramenta simples e eficaz utilizada para detectar polimorfismos a nível de DNA em indivíduos, sem que características fenotípicas tenham ainda sido expressas. O advento do desenvolvimento de princípio de Reações de Polimerização em Cadeia (PCR) possibilitou a utilização do RAPD, amplificando sequências de DNA genômico ao acaso a partir de iniciadores de sequência aleatória (FERREIRA; GRATAPLAGIA, 1995; FERREIRA, 2003). Estudos sobre divergência genética realizados com a técnica RAPD permitem distinguir diferenças mínimas entre indivíduos, populações e espécies (BRAMMER, 2000). Os marcadores moleculares ISSR também se baseiam em PCR e amplificam segmentos de DNA com um único iniciador composto por uma sequência do microsatélite com 16-25pb de comprimento, podendo amplificar sequências inter-SSR de diferentes tamanhos. Esses iniciadores podem estar desancorados ou usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3' por uma a quatro bases degeneradas. Essas ampliações não requerem informação prévia do genoma e permitem a obtenção de multilocos (CAIXETA et al., 2006; GOULÃO; OLIVEIRA, 2001).

Com base no problema exposto este trabalho teve como objetivo avaliar fluidos laticíferos da Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] na inibição do desenvolvimento de fungos fitopatogênicos de importância agrônômica de *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *Monosporascus cannonballus* e estudar a divergência genética em genótipos de Flor de Seda por meio de marcadores moleculares RAPD e ISSR.

## 1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.2.1 Potencial da Caatinga

O semiárido nordestino apresenta grandes potencialidades econômicas para o desenvolvimento sustentável, sendo a maior parte de seu território ocupado por uma vegetação xerófila, de fisionomia e florística variada, denominada “caatinga”, constituída especialmente de espécies lenhosas e herbáceas, de pequeno porte, geralmente dotadas de espinhos, sendo, geralmente, caducifólias, perdendo suas folhas no início da estação seca, e de cactáceas e bromeliáceas. O semiárido portanto, constitui-se em bioma rico em diversidade. Caatinga é um termo de origem Tupi-Guarani que significa “mata branca”, que caracteriza o ecossistema durante o período de estiagem (OLIVEIRA-BENTO, 2012). Para que a diversidade dos recursos genéticos vegetais da caatinga seja preservada é importante resguardá-la de alterações em sua qualidade genética fisiológica, sanitária e física (AZEVEDO et al., 2010).

A Caatinga ocupa uma área de cerca de 850.000 km<sup>2</sup>, cerca de 10% do território nacional, englobando de forma contínua parte dos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia (região Nordeste do Brasil) e parte do norte de Minas Gerais (região Sudeste do Brasil). Ocupando cerca de 850 mil Km<sup>2</sup>, é o mais fragilizado dos biomas brasileiros. O uso insustentável de seus solos e recursos naturais ao longo de centenas de anos de ocupação, associado à imagem de local pobre e seco, fazem com que a Caatinga esteja bastante degradada. Entretanto, pesquisas recentes vêm revelando a riqueza particular do bioma em termos de biodiversidade e fenômenos característicos.

### 1.2.2 Flor de Seda

Na busca de plantas que suportem os rigores do clima semiárido da região, a *Calotropis procera* surge ganhando destaque. Popularmente conhecida no Nordeste brasileiro como Flor de Seda, possui diversos sinônimos de acordo com as regiões do Brasil, como: Algodão de Seda, Algodão de Praia, Leiteira, Paininha

de Seda, Saco de Velho, Queimadeira, Pé de Balão, Jarnaúba, Ciúme e Ciumeira. Tem recebido destaque na adaptação às regiões semiáridas. Pertence à família Asclepiadaceae que possui 280 gêneros e 200 espécies, apresenta a seguinte descrição botânica: **Reino:** Plantae; **Subreino:** Tracheobionta; **Superdivisão:** Spermatophyta; **Divisão:** Magnoliophyta; **Classe:** Magnoliopsida (Dic.); **Subclasse:** Asteridae; **Ordem:** Gentianales; **Família:** Asclepiadaceae; **Gênero:** *Calotropis* R. Br.; **Espécie:** *Calotropis procera* (Aiton) W.T.Aiton.

Em relação às características botânicas, a Flor de Seda pode atingir de 2,5 a 6,0 metros de altura, possuindo uma ou poucas hastes e poucos galhos, seu caule corticiforme parece ser uma grande adaptação morfofisiológica que reduz a perda de água excessiva para o meio, funcionando também como isolante térmico e ação direta dos ventos, apresenta fissuras ou sulcos que pode permitir a troca controlada com o meio, além de caule seroso que reduz o ataque de insetos. O sistema radicular é bastante desenvolvido, com raiz principal pivotante que pode atingir de 1,7 a 3,0m em solos arenosos de deserto. As folhas são organizadas ao longo do caule, com formato oblongo-ovaladas (KISSMAN; GROTH, 1992). A inflorescência é constituída de pedúnculos carnosos e cilíndricos, terminais e axilares, em cuja extremidade encontram-se umbelas de flores pediceladas. As flores são actinomorfas e hermafroditas, cálice envolvente, com 5 lobos agudos, pouco perceptível por estar ajustado sobre a corola e apresentar-se com a mesma textura e coloração. Os frutos são folículos inflados, globosos e leves, devido ao grande espaço ocupado com o ar. Com o florescimento e frutificação durante todo o ano, produz milhares de sementes por planta que são disseminadas pelo vento, anemocórica, podendo alcançar vários quilômetros (LITTLE; WOODBURY; WADSWORTH, 1974). Suas sementes são ovóides, achatadas e de superfície um pouco rugosa, sensíveis a variações de temperatura, e segundo Labouriau, Valadares (1976) a Flor de Seda suporta variações de temperatura de 18° a 37°C para germinação, mas o intervalo de 28° a 32°C é considerada ideal. Possui fácil e rápida propagação devido à excelente germinação, sem haver necessidade de pré-tratamentos, pois não apresenta dormência podendo ser plantadas diretamente no solo (VOGT, 1995). É uma espécie de polinização entomófila, tendo como principais polinizadores as abelhas do gênero *Xylocopa* (EISIKOWITCH, 1986).

Nativa da África, Madagascar, Península Arábica, Sudoeste da Ásia, esta espécie possui ampla distribuição geográfica, atualmente estabelecida no Norte da Austrália, Tailândia, Vietnã e outros países (RAHMAN; WILCOCK, 1991;

CSURCHES; EDWARDS, 1998). Introduzida no Brasil com fins ornamentais em 1900, em Recife (INSTITUTO HÓRUS, 2013), encontra-se aclimatada, inclusive na caatinga do sertão nordestino, podendo ser encontrada em muitos estados da região Nordeste e nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Goiás e Distrito Federal (MOREIRA FILHO; VIANA, 2007).

Lindley (1985) afirmou que a Flor de Seda desenvolve-se bem nas mais diversas regiões do planeta, onde a precipitação anual varia de 150 a 1000mm, algumas vezes, é encontrada crescendo em solos excessivamente drenados com precipitação superior a 2000mm. Possui grande afinidade a regiões desérticas e áridas (KHAN; MALIK, 1989), ocorre em pastagens degradadas, no litoral a beira do mar, dunas, rodovias, terrenos baldios e margens de estradas, tolera solos pobres, ácidos, salinos e com elevado teor de alumínio (INSTITUTO HÓRUS, 2013).

### **1.2.3 Utilização da Flor de Seda**

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para demonstrar a viabilidade da Flor de Seda. Na alimentação animal, Nehra, Oswal, Faroda (1987) relataram que caprinos, ovinos e camelos se alimentam de folhas de Flor de Seda durante os períodos mais secos do ano, na região de Haryana, na Índia porém, o consumo é baixo. No entanto, os autores afirmaram que, quando as folhas são picadas e misturadas com outros alimentos, o consumo aumenta consideravelmente sem causar nenhum efeito prejudicial aos animais.

Fall (1991) citado por Vaz et al. (1998a) desenvolveram trabalho para avaliar a digestibilidade “*in vitro*” e a degradabilidade “*in situ*” de folhas de Flor de Seda no rúmen. As folhas apresentaram digestibilidade de 72% e 68% para matéria seca e matéria orgânica, respectivamente. Os melhores resultados para degradabilidade no rúmen foram obtidos com 72% às 6h, 88% às 24h, 96% às 48h e 98% às 72h de incubação. Ao realizar análise da composição química do feno de Flor de Seda.

Abbas, El Tayeb e Sulleiman (1992) obtiveram: 94,62% de matéria seca e 19,4% de proteína bruta. Os autores recomendam a utilização de folhas secas na

alimentação de caprinos, sem exceder 0,5 kg/dia, quando dieta exclusiva, e se misturadas a fenos de outras forrageiras, em até 50% do consumido.

Existem ainda relatos sobre o uso desta planta na medicina natural ou conhecimento popular, destacando-se: combate à anemia, asma, tuberculose, constipação, cáries, febre, infertilidade, picada de cobras, nematocidas, larvicida, úlceras gástricas, doenças hepáticas e anticancerígeno (AKTAR et al., 1992; BASU et al., 1992). As folhas e as raízes de Flor de Seda têm sido utilizadas para aliviar dores sob diferentes condições (BASU; NAG CHAUDHURI, 1991). Contudo, Dewan et al. (2000) sugerem que, é de fundamental importância identificar o princípio ativo desta espécie antes de recomendar o seu uso como analgésico.

Khan (1999) verificando algumas medidas de controle à erosão eólica, no deserto de Cholistan (Paquistão), para a estabilização de dunas de areia, observou que a planta de Flor de Seda crescia abundantemente neste tipo de habitat, recomendando o seu uso; entretanto, informou que a planta necessita de uma maior atenção, devido ser uma planta tóxica. Em um estudo de simulação do desenvolvimento e poder de reação de pastagens nas savanas da Austrália, Ludwig et al. (2001) constataram que a Flor de Seda foi a espécie, chamada de erva daninha exótica, que primeiro sobressaiu após 5 anos de abandono em uma pastagem altamente utilizada, mostrando desta forma o alto poder de estabelecimento desta espécie, podendo ser estudada na recuperação de áreas degradadas.

Na África, suas folhas são empregadas para clarificar a água potável (CORRÊA, 1984). Os pelos unicelulares que coroam suas sementes, apesar de alguns pesquisadores afirmarem que a fibra desprende um pó que ataca os pulmões, em muitos lugares servem para a fabricação de tecidos, no enchimento de almofadas e travesseiros. Vários institutos realizam estudos para encontrar um processo prático de fiação e da utilização destas fibras na fabricação de papel.

Samantaray et al. (2001) ao estudarem o estabelecimento de cobertura vegetal em rejeito de mina de cromita, na Índia, verificaram que a Flor de Seda suportou altas concentrações de níquel e cromo no caule e folhas. Os autores afirmaram que informações desta natureza são fundamentais para o estabelecimento da mesma em áreas degradadas por mineração.

#### **1.2.4 Flor de Seda e o látex**

Látex é o termo empregado para descrever um líquido com aspecto leitoso que é exsudado de plantas que sofreram algum dano mecânico. Embora na maioria das vezes possua um aspecto leitoso, como em *Hevea brasiliensis* ou *Calotropis procera*, o látex pode ser amarelo ou laranja, como em plantas da família *Papaveraceae*, marrom-amarelado, em *Cannabis*, ou pode ser límpido como no gênero *Morus* ou na espécie *Nerium oleander* (KEKWICK, 2001). O látex também pode ser produzido por fungos, como dos gêneros *Lactaria* e *Peziza*.

A capacidade para formar látex é encontrada em plantas crescidas em muitos diferentes habitats e diferentes características morfológicas como ervas, arbustos e árvores. Cerca de 12.000-35.000 espécies, pertencentes a 900 gêneros de aproximadamente 12 famílias, maioria dicotiledônea, formam látex.

Várias funções têm sido atribuídas aos laticíferos, uma delas é que eles formam um tecido de secreção, mas a vantagem para a planta de estocar látex ainda é duvidosa, pois a enorme quantidade de energia envolvida na síntese de borracha ou de outros componentes do látex não parece ser recuperável. Tem-se sugerido há 100 anos, desde que o látex foi encontrado em plantas do semiárido, que os laticíferos podem ser uma reserva de água, mas nem todas as plantas que contêm látex estão restritas a regiões secas. Possivelmente, a justificativa mais aceita da presença de látex é seu envolvimento na defesa da planta (RUDALL, 1987). O látex possui uma ação colante que pode imobilizar pequenos insetos ou mesmo uma lagarta (MOURS, 1997).

A presença de proteínas relacionadas à defesa contra patógenos (PR-Proteínas), como glucanases e quitinases (VAN LOON; VAN STTRIEN, 1999), proteinases (SGARBIERI et al, 1964; GLAZER; SMITH, 1971; ABRAHAM; JOSHI, 1979; DUBEY; JAGANADHAM, 2002) e inibidores de proteinases (MONTIL et al., 2004; SRITANYARAT et al., 2006) no látex de várias espécies sugere que essa secreção poderia agir contra o ataque de insetos e patógenos. Estudos apontam que a composição química do látex age no combate a fungos e a vírus por meio de suas substâncias constituintes (PEREIRA et al., 1999).

Fluidos laticíferos também apresentam forte potencial para o controle de mosquitos vetores de algumas doenças, como *Aedes aegypti* (transmissor da dengue), *Anopheles stephensi* (transmissor da malária) e *Culex fatigan* (transmissor da febre amarela) (GIRDHAR et al., 1984). Quase todos os estudos bioquímicos e



funcionais de fluidos laticíferos envolvem a planta *Hevea brasiliensis*, a Seringueira.

A Flor de Seda é uma planta laticífera, sendo assim chamada por produzir látex. A produção de látex em Flor de Seda é extraordinária, sendo possível coletar até 60mL de fluido de uma única planta sem comprometer sua saúde. No Paquistão, o látex de Flor de Seda é usado nas plantações de tomate (MAQBOOL; HASHMI; GHAFAR, 1987) no controle de pragas. Existem ainda relatos de seu aproveitamento na produção de adesivos, além de seu uso como matéria-prima para outros produtos, especialmente polímeros, base das colas comerciais existentes, podendo ainda ser usado como poderoso depilatório.

Proteínas do látex de Flor de Seda apresentaram ação nociva para várias pragas agrícolas (RAMOS et al., 2007b) e provavelmente um inibidor de protease pode estar envolvido nos efeitos deletérios observados (RAMOS et al., 2009b). Moléculas presentes no látex de Flor de Seda produzem efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento larval e eclosão de ovos do mosquito transmissor da dengue (RAMOS et al., 2006a).

### **1.2.5 Fungos e proteínas antifúngicas**

Os fungos apresentam grande variedade de modos de vida. Podem viver como saprófagos, quando obtêm seus alimentos decompondo organismos mortos; como parasitas, quando se alimentam de substâncias que retiram dos organismos vivos nos quais se instalam, prejudicando-o ou podendo estabelecer associações mutualísticas com outros organismos, em que ambos se beneficiam. Em todos os casos mencionados, os fungos liberam enzimas digestivas para fora de seus corpos. Essas enzimas atuam imediatamente no meio orgânico no qual eles se instalam, degradando-o a moléculas simples, que são absorvidas pelo fungo como uma solução aquosa.

As plantas estão expostas a uma grande quantidade de fungos patogênicos. Embora não tenham sistema imune, elas evoluíram em grande variedade de potentes mecanismos de defesa, incluindo a síntese de compostos de baixo peso molecular, proteínas e peptídeos com atividade antifúngica (SELITRENNIKOFF, 2001).

As proteínas antifúngicas são produzidas por muitos organismos incluindo plantas superiores, gimnospermas, fungos, bactérias, insetos, moluscos e mamíferos (WANG; NG, 2001; SELITRENNIKOFF, 2001). Nas plantas, elas estão envolvidas em defesa constitutiva e induzida do vegetal. Sementes de plantas são especialmente ricas em proteínas antifúngicas, com quantidades diversas vezes mais altas do que as presentes em folhas e flores (WANG; NG, 2001).

Os alvos estruturais das proteínas antifúngicas vão desde a parte mais exterior da célula fúngica, como a parede celular, membrana plasmática e, finalmente a diversos alvos intracelulares (THEIS; STHAL, 2004). Assim, essas proteínas exibem uma ampla variedade de mecanismos de ação, incluindo por exemplo, inibição da síntese da parede celular ou alteração da estrutura, formação de poros e canais na membrana, danos nos ribossomos, inibição da síntese de DNA e inibição do ciclo celular. Contudo, o modo de ação da maioria dessas proteínas ainda não foi elucidado (SELITRENNIKOFF, 2001; NG, 2004).

### 1.2.6 *Macrophomina phaseolina*

O fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanish agente causal de podridões de raízes e caules, é um organismo bastante difundido, parasitando mais de 500 espécies de plantas (SINCLAIR; BACKMAN, 1989) notadamente culturas agronomicamente importantes como alfafa (*Medicago sativa* L.), algodão (*Gossypium* spp.), amendoim (*Arachis hipogaea* L.), batata (*Solanum tuberosum* L.), batata-doce (*Ipomoea batatas* [L.]Lam.), feijão caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.), citrus (*Citrus* spp.), gergelim (*Sesamum annuum* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), guandu (*Cajanus cajan* [L] Millspaugh), melão (*Cucumis melo* L.), milho (*Zea mays* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), soja (*Glycine max* [L.] Merrill), entre outras (SINCLAIR; BACKMAN, 1989).

A denominação desse patógeno foi determinada por Goidanish (1947) após revisar a taxonomia do gênero *Macrophomina*, constituído por apenas uma espécie: *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. A doença causada por esse patógeno provoca redução no estande das plantas no campo, baixa qualidade de sementes, além de induzir a maturação precoce e morte das plantas. Em tecidos infectados, o

fungo produz microescleródios em grande quantidade, os quais consistem na principal fonte de inóculo desse patógeno. Com a decomposição desses tecidos, os microescleródios são liberados no solo, onde sobrevivem por anos, sob condições adversas, principalmente em condições de temperaturas elevadas e estresse hídrico. A disseminação ocorre através de implementos agrícolas, água de irrigação, vento, animais, além de sementes contaminadas (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 1997). Sendo considerado, portanto, um fitopatógeno de extrema importância e que causa grandes perdas na produção agrícola, fazendo-se necessário estudos aprofundados e constantes pesquisas com o intuito de se erradicar e/ou minimizar os danos causados pelo mesmo.

### 1.2.7 *Rhizoctonia solani*

O gênero *Rhizoctonia* foi descrito pela primeira vez pelo micologista francês De Candolle em 1815, como sendo um fungo não esporulante, que infecta preferencialmente raízes e que produz filamentos de hifas a partir de escleródios (SNEH; BURPEE; OGOSHI, 1991). O qual é classificado como Mitosporic Fungi, Hyphomycetes, forma ordem Agonomycetales por não produzir esporos em sua fase assexuada. Outra classificação considerando Agonomycetes como forma-classe e Mycelia Sterilia como forma-ordem (PEREIRA, 1997). O micélio é caracterizado pela ramificação em ângulo reto com septação imediatamente e após o ramo, constrição na base da ramificação e septo doliporo. A fase sexuada deste fungo é *Thanatephorus cucumeris*, classificado no reino Fungi, filo Basidiomycota, ordem Ceratobasidiales, Ceratobasidiaceae (BUTLER; BOLKAN, 1973; ANDERSON, 1982; ADAMS, 1988). Segundo Botelho et al. (2001), *Rhizoctonia solani* é um fungo cosmopolita, com vasto número de hospedeiros, e causa importantes doenças na maioria das plantas cultivadas em todo o mundo. É uma espécie complexa, com muitos biótipos que diferem quanto à patogenicidade, aos hospedeiros, à distribuição na natureza e à aparência em meio de cultura. Relatos sobre isolados de *Rhizoctonia*, fitopatogênicos ou saprofíticos, não descritos em nível específico, são comuns na literatura devido às dificuldades na identificação impostas por limitações morfológicas e taxonômicas do gênero, tais como: ausência de esporos assexuais; instabilidade na morfologia de culturas e

escleródios, em função de variações nas condições de cultivo (PARMETER; WHITNEY, 1970), ampla variabilidade morfológica, sendo que há espécies constituídas por diferentes grupos de isolados com afinidade para efetuar anastomose de hifas entre si (OGOSHI, 1987), necessidade de métodos específicos para se induzir estruturas basidiais in vitro (CARLING; SUMMER, 1992) e desconhecimentos dos teleomorfos para algumas espécies anamórficas (STALPERS; ANDERSEN, 1996).

