

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

ADRIELLE AYUMI DE VASCONCELOS

**ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (MYRTACEAE) POR MEIO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES TRANSFERÍVEIS**

DOURADOS, MS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

Adrielle Ayumi de Vasconcelos

ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (MYRTACEAE) POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES TRANSFERÍVEIS

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, no Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados. Orientador (a): Profa. Dra. Alexeia Barufatti Grisolia.

DOURADOS, MS

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

V331a Vasconcelos, Adrielle Ayumi De

Análise de diversidade genética em populações de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae) por meio de marcadores microssatélites transferíveis / Adrielle Ayumi De Vasconcelos -- Dourados: UFGD, 2016.

46f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Alexeia Barufatti Grisolia

TCC (Graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Guavira. 2. SSR. 3. Variabilidade genética. 4. Genética de populações. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

ADRIELLE AYUMI DE VASCONCELOS

ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (MYRTACEAE) POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES TRANSFERÍVEIS

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados.

Profa. Dra. Alexeia Barufatti Grisolia
Orientadora - FCBA/UFGD

Profa. Dra. Liliam Silvia Candido
Membro da banca avaliadora - FCBA/UFGD

Prof. Dr. Thiago de Oliveira Carnevali
Membro da banca avaliadora - FCBA/UFGD

Dourados-MS

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, principalmente aos meus pais, por todo amor, apoio incondicional e incentivo que foram essenciais para a conclusão dessa importante etapa da minha vida.

À Profa. Dra. Alexeia Barufatti Grisolia, pela orientação, ensinamentos, apoio e confiança durante todos esses anos. As oportunidades que me proporcionou me fizeram aprender e crescer muito.

À Profa. Dra. Maria do Carmo Vieira, pela colaboração, apoio e confiança nos meus trabalhos de iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Thiago de Oliveira Carnevali, pela coleta e concessão do material vegetal necessário para realização do trabalho.

À Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles da UFG pela parceria neste trabalho e pela disposição. A colaboração em seu laboratório foi essencial para realização da principal parte experimental deste trabalho.

Aos professores da FCBA, por todo o conhecimento que puderam transmitir durante esses anos, pela disposição, apoio e conselhos.

Aos membros antigos e atuais do Laboratório de Biotecnologia aplicada a Produção Animal e do Laboratório de Mutagênese Ambiental: Bruno, Jéssica, Juliana S., Juliana F., Jannaína, André, Ândrea, Allana, Deborah, Alexandre, Héline, Rafaela e demais. Obrigada pelo companheirismo, amizade, disposição em ensinar e ajudar, e por contribuírem no meu crescimento profissional e pessoal.

A todos os amigos que ganhei durante a graduação, pela amizade e convívio, pelo apoio, por estarem comigo nos momentos bons e difíceis. Juntos superamos muitos desafios e torço para que todos sejam ainda mais brilhantes no futuro.

Ao meu namorado Gustavo, pelo carinho, motivação, paciência e confiança.

A UFGD, CAPES, CNPq e FUNDECT pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que não citei o nome, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Ama-se mais o que se conquista com esforço”

(Benjamin Disraeli)

RESUMO

Campomanesia adamantium O. Berg (Myrtaceae), conhecida como guavira ou gabirola, é uma planta endêmica do Cerrado que possui potencial produtivo devido ao uso de seus frutos na culinária e por apresentar propriedades medicinais. Estudos de diversidade genética utilizando marcadores moleculares com esta espécie ainda são escassos, porém necessários para servir de base para programas de conservação e melhoramento. Nesse contexto, o trabalho foi realizado com o objetivo de investigar a variabilidade genética de cinco populações de *C. adamantium* por meio de marcadores microssatélites derivados de EST transferidos de *Eucalyptus*. Amostras de folhas foram coletadas de 167 indivíduos pertencentes a cinco populações localizadas em Dourados-MS, Bonito-MS, Ponta Porã-MS, Jardim-MS, no Brasil e Cerro Corá, no Paraguai. O DNA foi extraído e, em seguida a PCR foi realizada com sete marcadores microssatélites (Embra1335, 1076, 1470, 1364, 1363, 1374, 1811). Após genotipagem em analisador automático ABI3500, foram realizadas as análises de diversidade genética e estrutura populacional. Todos os sete loci foram polimórficos (9 alelos em média), sendo detectados 61 alelos, com tamanho variando de 197 a 396 pb. Todas as populações apresentaram altos níveis de riqueza alélica e diversidade genética. A população de Bonito demonstrou maior variabilidade genética, enquanto que a população de Dourados apresentou menor variabilidade. Visto que as populações apresentaram baixo nível de endogamia, os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos loci podem estar sendo causados por fluxo gênico de outras populações próximas, o que também contribui para a alta diversidade genética. A alta heterozigosidade encontrada pode estar relacionada ao maior vigor dos heterozigotos, conferindo maior adaptabilidade às condições ambientais do Cerrado. Um baixo nível de diferenciação interpopulacional foi detectado ($F_{ST}=0.028$) devido ao compartilhamento de alelos, sendo que populações geograficamente mais próximas foram mais similares geneticamente. Isso indica ocorrência de elevado fluxo gênico possivelmente por padrões *stepping stone* ou isolamento por distância, suportados pela ampla distribuição, densidade e frequência da espécie e seus padrões de dispersão estáveis por polinizadores e animais. Assim, torna-se importante a conservação e coleta de germoplasma de populações de guavira visando preservar sua elevada variabilidade genética, que além de ser importante para a sobrevivência da espécie, pode servir de fonte para seleção de genótipos superiores no melhoramento genético.

Palavras-chave: guavira; SSR; variabilidade genética; genética de populações.

ABSTRACT

Campomanesia adamantium O. Berg (Myrtaceae), known as guavira or gabirola, is an endemic plant of the Cerrado biome. It has potential of production due to the use of its fruits in culinary and its medicinal properties. Genetic diversity studies using molecular markers with this species are still scarce, but necessary to provide the basis for conservation and breeding programs. In this context, this work was carried out to investigate the genetic variability of five populations of *C. adamantium* through EST-derived microsatellite markers transferred from *Eucalyptus*. Leaf samples were collected from 167 individuals from five populations located in Dourados-MS, Bonito-MS, Ponta Porã-MS, Jardim-MS, in Brazil and in Cerro Corá, Paraguay. The DNA was extracted and then PCR was performed with seven microsatellite markers (Embra1335, 1076, 1470, 1364, 1363, 1374, 1811). After genotyping on ABI3500 automatic sequencer, analysis of genetic diversity and population structure were carried out. All seven loci were polymorphic (9 alleles on average) and 61 alleles were detected with size ranging 197-396 bp. All populations showed high levels of allelic richness and genetic diversity. The population of Bonito showed greater genetic variability, while the population of Dourados showed less variability. Since populations had low level of inbreeding, the deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium in the loci may have been caused by gene flow from other nearby populations, which also contributes to the high genetic diversity. The high heterozygosity found may be related to the greater vigor of heterozygotes, which provides adaptability to the environmental conditions of Cerrado. A low level of interpopulational differentiation was detected ($F_{ST}=0.028$) due to alleles being shared, and populations that were geographically closest were more similar genetically. This indicates occurrence of high gene flow possibly by stepping stone patterns or isolation by distance, supported by the wide distribution, density and frequency of the species and its stable dispersion patterns mediated by pollinators and animals. Thus, the conservation and collection of germplasm of guavira populations becomes important to preserve their high genetic variability, which in addition to being important for the survival of the species, can serve as a source for selection of superior genotypes in breeding programs.

Keywords: guavira; SSR; genetic variability; population genetics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Objetivos	11
1.2 Hipóteses.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 <i>Campomanesia adamantium</i> : Aspectos gerais	13
2.2 Marcadores moleculares em plantas	15
2.3 Marcadores microssatélites.....	17
2.4 Análise de Diversidade Genética em Populações	21
2.4.1 Medidas de Diversidade Genética.....	23
2.4.2 Análises de estrutura de populações.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Material biológico.....	26
3.2 Extração de DNA do tecido foliar	27
3.3 Marcadores Microssatélites	27
3.4 Análises Populacionais	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Diversidade Genética	30
4.2 Estrutura populacional	33
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
6. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da distribuição geográfica de <i>Campomanesia adamantium</i> O. Berg no Brasil	13
Figura 2. Aspecto geral de <i>Campomanesia adamantium</i> O. Berg com frutos e suas flores ...	14
Figura 3. Exemplo de microssatélite detectado por sequenciamento.....	18
Figura 4. Mapa das localizações geográficas das populações de guavira coletadas.	26
Figura 5. Dendograma Neighbor-Net baseado na distância de Reynold (F_{ST}) de sete loci microssatélites.	35
Figura 6. Grupamento de 167 acessos de cinco populações de <i>C. adamantium</i> , analisados pelo programa STRUCTURE utilizando o método Bayesiano com $K=5$	36
Figura 7. Grupamento de 167 acessos de cinco populações de <i>C. adamantium</i> , analisados pelo programa STRUCTURE utilizando o método Bayesiano, com $K=3$	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características dos diferentes tipos de marcadores moleculares	16
Tabela 2. Lista de alguns dos pacotes software mais utilizados para análises de diversidade genética de populações e tópicos relacionados.....	22
Tabela 3. Marcadores microssatélites utilizados e detalhes de amplificação por PCR.....	28
Tabela 4. Estimativas de variabilidade genética para as cinco populações de guavira com base em sete marcadores microssatélites	31
Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) interpopulacional e intrapopulacional das cinco populações de guavira.....	33
Tabela 6. Estimativa par a par da diferenciação genética entre as cinco populações de guavira.	34
Tabela 7. Número de indivíduos (N) por população e proporção de associação de cada população de <i>C. adamantium</i> em cada um dos cinco grupos inferidos pelo programa Structure.	35

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro é a segunda maior reserva genética de espécies nativas do país, apresentando elevada biodiversidade. Esse bioma possui flora de riqueza marcante, com diversas espécies frutíferas e medicinais, sendo vários desses recursos vegetais explorados pelo homem (KLINK; MACHADO, 2005). Diversas pesquisas para avaliar o potencial de produção e as possibilidades de cultivo de espécies nativas do Cerrado já foram realizadas, visando sua possível inserção no sistema de produção agrícola da região. Dentre as espécies estudadas, inclui-se a *Campomanesia adamantium* devido à sua aceitabilidade pela população, ampla densidade, frequência e distribuição no ambiente e vantagens produtivas, tais como precocidade para início da produção e alta produtividade (AGOSTINI-COSTA et al., 2006).