### 1.2.8 *Colletotrichum musae*

*Colletotrichum musae* (Berk & Curt.) von Arx. (Teleomorfo: *Glomerella musarum* Petch) causador da antracnose, é um patógeno comum de frutos de banana (*Musa* spp.), e possui ampla distribuição geográfica. Economicamente, o patógeno é muito importante por causar prejuízos em pós-colheita, sendo fator limitante da qualidade prejudicando a comercialização do fruto (JEFFRIES et al., 1990).

Em condições favoráveis, os conídios de *C. musae* germinam na superfície em frutos imaturos, dentro de 6 a 8h, produzindo um tubo germinativo, na extremidade do qual se forma o apressório, considerado um órgão de adesão (GOOS; TSCHIRSCH, 1962). Esse órgão capacita o patógeno a sobreviver em condições adversas do ambiente, antes da penetração no tecido do hospedeiro. Quando *C. musae* penetra em frutos imaturos, geralmente permanece quiescente até o início do processo de amadurecimento, ocorrendo a colonização e a expressão dos sintomas.

Leu e Chang (1988) verificaram que a tendência de *C. musae* em formar apressório a partir de tubos germinativos dos conídios depende do tipo de substrato no qual se encontra. Estes autores observaram maior germinação de conídios quando na superfície de frutos maduros. Por outro lado, Goos e Tschirsch (1962) relataram que além do pH 6,0 considerado ótimo para a germinação de conídios de *C. musae*, também a luminosidade, associada ao período de exposição, exercem influência na taxa de germinação de conídios, cujo máximo foi obtido em 8h, sendo a umidade relativa de 98-100% importante nesse processo fisiológico.

Com relação à temperatura ótima para crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios de *C. musae* Goos e Tschirsch (1962) relataram a faixa de 27-30°C, enquanto Cox e Irwin (1988) de 26-28°C. Entretanto, para outras espécies de *Colletotrichum*, a faixa ótima pode variar de 20-30°C, como é o caso do crescimento de *C. gloeosporioides* (Penzig) Sacc. do maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims) (NETO; NAKAMURA; OLIVEIRA, 1994).

### 1.2.9 *Monosporascus cannonballus*

*Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker é um fungo habitante do solo, pertencente à classe Ascomycetes, que produz esporos sexuados chamados ascósporos (POLLACK; UECKER, 1975), e de fase assexuada (conídios) ainda desconhecida (SIVANESAN, 1991). Os Ascomycetes, em geral, produzem oito ascósporos dentro de cada asca, no entanto, *M. cannonballus* produz um ascósporo por asca (e raramente dois), característica essa que o diferencia das demais espécies deste gênero (BELTRÁN, 2006).

Este fungo apresenta peritécios globosos, pretos, de formato esférico com diâmetro de 500µm (SIVANESAN, 1991), os quais geralmente aparecem no final do ciclo da doença, infiltrados em raízes afetadas (SALES JUNIOR et al., 2002), e que são facilmente visíveis a olho nu, ou ainda, observados em lupa. Esses peritécios por sua vez formam ascas periformes, de parede grossa, com diâmetro entre 30-50µm (BELTRÁN, 2006), com capacidade de sobreviver no solo por longos períodos na ausência de hospedeiro, constituindo o inóculo primário para as infecções radiculares (MARTYN; MILLER, 1996a; STANGHELLINI; KIM; RASMUSSEN, 1996; WAUGH et al., 2003). Durante o ciclo de vida do patógeno essas ascas desaparecem deixando livre os ascósporos. Esses, por sua vez, são lisos, de coloração negra brilhante, e semelhantes a bala de canhão (POLLACK; UECKER, 1974).

O micélio fúngico pode apresentar coloração embranquiçada que escurece com o tempo, formando peritécios com 20-30 dias (MARTYN et al, 1992) ou ainda pode formar colônia amarela que não formam peritécios e são de baixa patogenicidade.

O fungo se adapta bem a clima árido e semiárido devido às suas características termófilas (WOLFF, 1996; BRUTON, GARCÍA-JIMENEZ; ARMENGOL, 1999; PIVONIA et al., 2002), com temperatura ótima de crescimento variando entre 25 e 35°C, ocorrendo inibição em temperaturas abaixo de 15°C e acima de 40°C (MARTYN; MILLER, 1996a). Devido a sua característica termófila, o Nordeste brasileiro se apresenta como um excelente ambiente para o desenvolvimento deste patógeno. Por este motivo, a solarização do solo, como uma estratégia isolada, é incapaz de controlar esta enfermidade (REUVENI, KRIKUN; SHANI, 1983).

A faixa de pH que permite o melhor crescimento “*in vitro*” do patógeno varia entre 6-7, podendo este, crescer em pH igual à 9 (MARTYN; MILLER, 1996a). Apresenta tolerância a níveis relativamente altos de sódio e cloreto de cálcio (8-10%) e tem ótimo crescimento micelial em potencial osmótico de -0,6 a -0,8 MPa (FERRIN; STANGHELLINI, 2006).

Outros fatores, como umidade do solo e manejo da cultura, também exercem grande influência sobre a população de *M. cannonballus* no solo. Elevadas densidades de ascósporos têm sido registradas em solos com temperaturas entre 25-30°C (WAUGH et al., 2003) e sem saturação de umidade (BELTRÁN et al., 2005).

#### **1.2.10 Estudo de diversidade genética no melhoramento de plantas**

O Brasil é um dos poucos países que possui um grande número de ecossistemas com espécies que interagem entre si e alelos que diferenciam os indivíduos em cada população de cada espécie (CLEMENT, 2001).

Os recursos genéticos são portadores de genes de grande significado para o melhoramento genético das espécies, embora estejam ameaçados de extinção por várias causas, dependendo da espécie. Por outro lado, para algumas espécies, a variabilidade genética existente nos genótipos cultivados é pequena. Os recursos genéticos são estudados em várias etapas bem definidas, a saber: coleta ou introdução, multiplicação, preservação/conservação, avaliação/caracterização e uso (HAWKES, 1982). Em nível internacional, o International Board of Plant Genetic Resources (IBPGR), hoje International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI),

vem concentrando esforços para a sistematização dos estudos dos Recursos Genéticos, desenvolvendo consciência para a importância dos mesmos, a fim de que seja conservada e mantida, para gerações atuais e futuras, uma grande quantidade de acessos de muitas espécies (IBPGR, 1987). No Brasil, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA, 1995) já conta com mais de 85.000 acessos (NASS et al., 1993). No Nordeste do Brasil, já se encontram Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) e coleções de trabalho de fruteiras tropicais, olerícolas, forrageiras, grãos, fibrosas e oleaginosas.

Contudo, existe a necessidade de ampliar a coleta de determinadas espécies, bem como aprofundar os estudos sistematizados sobre o manejo dos recursos genéticos com espécies existentes na região. Segundo Santos (2007) um dos grandes desafios para a preservação dos recursos genéticos de espécies vegetais do Semiárido brasileiro é a estratégia para definir locais de amostragem, tamanho das amostras e formas de conservação, tanto *in situ* como *ex situ*.

A diversidade genética é responsável pela manutenção do equilíbrio e estabilidade dos ecossistemas, e constitui fonte inestimável de recursos econômicos. Dessa forma, a diversidade genética, além do seu valor intrínseco, agrega valor ecológico, genético, social, econômico, científico, educacional, cultural, recreativo e estético (DIAS, 2000).

A preservação da diversidade genética, tanto dentro, como entre populações naturais de uma determinada espécie é o principal objetivo da biologia da conservação (HAMRICK et al., 1991). Isto significa que, para que os recursos genéticos sejam conservados é importante que se entenda como a variância é distribuída e quais as características do ambiente ou da espécie que influenciam esta distribuição. Tais informações podem ser empregadas para o estabelecimento de populações representativas dos recursos genéticos de uma dada espécie, visando sua utilização em programas de conservação. Assim, se o tamanho de uma população é substancialmente reduzido, pode-se ter como consequências genéticas, fenômenos tais como depressão por endocruzamento e/ou diminuição da variabilidade, o que por sua vez afetará o valor adaptativo geral da população (SACCHERI, 1998). Em decorrência destes acontecimentos, o tamanho efetivo da população irá declinar, levando assim a população à extinção. Portanto, informações sobre a diversidade e/ou estrutura genética são extremamente importantes antes que decisões sobre manejo sejam adotadas. A quantidade de diferenciação genética entre populações pode também fornecer dados para o

planejamento de ações, tais como reforço da variabilidade das populações atuais, reintrodução ou manutenção de coleções *ex-situ* ou coleções de sementes.

Considera-se que a diversidade genética é a porção hereditária de uma variação possível de ser observada e mensurada, sendo empregada como termo alternativo para representar a variação genética, indicando o somatório da informação genética conhecida e potencial de indivíduos, grupos de indivíduos, populações ou subpopulações (VILELA-MORALES; VALOIS; NASS, 1997). Essa diversidade é avaliada a partir de características agronômicas, morfológicas, moleculares, entre outras (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011), sendo que as informações obtidas com as avaliações são expressas em medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade no conjunto de acessos estudados.

O estudo de diversidade genética é realizado a partir de informações de medidas de dissimilaridade obtidas de variáveis quantitativas discretas ou contínuas, dissimilaridades obtidas de variáveis qualitativas binárias e de variáveis qualitativas multicategóricas (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011). Ainda segundo os autores, buscam-se com o estudo da diversidade genética agrupar genótipos similares a partir de técnicas multivariadas e identificam genitores geneticamente diferentes, sendo estes mais convenientes para produzir alto efeito.

### **1.2.11 Caracterização molecular**

A caracterização é uma atividade essencial no manejo de coleções de germoplasma *ex situ* que consiste em tomar dados para descrever, identificar e diferenciar acessos de uma mesma espécie. A caracterização de germoplasma pode ser realizada por diversos métodos, sejam eles, práticas tradicionais, que envolvem o uso de lista de descritores morfológicos e agronômicos, ou aplicações bioquímicas para detecção de diferenças entre isoenzimas, proteínas e marcadores moleculares (VICENTE et al., 2005). Existem diversas razões para que os marcadores moleculares apresentem vantagens sobre os marcadores morfológicos convencionais. Em contrastes com caracteres morfológicos, os marcadores moleculares exibem neutralidade fenotípica, geralmente são herdados codominantemente, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos.



Diferentes metodologias têm sido utilizadas para obtenção de marcadores moleculares com a finalidade de caracterizar indivíduos e realizar estudos de diversidade genética intra e interespecífica. De um modo geral, faz-se a coleta e o isolamento do DNA, seguido da aplicação das técnicas que irão identificar diferenças genéticas. Existem sequências do DNA que permitem caracterizar o indivíduo como pertencente a um determinado gênero, outras podem identificar a espécie, e conforme o sistema de identificação empregado consegue-se determinar relações de parentesco e paternidade de indivíduos dentro da espécie (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Diversas técnicas de marcadores genéticos têm sido desenvolvidas, mas nenhuma é considerada universalmente ideal. A escolha do método depende da questão a ser pesquisada, da espécie envolvida e da resolução necessária, bem como do financiamento e da tecnologia disponível. O uso de marcadores moleculares permite que a seleção e novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência de um programa de melhoramento. Podem ser usados mesmo que não tenham sido mapeados, ou seja, associados a um gene, a uma região cromossômica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações subsequentes, comprovando sua natureza genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998a).

#### **1.2.12 Marcadores Moleculares**

Marcadores moleculares possuem a capacidade de acessar informações diretamente do genoma sem sofrer influência do efeito ambiental (BORBA et al., 2005). A utilização de marcadores moleculares em estudos populacionais de espécies arbóreas tem se demonstrado uma ferramenta com grande poder de discriminação (FREITAS et al., 2005), garantindo aumento da velocidade de resposta dos programas de melhoramento genético (CARNEIRO, 2002).

A caracterização intraespecífica e a avaliação da variabilidade genética entre indivíduos por meio de marcadores moleculares permitem a seleção de genótipos mais adequados para o cultivo e/ou melhoramento de plantas, reduzindo o tempo gasto nesta etapa do processo (LIMA et al., 2011).

Marcadores moleculares dominantes podem revelar classes de variações entre genomas distintos. Este fato se relaciona à fração do genoma analisado por

tais marcadores, à distribuição de repetições pelo genoma e à extensão do genoma que está sendo analisado em ensaios específicos (RUSSEL et al., 1997; DÁVILA; LOARCE; FERRER, 1999).

### 1.2.13 Marcadores RAPD

A técnica denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990) é relativamente simples, rápida e de baixo custo. Essa técnica trouxe uma verdadeira “democratização” da análise de polimorfismo molecular, ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas. Baseia-se na reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação da Polimerase em Cadeia), a qual envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima polimerase. As etapas básicas da PCR envolvem desnaturação do DNA, anelamento de oligonucleotídeos (*primers*) e extensão das cadeias de DNA que estão sendo amplificadas. Esses *primers* são sintetizados em laboratório de maneira que sua sequência de nucleotídeos seja complementar a sequências específicas que flanqueiam a reação-alvo (MILACH, 1998; MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001). Diferentemente das demais técnicas de PCR, a RAPD utiliza um único *primer* composto por 10 pares de bases de sequências arbitrárias com, no mínimo, 50% de conteúdo GC (CRUZ; MILACH, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), e o número esperado de produto amplificado é função do comprimento do genoma e do número máximo de bases, passível de ser amplificado pelo DNA polimerase em uso (VIEIRA; VELLO; SILVA-FILHO, 2004).

Marcadores RAPD têm natureza binária e segregam como alelos mendelianos dominantes, havendo apenas dois fenótipos moleculares, presença ou ausência de bandas. O polimorfismo detectado por RAPD é gerado por mutações ou por rearranjos entre os dois sítios, ou no próprio sítio de hibridização do *primer*. Diferenças em apenas um par de bases (mutações de ponto) podem ser suficientes para inibir a amplificação (VIEIRA; VELLO; SILVA-FILHO, 2004). Portanto, a presença de um determinado marcador no padrão de bandas de dois indivíduos indica que ambos compartilham o mesmo alelo naquele loco. Por outro lado, a ausência da banda representa o fenótipo recessivo, não sendo possível a distinção

entre homozigoto e heterozigoto (ALMEIDA et al., 2001). Apesar dessas limitações, os marcadores RAPD apresentam boa aceitação para: construção de mapas genéticos; seleção indireta de outros caracteres, isto é, seleciona-se com base na presença do alelo em população segregante e, com isso, traz-se o fenótipo de interesse; análise de estrutura genética de populações, desde que respeitadas certas premissas; DNA *fingerprinting*; identificação de regiões específicas do genoma, usando, por exemplo, as marcas como sondas, visando à atribuição de grupos de ligação aos cromossomos da espécie; identificação de híbridos somáticos e caracterização de bancos de germoplasma ou coleções de recursos genéticos (VIEIRA; VELLO; SILVA-FILHO, 2004). A técnica de RAPD abriu amplas possibilidades para a biologia da conservação, desde plantas a mamíferos, possibilitando, ainda, um estudo rápido de populações ameaçadas de extinção.

Atualmente, os programas de melhoramento genético têm utilizado a associação de técnicas clássicas a ferramentas biotecnológicas, como por exemplo, o uso de marcadores moleculares RAPD. Uma das principais vantagens da utilização destes marcadores é propiciar a redução do tempo para identificação da diversidade genética entre os indivíduos trabalhados (XAVIER et al., 2005). Na literatura há vários trabalhos empregando esta técnica para estudos da diversidade genética em diversas culturas, dentre os quais se destacam os estudos com aceroleira (SALLA et al., 2002), bananeira (SOUZA et al., 2008), açaizeiro (OLIVEIRA et al., 2007), milho pipoca (VILELA et al., 2008), brachiaria (AMBIEL et al., 2008) e maracujazeiro (VIANA et al., 2005).

#### 1.2.14 Marcadores ISSR

O ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (ZIETKIEWICZ; RAFALKI; LABUDA, 1994; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002) também se baseia em PCR e é um método fundamentado em microssatélite, que não necessita o conhecimento prévio do genoma ou desenho do primer clonado. Enquanto os SSR são baseados na amplificação da região repetida usando dois *primers* loco-específicos, em ISSR, um único *primer* composto por uma sequência do microssatélite usualmente de 16-25bp de comprimento é utilizado para amplificar principalmente as sequências Inter-SSR de diferentes tamanhos. Estes *primers* podem estar desancorados ou

usualmente ancorados na extremidade 5' ou 3' por 1 a 4 bases degeneradas. Os alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma esteja faltando à sequência repetida ou têm uma deleção ou uma inserção que modifica a distância entre as repetições. Para os *primers* ancorados na posição 5', polimorfismos ocorrem também devido às diferenças no comprimento do microsatélite. As sequências de repetições e de nucleotídeos ancorados são selecionadas aleatoriamente. Embora ISSR sejam marcadores dominantes, têm a vantagem de analisar *loci* múltiplos em uma única reação (GOULÃO; OLIVEIRA, 2001).

O método fornece resultados altamente reprodutíveis e gera abundante polimorfismo em muitos sistemas. A maioria das aplicações tem usado eletroforese no gel de agarose com detecção por brometo de etídio ou eletroforese no gel de poliacrilamida (LIU; WENDEL, 2001). O “DNA *fingerprinting*” é uma importante ferramenta para caracterização de germoplasma, híbridos e estabelecimento da identidade de variedades/híbridos e fontes de genitores no melhoramento de plantas e no manejo de germoplasma. *Primers* de ISSR têm sido usados para caracterização e manutenção de germoplasma de cacau (CHARTERS; WILKINSON, 2000), para distinguir entre várias cultivares de crisântemo (WOLFF, 1995), e também para distinguir plantas derivadas de micrósporos daquelas oriundas de tecidos somáticos em cultura de anteras em linho no estágio de plântulas (CHEN et al., 1998). O ISSR é uma técnica simples, rápida, de custo acessível e eficiente, apresentando alta reprodutibilidade devido ao uso de *primers* longos mediante a aplicação de alta temperatura (WOLFE, 2005). Devido à sua abundância e dispersão no genoma, tem sido muito utilizado para estudar relações entre duas populações muito relacionadas (HUANG; SUN, 2000; DESHPANDE et al., 2001), ou indivíduos aparentados, devido ao elevado grau de polimorfismo (BORBA et al., 2005).

### 1.3 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABBAS, B. A.E.; EL TAYEB; SULLEIMAN, Y.R. *Calotropis procera*: feed potential for arid zones. **Veterinary Record**, v.131, n.6, p.132, 1992.

ABRAHAM, K.I.; JOSHI, P.N. Studies on proteinases from *Calotropis gigantean* latex. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrates. **Biochim.Biophys. Acta**, **568**: 111-119, 1979.

ADAMS, G.C. *Thanatephorus cucumeris (Rhizoctonia solani)*, a species complex of wide host range. *Advances in Plant Pathology*, London, v.6, p.535-552, 1988.

AKTAR, N. et al. Proceragenin and antibacterial cardenolide from *Calotropis procera*. **Phytochemistry**. v. 31, n. 8, p.2821-2824, 1992.

ALMEIDA, C. et al. Técnicas de avaliação da diversidade genética. In: GARAY, I.; DIAS, B. (Ed.). **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais**. Petrópolis: [s.n.], 2001.

AMBIEL, A. C.; GUABERTO, L. M.; VANDERLEI, T. M.; MACHADO NETO, N. B. Agrupamento de acessos e cultivares de três espécies de *Brachiaria* por RAPD. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 4, p. 457-464, 2008.

ANDERSON, N.A. **The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani***. **Phytopathology**, St. Paul, v.20, p.329-344, 1982.

ATKINS JR., J.G; LEWIS, W.D. *Rhizoctonia* aerial blight of beans in Louisiana. **Phytopatology**, 42: 1, 1952.

AZEVEDO, C. F.; BRUNO, R. L. A.; GONÇALVES, E. P.; QUIRINO, Z. G. M. Germinação de sementes de cabaça em diferentes substratos e temperaturas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.5, n.3, p.354-357, jul.-set., 2010.

BASU, A. et. al. Hepatoprotective effects of *Calotropis procera* root extract on experimental liver damage in animals. **Fitoterapia**, v. 63, n. 6, p.507-514, 1992.

BASU, A.; NAG CHAUDHURI, A. K. Preliminary studies on the antiinflammatory and analgesic activities of *Calotropis procera*. **Journal of Ethanopharmacology**, v. 31, p. 319-324, 1991.

BELTRÁN, R. **Estudios epidemiológicos y de patogenicidad de *Monosporascus cannonballus* Pollack e Uecker**. 2006. 315f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) Universidad Politécnica de Valencia, Espanha, 2006.