A *Campomanesia adamantium* O. Berg (Myrtaceae), conhecida como guavira, gabiroba, guabiroba, guabiroba-do-campo ou guariroba, é uma planta nativa amplamente encontrada no Cerrado (SILVA et al., 2001). Os frutos da guavira são consumidos *in natura* e utilizados no preparo de doces. Além disso, as folhas e frutos da planta também são usados na medicina popular (PORTO; GULIAS, 2006; CARDOSO et al., 2010). Além de trabalhos caracterizando suas propriedades químicas e medicinais, pesquisas visando a domesticação desta planta também têm sido realizadas e indicam a existência de grande variabilidade genética, inferida através da avaliação de variações fenotípicas (AGOSTINI-COSTA et al., 2006; MELCHIOR et al., 2006; PELLOSO, 2011; OLIVEIRA et al., 2011; AJALLA, 2012; DRESCH et al., 2013; WESP et al., 2013; RESENDE; TEIXEIRA, 2015).

A variabilidade genética é fundamental para programas de melhoramento genético de plantas e em estratégias de conservação (SEHGAL; RAINA, 2008). Uma das ferramentas úteis para avaliar variações genéticas são os marcadores moleculares, que também constituem meios eficientes de relacionar variações fenotípicas e genotípicas (VARSHNEY et al., 2005). Nos últimos anos, os marcadores moleculares têm avançado nossa compreensão sobre os recursos genéticos e contribuído com os programas de melhoramento (KALIA et al., 2011).

Dentre os tipos de marcadores moleculares existentes, os marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) têm sido extensamente utilizados para o estudo da genética em plantas, pois são tipicamente codominantes, multialélicos, polimórficos e apresentam alta heterozigosidade (BRONDANI et al., 1998; PARIDA et al., 2009). Para reduzir o tempo e custo investidos no desenvolvimento de marcadores microssatélites para uma espécie, a

transferibilidade, ou seja, a habilidade de transferir marcadores entre espécies filogeneticamente próximas é uma estratégia muito utilizada (KALIA et al., 2011), o que já foi realizado para a *C. adamantium* a partir de marcadores microssatélites derivados de EST de *Eucalyptus spp.* (MIRANDA et al., 2016).

Pesquisas que utilizem marcadores moleculares em *C. adamantium* ainda são escassos (ASSIS et al., 2013; MIRANDA et al., 2016). Dessa forma, estudos de genética de populações são necessários para dar suporte a programas de conservação e melhoramento, visto que a degradação do Cerrado, seja pelo extrativismo inadequado ou pela expansão das fronteiras agrícolas, pode afetar a variabilidade genética em *Campomanesia* (MIRANDA et al., 2016).

Nesse contexto, considerando que existe um grande interesse pela guavira na região do Cerrado, e que poucos estudos de diversidade genética foram realizados com a espécie, torna-se relevante o uso de marcadores microssatélites transferíveis para avaliar a variabilidade em nível molecular de populações de *C. adamantium*. Esse tipo de estudo pode gerar informações que poderão servir de suporte para programas de conservação e melhoramento da guavira.

1.1 Objetivos

Geral:

- Caracterizar a diversidade genética de cinco populações de *C. adamantium* do Cerrado utilizando marcadores microssatélites derivados de EST transferidos de *Eucalyptus*.

Específicos:

- Avaliar parâmetros de diversidade genética para inferir o nível de variabilidade genética presente nas populações de *C. adamantium*;
- Analisar a estrutura populacional e o grau de diferenciação entre as populações de *C. adamantium*.

1.2 Hipóteses

- H0: As cinco populações de guavira estudadas não apresentam diversidade genética em seu ambiente natural, e a distância geográfica entre as populações de guavira não afeta a diferenciação genética.
- H1: As cinco populações de guavira estudadas apresentam diversidade genética em seu ambiente natural, e quanto maior for a distância geográfica entre as populações de guavira, maior será a diferenciação genética.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Campomanesia adamantium*: Aspectos gerais

Campomanesia adamantium (Cambess) O. Berg pertence à família Myrtaceae, uma das maiores famílias da flora brasileira, com 26 gêneros e cerca de 1000 espécies no país (LORENZI; SOUZA, 2008). Popularmente, é conhecida como guavira, sendo chamada também de gabioba, guabiroba, guariroba, guabiroba-do-campo, guabiroba-do-Cerrado, guabiroba-do-lisa, guabiroba-branca (SILVA et al., 2001).

A guavira é uma planta nativa do Cerrado, cerradão, campo sujo. Distribui-se amplamente pelo país nesse bioma e em fisionomias campestres de cerrado, sendo encontrada nos estados de São Paulo, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Minas Gerais, até Santa Catarina, chegando as regiões adjacentes da Argentina e Paraguai (Figura 1) (SILVA et al., 2001; DURIGAN et al, 2004; LORENZI et al., 2006; SOBRAL et al., 2014).



Figura 1. Mapa da distribuição geográfica de *Campomanesia adamantium* O. Berg no Brasil (Fonte: adaptado de SOBRAL et al., 2014).

A planta se desenvolve de forma arbustiva, variando de 0,5 a 2 metros de altura, com muitos ramos delgados essencialmente glabros. Suas folhas são simples, subcoriáceas, elípticas a obovadas, glabras quando adultas, de 3 a 10 cm de comprimento. As flores são brancas, solitárias, andróginas, e surgem entre agosto a novembro (Figura 2). Os frutos amadurecem entre novembro e dezembro, são globosos, de 2 a 2,5 cm de diâmetro, com coloração verde escura, verde clara ou amarelada, seis lóculos, com polpa amarelada. As sementes são pequenas, discoides, reniformes, pardas e recalcitrantes (SILVA et al., 2001; DURIGAN et al., 2004; LORENZI et al., 2006).



Figura 2. Aspecto geral de *Campomanesia adamantium* O. Berg com frutos, na imagem à esquerda. À direita, suas flores em detalhes. Fotos: Mercadante (2012).

Os frutos da guavira possuem um sabor ácido e levemente adocicado, com aroma cítrico agradável (VALLILO et al., 2006). São consumidos *in natura* e em sucos, sorvetes e doces caseiros, sendo utilizados também na produção de licores e vinhos (PORTO; GULIAS, 2006; CARDOSO et al., 2010). Possuem elementos nutricionais importantes, como ferro, potássio e cálcio, e altos níveis de compostos antioxidantes, em particular vitamina C e compostos fenólicos (VALLILO et al., 2006, NAVES et al., 2016). Podem ser encontrados sendo comercializados as margens de rodovias e em feiras da região do Cerrado, e possuem grande aceitação pela população (PORTO; GULIAS, 2006).

A planta também é considerada melífera, polinizada por abelhas do gênero *Bombus* e outros insetos, e ornamental, pois durante a floração perde suas folhas e reveste-se de flores

brancas (ALMEIDA et al., 2000). Seu plantio tem sido recomendado para a recuperação de áreas desmatadas ou degradadas, em parques e jardins, em áreas acidentadas para controle de erosão e em áreas de proteção ambiental (HARDT et al., 2006; PORTO; GULIAS, 2006; SCHIEVENIN et al., 2012).

Na medicina popular, a guavira é utilizada para tratar doenças do trato urinário e desarranjos intestinais (FERREIRA, 1972; PIVA, 2002). Várias pesquisas relatam suas diversas propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória (FERREIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2014), antioxidante (RAMOS et al., 2007; COUTINHO et al., 2008; COUTINHO et al., 2009; COUTINHO et al., 2010; PASCOAL et al., 2011; ESPINDOLA et al., 2016; NAVES et al., 2016), antimicrobiana (PAVAN et al., 2009; COUTINHO et al.; 2009; CARDOSO et al., 2010), antiproliferativa, apoptótica (PASCOAL et al., 2014), hepatoprotetora (FERNANDES et al., 2014), antihiperalgésica, antidepressiva (SOUZA et al., 2014), e antihiperlipidêmica (ESPINDOLA et al., 2016).

A guavira apresenta boas perspectivas de produção comercial na região do Cerrado, pois é bem aceita pela população, possui ampla densidade, frequência e distribuição no ambiente e vantagens produtivas, como a facilidade de propagação natural, grande disponibilidade de sementes, precocidade e longa extensão do período produtivo (PORTO; GULIAS, 2006). Alguns trabalhos visando a domesticação da planta já existem, mas até o momento, poucos estudos de variabilidade genética com a guavira foram publicados. A maioria dos trabalhos tem inferido a variabilidade genética a partir das variações fenotípicas avaliadas em populações por meio da biometria, e indicam a existência de variabilidade em várias características, como germinação das sementes e morfologia dos frutos (MELCHIOR et al., 2006; PELLOSO, 2011; OLIVEIRA et al., 2011; AJALLA, 2012; DRESCH et al., 2013; WESP et al., 2013; RESENDE; TEIXEIRA, 2015). Até o momento, apenas dois estudos utilizaram marcadores moleculares para analisar a diversidade genética em guavira, e ambos indicaram alta variabilidade genética nas populações estudadas (ASSIS et al., 2013; MIRANDA et al., 2016). No entanto, estes trabalhos ainda são insuficientes para compreender a variabilidade genética e estrutura das populações de guavira.