BELTRÁN, R., VINCENT, A., SALES JR., R., GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Population dynamics of *Monosporascus cannonballus* ascospores in marsh soils in eastern Spain. **European Journal of Plant Pathology**, v.113, p.357-365, 2005.

BENZAQUEM, D. C.; FREITAS, D. V.; CONTIM, L. A. S.; VERAS, Y. T.; BARROS, W. G.; SAMPAIO, P. de T. B. Seleção de primers ISSR para análise genético-populacional em espécies do gênero Aniba. In: 61 REUNIÃO ANUAL DA SBPC. **Anais...** Manaus: SBPC, 2009. Disponível em: <<http://www.sbpnet.org.br/livro/61ra/resumos/resumos/4493.htm>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica ceres, 1997, v. 2, p. 397.

BITANCOURT, A. A. Uma nova doença do feijão. **O Biológico**, São Paulo, v. 1, n. 2, 1935.

BORBA, R. DA S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 565-569, 2005.

BOTELHO, S.A.; RAVA, C.A.; LEANDRO, W.M. Supressividade induzida a *Rizoctonia solani* pela adição de diferentes resíduos vegetais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 35-42, 2001.

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 7p. (Embrapa Trigo. Documentos online, 3). Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do03.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.htm)>. Acesso em: 22 jan. 2014.

BRUTON, B. D.; GARCÍA JIMENEZ, J.; ARMENGOL, J. Análisis of the relationship between temperatura and vine declines caused by *Acremonium cucurbitacearum* and *Monosporascus cannonballus* on muskmelon. **Subtropical Plant Science**, v.51, p.23-28, 1999.

BUTLER, E.E; BOLKAN, H. A medium for heterokaryon formation in *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, St. Paul, v.63, p.542-543, 1973.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p. 9-78.

CARDOSO, J. E. Podridões radiculares, p.151- 64. In: SARTORATO, A.; RAVA, A. (Eds.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: Embrapa-SPI. 1994, 300p.

CARLING, E.E.; SUMMNER, D.R. *Rhizoctonia*. In: SINGLETON L.L.; MIHAIL, J.D.; RUSH, C.M. (Eds). **Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi**. Minnesota, USA: APS Press, 1992. p.157-165.

CARNEIRO, V. **Debulha, classificação em tamanho e armazenamento na qualidade de sementes de milho-pipoca**. 2002. 40 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

CAVALIER-SMITH, T. (2004). "Only six kingdoms of life". *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* **271**: 1251–62.

CHARTERS, Y. M.; WILKINSON, M.J., *Theor. Appl. Genet.* 111, p. 47-55, 2000.

CHEN, Y.; HAUSNER, G.; KENASCHUK, E.; PROCUNIER, D.; DRIBNENKI, P. PENNER, G. 1998. Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers. **Plant Cell Reports** **18**: 44-48.

CLEMENT, C. R. **Melhoramento de espécies nativas - Recursos genéticos & melhoramento - plantas**. Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária de Mato Grosso - Fundação MT, Rondonópolis, MT. p. 423-441, 2001.

**COOPERACION internacional através de lãs pruebas internacionales de arroz**. Cali: CIAT, 1978. (Noti- CIAT. Serie AS- 6).

CORDEIRO, Z. J. M.; KIMATI, H. Doenças da bananeira. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. & REZENDE, J. A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. v. 2. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 112-136, 1997.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. IBDF. 1984.

COSTA, R. G.; MEDEIROS, A. N.; ALVES, A. R. **Perspectivas de utilização da Flor-de-Seda (*Calotropis procera*) na produção animal**. Caatinga (Mossoró,

Brasil), v.22, n.1, p.01-09, janeiro/março de 2009.

COX, G.; PERFECT, J. Fungal infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, **6**:422-426.1993.

COX, M.L.; IRWIN, J.A.G. Conidium and apressorium variation in Australian isolates of the *Colletotrichum gloeosporioides* group and closely related species. **Australian Systematic Botany** 1:139-144.1988.

CRUZ, C.D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1990.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. Diversidade genética. In: Cruz, c.d.; carneiro, p.c.s. (Ed). **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, v.2, Cap. 6, p.338-434, 2003.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, J. A.; CARNEIRO, P.C.S. Divergência genética. In: CRUZ, C.D.; REGAZZI, J.A.; CARNEIRO, P.C.S. (Ed). **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, v. 1, Cap. 8, p. 377-413, 2004.

CRUZ, C.D; FERREIRA, F.M; PESSONI, L.A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2011, 620p.

CRUZ, R.P.; MILACH, S.C.K. Análise de RAPD. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre, 1998. p. 107-116.

CSURHES, S.; EDWARDS, R. **Potential environmental weeds in Australia: Candidate species for preventive control**. Queensland Department of Natural Resources. p. 147, 1998.

DANIELS, Saprophytic and parasitic activities of some isolates of *Corticium solani*. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v. 46, n. 4, p. 385-502, 1963.

DÁVILA, J. A.; LOARCE, Y.; FERRER, E. Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p. 265-273, 1999.

DESHPANDE, K.U.; APTE G.S.; BAHULIKAR, R.A., LAGU, M.D., KULKARNI, B.O., SURESH, H.S., SINGH, N.P., RAO, M.K., GUPTA, V.S., PANT, A., RENJEKAR, P.K. Genetic diversity across natural populations of



montane plant species from the western Ghats, India revealed by inter-simple sequence repeats. **Molecular Ecology**. v.10, p. 2397–2408, 2001.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V. L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p.307-311, 2000.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. 1978. 166 f. Monografia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

DIAS, B.F. de S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: **desafios e oportunidades**. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br/publicações/padct/bio/cap1/prob.html>>. 2000. Acesso em 10 nov. 2014.

DOMSALLA, A.; MELZIG, M.F. Occurrence and properties of proteases in plant látices. **Planta Medica**, **74**: 699-711, 2008.

DUBEY, V. K.; JAGANNADHAM, M.V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**. **62**: 1057-1071, 2002.

EISIKOWITCH, D. Morpho-ecological aspects on the pollination of *Calotropis procera*. (Asclepiadaceae) in Israel. **Plant Systematics and Evolution**, n.152, 185-194, 1986.

EMBRAPA (Brasília, DF). **Pronapa 1995**: Programa Nacional de Pesquisa.

FALL, S.T. Digestibilité in vitro et dégradabilité in situ dans le rumen de ligneux forragers disponibles sur pâturages naturels au Sénégal. Premier resultat. **Re.Elev. Méd.Vét. Pays. Trop**, v.44, n.3, p.345-354, 1991.

FERREIRA, M. A. J. F. **Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2003. 63p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPLAGIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 1995. 220p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. Ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1996.220 p.

(Embrapa-Cenargen. Documentos, 20).

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FERRIN, D. M.; STANGHELLINI, M. E. Effect of water potential on mycelial growth and perithecial production of *Monosporascus cannonballus* in vitro. **Plant Pathology**, v.55, p.421-426, 2006.

FIGUEIREDO, M. B.; TERANISHI, J.; CARDOSO, E. R. M. G. Incidência de *Macrophomina phaseolina* em feijoeiro e outras plantas cultivadas. **O Biológico**, São Paulo, v. 35, p. 105-109, 1969.

FREITAS, C.D.T.; OLIVEIRA, J.S.; MIRANDA, M.R.A.; MACEDO, N.M.R.; SALES, M.P.; VILLAS-BOAS, L.A.; RAMOS, M.V. (2007). Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiol Biochem**, **45(10-11)**:781-789.

FREITAS, M. L. M.; AUKAR, A.P.A.; SEBBENN, A.M.; MORAES, M. L. T.; LEMOS, E. G. M. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcador AFLP. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.68, p.21-28, 2005.

GHAFFAR, A.; ZENTMYER, G.A. *Macrophomina phaseolina* on some new weed hosts in California. **Plant Disease Reporter**, v. 52, p. 223, 1968.

GIACOMETTI, D. C. Recursos genéticos de fruteiras nativas do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECURSOS GENÉTICOS DE FRUTEIRAS NATIVAS, 1993, Cruz das Almas, **Anais**. Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMPF, 1993. p.13-27.

GIRDHAR, G.; DEVAL, K.; MOTTAL, P.K.; VASUDEVAN, P. (1984). Mosquito control by *Calotropis procera* látex. **Pesticides**, **18(10)**: 26-29.

GLAZER, A. N.; SMITH, E. L. Papain and other plant sulfhydryl proteolytic enzymes. In: Boyer, P.D. (Ed.). **The Enzymes**. Academic Press, New York, 501-546, 1971.

GOIDANISH, G. Revisione del genere *Macrophomina* Petrak. Species tipica: *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid. nov. comb. Nec. *M. Phaseoli* (Maubl.) Ashby. **Annali della Sperimentazione Agraria**, Roma, v. 1, p. 449-461, 1947.

GOOS, R.D. & TSCHIRSCH, M. **Effect of environmental factors on spore germination, spore survival, and growth of *Gloeosporium musarum***. *Mycologia* **54**:353-367. 1962.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica*, v.122, p.81-89, 2001.

GOUVÊA, L. R. L.; RUBIANO, L. B.; CHIORATTO, A. F.; ZUCHI, M. I.; GONÇALVES, P. S. Genetic divergence of rubber tree estimated by multivariate techniques and microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, v. 33, n. 2, p. 308-318, 2010.

HAMRICK, J. L.; GODT, M.J.W.; MURAWSKI, D.A.; LOVELESS, M.D. Correlations between Species Traits and Allozyme Diversity: Implication for Conservation Biology. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (Eds) **Genetics and Conservation of Rare Plants** . Oxford University Press, Oxford. p.75-86, 1991.

HARRISON, R. E.; LUBY, J.J.; FUNIER, G.R; HANCOCK, J.F. Differences in the apportionment of molecular and morphological variation in North American strawberry and consequences for genetic resources management. **Genetic Resources and Croup Evolution**, Dordrecht-Holanda, v.47, p.647-657, 2000.

HAWKES, J. G. Germplasm collection, preservation, and use. In: FREY, K. J., ed. **Plant Breeding II**. Ludhiana: Kalyani Publishers, 1982. p. 57-83.

HOLLIDAY, P.; PUNITHALINGAN, E. *Macrophomina phaseolina*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria**, n. 275, 1970. 2 p.

HUANG, J.; SUN, S. M. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. 2000. **Theorycal Applied Genetica**, v.100, p. 1050-1060, 2000.

INSTITUTO HÓRUS - Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental. **The Nature Conservancy**, [www.institutohorus.org.br/ download /fichas/calotropis\\_procera.htm](http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/calotropis_procera.htm)> Acesso em: 11 agosto 2013.

JEFFRIES, P., DODD, J.C., JEGER, M.J. & PLUMBIEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruits crops. **Plant Pathology** **39**:343-366. 1990.

JEKEL, P.A.; HARTMANN, B.H.; BEINTEMA, J.J. (1991) The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. **European J. Biochem**, **200**:123-130.

KEKWICK, RG.G.O. Latex and laticifers. **Encyclopedia of Life Science**. Nature Publishing Group, pp.1-6 2001.

KHAN et. al. Preliminary results from reseeded degraded Dera Ghazi Khan rangeland to improve small ruminant production in Pakistan. **Small Ruminant Research**, v.32, p. 43-49, 1999.

KHAN, A.Q.; MALIK, A. Asteroids from *Calotropis procera*, **Phytochemistry**, v.28, n.10, p. 2859-2861, 1989.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira S.A., 1992. 798p.

KNOX-DAVIES, P.S. Mitosis and aneuploidy in the vegetative hyphae of *Macrophomina phaseoli*. **American Journal of Botany**, v. 54, p. 1290- 1295, 1967.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNO, K. (2004). Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant J**, **37**:370-378.

LABORIAU, L.G.; VALADARES, M.B. On the germination of seeds of *Calotropis procera*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, p. 174-186, 1976.

LEU, LII-SIN; CHANG, CHWEN-WEN. **Conidium germination and appressorium formation of *Colletotrichum musae***. **Transactions Mycological Society of Japan** **29**:1-12. 1988.

LIMA, A. T. B., SOUZA, V. A. B.; GOMES, R. L. F.; LIMA, P. S. C. Molecular characterization of cajá (*Spondias mombin*) (Anacardiaceae) by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p. 2893-2904, 2011.

LINDLEY, J. 1985. Flora medica. **Ajay Book Service**, New Delhi.

LITTLE, E.L.; WOODBURY, R.O.; WADSWORTH, F.H. Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands, v. 2. **Agric. Handb**, 449. U.S. Department of Agriculture,

Washington, DC. p. 1024, 1974.

LIU, B.; WENDEL, J. F. 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, p.205-208.

LUDWIG et al. **Environmental International**, v. 27, p. 167-172, 2001.

LUKE, W. J.; PINCKARD, J.A. & WANG, S. L. Basidiospore infection of cotton bolls by *Thanatephorus cucumeris*. **Phytopathology**, v. 64, p. 107-111, 1974.

MAQBOOL, M.A.; HASHMI, S.; GHAFAR, A. **Pak. J. Nem**, 5(1), 43. 1987.

MARTYN, R. D.; MILLER, M. E. Monosporascus root rot and vine decline: an emerging disease of melons worldwide. **Plant Disease**, v.80, p.716-725, 1996a.

MARTYN, R.D.; MERTELY, J.C.; MILLER, M.E.; KATSAR, C.; BAASIRI, M.E. Morphology and germination of *Monosporascus cannonballus* ascospores. **Phytopathology**, v.82, p.1115, 1992.

MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, Sergio Russo (Ed.). **Biologia Molecular e evolução**. Ribeirão Preto: [s.n.], 2001.

MATZ, J. **Uma enfermedad danina de la habichuela**. Porto Rico: 1921. p. 8 (Insular Sta. Circ., 57).

MATZ, J.A. *Rhizoctonia* of the fig. **Phytopatology**, v. 7, p. 110-8, 1917.

MENDES, H.C.; RIBEIRO, I.J.; CIA, E.; ABRAHÃO, J. Estiolamento do algodoeiro causado por *Macrophomina phaseolina*. **Bragantia**, v. 30, n. 1, p. 43-48, 1971.

METCALFE, C. R., CHALK, L. 1983. Anatomy of the Dicotyledons.II. Wood Structure and Conclusion of General Introducion. 2<sup>nd</sup>. End. Clarendon Press, Oxford.

MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.5, p.14-17, 1998b.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS,

1998a.

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: [s.n.], 1998.

MONTIL, R.; CONTIERO, J.; GOULART, A.J. (2004). Isolation of natural inhibitors of papain obtained from *Carica papaya* Latex. **Braz. Arch Biol Technol**, **47**: 747-754.

MOREIRA FILHO, E. C.; VIANA, B. L. **Flor de seda: considerações gerais**, 2007. Disponível em <http://www.cca.ufpb.br/lavouraxerofila/pdf/fs.pdf>. Acesso em 05 julho 2013.

MOURSY, L.E. (1997). Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly. *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. **J. Egypt Soc Parasitol**, **27**: 505-14.

MOUSSAQUI, A.; EL NIJS, M.; PAUL, C.; WINT JENS, R.; VINCENTELLI, J.; AZARKAN, M.LOOZE, Y. (2001) Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defense mechanism. **Cell. Mol Life Sci**, **59**:556-570.

NASS, L. L.; PELLICANO, I. J.; VALOIS, A. C. C. Utilization of genetic resources for maize and soybean breeding in Brazil. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 4, p. 983-988, 1993.

NEHRA, O.P.; OSWAL, M.C.; FARODA, A.S. Management of fodder tree in Haryana. **Indian Farming** v. 37, n. 3, p. 31-33, 1987.

NETO, E.F., NAKAMURA, K.; OLIVEIRA, J.C. **Influência de alguns fatores na germinação de conídios, no crescimento micelial e na esporulação de alguns isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, obtidos de *Passiflora***. **Summa Phytopathologica** **20**:96-100. 1994.

NG, T.B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. **Peptides**, **25**: 1215-1222, 2004.

OGOSHI, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraespecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, p. 125-143. 1987.

OLIVEIRA, M. S. P.; AMORIM, E. P.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, D. F.

Diversidade genética entre acessos de açazeiro baseada em marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1645-1653, 2007.

OLIVEIRA-BENTO, S.R.S. de. **Biometria de frutos e sementes, germinação e armazenamento de sementes de flor de seda [*Calotropis procera* (Aiton)W.T. Aiton]**. 2012. 144f.il. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Semiárido-RN, 2012.

PARMETER, J. R.; WHITNEY, H. S. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: Parmeter, J.R. (Ed.) ***Rhizoctonia solani, biology and pathology***. London: University of California, 1970, p.7- 19.

PEREIRA, L.S.; GOMES, M.V.; FERNANDES, K.V.S.; SALES, M.P.;XAVIER-FILHO, J.(1999) Insecticidal and antifungic proteins of the latex from *Manihot glaziovii* muell. **Arg. Ver. Bras. Bot**,22:1-8.

PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho (*Zea mays* L.). In: KIMATI, H. et. al. **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**, v.2, p. 538-555, 1997.  
POLLACK, F. G.; UECKER F. A. *Monosporascus cannonballus*, an unusual Ascomycete in cantaloupe roots. **Mycologia** v.66, p.346-349, 1974.

PIVONIA, S.; COHEN, R.; KATAN, J.; KIGEL, J. Effect of fruit load on the water balance of melon plants infected with *Monosporascus cannonballus*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.60, p.39-49, 2002.

POLLACK, F. G.; UECKER, F. A. Development and cytology of *Monosporascus cannonballus*. **Bot. Gaz**, v.136, p.333-340, 1975.

RAHMAN, M.A.; WILCOCK, C.C.A. A Taxonomic revision of *Calotropis procera* (*Asclepiadaceae*). **NordicJournal of Botany**. v. 11, n. 3, p. 301-308, 1991.

RAMOS, M.V.; BANDEIRA, G.P.; FREITAS, C.D.T.; NOGUEIRA, N.A.P.; ALENCAR, M. N.; SOUSA, P.A.S.; CARVALHO, A.F.U. (2006a). Latex constituents from *Calotropis procera* (R.Br) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypt* (Linn). Mem Inst **Oswaldo Cruz**, **111**:503-510.

RAMOS, M.V.; FREITAS, C.D.T.; STANISÇUASKI, F.; MACEDO L.L.P.; SALES, M.P.; SOUZA, D.P.; CIARLINI, C.R. (2007b) Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Sci (Limerick)**, **173(3)**:349-357.

RAMOS, M.V.; FREITAS, C.D.T.; STANISÇUASKI, F.; MACEDO L.L.P.; SALES, M.P.; SOUZA, D.P.; CIARLINI, C.R. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: role of

laticifer proteins in plant defense. **Plant Sci (Limerick)**, **173(3)**:349-357, 2007.

RAMOS, M.V.; PEREIRA, D.A.; ARAÚJO, E.S.; FREITAS, C.D.T.; CAVALHEIRO, M.G.; MATOS, M.P.V.; CARVALHO, A.F.F.U. (2009) Potential of laticifer fluids for innibiting larvae development of *Stegomyia (Aedes) aegypti*: Evidences for the involvement of proteolytic activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **104**:805-812.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, Kluwer Academic Publishers Printed in the Netherlands. 128: 9-17.

REUVENI, R.; KRIKUN J. E SHANI N. The role of *Monosporascus eutypoides* in a collapse of melon plants in an arid area of Israel. **Phytopathology** v.73, n.9, p.1223-1226, 1983.

RUDALL, P.J. Laticifers in Euphorbiaceae a conspectus. **Botanical Journal of the Linnean Society**, **94**: 143-163, 1987.

RUSSELL; J. R., FULLER, J. D., MACAULAY, M.; HATZ, B. G., JAHOR, A.; POWELL, W., WAUGH, R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 714-722, 1997.

SACCHERI, I.; KUUSSAARI, M.; KANKARE, M. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. **Nature** v. 392: p.491-494, 1998.

SALES JUNIOR, R.; VICENT, A.; ARMENGOL, J.; GARCIA-JIMÉNEZ, J.; KOBORI, R. F. Comportamento de cultivares de meloeiro e melancia inoculados com *Acremonium cucurbitacearum* e *Monosporascus cannonballus*. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.2, p.206-210, 2002.

SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; PÍPOLO, V. C. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2002.

SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R.; DAS, P. Heavy metal and nutrient concentration in soil and plants growing on a metalliferous chromite minespoil. **Environment Technological**, v. 22, n. 60, p. 1147-1154, 2001.

SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C.; FIGUEIRÔA, J. M.; SANTOS JUNIOR, A. G. (2006). Espécies do Semiárido baiano com potencial econômico. **Magistra**, v. 18, p. 6-8.



SANTOS, C. A. F. (2007). **Zoneamento agroecológico do nordeste e mapas de vegetação como ferramentas para a prospecção e conservação de recursos genéticos vegetais**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 24 p. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 73).

SELITRENNIKOFF, C.P. Antifungal proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, **67**: 2883-2894, 2001.

SGARBIERI, V.C.; GUPTA, S. M.; KRAMER, D.E. AND WHITAKER, J.R. Ficus enzymes: Separation of proteolytic enzymes of *Ficus glabrata* and *Ficus carica*. **J. Chem.** **239**: 2170-2177, 1964.

SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. (Eds.). **Compendium of soybean disease**. 3. ed. American Phytopathological Society. 1989, 116 p.

SIVANESAN A. *Monosporascus cannonballus*. **Mycopathologia** v.114, p.53-54, 1991.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of Rhizoctonia species**. Minnesota: USA. APS Press, 1991.

SOUZA, C. M. P.; VIANA, A. P.; FERREIRA, C. F.; SILVA, S. O.; CARVALHO, A. J. C.; BERBERT, P. A.; SOUSA, E. F. Avaliação da dissimilaridade genética em genótipos de bananeira (*Musa* spp.) via marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 419-424, 2008.

SRITANYARAT, W.; PEARCE, G.; SIEMS, W.F.; RYAN, C.A.; WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D. (2006). Isolation and characterization of iso-inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochem**, **67**(15). 644-1650.

STALPERS, J.A., ANDERSEN, T.F. **A synopsis of the taxonomy of teleomorphs connected with *Rhizoctonia* S. L.** In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. & Dijst, G. (eds.) *Rhizoctonia* species: Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, Netherlands. Kluwer Academic Publishers. 1996. p. 37-47.

STANGHELLINI, M. E.; KIM, D. H.; RASMUSSEN, S. L. Ascospores of *Monosporascus cannonballus*: germination and distribution in cultivated and desert soils in Arizona. **Phytopathology** v.86, p.509-514, 1996.

THEIS, T.; STHAL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective

applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **61**: 437-455, 2004.

VAN BEUNING, L. T.; BUSCH, R. H. Genetic diversity among North American spring wheat cultivars: III. Cluster analysis based on quantitative morphological traits. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 981-988, 1997.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. (1999) The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol Mol Plant Pathol**, **55**:85-97.

VAZ, F.L. et. al. Avaliação do potencial forrageiro do algodão de seda (*Calotropis procera*) I – consumo voluntário e digestibilidade da MS. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 35. 1998. Botucatu-SP. **Anais...** Botucatu-SP: SBZ, 1998. v. 1, p. 62-63.

VAZ, F.L. et. al. Avaliação do potencial forrageiro do algodão de seda (*Calotropis procera*) I – consumo voluntário e digestibilidade das frações fibrosas. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 35. 1998. Botucatu-SP. **Anais...** Botucatu-SP: SBZ, 1998. v. 1, p. 464-465

VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, J. F. M. Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 489-493, 2005.

VICENTE, M. C.; GUZMÁN, F. A.; ENGELS, J.; RAMANATHA RAO, V. Genetic characterization and its use in decision making for the conservation of crop germoplasma. In: THE ROLE OF BIOTECHNOLOGY, 2005, Turin. **Proceedings...** Turin: 2005, p. 121-128.

VIEIRA, M.L.C.; VELLO, N.A.; SILVA-FILHO, M. de C. Genética e Melhoramento Vegetal. In: MIR, Luis (Org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004

VILELA, F. O.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; PEREIRA, M. G.; SCAPIM, C. A.; VIANA, A. P.; FREITAS JÚNIOR, S. P. Effect of recurrent selection on the genetic variability of the UNB-2U popcorn population using RAPD markers. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 25-30, 2008.

VILELA-MORALES, E.A.; VALOIS, A.C.C.; NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa-Cenargen, 1997. 78 p.

VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p.135-155, 1994.

VOGT, K. **A field guide to the identification, propagation and uses of common trees and shrubs of dryland Sudan**. SOS Sahel International (UK), 1995.

WANG, H.; NG, T.B. Isolation of a novel deoxyribonuclease with antifungal activity from *Asparagus officinalis* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **289**:120-124, 2001.

WAUGH, M. M.; KIM, D. H.; FERRIN, D. M.; STANGHELLINI, M. E. Reproductive potential of *Monosporascus cannonballus*. **Plant Disease**, v.87, p.45-50, 2003.

WHITTAKER, R.H.. (1969). "New concepts of kingdoms of organisms". *Science* **163** (3863): 150–60.

WILLIAMS, J.; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKI, A.; TINGEY, S. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data**, Part B, v. 395, p. 134-144, 2005.

WOLFF, D. W. Evaluation of melon germoplasm for resistente to *Monosporascus* root rot/vine decline symptomexpression in melon (*Cucumis melo* L.). In: EUCARPIA MEETING ON CUCURBIT GENETCS AND BREEDING. **Cucurbits Toward 2000**, 6, Málaga, Espanha, p. 224-228, 1995.

WOLFF, D. W. Evaluation of melon germoplasm for resistente to *Monosporascus* root rot/vine decline symptomexpression in melon (*Cucumis melo* L.). In: EUCARPIA MEETING ON CUCURBIT GENETCS AND BREEDING. **Cucurbits Toward 2000**, 6, Málaga, Espanha, p. 224-228, 1996.

WYLLIE, T. D. et al. Germination and production of *Macrophomina phaseolina* microsclerotia as affected by oxygen and carbon dioxide concentration. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 81, p. 195-201, 1984.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; FREIRE FILHO, F. R. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 4, p. 353-359, 2005.

ZAUMEYER, W. J.; THOMAZ, H. R. **A monographic study of bean diseases**

**and methods for their control.** Washington: USDA, 1957. p. 63-5 (Technical Bulletin, 868).

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALKI, A.; LABUDA, D. 1994. **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification.** *Genomics* **20**: 176-183.

## CAPÍTULO II

### EFEITO INIBITÓRIO DE FLUIDOS LATICÍFEROS DE *Calotropis procera* (AIT.) R. Br. EM FUNGOS DE IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA

#### RESUMO

As plantas apresentam inúmeros mecanismos de defesa contra a invasão de patógenos e insetos. Uma delas são os sistemas de canais que contêm várias secreções, tais como os laticíferos, as resinas e as mucilagens. A Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] é uma planta que vem ganhando destaque devido ao fato de pesquisas apontarem que a composição química do látex age no combate a fungos e a vírus por meio de suas substâncias constituintes. Com base no exposto, este trabalho objetivou avaliar o papel de fluidos laticíferos de Flor de Seda na inibição micelial de fungos fitopatogênicos de *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *Monosporascus cannonballus*. Plantas saudáveis e espontâneas de Flor de seda localizadas no campus central leste da UFERSA, Mossoró-RN, tiveram seu látex coletado através de incisões nos ápices caulinares com auxílio de um bisturi com lâmina estéril, em seguida foram tratados da seguinte forma: parte do látex coletado foi diluído em um tubo do tipo Falcon contendo água destilada autoclavada para produzir uma mistura de 1:1(v/v), e a outra parte foi estocada de forma pura. Posteriormente foi utilizada uma alíquota de 1 ml de cada tipo de látex (puro e diluído) e adicionado a 250 ml de meio de cultura tipo BDA, os meios contendo os tratamentos, composto por 3 placas por isolado, foram vertidos em placas de Petri. Após a polimerização em placa do meio de cultura contendo os tratamentos, os isolados fúngicos foram cultivados. As avaliações foram realizadas 7 dias após a incubação dos isolados fúngicos, sendo o tamanho do crescimento micelial obtido pela medição do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais e posteriormente calculada a média pela porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC). Os resultados obtidos mostraram que os tratamentos formados a base do látex de Flor de Seda foram indiferentes do tratamento testemunha em relação ao PIC expressado, portanto, não foi observada redução no crescimento micelial das espécies fúngicas avaliadas em nenhum percentual, não havendo efeito inibitório do látex de Flor de Seda para os isolados de *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *Monosporascus cannonballus* nas condições estudadas.

**Palavras-chave:** Látex, fluidos laticíferos, fungos fitopatogênicos.

## ABSTRACT

The plants have numerous defense mechanisms against invading pathogens and insects. One is the channel systems containing various secretions, such as latex, resins, and mucilages. The Silk Flower [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] is a plant that has gaining attention due to the fact research indicate that the latex chemical composition acts to combat fungi and viruses through its constituent substances. Based on the above, this study aimed to evaluate the role of latex fluid Silk Flower in inhibiting mycelial of *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* and *Monosporascus cannonballus* pathogenic fungi. Healthy and spontaneous silk flower plants located in Mossoró/RN cities, had its latex collected through incisions in the shoot tips with a scalpel with sterile blade, then were treated as follows: part of latex was diluted collected in a Falcon tube type containing sterile distilled water to give a mixture of 1: 1 (v / v), and the other part was stored in pure form. Subsequently, it was used a 1 ml aliquot of each type of latex (neat and diluted) and added to 250 ml of medium type of BDA culture media containing the treatment consisting of 3 plates per isolate was poured into Petri dishes. After the polymerization, the plate culture medium containing the treatments, the fungal isolates were grown. The evaluations were performed 7 days after incubation of the isolated fungi, with the size of mycelial growth achieved by measuring the radial growth of the colony in two orthogonal axes and then averaged the percentage of inhibition of mycelial growth (PIC). The results showed that the treatments formed Silk Flower latex base were indifferent to the control treatment in relation to the PIC expressed, therefore, there was no reduction in mycelial growth of fungal species assessed in any percentage, with no inhibitory effect of latex of Silk Flower to the isolated *Macrophominaphaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* and *Monosporascus cannonballus* in the studied conditions.

**Keywords:** latex, latex fluid, pathogenic fungi.

## 2.3 INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos é um dos principais métodos de controle de doenças de plantas utilizados na agricultura convencional. Este método de controle tem se intensificado nos últimos anos, sendo realizado, basicamente, através do emprego de substâncias sintéticas.

O uso desses produtos, em curto prazo, auxilia de maneira eficaz o agricultor no alcance de altas produtividades. Não obstante, em longo prazo, além do risco de surgimento de fungos resistentes a essas substâncias, os resultados para a sociedade e para o meio ambiente podem se tornar negativos, devido a possibilidade de resíduos de agrotóxicos nos alimentos, riscos ambientais, assim como um aumento nos custos de produção.

Outro efeito negativo observado no uso indiscriminado de agrotóxicos no controle de doenças de plantas é a fitotoxicidade. Ou seja, o efeito adverso dos agrotóxicos sobre as plantas.

Na atualidade, existe uma grande pressão da sociedade por produtos livres de agrotóxicos. O que fez necessário o aumento da pesquisa na busca por produtos biodegradáveis e seletivos.

Uma alternativa que vem sendo muito utilizada ultimamente para o controle de pragas e doenças é a utilização de metabólitos secundários presentes em algumas plantas. Os métodos físicos e biológicos constituem-se em alternativas viáveis e desejáveis em relação ao método químico tradicional, principalmente em função de não deixarem resíduos tóxicos nos frutos tratados. No entanto os resultados nem sempre apresentam uma alta eficiência.

Segundo Cantarelli et al. (2005) é possível obter novas formas de produtos com ação erradicante a pragas partindo da extração de compostos originados de metabólitos secundários presentes em algumas plantas.

Do ponto de vista fitossanitário, os produtos vegetais podem apresentar três atividades: antimicrobiana direta, indução de resistência e estímulo do crescimento de plantas (STADNIK; TALAMINI, 2004). Isso se dá pela termo-estabilidade dos compostos presentes nas plantas, que depende diretamente da espécie (BALBI-PEÑA et al., 2006).

As plantas apresentam inúmeros mecanismos de defesa contra a invasão de patógenos e insetos. Uma delas são os sistemas de canais que contêm várias

secreções, tais como os laticíferos, as resinas e as mucilagens (FARRELL; DUSSOURD; MITTER, 1991).

No caso de plantas que produzem látex, este sofre um processo de agregação progressiva que lembra o processo de coagulação sanguínea. Este processo é comum ocorrer após a planta sofrer algum dano mecânico, o que leva a liberação do fluido laticífero, impedindo que a área injuriada seja penetrada por patógenos. O látex também possui uma ação colante que pode imobilizar pequenos insetos ou até mesmo uma lagarta (MOURSY, 1997). Entretanto, além deste efeito mecânico, a composição química do látex parece também funcionar como uma ferramenta de defesa, neste caso, agindo no combate a fungos e a vírus por meio de suas substâncias constituintes (PEREIRA et al., 1999).

Fluidos laticíferos também apresentam forte potencial para o controle de mosquitos vetores de algumas doenças, como *Aedes aegypti* (transmissor da dengue), *Anopheles stephensi* (transmissor da malária) e *Culex fatigan* (transmissor da febre amarela) (GIRDHAR et al., 1984).

Na busca por alternativas que possam minimizar esses problemas, uma planta que vem sendo estudada, nos últimos anos, é a Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.]. Estudos apontam que proteínas do látex de Flor de Seda apresentaram ação nociva para várias pragas agrícolas (RAMOS et al., 2007b) e, provavelmente um inibidor de protease pode estar envolvido nos efeitos deletérios observados (RAMOS et al., 2009b). Moléculas presentes no látex de Flor de Seda produzem efeitos tóxicos sobre o desenvolvimento larval e eclosão de ovos do mosquito transmissor da dengue (RAMOS et al., 2006a). Estudos apontam que a composição química do látex age no combate a fungos e a vírus por meio de suas substâncias constituintes (PEREIRA et al., 1999).

Muitas alternativas ao uso de agrotóxicos têm sido propostas. Dentre elas, a utilização de produtos naturais tem sido promissora. Dentro desse contexto, é crescente a pesquisa por proteínas vegetais que poderiam ser utilizadas como ferramentas biotecnológicas para tal fim.

Com base no exposto, este trabalho objetivou avaliar o papel de fluidos laticíferos de Flor de Seda na inibição miceliar de fungos fitopatogênicos de *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *Monosporascus cannonballus*.



## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.4.1 Local da Pesquisa

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia II da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Departamento de Ciências Vegetais, Campus Mossoró-RN no período de Setembro a Outubro de 2014.

### 2.4.2 Espécies fúngicas utilizadas

As espécies fúngicas utilizadas neste trabalho foram obtidas na micoteca do Laboratório de Fitopatologia II da UFERSA. Estas espécies foram: *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid., *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Colletotrichum musae* (Berk. & Curtis) Arx e *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker (isolado CMM-2390).

### 2.4.3 Coleta do material vegetal e fracionamento do látex

Plantas saudáveis e espontâneas de Flor de seda localizadas no campus central leste da UFERSA, Mossoró-RN, tiveram seu látex coletado através de incisões nos ápices caulinares com auxílio de um bisturi com lâmina estéril. O látex foi coletado em tubos plástico estéreis de 50 ml tipo Falcon, em seguida foram tratados da seguinte forma: parte do látex coletado foi diluído em um tubo contendo água destilada autoclavada para produzir uma mistura de 1:1(v/v), e a outra parte foi estocada de forma pura. Depois desse processo, o qual ainda foi realizado no local de coleta dos látex, estes materiais seguiram para o Laboratório de Fitopatologia II onde sofreram um pré-resfriamento a 6°C por 10 minutos, e em seguida foram centrifugados a 14.000 rpm por 1 minuto a temperatura de 10°C. Do material centrifugado, extraiu-se apenas o sobrenadante, descartando-se a fração

precipitada no tubo, a qual corresponde em maior parte a látex. Após este processo os sobrenadantes foram estocados para posterior aplicação.

#### **2.4.4 Instalação e condução do experimento**

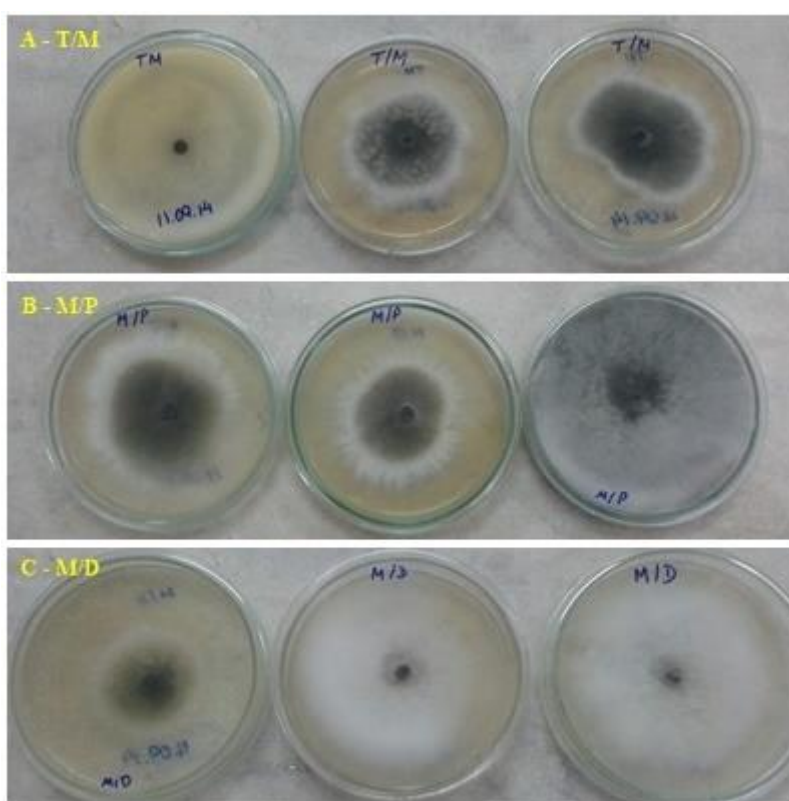
Foi utilizada uma alíquota de 1 ml de cada tipo de látex (puro e diluído) e adicionado a 250 ml de meio de cultura tipo BDA (batata dextrose ágar) após a autoclavagem do meio, e quando atingida a temperatura de  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ , em condições assépticas, os meios contendo os tratamentos, composto por 3 placas por isolado, foram vertidos em placas de Petri de dimensões 100x15mm. Após a polimerização em placa do meio de cultura contendo os tratamentos, discos de 5 mm de outro meio de cultura também do tipo BDA onde os isolados fúngicos foram cultivados a sete dias, foram retirados e depositados no centro das placas contendo o meio de cultura já com os tratamentos integrados. Essas placas foram então mantidas em incubadora tipo B.O.D. (*biochemical oxygen demand*) a  $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$  para proporcionar o crescimento fúngico.

#### **2.4.5 Avaliações e análises dos dados**

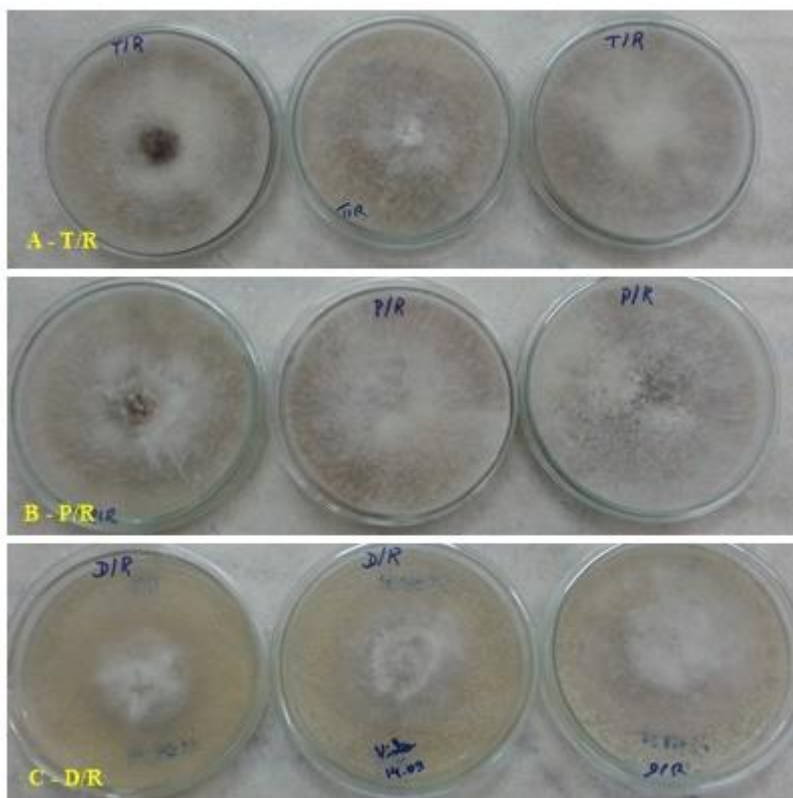
As avaliações foram realizadas 7 dias após a incubação dos isolados fúngicos, tempo suficiente para as placas testemunhas, ou seja, placas que não receberam nenhum tipo de tratamento com o látex, serem totalmente tomadas pelas colônias dos patógeno. O tamanho do crescimento micelial foi obtido pela medição do crescimento radial da colônia em dois eixos ortogonais, sendo posteriormente calculada a média pela porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), que é expressa pela fórmula:  $\text{P.I.C.} = [(\text{crescimento da testemunha} - \text{crescimento do tratamento}) \times 100] \div \text{crescimento da testemunha}$  (EDGINTON et al., 1971).