2.2 Marcadores moleculares em plantas

Marcadores moleculares são macromoléculas ou loci no DNA que apresentam polimorfismos detectáveis, e que podem ser facilmente rastreados e quantificados em um

indivíduo ou população. Os marcadores de DNA podem ser ilimitados em número e servirem para vários propósitos em plantas (GUPTA et al., 2002).

Existem muitos tipos de marcadores moleculares atualmente. Os mais amplamente utilizados são: *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP), *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSRs), microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR), e *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) (OUBORG et al., 1999; VARSHNEY et al., 2007; SEHGAL; RAINA, 2008). Esses marcadores apresentam diferenças em relação a abundância genômica, nível de polimorfismo detectado, informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e custos (BUSO et al., 2003). Embora cada marcador possua algumas vantagens e desvantagens, a escolha do marcador é determinada em grande parte pela aplicação desejada, conveniência e custo envolvido (GUPTA et al., 2002). A **Tabela 1** resume as principais características dos diferentes tipos de marcadores moleculares.

Tabela 1. Principais características dos diferentes tipos de marcadores moleculares.

Características	EST-SSRs	SSRs	RFLP	RAPD/AFLP/ISSR
Necessidade de dados de sequências	Essencial	Essencial	Não requer	Não requer
Nível de polimorfismos	Baixo	Alto	Baixo	Baixo-médio
Dominância	Codominante	Codominante	Codominante	Dominante
Transferibilidade interespecífica	Alta	Baixa-média	Média-alta	Baixa-média
Utilidade na seleção assistida por marcadores	Alta	Alta	Média	Baixa-média
Custo e esforço no desenvolvimento	Baixo	Alto	Alto	Baixo-médio

Fonte: KALIA et al (2011).

Tratando-se de plantas, os marcadores moleculares têm sido usados de diversas maneiras, não apenas para suplementar e acelerar métodos convencionais de melhoramento de culturas, mas também para a caracterização e manutenção de recursos genéticos vegetais, que são vitais para os programas de melhoramento e conservação (GUPTA et al., 2002). Dentre suas várias aplicações, inclui-se a investigação de relações genéticas entre indivíduos,

mapeamento de genes, construção de mapas de ligação, estudos da organização dos genomas, transformação genética, seleção assistida por marcadores e cruzamentos, identificação de clones, linhagens, híbridos e organismos geneticamente modificados, testes de paternidade, genética de populações e estudos filogenéticos (JAIN et al., 2002; BUSO et al., 2003; VARSHNEY et al., 2007; KALIA et al., 2011).

No estudo de genética de populações, marcadores moleculares podem ser utilizados para estimar o fluxo gênico por meio da análise da distribuição de alelos no espaço. Em amplas escalas geográficas, os estudos de populações geralmente se direcionam para as análises de parentesco e filogenética, ao invés da análise de nível de fluxo gênico. Marcadores menos variáveis são mais adequados para estes casos, como os de DNA do cloroplasto (cpDNA) ou DNA mitocondrial (mtDNA), que evoluem lentamente (OUBORG et al., 1999).

O desenvolvimento de tecnologias de marcadores de DNA aliado ao conceito de seleção assistida por marcadores fornece novas soluções para a seleção e manutenção de genótipos em programas de melhoramento genético. Marcadores moleculares ligados a características de interesse podem ser usados na seleção de populações em segregação inicial e em estágios iniciais de desenvolvimento das plantas. A seleção assistida por marcadores e identificação de marcadores ligados a características importantes podem ser usadas para piramidizar os principais genes, incluindo genes de resistência, com o objetivo final de produzir cultivares com mais caracteres desejáveis. Desse modo, o tempo gasto em programas de melhoramento pode ser reduzido (MOHAN et al., 1997).

2.3 Marcadores microssatélites

Dentre os vários tipos de marcadores moleculares, os microssatélites têm recebido importância considerável na genética de plantas e no melhoramento, sendo provado e recomendado como a melhor escolha (GUPTA; VARSHNEY, 2000; ELLIS; BURKE, 2007; PARIDA et al., 2009). Inúmeros trabalhos com marcadores microssatélites podem ser encontrados envolvendo não somente suas diversas aplicabilidades e seu desenvolvimento em diferentes espécies, mas também elucidando as características dos microssatélites nos genomas dos organismos (CHISTIYAKOV et al., 2006; WANG et al., 2009; KALIA et al., 2011).

Microssatélites, SSRs (*Simple Sequence Repeats*) ou STRs (*Simple Tandem Repeats*) são segmentos de DNA que consistem em unidades curtas de nucleotídeos repetidas em tandem, de 1-6 pares de base de comprimento, sendo encontradas em todos os genomas eucariotos

(BECKMANN; WEBER, 1992; GOLDSTEIN; SCHLOTTERER, 1999; GUPTA et al., 2002; ZANE et al., 2002). Essas unidades de repetição são repetidas normalmente de 5 a 20 vezes, com um comprimento mínimo de repetição de 12 pares de base (ELLEGREN, 2004). Plantas são ricas em repetições do tipo AT, enquanto que animais apresentam repetições de AC em maior frequência (POWELL et al., 1996). A **Figura 3** ilustra um exemplo de microssatélite detectado por sequenciamento.

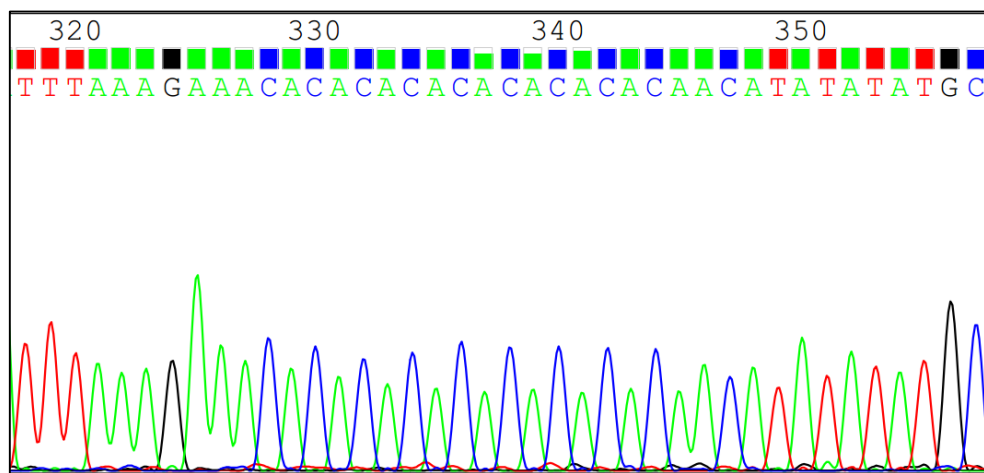


Figura 3. Exemplo de microssatélite detectado por sequenciamento. Os picos representam a detecção das bases nitrogenadas (citosina em azul, adenina em verde, timina em vermelho e guanina em preto). A repetição é dinucleotídica e se inicia na posição 327 e termina na posição 344, totalizando 9 repetições de AC. Fonte: A autora, 2016.

Os microssatélites podem ser encontrados em qualquer região do genoma, tanto em regiões codificadoras como não-codificadoras (TÓTH et al., 2000). Em eucariotos, os microssatélites são encontrados em excesso em regiões não-codificadoras, sendo relativamente raros em regiões transcritas do genoma, como genes e sequências-alvo expressas (ESTs – *Expressed Sequence Tags*), variando entre 7-10% em plantas superiores (WANG et al., 1994; VARSHNEY et al., 2002; (MORGANTE et al., 2002; LI et al., 2004).

Existem várias classificações para os microssatélites, baseadas no tamanho, tipo de unidade de repetição e localização no genoma. Dependendo do número de nucleotídeos por unidade de repetição, os SSRs têm sido classificados como mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ou hexanucleotídeos (KALIA et al., 2011). Dependendo do arranjo dos nucleotídeos nos segmentos de repetições, Weber (1990) classifica os microssatélites como perfeitos, imperfeitos e compostos, enquanto que Wang et al. (2009) usa os termos perfeitos simples, imperfeitos simples, perfeitos compostos e imperfeitos compostos. Repetições perfeitas são arranjos em

tandem de um conjunto único de repetição, enquanto que repetições imperfeitas são repetições perfeitas interrompidas por um segmento não-repetitivo em alguns sítios. Em microssatélites compostos, dois conjuntos de repetições básicos apresentam-se juntos em várias configurações. Jarne e Lagoda (1996) utilizam os termos puro e interrompido para repetições perfeitas e imperfeitas. Quanto a localização no genoma, a maioria dos microssatélites são nucleares (nuSSR), no entanto, também podem ser encontrados nos genomas mitocondriais (mtSSR) e do cloroplasto (cpSSR) (SORANZO et al., 1999; PROVAN et al., 2001; KALIA et al., 2011).

A evolução dos microssatélites, ou seja, qualquer mudança nos microssatélites que resulta em aumento ou diminuição no número de repetições, é associada com sua taxa de mutação. O surgimento de microssatélites é um processo evolucionário dinâmico e extremamente complexo (ELLEGREN, 2004; PEARSON et al., 2005). As possíveis causas do surgimento de microssatélites incluem deslizamentos no DNA de fita simples, recombinação de DNA fita-dupla (crossing over desigual e conversão de gene), não-complementariedade/reparo de quebra de fita dupla, e retrotransposição (KALIA et al. 2011).

Os microssatélites representam marcadores tipicamente neutros à seleção. No entanto, diversos estudos relatam a relevância funcional de um número significativo de SSRs (CHISTIakov et al., 2006). Os microssatélites apresentam função importante na organização da estrutura cromossomal, por estarem envolvidos na formação de uma grande variedade de estruturas incomuns de DNA (RICH et al., 1983; EPPLIN et al., 1996), e na constituição e compactação de regiões teloméricas e centroméricas dos cromossomos (CANAPA et al., 2002). Os SSRs são altamente susceptíveis a recombinação (JEFFREYS et al., 1998), sendo as repetições de dinucleotídeos os locais preferenciais para eventos de recombinação devido à alta afinidade por enzimas de recombinação (BIET et al., 1999). Além disso, diversos trabalhos demonstram que SSRs localizados em regiões promotoras e em íntrons podem influenciar a expressão de genes, possivelmente servindo como sequências-alvo de proteínas reguladoras da expressão (CHISTIakov et al., 2006).