## 2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostraram que os tratamentos formados a base do látex de Flor de Seda foram indiferentes do tratamento testemunha em relação ao PIC expressado, portanto, não observou-se redução no crescimento micelial das espécies fúngicas avaliadas em nenhum percentual [Figuras 1 (A, B e C) e 2 (A, B e C)].



**Figura 1** – Comparação entre o crescimento das colônias entre a testemunha e os tratamentos para *Macrophomina phaseolina* utilizando o látex da Flor de Seda; A - T/M: Testemunha *Macrophomina*; B - M/P: *Macrophomina* Pura (corresponde a utilização do látex puro); C - M/D: *Macrophomina* Diluída (corresponde a utilização do látex diluído 1:1). Mossoró, 2014.



**Figura 2** – Comparação entre o crescimento das colônias entre a testemunha e os tratamentos para *Rhizoctonia solani* utilizando o látex da Flor de Seda; A - T/R: Testemunha *Rhizoctonia*; B – M/P: *Rhizoctonia* Pura (corresponde a utilização do látex puro); C – M/D: *Rhizoctonia* Diluída (corresponde a utilização do látex diluído 1:1). Mossoró, 2014.

Apesar dos resultados obtidos não demonstrarem atividade antifúngica para os isolados utilizados, outros autores conseguiram demonstrar atividades antimicrobianas do látex desta planta. Souza (2010) trabalhando com proteínas isoladas do látex de Flor de Seda sobre os fungos *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Neurospora* e *Aspergillus niger* observou atividade antifúngica que variou de forte a muito forte para os fungos *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Fusarium solani*. Em contrapartida a estes resultados, este mesmo autor verificou a ineficiência dos látices de *Plumeria rubra* e *Euphorbia tirucalli* para todos os isolados fúngicos trabalhados.

A atividade antimicrobiana do látex de Flor de Seda tem sido atribuída à presença de enzimas proteolíticas (EC 3.4) (SOUZA, 2010), que quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Esta atividade antimicrobiana já foi relatada para outros tipos de plantas laticíferas, como é o caso

do látex de mamão, do qual já foram extraídas quitinases (EC 3.2.1.14), as quais constituem o principal grupo de proteínas antifúngicas conhecidas (AZARKAN et al., 2004). No entanto para poder expressar a sua atividade biológica, muitas enzimas precisam ser isoladas e purificadas. No caso da Flor de Seda o principal constituinte do látex é a borracha, representando aproximadamente 85% da matéria seca, enquanto as proteínas solúveis representam em torno de 10% (CAVALCANTE 2007). Tendo em vista a toxicidade do componente poliisopropeno, a borracha, surgiu o interesse de fracionar o látex. Este fator pode ter influenciado nos resultados obtidos neste trabalho, já que o tratamento dado ao látex, não seguiu um protocolo para extração específica de frações destes constituintes. Embora na metodologia testada o látex tenha sido centrifugado, o tempo, a temperatura e a rotação aplicada, foram diferentes das trabalhadas por Souza (2010) ao avaliar espécies fúngicas e Oliveira (2010), ao trabalhar com bactérias, os quais obtiverem efeito antimicrobiano com o látex da Flor de Seda nestes microorganismos. Além disso, no protocolo de tratamento dado ao látex seguidos por estes autores, constou a utilização de diálises, o que promoveu exatamente a separação de frações específicas, entre as quais supostamente estavam contidas as proteínas proteolíticas com ação antifúngica estimada.

Apesar da existência de trabalhos científicos, tendo demonstrado relatos positivos com relação à inibição de fitopatógenos, ainda são escassos os estudos voltados para atividades deletérias antifúngicas. Em virtude das observações realizadas, faz-se necessária a ampliação de pesquisas direcionadas à avaliação do potencial antimicrobiano do látex da Flor de Seda, com ênfase em fungos fitopatogênicos, visto o potencial antimicrobiano que este possui.

## 2.6 CONCLUSÕES

Não houve efeito inibitório do látex de Flor de Seda para os isolados de *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae* e *Monosporascus cannonballus* nas condições estudadas.

## 2.7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABRAHAM, K.I.; JOSHI, P.N. Studies on proteinases from *Calotropis gigantean* latex. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrates. **Biochim.Biophys. Acta**, **568**: 111-119, 1979.

AZARKAN, M.; WINTJENS, R.; LOOZE, Y.; VOLANT, D.B. Detection of three wound-induced proteins in papaya latex. **Phytochemistry**, **65(5)**: 525-534. 2004.

BALBI-PEÑA MI, BECKER A, STANGARLIN JR, FRANZENER G, LOPES MC, SCHWAN-ESTRADA KRF. Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e *curcumina* - I. avaliação *in vitro*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 310-314, 2006.

CANTARELLI, E. B.; COSTA, E. C.; OLIVEIRA, L. S.; PERRANDO, E. R. Efeito de diferentes doses do formicida "citromax" no controle de *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.15, n.3, p.249-253, 2005.

CAVALCANTE, C.F. **Estudo do efeito da fração não dialisável do látex de *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. em modelos experimentais de inflamação**. 2007. 89f:il. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2007.

DUBEY, V. K.; JAGANNADHAM, M.V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**. **62**: 1057-1071, 2002.

EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L. & BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**. Minnesota, v.62, p. 42-44. 1971.

FARREL, B. D.; DUSSOURD, D.E.; MITTER, C. Escalation of Plant Defense: Do Latex and Resin Canals Spur Plant Diversification? **The American Naturalist**, **138 (4)**: 881-900, 1991.

GIRDHAR, G.; DEVAL, K.; MOTTAL, P.K.; VASUDEVAN, P. (1984). Mosquito control by *Calotropis procera* latex. **Pesticides**, **18(10)**: 26-29.

GLAZER, A. N.; SMITH, E. L. Papain and other plant sulfhydryl proteolytic enzymes. In: Boyer, P.D. (Ed.). **The Enzymes**. Academic Press, New York, 501-546, 1971.

LOVATTO, P.B.; GOETZE, M.; THOMÉ, G.C.H. Efeito de extratos de plantas

silvestres da família Solanaceae sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*). **Revista Ciência Rural**, v.34, p.971-978, 2004.

LUZ, J.M.Q.; SHINZATO, A.V.; SILVA, M.A.D. Comparação dos sistemas de produção de tomate convencional e orgânico em cultivo protegido. **BioScience Journal**, v.23, n.2, p.7-15, 2007.

MONTIL, R.; CONTIERO, J.; GOULART, A.J. (2004). Isolation of natural inhibitors of papain obtained from *Carica papaya* Latex. **Braz. Arch Biol Technol**, **47**: 747-754.

MOURSY, L.E. (1997). Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly. *Sarcophaga haemorrhoidalis* fallen. **J. Egypt Soc Parasitol**, **27**: 505-14.

OLIVEIRA, R.S.B. de. **Caracterização bioquímica e mecanismo de ação do efeito protetor de proteínas do látex de *Calotropis procera* (AIT.) R. Br. sobre infecção letal induzida por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium.** 2010. 109f:il. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE, 2010.

PEREIRA, L. S.; GOMES, M. V.; FERNANDES, K.V.S.; SALES, M.P. & XAVIER-FILHO, J. Insecticidal and antifungic proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. Arg. Ver. **Bras. Bot.** **22(1)**: 1-8, 1999.

RAMOS, M.V.; BANDEIRA, G.P.; FREITAS, C.D.T.; NOGUEIRA, N.A.P.; ALENCAR, M. N.; SOUSA, P.A.S.; CARVALHO, A.F.U. (2006a). Latex constituents from *Calotropis procera* (R.Br) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **111**:503-510.

RAMOS, M.V.; FREITAS, C.D.T.; STANISÇUASKI, F.; MACEDO L.L.P.; SALES, M.P.; SOUZA, D.P.; CIARLINI, C.R. (2007b) Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Sci (Limerick)**, **173(3)**:349-357.

RAMOS, M.V.; FREITAS, C.D.T.; STANISÇUASKI, F.; MACEDO L.L.P.; SALES, M.P.; SOUZA, D.P.; CIARLINI, C.R. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Sci (Limerick)**, **173(3)**:349-357, 2007.

RAMOS, M.V.; PEREIRA, D.A.; ARAÚJO, E.S.; FREITAS, C.D.T.; CAVALHEIRO, M.G.; MATOS, M.P.V.; CARVALHO, A.F.F.U. (2009) Potential of laticifer fluids for innibiting larvae development of *Stegomyia* (*Aedes*) *aegypti*: Evidences for the involvement of proteolytic activity. **Memórias do Instituto**



Oswaldo Cruz 104:805-812.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M.E. da S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 54-56, 2003.

SGARBIERI, V.C.; GUPTA, S. M.; KRAMER, D.E. AND WHITAKER, J.R. Ficus enzymes: Separation of proteolytic enzymes of *Ficus glabrata* and *Ficus carica*. **J. Chem.** **239**: 2170-2177, 1964.

SOUZA, D.P. de. **Proteínas inibidoras de fitopatógenos em fluidos laticíferos: atividade e mecanismo de ação**. 2010. 99f:il. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal Ceará, Fortaleza-CE, 2010.

SRITANYARAT, W.; PEARCE, G.; SIEMS, W.F.; RYAN, C.A.; WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D. (2006). Isolation and characterization of iso-inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochem**, **67**(15). 644-1650.

STADNIK, M.J.; TALAMINI, V. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M.J.; TALAMINI, V. (Eds). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: CCA/UFSC, 2004. p.45-62.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. (1999) The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol Mol Plant Pathol**, **55**:85-97.

VASCONCELOS, G.J.N.; GODIN JUNIOR, M.G.C.; BARROS, R. Extratos aquosos de *Leucaena leucocephala* e *Sterculia foetida* no controle de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Ciência Rural**, v.36, n.5, p.1353-1359, 2006.

VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.1, p.18-23, 2011.

WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. **Biological control of postharvest plant diseases of fruits and vegetables: theory and practice**. Boca Raton: CRC Press, 1994.

**CAPÍTULO III**  
**ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLANTAS DE *Calotropis***  
***procera* (AIT.) R.Br. POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES**  
**RAPD E ISSR**

**RESUMO**

A Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] é uma planta de múltiplas funções e alto potencial na agricultura, indústria e medicina natural. O conhecimento relacionado à diversidade genética das espécies traz diversas vantagens a um programa de melhoramento, somado a isto, os marcadores moleculares possibilitam várias aplicações e análises genéticas com grandes oportunidades de utilização no melhoramento genético. Esse trabalho teve por objetivo estudar a divergência genética por meio de marcadores moleculares RAPD e ISSR em genótipos de Flor de Seda. Vinte amostras de folhas da espécie foram coletadas na cidade de Grossos/RN e na cidade de Mossoró/RN no Campus Leste da UFERSA (dez plantas para cada local de coleta), sendo estas, previamente fotografadas, marcadas e georreferenciadas, por se tratar de plantas coletadas ao acaso. O DNA de cada uma das plantas foi extraído e uma amostra de cada local de coleta foi avaliada para um teste de polimorfismo com 60 *primers* RAPD e 23 *primers* ISSR. Após as análises moleculares foram selecionados 11 *primers* RAPD e 10 ISSR e avaliados nos vinte genótipos. Os resultados obtidos revelaram um bom padrão de amplificação para ambos os marcadores de DNA, tendo sido detectada a presença de variabilidade genética entre os genótipos de Flor de Seda. Para o marcador RAPD houve a formação de quatro grupos distintos, e para o marcador ISSR foi possível observar a formação de seis grupos distintos. Quando se analisou os dois marcadores de forma correlacionada foi possível detectar a formação de sete grupos distintos demonstrando a existência de variabilidade. A diferença encontrada nos resultados de ambos marcadores pode ser explicada por se tratar de dois marcadores que cobriram diferentes regiões do genoma. Houve a formação de grupos de genótipos consistentes para os marcadores RAPD e ISSR, porém discordando com a distribuição geográfica, os marcadores moleculares não permitiram observar uma relação com a origem dos pontos de coleta dos mesmos, pois obtivemos grupos formados por plantas das diferentes localidades coletadas.

**Palavras-chave:** Flor de Seda, marcadores moleculares, *primers*, RAPD, ISSR.

## ABSTRACT

The Silk Flower [*Calotropis procera* (Ait) R.Br.] is a plant that to present a multi-function and high potential to agriculture, industry and medicine natural. O knowledge related to genetic diversity of species brings several advantages to a breeding program, added this, molecular markers allow various applications and genetic analyzes with use great opportunities for breeding. This work aimed to study the genetic diversity using RAPD and ISSR molecular markers in Silk Flower genotypes. Twenty samples of species of leaves were collected in Grossos/RN and Mossoro/RN cities (ten plants for each site collection), which are previously photographed, tagged and geo-referenced, in the case of plants collected at random. The DNA from each plant it was extracted and a sample of each collection site it has been reported for a polymorphism test with 60 RAPD primers and 23 ISSR primers. After the molecular analyzes were selected 11 RAPD primers and 10 ISSR and evaluated in the twenty genotypes. The results showed a good amplification standard for both DNA markers, where it was detected the presence of genetic variability among Silk Flower genotypes. For the RAPD marker it was the formation of four distinct groups, and the ISSR marker was possible to observe the formation of six different groups. When it was analyzed the two markers in a corresponding manner it was possible to detect the formation of seven distinct groups showing the existence of variability. The difference in the results of both markers can be explained by the case of two markers that covered different regions of the genome. There was the formation of groups of genotypes consistent for RAPD and ISSR markers, but disagreeing with the geographical distribution, molecular markers to observe a relationship with the origin of the collection of the same points, as we have obtained the groups formed by plants of different locations collected.

**Keywords:** Silk Flower, molecular markers, primers, RAPD, ISSR.

### 3.3 INTRODUÇÃO

Apesar de haver informações disponíveis sobre diversas propriedades da Flor de Seda, ainda são escassos os relatos de estudos de base genética. Trata-se de uma planta de múltiplas funções e alto potencial na agricultura, indústria, farmacêutica, devendo existir, portanto, maiores pesquisas e incentivos no âmbito biotecnológico na tentativa de se tentar identificar genes que sejam de interesse para a classe científica a fim de ampliar e estimular o conhecimento acerca dessa planta de interessantes funcionalidades.

O conhecimento relacionado à diversidade genética das espécies traz duas vantagens a um programa de melhoramento. A primeira diz respeito à heterogeneidade genética que limita a vulnerabilidade das espécies às pragas e doenças e a segunda está relacionada ao fornecimento de um amplo suprimento de variação alélica que pode ser usada para criar novas combinações de genes favoráveis. Os marcadores moleculares possibilitam várias aplicações e análises genéticas com grandes oportunidades de utilização no melhoramento genético. Estes marcadores apresentam várias vantagens sobre os marcadores morfológicos, dentre elas, destaca-se o polimorfismo, a independência entre os efeitos ambientais e o estágio fisiológico da planta. Sendo assim, novas tecnologias como a identificação e seleção baseada diretamente no genótipo do indivíduo pode resultar em maior progresso genético, o que poderia ser obtido com o uso de marcadores moleculares, pelo fato destes basearem-se no uso do DNA dos indivíduos.

A informação prévia da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de uma espécie é uma etapa inicial importante para o desenvolvimento do manejo e conservação *in situ* e de repovoamento de espécies. Para isso, deve-se levar em conta se uma espécie está distribuída como apenas uma população, ou como populações geneticamente diferentes e qual o grau de interação entre elas. Nesse sentido o uso de marcadores moleculares em estudos de diversidade genética tem facilitado pesquisas com plantas. Com o objetivo de preservação de espécies economicamente importantes, os marcadores são úteis na detecção de populações caracterizadas por apresentar diversos graus de variabilidade genética, requerendo diferentes estratégias para conservação *in situ* ou *ex situ* (NEWTON et al., 1999). Por outro lado, se o objetivo for à domesticação de espécies, os marcadores moleculares podem auxiliar na determinação de

programas de coleta visando à seleção de apenas uma amostra da variabilidade de interesse para o melhorista (BORÉM, 1998).

Os marcadores moleculares RAPD e ISSR são dominantes e se baseiam em uma Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) amplificando segmentos de DNA com apenas uma única sequência de nucleotídeos. A vantagem de se utilizar dois marcadores moleculares para análises deve-se ao fato de que diferentes regiões do genoma da espécie serão amostradas (RUSSEL et al., 1997; DÁVILA et al., 1999).

Esse trabalho teve por objetivo estudar a divergência genética por meio de marcadores moleculares RAPD e ISSR em 20 genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] coletados em Mossoró-RN e Grossos-RN.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 Material Genético

Plantas saudáveis e não cultivadas de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] foram coletadas nos municípios de Mossoró-RN e Grossos-RN, sendo dez plantas de cada localidade, totalizando 20 plantas. As dez plantas oriundas de Mossoró-RN, foram coletadas dentro do Campus da UFERSA (Universidade Federal Rural do Semiárido), e as plantas do município de Grossos, foram coletadas ao redor de todo o município, tendo sido em ambas localidades escolhidas o mais distante possível e totalmente ao acaso. As plantas foram fotografadas (Figura 3) e georreferenciadas (Tabela 1).



**Figura 3** – Plantas de Flor de Seda coletadas nos municípios de Mossoró-RN (1C, 1D e 1E) e Grossos-RN (1A e 1B). UFERSA, Mossoró, 2015.

**Tabela 1** – Georreferenciamento e localização dos 20 genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] coletados nas cidades de Mossoró-RN e Grossos-RN. UFERSA, Mossoró, 2015.

Número	Genótipo	Local de Coleta	Georreferência
1	CP1	Mossoró	Lat. 5°12'38" Long. 37°18'53"
2	CP2	Mossoró	Lat. 5°12'33" Long. 37°18'59"
3	CP3	Mossoró	Lat. 5°12'31" Long. 37°19'1"
4	CP4	Mossoró	Lat. 5°12'31" Long. 37°19'2"
5	CP5	Mossoró	Lat. 5°12'31" Long. 37°19'10"
6	CP6	Mossoró	Lat. 5°12'16"

			Long. 37°19'27"
<b>7</b>	<b>CP7</b>	Mossoró	Lat. 5°12'21"
			Long. 37°19'18"
<b>8</b>	<b>CP8</b>	Mossoró	Lat. 5°12'21"
			Long. 37°19'17"
<b>9</b>	<b>CP9</b>	Mossoró	Lat. 5°12'23"
			Long. 37°19'14"
<b>10</b>	<b>CP10</b>	Mossoró	Lat. 5°12'22"
			Long. 37°19'14"
<b>11</b>	<b>CP11</b>	Grossos	Lat. 4°59'13"
			Long. 37°9'54"
<b>12</b>	<b>CP12</b>	Grossos	Lat. 4°59'40"
			Long. 37°10'0"
<b>13</b>	<b>CP13</b>	Grossos	Lat. 4°59'31"
			Long. 37°9'49"
<b>14</b>	<b>CP14</b>	Grossos	Lat. 4°58'7"
			Long. 37°10'32"
<b>15</b>	<b>CP15</b>	Grossos	Lat. 4°58'12"
			Long. 37°10'21"
<b>16</b>	<b>CP16</b>	Grossos	Lat. 4°58'24"
			Long. 37°9'51"
<b>17</b>	<b>CP17</b>	Grossos	Lat. 4°59'4"
			Long. 37°8'59"
<b>18</b>	<b>CP18</b>	Grossos	Lat. 4°59'11"
			Long. 37°9'1"
<b>19</b>	<b>CP19</b>	Grossos	Lat. 4°59'11"
			Long. 37°9'1"
<b>20</b>	<b>CP20</b>	Grossos	Lat. 4°59'11"
			Long. 37°9'1"

Fonte: Dados da Pesquisa

### 3.4.2 Caracterização Molecular

#### 3.4.2.1 Coleta e preparo do material vegetal

Foram coletadas folhas jovens e sadias de plantas de Flor de Seda, as quais, após a coleta, foram armazenadas em sacos plásticos identificados, com posterior acondicionamento em caixa térmica. As folhas de Flor de Seda passaram por uma etapa de secagem em estufa a 50°C por um período de 24 horas, para posterior extração do DNA vegetal. Acredita-se que a redução na umidade permitiu obtenção de um DNA em quantidade e qualidade desejáveis, justificando a otimização dessa etapa do protocolo.