As sequências que flanqueiam um loci específico de microssatélite em um genoma são conservadas dentro de uma espécie, entre espécies do mesmo gênero, e raramente entre gêneros relacionados. Desse modo, essas sequências flanqueadoras têm sido utilizadas para desenhar *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) para sítios específicos de microssatélites. Os marcadores microssatélites revelam polimorfismos devido a variação no número de vezes em que a repetição ocorre em um locus, causados por erros na replicação e/ou crossing-over desigual durante a meiose. Essas variações no número de repetições são detectadas em

variações no comprimento dos fragmentos amplificados por PCR e pela separação desses fragmentos na eletroforese (GOLDSTEIN; SCHLOTTERER, 1999; GUPTA et al., 2002; BUSO et al., 2003)

Desse modo, os marcadores microssatélites apresentam hipervariabilidade, natureza multialélica, herança codominante, reprodutibilidade, abundância relativa, cobertura extensa do genoma (incluindo genomas de organelas), localização específica no cromossomo, possibilidade de automação e genotipagem de alto rendimento (POWELL et al., 1996; PARIDA et al., 2009).

A obtenção de primers para amplificação de cada locus é a maior limitação do uso em larga escala desses marcadores. A construção de bibliotecas genômicas e sua triagem subsequente é trabalhosa, cara, e requer alto grau de especialização, pois envolve clonagem, sequenciamento, desenho e teste de primers e caracterização dos marcadores. No geral, apenas cerca de 10% a 20% dos primers obtidos são informativos. Porém, após a obtenção dos primers para uma espécie, as demandas de custos e mão-de-obra são reduzidas drasticamente, assim como o tempo necessário para realização das técnicas laboratoriais (GUPTA et al., 2002; BUSO et al., 2003).

Várias alternativas têm sido criadas para reduzir o tempo e custo investido no desenvolvimento dos marcadores, tais como a identificação de sequências em *amplicons* de RAPD, triagem de bancos de dados de EST sequenciados e transferibilidade de marcadores de espécies geneticamente relacionadas (ZANE et al., 2002; KALIA et al., 2011).

A transferibilidade de marcadores SSR entre táxons se baseia na homologia existente entre genomas de duas ou mais espécies/gêneros filogeneticamente próximos (ELLIS; BURKE, 2007; VARSHNEY et al., 2007). Tanto os marcadores microssatélites gênicos como os genômicos podem ser transferidos entre espécies. No entanto, o esperado é que marcadores SSR gênicos (derivados de EST) tenham maior taxa de transferência devido a conservação de regiões transcritas entre espécies relacionadas. Resultados de diversos estudos demonstram que marcadores EST-SSRs podem ser transferidos não apenas entre espécies dentro de um gênero, mas em alguns casos também entre múltiplos gêneros dentro de uma família (ELLIS, BURKE, 2007). Isso é extremamente útil em plantas que não possuem nenhuma informação de sequências, permitindo análises de diversidade genética mais robustas além das realizadas com caracteres morfológicos (KALIA et al., 2011).

Comparados aos SSRs genômicos, os EST-SSRs apresentam como vantagens a detecção de variações em porções expressas do genoma, de modo que a marcação de um gene pode resultar em associações entre marcador e característica, e a possibilidade de utilizar esses marcadores para uma gama maior de espécies relacionadas (GUPTA et al., 2003). No entanto, as sequências de DNA em regiões transcritas são mais conservadas e conseqüentemente EST-SSRs apresentam menos polimorfismos, tornando-os menos eficientes em comparação aos SSRs genômicos para distinguir genótipos mais geneticamente relacionados. Portanto, os marcadores SSRs genômicos são superiores a EST-SSRs para estudos de *fingerprinting* ou identificação de genótipos. Além disso, o desenvolvimento de marcadores EST-SSRs é restrito as espécies que possuem dados suficientes de sequenciamento disponíveis (VARSHNEY et al., 2005).

2.4 Análise de Diversidade Genética em Populações

A análise de diversidade genética mede a similaridade ou as diferenças genéticas entre e dentro das espécies, informação vital para a conservação e desenvolvimento de cultivares, caracterização de acessos em coleções de germoplasmas e estudos taxonômicos (ROMERO et al., 2009). Conceitualmente, a diversidade genética se refere a variação dos genes dentro de espécies, isto é, a recombinação de genes contida nos indivíduos. Isso abrange populações diferentes da mesma espécie ou variações genéticas dentro de uma população. Em última instância, a diversidade genética reside nas mudanças nas sequências de DNA que constituem o código genético. Novas variações genéticas são criadas por mutações e, em organismos com reprodução sexuada, são espalhadas por recombinação. A seleção age sobre a atual gama de variação genética e, conseqüentemente, facilita a evolução e melhoramento por seleção artificial. A diversidade genética permite que populações se adaptem a mudanças nas condições ambientais (VICENTE et al., 2003).