#### 3.4.2.2 Extração de DNA vegetal

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990) com modificações. As folhas jovens coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um fino pó. O produto obtido da maceração foi disposto em microtubos de 2,0mL contendo 1000µL de tampão de extração CTAB (2% de CTAB, EDTA 25mM, NaCl 250mM, Tris-HCl 200mM pH 8,0 e 1,4% de β-mercaptoetanol), o volume foi completado com água ultra-pura. Os microtubos contendo a solução foram homogeneizados por inversão durante 60 minutos com agitação a cada 10 minutos. Adicionou-se 700µL de uma mistura de clorofórmio-álcool-isoamílico (CIA) e misturou-se vagarosamente, sendo posteriormente centrifugada por 10 minutos à 10.000rpm, transferiu-se a fase aquosa (superior) para outro tubo e esta etapa foi repetida por mais uma vez. Em seguida foi adicionado aos tubos 2/3 do sobrenadante de álcool isopropanol e as amostras foram incubadas à -20°C durante 1 hora. Centrifugou-se por 10 minutos à 10.000rpm e descartou-se o sobrenadante, onde foi realizada posteriormente uma lavagem contendo 1mL de álcool 70% e 90% respectivamente, onde entre uma lavagem e outra com álcool foi realizada uma centrifugação de 10 minutos à 10.000rpm. A secagem do pellet foi realizada em temperatura ambiente, após a



secagem adicionou-se 4 $\mu$ L de RNase de 10 $\mu$ g/mL e o DNA obtido foi eluído com 70 $\mu$ L de água ultra-pura por amostra. As amostras foram colocadas em banho-maria durante 1 hora à 45°C para homogeneizar as amostras.

A quantificação e a verificação da integridade das extrações de DNA foram realizadas por eletroforese com gel de agarose a 1,0% (p/v), corado com brometo de etídeo e visualizadas em fotodocumentador de luz UV e fotografadas em câmera digital. As amostras foram diluídas em 70  $\mu$ L de água ultra-pura e padronizadas a concentração de 10 ng/ $\mu$ L.

#### 3.4.2.3 Seleção de *primers* RAPD

Com o objetivo de reduzir os custos nas análises moleculares foi feita uma pré-seleção a partir de 60 *primers* RAPD, utilizando dois DNA's originados de diferentes pontos de coleta (CP05-Mossoró e CP17-Grossos) de Flor de Seda. Os *primers* que tiveram maior porcentagem de polimorfismo com a presença de fragmentos consistentes foram selecionados para a análise com todos os genótipos de Flor de Seda.

As reações de amplificação para o marcador molecular foram feitas num volume total de 12  $\mu$ L, no qual os reagentes foram misturados em forma de coquetel, separadamente do DNA. Cada reação continha 10 ng de DNA genômico, 10 mM (pH 8,3) de Tris-HCl, 2,5  $\mu$ M de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de cada dNTP, 5 mM do iniciador RAPD, 1 unidade de Taq DNA polimerase e água milliQ estéril para completar o volume da reação. O programa de amplificação foi realizado num termociclador da marca Perkin Elmer modelo 9700 que constou de uma etapa a 96°C por 1 minuto para desnaturação inicial do DNA, seguida de 40 ciclos de amplificação, os quais possuíam: (1) desnaturação do DNA, 92°C por 1 minuto; (2) anelamento do iniciador à 32°C por 1 minuto; (3) amplificação do DNA, 72°C por 2 minutos, com extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese horizontal em géis de agarose e corados com brometo de etídeo. A concentração do gel de agarose foi de 1% (p/v) para o marcador RAPD e a corrida eletroforética foi realizada numa potência constante de 100V por uma hora numa solução de Tampão

TBE 1X. Em seguida, o gel foi exposto à luz ultravioleta e fotografado com câmera digital.

#### 3.4.2.4 Seleção de *primers* ISSR

Uma pré-seleção foi realizada a partir de 23 *primers* ISSR (SANTANA et al., 2011), utilizando-se os mesmos DNA's contrastantes (CP05 e CP17) de Flor de Seda. Os iniciadores que tiveram maior porcentagem de polimorfismo com a presença de fragmentos consistentes foram selecionados para o procedimento, tendo sido escolhidos um total de 10 *primers* ISSR.

As reações de amplificação para o marcador molecular foram feitas num volume total de 12 uL, no qual os reagentes foram misturados em forma de coquetel, separadamente do DNA. Cada reação continha 10 ng de DNA genômico, 10 mM (pH 8,3) de Tris-HCl, 2,5 uM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de cada dNTP e 0,2 uM do iniciador ISSR, 1 unidade de Taq DNA polimerase e água milliQ estéril para completar o volume da reação. Para ambos os marcadores moleculares o programa de amplificação foi realizado num termociclador da marca Perkin Elmer, modelo 9700. A cada reação foi aplicado 10µL de óleo mineral para evitar a evaporação durante o processo de PCR.

Para este marcador o programa de amplificação constou das seguintes etapas: 94°C por 4 minutos para desnaturação inicial do DNA, seguida de 35 ciclos de amplificação à 94 °C por 40 segundos, temperatura de anelamento do iniciador variando a temperatura conforme o tipo do iniciador 40 e/ou 45°C por 40 segundos e amplificação do DNA, 72°C por 1 minutos. Por fim, foi feita uma extensão final de 72°C por 2 minutos.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese horizontal em géis de agarose corados com brometo de etídeo. A concentração do gel de agarose foi de 2,5% (p/v) para o marcador ISSR. A corrida eletroforética foi realizada em uma potência constante de 100V por três horas em uma solução de Tampão TBE 1X. Em seguida, o gel foi exposto à luz ultravioleta e fotografado com câmera digital.

### 3.4.2.5 Leitura dos dados moleculares e análise estatística

Os dados moleculares foram obtidos a partir dos produtos de amplificação analisados pela avaliação visual das bandas mais consistentes dos 20 genótipos analisados.

Uma matriz composta por dados binários foi elaborada a partir da visualização dos géis de agarose, em que o número 1 correspondeu à presença do fragmento; o zero à ausência e o número 2 aos dados perdidos em função da não amplificação de um fragmento em um genótipo para determinado iniciador.

Para interpretação das análises moleculares, utilizou-se o complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard, gerando uma estimativa de similaridade genética entre os genótipos. O coeficiente de Jaccard é definido pela seguinte fórmula:

$$S_{ij} \text{ Jaccard} = \frac{a}{a+b+c}$$

Em que:

$S_{ij}$  - é a similaridade genética entre o par de cultivares  $i$  e  $j$ .

$a$  - é a presença da banda em ambas as populações (número de contagens de concordância do tipo 1 1),

$b$  - presença da banda no genótipo  $i$  e ausência em  $j$  (número de discordância do tipo 1 0),

$c$  - ausência da banda em  $i$  e presença em  $j$  (número de contagens de discordância do tipo 0 1).

As similaridades resultantes deste coeficiente foram transformadas em medidas de distância genética pela seguinte expressão:  $dg_{ij} = 1 - s_{ij}$ . O coeficiente de Jaccard foi escolhido por considerar a ausência de fragmentos como sinônimo de similaridade genética (CRUZ; CARNEIRO, 2003).

Para a construção do dendrograma foi utilizado o método hierárquico UPGMA a partir da matriz de dissimilaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard (CRUZ; REGAZZI; CARNEIRO, 2004). A confirmação da formação dos grupos foi testada pelo cálculo do Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC), que tem

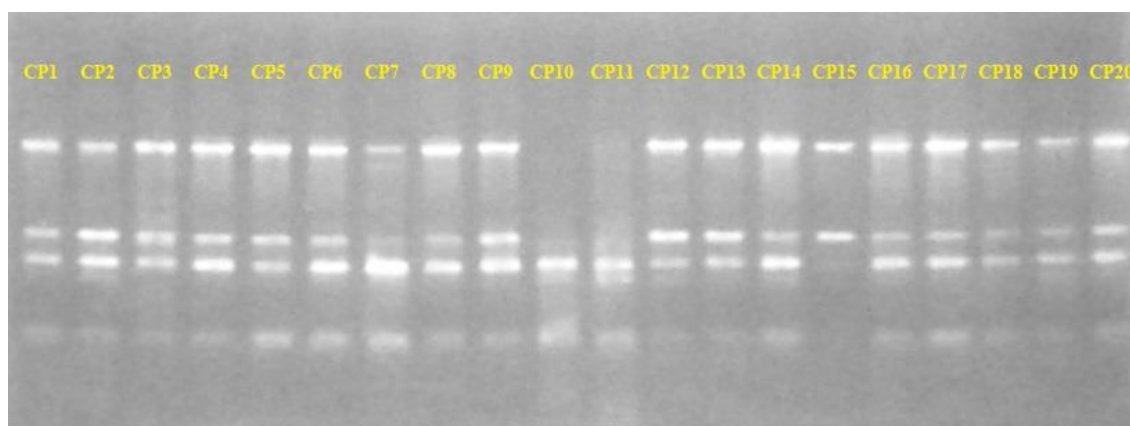
como função correlacionar a matriz de dissimilaridade (matriz fenética) com a matriz de valores cofenéticos. Quanto maior o valor de CCC, mais consistente se torna o agrupamento. Um valor de CCC menor que 0,7 indica inadequação do método de agrupamento (BUSSAD; MIAZAKI; ANDRADE, 1990). Foi efetuada a análise de reamostragem para verificar a consistência das bifurcações entre os grupos formados.

O recurso computacional utilizado foi o Programa Genes, com a construção do dendrograma originado pelo método UPGMA juntamente com a correlação cofenética (CRUZ, 2013).

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.5.1 Marcador Molecular RAPD

A partir da triagem de 60 *primers* RAPD foram selecionados 11 por apresentarem fragmentos consistentes. Fragmentos de baixa resolução foram descartados, evitando o comprometimento das análises. A Figura 4 ilustra o padrão eletroforético dos 20 genótipos de Flor de Seda amplificados com o marcador molecular RAPD (OPA-04).



**Figura 4** – Padrão eletroforético de 20 genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] obtidos pelo marcador molecular *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (OPA-04); 1: CP01; 2: CP02; 3: CP03; 4: CP04; 5: CP05; 6: CP06; 7: CP07; 8:

CP08; 9: CP09; 10: CP10; 11: CP11; 12: CP12; 13: CP13; 14: CP14; 15: CP15; 16: CP16; 17: CP17; 18: CP18; 19: CP19; 20: CP20. UFERSA, Mossoró/RN, 2015.

Da análise do marcador RAPD foram gerados 67 fragmentos, com 76,11% de fragmentos polimórficos e 23,89% de fragmentos monomórficos (Tabela 2). O número de fragmentos produzidos por iniciador variou entre 3 (OPD-16) e 8 (OPA-04, OPH-03 e OPH-04). As análises moleculares com os marcadores RAPD utilizados foram suficientes para discriminar genótipos de Flor de Seda.

**Tabela 2** – *Primers Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) selecionados para amplificação de genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.], com respectivas sequências, temperatura de anelamento (Tm), número total de fragmentos (NTF), número total de fragmentos polimórficos (NFP) e percentagem de polimorfismo (%). UFERSA, Mossoró/RN, 2015.

Nome do Iniciador	Sequência do iniciador*	Tm (°C)	NTF	NFP	% Polimorfismo
OPA-04	AATCGGGCTG	32	8	8	100
OPA-13	CAGCACCCAC	32	5	4	80
OPA-15	TTCCGAACCC	32	7	5	71,4
OPD-12	CACCGTATCC	32	7	4	57,1
OPD-13	GGGGTGACGA	32	4	0	0
OPD-16	AGGGCGTAAG	32	3	2	66,7
OPD-20	ACCCGGTCAC	32	6	5	83,3
OPH-01	GGTCGGAGAA	32	7	7	100
OPH-03	AGACGTCCAC	32	8	7	87,5
OPH-04	GGAAGTCFCC	32	8	6	75
OPH-05	AGTCGTCCCC	32	4	3	75
<b>TOTAL</b>		-	67	51	
<b>MÉDIA</b>		-	-	-	

Fonte: Dados da pesquisa

As distâncias genéticas determinadas entre os 20 genótipos de Flor de Seda para os municípios estudados são apresentadas na Tabela 3. Verificou-se que as maiores dissimilaridades foram encontradas entre os genótipos CP02 e CP04 (0,672), ambas pertencentes à cidade de Mossoró, significando que estas, são as

plantas mais divergentes geneticamente. Os menores valores de dissimilaridade encontrados foram obtidos a partir dos genótipos CP04 e CP14 (0,138), sendo a primeira pertencente à cidade de Mossoró e a outra pertencente ao município de Grossos. Valores desta natureza significam que estes genótipos apresentam um maior número de regiões idênticas ou são mais próximas geneticamente. Dados como este demonstram que podem existir divergências genéticas tanto em plantas que se encontram mais próximas, ou na mesma localidade, como também em plantas que estão situadas mais distantes geograficamente.

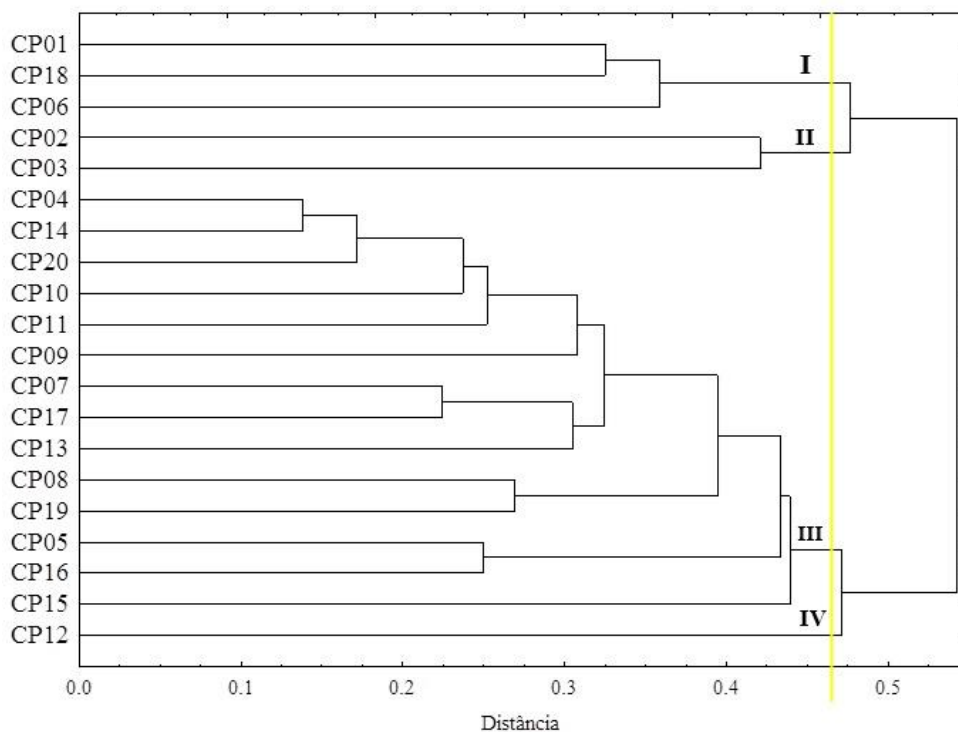
**Tabela 3** - Coeficientes de correlação linear avaliados em genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] com base no uso de *Primers Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). UFERSA, Mossoró/RN, 2015.

	CP01	CP02	CP03	CP04	CP05	CP06	CP07	CP08	CP09	CP10	CP11	CP12	CP13	CP14	CP15	CP16	CP17	CP18	CP19	CP20
CP01	0,000	0,513	0,390	0,556	0,580	0,333	0,600	0,408	0,561	0,426	0,500	0,522	0,518	0,554	0,611	0,542	0,569	0,325	0,510	0,508
CP02	0,513	0,000	0,421	0,672	0,587	0,457	0,607	0,500	0,566	0,589	0,556	0,558	0,574	0,603	0,563	0,545	0,649	0,548	0,478	0,603
CP03	0,390	0,421	0,000	0,500	0,648	0,558	0,567	0,431	0,500	0,474	0,436	0,478	0,583	0,476	0,519	0,642	0,559	0,395	0,440	0,523
CP04	0,556	0,672	0,500	0,000	0,393	0,641	0,238	0,385	0,242	0,250	0,238	0,492	0,333	0,138	0,328	0,410	0,281	0,554	0,415	0,194
CP05	0,580	0,587	0,648	0,393	0,000	0,574	0,404	0,509	0,492	0,467	0,431	0,438	0,448	0,397	0,453	0,250	0,333	0,604	0,491	0,397
CP06	0,333	0,457	0,558	0,641	0,574	0,000	0,621	0,490	0,632	0,500	0,571	0,476	0,537	0,571	0,608	0,533	0,614	0,385	0,588	0,548
CP07	0,600	0,607	0,567	0,238	0,404	0,621	0,000	0,444	0,300	0,359	0,375	0,483	0,339	0,273	0,362	0,393	0,224	0,574	0,452	0,273
CP08	0,408	0,500	0,431	0,385	0,509	0,490	0,444	0,000	0,426	0,429	0,281	0,481	0,410	0,313	0,587	0,444	0,410	0,347	0,269	0,338
CP09	0,561	0,566	0,500	0,242	0,492	0,632	0,300	0,426	0,000	0,339	0,328	0,491	0,446	0,303	0,309	0,533	0,371	0,583	0,508	0,328
CP10	0,426	0,589	0,474	0,250	0,467	0,500	0,359	0,429	0,339	0,000	0,279	0,466	0,375	0,231	0,426	0,483	0,400	0,483	0,484	0,231
CP11	0,500	0,556	0,436	0,238	0,431	0,571	0,375	0,281	0,328	0,279	0,000	0,483	0,439	0,219	0,492	0,475	0,365	0,474	0,316	0,273
CP12	0,522	0,558	0,478	0,492	0,438	0,476	0,483	0,481	0,491	0,466	0,483	0,000	0,474	0,444	0,451	0,490	0,446	0,521	0,519	0,444
CP13	0,518	0,574	0,583	0,333	0,448	0,537	0,339	0,410	0,446	0,375	0,439	0,474	0,000	0,288	0,459	0,411	0,271	0,517	0,362	0,206
CP14	0,554	0,603	0,476	0,138	0,397	0,571	0,273	0,313	0,303	0,231	0,219	0,444	0,288	0,000	0,385	0,413	0,262	0,530	0,344	0,149
CP15	0,611	0,563	0,519	0,328	0,453	0,608	0,362	0,587	0,309	0,426	0,492	0,451	0,459	0,385	0,000	0,472	0,433	0,655	0,619	0,385
CP16	0,542	0,545	0,642	0,410	0,250	0,533	0,393	0,444	0,533	0,483	0,475	0,490	0,411	0,413	0,472	0,000	0,382	0,596	0,453	0,387
CP17	0,569	0,649	0,559	0,281	0,333	0,614	0,224	0,410	0,371	0,400	0,365	0,446	0,271	0,262	0,433	0,382	0,000	0,491	0,417	0,262
CP18	0,325	0,548	0,395	0,554	0,604	0,385	0,574	0,347	0,583	0,483	0,474	0,521	0,517	0,530	0,655	0,596	0,491	0,000	0,420	0,460
CP19	0,510	0,478	0,440	0,415	0,491	0,588	0,452	0,269	0,508	0,484	0,316	0,519	0,362	0,344	0,619	0,453	0,417	0,420	0,000	0,369
CP20	0,508	0,603	0,523	0,194	0,397	0,548	0,273	0,338	0,328	0,231	0,273	0,444	0,206	0,149	0,385	0,387	0,262	0,460	0,369	0,000

Os valores das distâncias genéticas geraram um dendrograma representado na Figuras 5, cujos coeficientes de correlação cofenético (CCC) entre as matrizes de distâncias genéticas e as matrizes de agrupamentos foram positivos e significativos apresentando o valor de 0,86 para os genótipos. Esses valores podem ser considerados razoáveis permitindo fazer inferências sobre os dendrogramas.

A partir do ponto de corte para dissimilaridade genética de aproximadamente 45% observou-se a formação de quatro grupos distintos (Figura 5). O **Grupo I** foi composto pelos genótipos: CP01, CP18 e CP06. O **Grupo II** foi composto pelos genótipos: CP02 e CP03. O **Grupo III** engloba os genótipos:

CP04, CP14, CP20, CP10, CP11, CP09, CP07, CP17, CP13, CP08, CP19, CP05, CP16 e CP15. O **Grupo IV** é formado apenas pelo genótipo CP12.



**Figura 5** - Dendrograma UPGMA de vinte acessos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] obtidos pelo complemento do índice de Jaccard calculado com dados de marcadores RAPD. ( $r=0,86^{**}$ ). r: correlação cofenética.

O agrupamento dos genótipos com base nos marcadores moleculares não permitiu observar uma relação com a origem dos pontos de coleta dos mesmos. Isto pode ser justificado pelo fato de que os marcadores moleculares acessam regiões aleatórias do DNA, não amostrando necessariamente, neste caso, a cobertura de regiões que possam distinguir os grupos.

Os genótipos das diferentes localidades foram distribuídos entre os distintos grupos formados, provavelmente devido ao fato de estarem localizados dentro de uma mesma região geográfica, o que não os fez diferirem muito geneticamente quanto ao que se era esperado, que seria a formação de dois grandes grupos, um para as plantas coletadas em Mossoró e outro para as coletadas em Grossos. Para explicar os resultados obtidos no que diz respeito à variabilidade encontrada no material estudado, vários aspectos devem ser considerados, sementes de Flor de Seda são pequenas e leves e podem ser facilmente

transportadas, o que facilita a dispersão destas por animais e pelo vento (ORWA et al., 2009). Suas sementes podem percorrer quilômetros sem que haja perda de viabilidade, além disso, as distâncias geográficas entre os acessos não eram extensas, o que pode ter facilitado na formação dos grupos compostos por genótipos dos diferentes locais de coleta. Essa combinação pode desempenhar um papel importante na propagação e disseminação desta espécie influenciando desta forma na sua genética da população e na variabilidade genética encontrada entre os genótipos analisados.

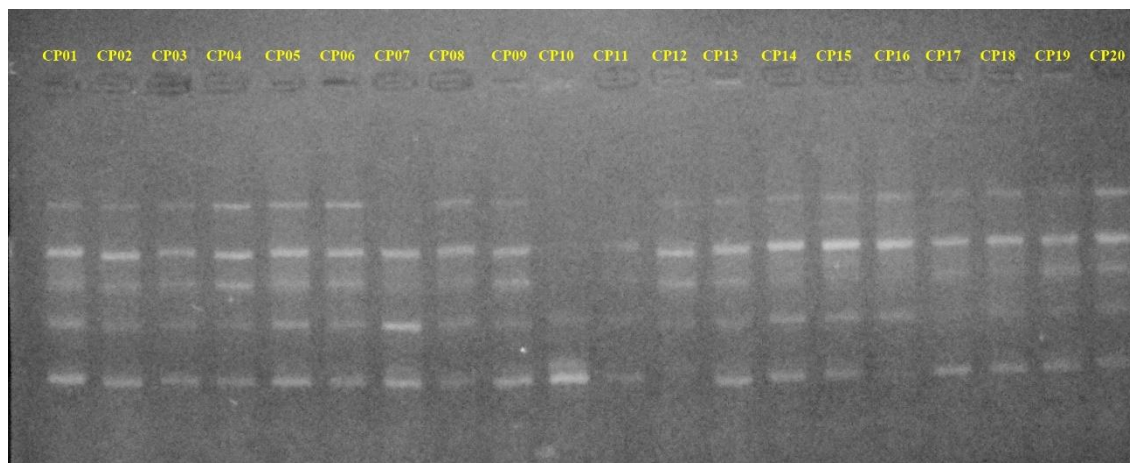
Junqueira et al. (2007) avaliando a diversidade genética de genótipos de maracujá suspiro (*Passiflora nitida* Kunth.) com base em marcadores RAPD verificaram que acessos procedentes do mesmo estado apresentavam menor variabilidade, principalmente entre genótipos procedentes de diferentes tipos morfofisionômicos.

Fajardo et al. (1998) utilizando marcadores RAPD, observaram uma grande variação intraespecífica em *P. ligularis* e *P. adenopoda*, porém, em *P. edulis* e *P. maliformis* houve pouca variabilidade.

### **3.5.2 Marcador Molecular ISSR**

Dos 23 iniciadores ISSR testados, 10 apresentaram resultado adequado com a produção de fragmentos consistentes e perfil de amplificação satisfatório. Fragmentos de baixa resolução foram descartados, evitando o comprometimento das análises. A Figura 6 ilustra o padrão eletroforético dos 20 genótipos de Flor de Seda com o marcador molecular ISSR (DiGA3'T).





**Figura 6** – Padrão eletroforético de 20 genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] obtidos pelo marcador molecular *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) (DiGA3'T); 1: CP01; 2: CP02; 3: CP03; 4: CP04; 5: CP05; 6: CP06; 7: CP07; 8: CP08; 9: CP09; 10: CP10; 11: CP11; 12: CP12; 13: CP13; 14: CP14; 15: CP15; 16: CP16; 17: CP17; 18: CP18; 19: CP19; 20: CP20. UFRSA, Mossoró/RN, 2015.

Da análise dos marcadores ISSR foram gerados 53 fragmentos, onde os mesmos apresentaram um padrão 100% polimórfico. O número de fragmentos produzido por *primer* variou entre 1 (TriTCC 3'RC) e 13 (DiGA3'T). A quantidade de fragmentos gerados por meio de 10 *primers* ISSR foi considerada suficiente para detecção da variabilidade genética existente entre genótipos de Flor de Seda.

Segundo Grativol et al. (2011), a eficiência de um marcador molecular pode ser medida pela quantidade de polimorfismo que o mesmo é capaz de detectar. Tal eficiência foi evidenciada por Kumar, Parthiban, Rao (2008), em estudo de diversidade genética entre espécies do gênero *Jatropha*, no qual oito *primers* ISSR registraram 100% de bandas polimórficas. He et al. (2007) avaliaram na China, a diversidade e estruturação genética em nove populações naturais de pinhão manso com base em 10 *primers* ISSR e obtiveram polimorfismo total de 97,04%.

Ao utilizar marcadores ISSR no estudo da variabilidade genética entre os acessos de espécies de *Manihot*, Silva et al. (2011) encontraram divergências genéticas intra e interespecíficas com polimorfismo de 89,7% e Mühlen, Martins, Ando (2000) obtiveram 97,96% de polimórficos, o que caracteriza o marcador ISSR como eficiente.

Os resultados obtidos no nosso estudo mostram que há congruência com os observados em outros trabalhos para outras espécies, corroborando assim como a detecção do alto nível de polimorfismo deste marcador molecular.

**Tabela 4** – Iniciadores *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) selecionados para amplificação de genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.], com respectivas sequências, temperatura de anelamento ( $T_m$ ), número total de fragmentos (NTF). UFERSA, Mossoró/RN, 2015.

Nome do Iniciador	Sequência do iniciador*	$T_m$ (C°)	NTF
DiGA3'C	(GA) <sub>8</sub> C	45	4
DiGA3'T	(GA) <sub>8</sub> T	45	13
TriGTG3'YC	(GTG) <sub>5</sub> YC	45-50	3
TriTGT3'RC	(TGT) <sub>5</sub> RC	50	2
TriTGT5'CY	CY(TGT) <sub>5</sub>	50	6
TriAAC 3'RC	(AAC) <sub>5</sub> RC	45	5
TriAAG 3'RC	(AAG) <sub>5</sub> RC	45	8
TriACA 3'RC	(ACA) <sub>5</sub> RC	45	6
TriAGG 3'RC	(AGG) <sub>5</sub> RC	45	5
TriTCC 3'RC	(TCC) <sub>5</sub> TRC	45	1
	<b>TOTAL</b>	-	53
	<b>MÉDIA</b>	-	

\*R=A, G; Y=C, T;

Fonte: Dados da pesquisa

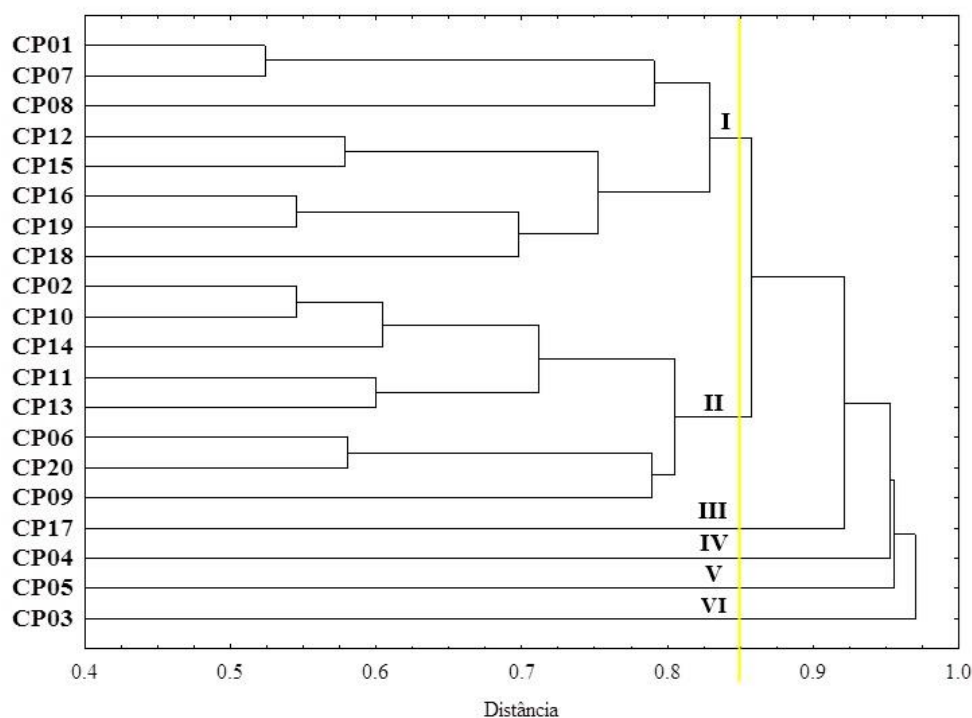
Com base nos intervalos de dissimilaridade entre as distâncias genéticas determinadas para os 20 genótipos de Flor de Seda dos municípios estudados, constatou-se que o menor valor de dissimilaridade ocorreu entre os genótipos CP01 e CP07 (0,524), tendo sido ambas coletadas na cidade de Mossoró e o maior grau de dissimilaridade entre os genótipos CP03 e CP07 (1,000), ambas também coletadas em Mossoró, demonstrando mais uma vez que há variabilidade genética entre e dentro dos locais de coleta (Tabela 5).

**Tabela 5** - Coeficientes de correlação linear avaliados em genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] com base no uso de marcadores ISSR. UFERSA, Mossoró/RN, 2015.

	CP01	CP02	CP03	CP04	CP05	CP06	CP07	CP08	CP09	CP10	CP11	CP12	CP13	CP14	CP15	CP16	CP17	CP18	CP19	CP20
CP01	0,000	0,950	0,933	1,000	1,000	0,833	0,524	0,810	0,882	0,842	0,810	0,857	0,857	0,964	0,897	0,857	0,895	0,917	0,800	0,872
CP02	0,950	0,000	1,000	0,889	1,000	0,833	0,857	0,941	0,727	0,545	0,714	0,786	0,714	0,647	0,800	1,000	1,000	0,813	0,774	0,848
CP03	0,933	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,917	0,909	1,000	0,933	0,944	0,944	1,000	0,923	0,967	0,968
CP04	1,000	0,889	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,833	1,000	0,917	0,923	1,000	0,909	0,938	0,947	0,947	1,000	1,000	0,929	0,968
CP05	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,938	0,944	1,000	0,900	1,000	1,000	1,000	0,917	1,000	0,889	0,833	1,000	0,923	0,897	0,969
CP06	0,833	0,833	1,000	1,000	0,938	0,000	0,929	0,900	0,765	0,895	0,810	0,958	0,737	0,885	0,935	0,857	0,889	0,826	0,872	0,581
CP07	0,524	0,857	1,000	1,000	0,944	0,929	0,000	0,773	0,824	0,818	0,880	0,773	0,960	0,933	0,640	0,778	0,905	0,880	0,636	0,932
CP08	0,810	0,941	1,000	0,833	1,000	0,900	0,773	0,000	0,917	0,882	0,889	0,947	0,895	0,909	0,917	0,875	1,000	0,900	0,767	0,774
CP09	0,882	0,727	1,000	1,000	0,900	0,765	0,824	0,917	0,000	0,917	0,867	0,938	0,750	0,733	0,913	0,842	1,000	0,800	0,760	0,815
CP10	0,842	0,545	1,000	0,917	1,000	0,895	0,818	0,882	0,917	0,000	0,692	0,714	0,583	0,563	0,714	1,000	0,750	0,765	0,806	0,875
CP11	0,810	0,714	0,917	0,923	1,000	0,810	0,880	0,889	0,867	0,692	0,000	0,824	0,600	0,818	0,783	0,880	0,867	1,000	0,857	0,719
CP12	0,857	0,786	0,909	1,000	1,000	0,958	0,773	0,947	0,938	0,714	0,824	0,000	0,944	0,800	0,579	0,880	0,933	0,625	0,781	0,919
CP13	0,857	0,714	1,000	0,909	0,917	0,737	0,960	0,895	0,750	0,583	0,600	0,944	0,000	0,750	0,923	0,880	0,933	0,900	0,788	0,758
CP14	0,964	0,647	0,933	0,938	1,000	0,885	0,933	0,909	0,733	0,563	0,818	0,800	0,750	0,000	0,862	0,969	0,895	0,773	0,676	0,722
CP15	0,897	0,800	0,944	0,947	0,889	0,935	0,640	0,917	0,913	0,714	0,783	0,579	0,923	0,862	0,000	0,759	0,857	0,800	0,667	0,860
CP16	0,857	1,000	0,944	0,947	0,833	0,857	0,778	0,875	0,842	1,000	0,880	0,880	0,880	0,969	0,759	0,000	1,000	0,750	0,545	0,676
CP17	0,895	1,000	1,000	1,000	1,000	0,889	0,905	1,000	1,000	0,750	0,867	0,933	0,933	0,895	0,857	1,000	0,000	0,941	0,971	0,912
CP18	0,917	0,813	0,923	1,000	0,923	0,826	0,880	0,900	0,800	0,765	1,000	0,625	0,900	0,773	0,800	0,750	0,941	0,000	0,645	0,806
CP19	0,800	0,774	0,967	0,929	0,897	0,872	0,636	0,767	0,760	0,806	0,857	0,781	0,788	0,676	0,667	0,545	0,971	0,645	0,000	0,674
CP20	0,872	0,848	0,968	0,968	0,969	0,581	0,932	0,774	0,815	0,875	0,719	0,919	0,758	0,722	0,860	0,676	0,912	0,806	0,674	0,000

A partir do ponto de corte para dissimilaridade genética de aproximadamente 86% foi possível observar a formação de seis grupos distintos (Figura 7). O **Grupo I** foi composto pelos genótipos: CP01, CP07, CP08, CP12, CP15, CP19 e CP18. O **Grupo II** foi composto pelos genótipos: CP02, CP10, CP14, CP11, CP13, CP06, CP20 e CP09. Os demais grupos foram formados por genótipos isolados, sendo o **Grupo III** composto pelo genótipo: CP17. O **Grupo IV** foi composto pelo genótipo: CP04. O **Grupo V** foi formado a partir do genótipo: CP05 e o **Grupo VI** foi formado pelo genótipo: CP03.

Com relação ao coeficiente de correlação cofenética (CCC), a associação entre as distâncias obtida pelo coeficiente de Jaccard e a matriz cofenética forneceu um valor indicando alta representatividade (81%), inferindo que os agrupamentos realizados são consistentes (VAZ PATTO et al., 2004).



**Figura 7** - Dendrograma UPGMA de vinte acessos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] obtidos pelo complemento do índice de Jaccard calculado com dados de marcadores ISSR. ( $r=0,81$ ). r: correlação cofenética.

É interessante observar que os genótipos coletados ficaram separados em diferentes grupos, quando na verdade o que se supunha é que genótipos de uma mesma localidade fossem mais próximos geneticamente.

Hamrick, Godt (1990) afirmaram que espécies de ampla distribuição geográfica normalmente possuem maior variabilidade genética dentro da população. Hamrick, Loveless (1989) afirmaram que as diferenças na estrutura genética de plantas podem ser atribuídas, entre outros fatores, aos diferentes tipos de fluxo gênico, o que inclui a dispersão de sementes. Este fato evidencia a existência de variação genética em diferentes pontos dentro de uma mesma localidade, sugerindo a ocorrência de gargalos genéticos ocasionados pela intensa fragmentação dos habitats.

Agossou Yao et. al. (2014) analisaram a diversidade genética de 20 genótipos de Flor de Seda coletados na região oeste da África. Utilizando-se os marcadores AFLP, os autores encontraram cinco classes distintas, onde houve heterogeneidade do material na separação dos mesmos. Foi possível obter grupos compostos de plantas da mesma região e categorias onde havia semelhanças

genéticas entre amostras de regiões diferentes. Corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa.

Quanto ao polimorfismo, a técnica ISSR apresentou maior polimorfismo quando comparado ao RAPD, confirmando sua superioridade (BORBA et al., 2005; GOULÃO; OLIVEIRA, 2001). Em ambos os marcadores moleculares houve uma tendência dos genótipos, independentemente do local, se agruparem de maneira desordenada.

### 3.5.3 Correlação entre as análises moleculares RAPD e ISSR

Pela análise da comparação dos agrupamentos gerados a partir das dissimilaridades genéticas, foi constatada significância entre os marcadores moleculares ISSR+RAPD ( $r= 0,86$ ) (Tabela 6), o que indica boa consistência dos dados.

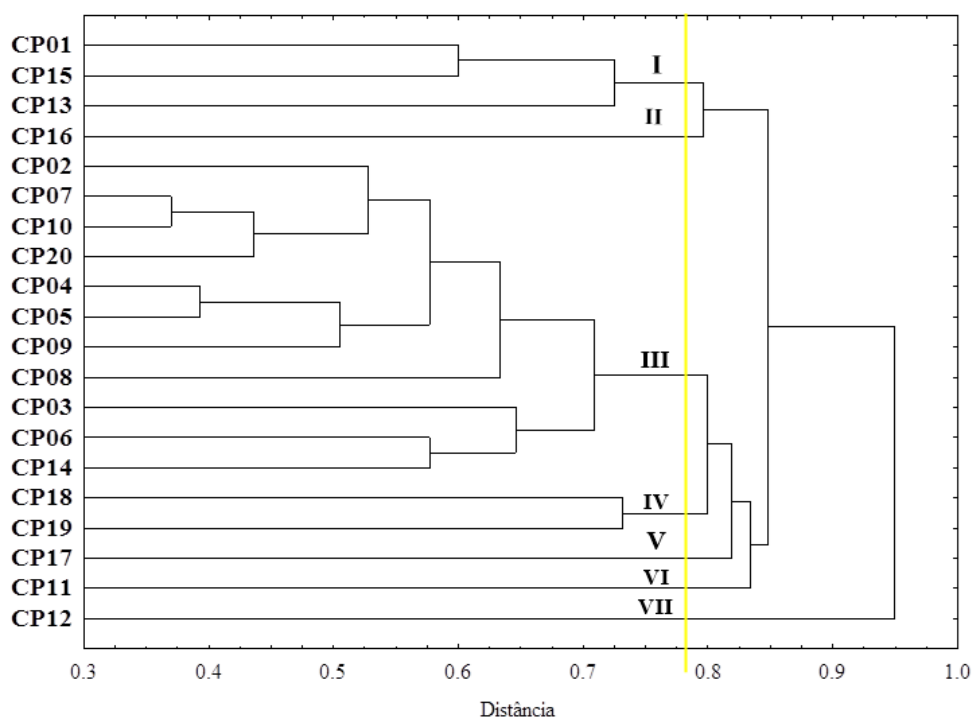
Com base nos intervalos de dissimilaridade entre as distâncias genéticas determinadas para os 20 genótipos de Flor de Seda dos municípios estudados, constatou-se que o menor valor de dissimilaridade ocorreu entre os genótipos CP07 e CP10 (0,3700), tendo sido ambas coletadas na cidade de Mossoró e o maior grau de dissimilaridade entre os genótipos CP12 e CP13 (1,000), ambas também coletadas em Grossos. Dados como este reforçam a hipótese de que podem existir divergências genéticas tanto em plantas que se encontram mais próximas, ou na mesma localidade, como também em plantas que estão situadas mais distantes geograficamente. (Tabela 6).

**Tabela 6** - Coeficientes de correlação linear avaliados em genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera*, (Aiton) R.Br.] com base no uso de marcadores ISSR+RAPD. UFERSA, Mossoró/RN, 2015.

	CP01	CP02	CP03	CP04	CP05	CP06	CP07	CP08	CP09	CP10	CP11	CP12	CP13	CP14	CP15	CP16	CP17	CP18	CP19	CP20
CP01	0,0000	0,7917	0,8246	0,8193	0,7683	0,7656	0,7553	0,9254	0,8841	0,7284	0,8537	0,8571	0,7429	0,7778	0,6000	0,7949	0,8696	0,9123	0,9778	0,7286
CP02	0,7917	0,0000	0,8471	0,6563	0,5495	0,7778	0,4255	0,6447	0,7143	0,5544	0,8824	0,9492	0,7627	0,8235	0,8750	0,8182	0,7031	0,7432	0,8677	0,6047
CP03	0,8246	0,8471	0,0000	0,6203	0,6667	0,7143	0,6383	0,7612	0,7059	0,6861	0,8400	0,9512	0,9400	0,5778	0,8261	0,8628	0,8546	0,7414	0,8125	0,7952
CP04	0,8193	0,6563	0,6203	0,0000	0,3933	0,6405	0,4100	0,6744	0,4133	0,5600	0,8056	0,9403	0,9367	0,7361	0,7910	0,7500	0,7632	0,7161	0,7945	0,6633
CP05	0,7683	0,5495	0,6667	0,3933	0,0000	0,6222	0,3800	0,6235	0,5977	0,5152	0,8267	0,9437	0,8056	0,7703	0,7500	0,7895	0,7722	0,6625	0,8026	0,5591
CP06	0,7656	0,7778	0,7143	0,6405	0,6222	0,0000	0,5859	0,7821	0,6667	0,5682	0,8167	0,9808	0,8036	0,5769	0,7959	0,8525	0,8806	0,7681	0,8500	0,6000
CP07	0,7553	0,4255	0,6383	0,4100	0,3800	0,5859	0,0000	0,5544	0,5319	0,3700	0,7791	0,9529	0,8256	0,6707	0,7875	0,8111	0,7582	0,7188	0,8111	0,4536
CP08	0,9254	0,6447	0,7612	0,6744	0,6235	0,7821	0,5544	0,0000	0,7600	0,5952	0,8039	0,9556	0,8889	0,8448	0,9455	0,8750	0,7857	0,7619	0,8077	0,5811
CP09	0,8841	0,7143	0,7059	0,4133	0,5977	0,6667	0,5319	0,7600	0,0000	0,6222	0,7407	0,9592	0,9333	0,8065	0,8333	0,7636	0,7627	0,8933	0,8246	0,7640
CP10	0,7284	0,5544	0,6861	0,5600	0,5152	0,5682	0,3700	0,5952	0,6222	0,0000	0,7867	0,9296	0,7973	0,6849	0,7941	0,8354	0,7625	0,8000	0,9048	0,4186
CP11	0,8537	0,8824	0,8400	0,8056	0,8267	0,8167	0,7791	0,8039	0,7407	0,7867	0,0000	0,9546	0,9412	0,7805	0,9091	0,8857	0,8974	0,9600	0,9730	0,7846
CP12	0,8571	0,9492	0,9512	0,9403	0,9437	0,9808	0,9529	0,9556	0,9592	0,9296	0,9546	0,0000	1,0000	1,0000	0,9524	0,9583	0,9630	0,9429	0,9000	0,9492
CP13	0,7429	0,7627	0,9400	0,9367	0,8056	0,8036	0,8256	0,8889	0,9333	0,7973	0,9412	1,0000	0,0000	0,8421	0,7083	0,8710	0,8889	0,9592	1,0000	0,7742
CP14	0,7778	0,8235	0,5778	0,7361	0,7703	0,5769	0,6707	0,8448	0,8065	0,6849	0,7805	1,0000	0,8421	0,0000	0,7188	0,8500	0,9375	0,7959	0,8781	0,7188
CP15	0,6000	0,8750	0,8261	0,7910	0,7500	0,7959	0,7875	0,9455	0,8333	0,7941	0,9091	0,9524	0,7083	0,7188	0,0000	0,7241	0,9189	0,9333	0,9714	0,8254
CP16	0,7949	0,8182	0,8628	0,7500	0,7895	0,8525	0,8111	0,8750	0,7636	0,8354	0,8857	0,9583	0,8710	0,8500	0,7241	0,0000	0,8421	0,9400	1,0000	0,8529
CP17	0,8696	0,7031	0,8546	0,7632	0,7722	0,8806	0,7582	0,7857	0,7627	0,7625	0,8974	0,9630	0,8889	0,9375	0,9189	0,8421	0,0000	0,9643	0,8649	0,8356
CP18	0,9123	0,7432	0,7414	0,7161	0,6625	0,7681	0,7188	0,7619	0,8933	0,8000	0,9600	0,9429	0,9592	0,7959	0,9333	0,9400	0,9643	0,0000	0,7317	0,7500
CP19	0,9778	0,8677	0,8125	0,7945	0,8026	0,8500	0,8111	0,8077	0,8246	0,9048	0,9730	0,9000	1,0000	0,8781	0,9714	1,0000	0,8649	0,7317	0,0000	0,8873
CP20	0,7286	0,6047	0,7952	0,6633	0,5591	0,6000	0,4536	0,5811	0,7640	0,4186	0,7846	0,9492	0,7742	0,7188	0,8254	0,8529	0,8356	0,7500	0,8873	0,0000

Quando analisamos os dois marcadores em associação, notamos a partir do ponto de corte para dissimilaridade genética de aproximadamente 79% que foi possível a formação de sete grupos distintos (Figura 8). O **Grupo I** foi composto pelos genótipos: CP01, CP15 e CP13. O **Grupo II** foi composto apenas pelo genótipo: CP16. O **Grupo III** formado pelos genótipos: CP02, CP07, CP10, CP20, CP04, CP05, CP09, CP08, CP03, CP06 e CP14. O **Grupo IV** foi composto pelos genótipos: CP18 e CP19. O **Grupo V** foi formado a partir do genótipo: CP17 e o **Grupo VI** foi formado pelo genótipo: CP11 e o **Grupo VII** foi composto pelo genótipo: CP12.

Com relação ao coeficiente de correlação cofenética (CCC), a associação entre as distâncias obtida pelo coeficiente de Jaccard e a matriz cofenética forneceu um valor indicando alta representatividade (86%) e segundo Vaz Patto et al. (2004) é um índice considerado confiável, inferindo que os agrupamentos realizados são consistentes.



**Figura 8** - Dendrograma UPGMA de vinte acessos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] obtidos pelo complemento do índice de Jaccard calculado com dados de marcadores (ISSR+RAPD). ( $r=0,86$ ). r: correlação cofenética.

Quando se analisou os dois marcadores em associação, foi possível notar a formação de uma maior quantidade de grupos. Em todos os casos houve uma certa tendência dos genótipos, independentemente do local, se agruparem de maneira desordenada, no que diz respeito à distribuição dos grupos quanto a localidade.

A partir da análise visual do dendrograma, nota-se que apenas no Grupo IV houveram genótipos de uma mesma localidade que apresentaram 100% de similaridade entre si, formados pelos genótipos CP18 e CP19, ambos coletados no município de Grossos. Foi constatado também que o genótipo CP12 foi o mais divergente geneticamente entre todos os demais, constituindo um grupo à parte na análise do marcador RAPD e quando se analisou os dois marcadores RAPD+ISSR em conjunto.

Faleiro et al. (2001), analisando acessos de Cacao (*Theobroma cacao* L.), concluíram que a quantidade e a reprodutibilidade dos fragmentos são os principais fatores que influenciam a associação entre os marcadores moleculares. Outros trabalhos na literatura comparam as informações geradas pelas associações entre diferentes marcadores (LINS, 2008; COLOMBO et al., 2000; DANTAS, 2011; MOULIN et al., 2012; SANDEGHI; CHEGHAMIRZA, 2012).

Basha, Sujatha (2007) obtiveram variabilidade de 33,5% (ISSR) e 42% (RAPD), Shen et al. (2010) e Chen et al. (2011) obtiveram 26,99% (RAPD) e 34,0% (RAPD+ISSR), respectivamente.

O marcador ISSR detectou uma maior variabilidade comparado ao RAPD. Isso pode ser justificado pelo fato de que os marcadores amostraram regiões distintas e os ISSR, por conseguinte, conseguiu amostrar o que há de mais distinto entre os genótipos a nível de DNA.

A distribuição de grupos variou em função do marcador utilizado. Os marcadores RAPD têm sido utilizados em diversos estudos de análise de diversidade genética em populações naturais (BUSO; RANGEL; FERREIRA, 1998; KELLER, 2000; ZUCCHI, 2002; CAVALLARI, 2006), mostrando-se como uma ferramenta eficiente para descrição de padrões de diversidade e para delimitação de espécies (COLLINS; MILL; MOLLER, 2003; ANAND, et al., 2010). Porém quando comparados com os marcadores ISSR, os marcadores RAPD apresentam certas desigualdades, como a apresentação de níveis mais baixos de polimorfismo (YANG et al., 1996; NAGAOKA; OGIHARA, 1997; PARSONS et al., 1997). Além disso, os iniciadores ISSR são mais robustos devido ao fato de apresentarem maior superfície de ancoragem e por possuírem maiores temperaturas de anelamento, produzindo assim um aumento na reprodutibilidade dos produtos de PCR (TSUMURA; OHBA; STRAUSS, 1996; WOLFE; XIANG; KEPHART, 1998).

Esses resultados apesar de inesperados estão em concordância com os resultados propostos por Agossou Yao et. al. (2014). Estes autores ao analisar 20 genótipos de Flor de Seda coletados na região oeste da África, fazendo uso de marcadores AFLP encontraram cinco grupos distintos. Houve a mesma desordem na formação dos mesmos, em que se obteve conjuntos compostos de plantas da mesma região e outros onde haviam semelhanças genéticas entre amostras de regiões diferentes. Os autores ressaltaram ainda a escassez de estudos de base genética com Flor de Seda, sendo o trabalho dos mesmos, considerado pioneiro. Consequentemente faz-se necessário estudos mais aprofundados a fim de se encontrar genótipos com características de interesse mais eficientes.



### 3.6 CONCLUSÕES

- As análises através do marcador RAPD mostrou que os genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.] apresentam para estes marcadores uma ampla dissimilaridade genética.
- O marcador ISSR apresentou uma maior quantidade de grupos formados, sendo detectada, portanto, uma maior dissimilaridade entre os genótipos avaliados.
- Os marcadores moleculares RAPD e ISSR detectaram a presença de variabilidade genética entre os genótipos de Flor de Seda [*Calotropis procera* (Aiton) R.Br.].

## 3.7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

AGOSSOU YAO, D.A.R.; SPRYCHA, Y.; POREMBSKI, S.; HORN, R. AFLP assessment of the genetic diversity of *Calotropis procera* (Apocynaceae) in the West Africa region (Benin). **Genetic Resour Crop Evol**, Germany, p. 1573-5109, 2014.

AKHTAR, N.; MALIK, A.; ALI, S. N.; KAZMI, S. U. Proceragenin, and antibacterial cardenolide from *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v. 3, n. 8, p. 2821- 2824, 1992.

ANAND, K.K.; SRIVASTAVA, R.K.; CHAUDHARY, L.B.; SINGH, A.K. Delimitation of species of the *Astragalus rhizanthus* complex (Fabaceae) using molecular markers RAPD, ISSR and DAMD. **Taiwania**, Taipei, v. 55, p. 197-207, 2010.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against diferente mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 4, p. 228-232, 2005.

BASHA, S. D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. **Euphytica**, v. 156, p. 375–386, 2007.

BERED, F. et al. **Genetic variability in wheat (*Triticum aestivumz* L.) germoplasm revealed by RAPD markers**. Crop Breeding and Applied Biotechnology, Londrina, v.2, n.4, p. 499-506, 2002.

BORBA, R. DA S.; GARCIA, M. S.; KOVALLESKI, A.; OLIVEIRA, A. C.; ZIMMER, P. D.; BRANCO, J. S. C.; MALONE, G. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 565-569, 2005.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. 2ed. Viçosa: UFV, 1998. 453 p.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 374p.

BUSO, G.S.; RANGEL, P.H.; FERREIRA, M.E. Analysis of genetic variability of south American wild rice populations (*Oryzaglumaepatula*) with isozymesand RAPD markers. **MolecularEcology**, Vancouver, v. 7, p. 107-117, 1998.

BUSSAD, W. de O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. **Introdução à análise de agrupamentos**. São Paulo: ABE, 1990. 105 p.

CAVALLARI, M.M.; FORZZA, R.C.; VEASEY, E.A.; ZUCCHI, M.I; OLIVEIRA, G.C.X.O. Genetic variation in three endangered species of *Encholirium* (Bromeliaceae) from cadeia do espinhaço, Brazil, detected using RAPD markers. **Biodiversity and Conservation**. Madri, v. 15, p. 4357-4373, 2006.

CHEN, K.; REN, P.; YING, C.; JIANG, Q.; JIA, X., Genetic relationships among *Jatropha curcas* L. clones from Panzhuhua, China as revealed by RAPD and ISSR. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, p. 2582–2585, 2011.

COLLINS, D.; MILL, R.R.; MOLLER, M. Species separation of *Taccus baccata*, *T. canadensis* and *T. cuspidata* (Taxaceae) and origins of their reputed hybrids inferred from RAPD and cpDNA data. **American Journal of Botany**, New York, v. 90, p. 175-182, 2003.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIES, A. Genetic relatedness between cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and *M. flabellifolia* and *M. Peruviana* based on both RAPD and AFLP markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 417-423, 2000.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, p. 271-276, 2013.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2 ed. Viçosa-MG: UFV, 2004, 480p.

CRUZ, C. D; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2 ed. Viçosa, UFV. 2003. 579p.

DANTAS, A. C. de A. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de melão coletados no nordeste brasileiro**. 2011, 64p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

DÁVILA, J. A.; LOARCE, Y.; FERRER, E. Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p. 265-273, 1999.

DEWAN, S; SAN GRAUKA, H; KUMAR, V. L. Preliminary studies on the analgesics activity of latex *Calotropis procera*. **Journal Ethnopharmacol**, v. 73, n. 1/2, p. 307-311, 2000.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

EIGENBRODE, S.D. (1996) **Plant surface and insect behaviour** In: Kerstiens G (ed), *Plant cuticles: an integrated functional approach*, pp. 201-221. Bios Scientific Publishers, Lancaster.

FAJARDO, D.; ANGEL, F.; GRUM, M.; TOHME, F.; LOBO, M.; ROCA, W.M.; SANCHEZ, I. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* i. using RAPD markers. **Euphytica**, Dordrecht, v. 101, n.3, p. 341-347, 1998.

FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIRES, J. L.; BAHIA, R. C. S.; SANTOS, R. C.; GOMES, L. M. C.; ARAÚJO, I. S.; FALEIRO, A. S. G.; GRAMACHO, K. P.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; VALE, R. R. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotropica**, v.13, n.2, p. 79-86, 2001.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v.122, p.81-89, 2001.

GRATIVOL, C.; MEDEIROS, C. F. L.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Reporter**, v. 38, p. 4245–4256, 2011.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (Ed.). *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*, p.43–63, 1990.

HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. The Genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. In: BOCK, J.H.; LINHART, Y.B. (Ed.). **The Evolutionary Ecology of Plants**. Boulder: Westview Press, 1989. p. 129-146.

HANELT P, INSTITUTE OF PLANT GENETICS AND CROP PLANT RESEARCH (2001) **Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops**. Springer-Verlag, Berlin, pp 1755–1756.

HE, W.; GUO, L.; WANG, L.; YANG, W.; TANG, L.; CHEN, F. ISSR analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* L. **Chinese Journal Application Environmental Biology**, v. 13, p. 466–470, 2007.

IQBAL, Z.; LATEEF, M.; JABBAR, A.; MUHAMMAD, G.; KHAN, M. N.; Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. **Journal of Ethnopharmacology** v. 102, n. 2, p. 256-261, 2005.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, J.D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro (*Passiflora nítida* Kunt) com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 2007, vol.29, n.3, p.571-575. ISSN 0100-2945. 2007.

KELLER, B.E.M. Genetic variation among and whiting populations of *Phragmetis australis* in the Charles River watershed. **Aquatic Botany**. Nijmegen, v. 66, p. 195-208, 2000.

KUMAR, R. S.; PARTHIBAN, K. T.; RAO, M. G. Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Biology Reporter*, v. 36, p. 1951–1956, 2008.

KUMAR, V. L; BASU, N. Anti-inflammatory activity of the látex of *Calotropis procera*. **Journal Ethnopharmacoly**, v. 44, n. 2, p. 123-125, 1994.

LINS, A. B. **Distâncias genéticas estimadas com marcadores moleculares e associação com performance de híbridos de *Theobroma cacao* L.** 2008. 85f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.

MELO, M. M.; VAZ, F. A.; GONÇALVES, L. C.; SATURNINO, H. M. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait. e sua utilização na alimentação de caprinos: Efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 1, p. 15-20, 2001. Publicação online, EMV-UFBA.

MOULIN, M. M.; RODRIGUES, R.; GONÇALVES, L. S. A.; SUDRÉ, POMBO, C.; PEREIRA, M. G. A comparison of RAPD and ISSR markers reveals genetic diversity among sweet potato landraces (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Acta Scientiarum Agronomy**, v.34, p.139-147, 2012.

MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores moleculares de DNA. *Scientia Agricola*, v.57, p.319–328, 2000.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Aplicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and

RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 94, p. 597-602, 1997.

NEWTON, A.C.; ALLNUTT, T.R.; GILLIES, A.C.M.; LOWE, A.J.; ENNOS, R.A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**. n. 14, p. 140-145, 1999.

ORWA, C.; MUTUA, A.; KINDT, R.; JAMNADASS, R.; SIMONS, A. (2009). **Agroforestry database: a tree reference and selection guide version 4.0** (<http://worldagroforestry.org/af/treedb>).

PARSONS, B.J.; NEWBURY, H.J.; JACKSON, M.T.; FORD-LLOYD, B.V. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oriza sativa* L.) using different marker types. **Molecular Breeding**, Lleida, v. 3, p. 115-125, 1997.

ROY, S.; SEGHAL, R.; PADHY, B. M.; KUMAR, V.L. Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 470-473, 2005.

RUSSELL; J. R., FULLER, J. D., MACAULAY, M.; HATZ, B. G., JAHOR, A.; POWELL, W., WAUGH, R. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 95, p. 714-722, 1997.

SADEGHI, A.; CHEGHAMIRZA, K. Efficiency of RAPD and ISSR marker systems for studying genetic diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. **Annals of Biological Research**, v. 3, p.3267-3273, 2012.

SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA, E. J. de; SOARES FILHO, W.S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M. A. P. C.; MOREIRA, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.868-876, 2011.

SHEN, J. L.; JIA, X. N.; NI, H. Q.; SUN, P. G.; NIU, S. H.; CHEN, X. Y. **AFLP analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* L. grown in Hainan, China.** **Trees**, v. 24, p. 455-462, 2010.

SILVA, K. V. P. da; CUNHA, A. A. da; MARTINS, M. I. G.; MELO, C. A. F. de; CARVALHO, R. de; **Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR.** Pesquisa agropecuária brasileira. [online]., v. 46, p. 1082-1088, 2011.

TSUMURA, Y.; OHBA, K.; STRAUSS, S.H. Diversity and inheritance of inter-

simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p 40-45, 1996.

VAZ PATTO, M.C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, v.137, n.1, p.63-72, 2004

WILLIAMS, R. J.; Spencer, J. P. E.; Rice-Evans, C..2004. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules. **Free Rad. Biol. Med.**, **36**: 838-849.

WOLFE, A.D; XIANG, Q.I.; KHEPART, S.R. Assessing hibridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulareaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. **Molecular Ecology**, Vancouver, v.7, p. 1107-1125, 1998.

YANG, W.P.; OLIVEIRA, A.C; GODWIN, I.; SCHERTZ, K.; BENNETZEN, J.L. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability chinese sorghums. **CropScience**, Madison, v. 36p.1669-1676,1996.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores moleculares RAPD e SSR**. 2002. 130p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.