Uma população é um grupo de indivíduos da mesma espécie que existem juntos no mesmo tempo e local e que podem se reproduzir entre si. A composição genética de uma população é o conjunto de frequências de genótipos diferentes nessa população. Essas frequências são resultantes dos processos que atuam em indivíduos para aumentar ou diminuir o número de organismos de cada genótipo. Os fenômenos que relacionam os processos genéticos básicos em âmbito individual a composição genética da população incluem os efeitos

dos padrões de reprodução, migração de indivíduos entre populações, mutação, recombinação, seleção natural e deriva genética (GRIFFITHS et al. 2009, HEDRICK, 2011).

Análises de genética de populações podem fornecer dados sobre uma variedade de parâmetros evolucionários importantes, incluindo níveis de variação genética, a partição dessa variabilidade dentro e entre populações, níveis gerais de endogamia, taxas de autofecundação versus fecundação cruzada, tamanhos efetivos de populações, e a dinâmica de gargalos populacionais recentes. Além de fornecer informações evolutivas básicas, tais análises também são importantes ferramentas para desenvolver estratégias efetivas de gestão para espécies ameaçadas e/ou invasivas (HEDRICK, 2011). Devido à natureza codominante e altamente polimórfica, os marcadores microssatélites têm se tornado o marcador preferencial nas análises populacionais (ELLIS; BURKE, 2007).

Nos últimos anos, vários pacotes de softwares têm sido disponibilizados para estimar muitos dos parâmetros importantes em genética de populações (HEDRICK, 2011; MCMANUS et al., 2011). A **Tabela 2** lista alguns dos programas computacionais mais utilizados.

Tabela 2. Lista de alguns dos pacotes software mais utilizados para análises de diversidade genética de populações e tópicos relacionados.

Pacote software	Análises e testes
Arlequin	AMOVA, MSN, diversidade nucleotídica, incompatibilidade de distribuição, desequilíbrio de ligação, Hardy-Weinberg, testes de neutralidade, teste de Mantel, distancia genética par a par.
FSTAT	Diversidade de genes, estatística F, riqueza alélica, Hardy-Weinberg, intervalos de confiança, dispersão, teste de Mantel.
GDA (Genetic Data Analysis)	Desequilíbrio de ligação, Hardy-Weinberg, distancias genéticas, e estatística F hierárquicas
GENEPOP	Desequilíbrio de ligação, Hardy-Weinberg, fluxo gênico, estatística F
MEGA	Matrizes de distância par a par, razão não-sinonimo/sinônimo, testes de neutralidade, análises filogenéticas
CERVUS	Análise de frequência alélica, simulação da análise de paternidade, análise de parentesco, análise de identidade
PowerMaker	Desequilíbrio de ligação, Hardy-Weinberg, estatística F, matrizes de coancestralidade, análises filogenéticas, desenvolvido especialmente para análise de dados SSR/SNP.
STRUCTURE	Estrutura de populações.

Fonte: HEDRICK, 2011; MCMANUS et al., 2011.

2.4.1 Medidas de Diversidade Genética

A medida da variação genética mais comum é a quantidade de heterozigosidade para um gene em uma população, expressa pela frequência total de heterozigotos do gene. A heterozigosidade pode ser observada diretamente por meio da contagem dos heterozigotos ou calculada pelas frequências alélicas usando as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg (heterozigosidade esperada). O equilíbrio de Hardy-Weinberg afirma que a segregação meiótica em populações de reprodução aleatória resulta em uma distribuição de equilíbrio de genótipos após apenas uma geração, e assim mantem-se a variação genética na ausência de mecanismos evolutivos. O equilíbrio é a consequência direta da segregação de alelos na meiose em heterozigotos (GRIFFITHS et al., 2009, HEDRICK, 2011).

Outra medida da diversidade genética em populações é indicada pela endogamia. A endogamia ocorre quando indivíduos tendem a se reproduzir dentro de seu próprio grupo, ou seja, a reprodução não é aleatória com relação a espécie como um todo, e as frequências de genótipos homozigotos tendem a aumentar em relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, diferindo de grupo para grupo. A endogamia é medida pelo coeficiente de endogamia F , que é a probabilidade de que dois alelos sejam idênticos por descendência. O coeficiente pode variar de 0 a 1, sendo que 0 indica que a reprodução é aleatória, e 1 indica que todos os alelos são idênticos por descendência (FUTUYMA, 1992; GRIFFITHS et al., 2009; PIERCE, 2011).

Outros conceitos medidores de diversidade genética são a riqueza alélica, ou número de tipos distintos de alelos encontrados em uma amostra de um certo tamanho, e a uniformidade, que está relacionada a distribuição de frequências alélicas, ou seja, uma população com três alelos igualmente frequente é mais diversa que uma com um único alelo predominante e dois alelos raros (BROWN; WEIR, 1983).

2.4.2 Análises de estrutura de populações

Na maioria das espécies, as populações são frequentemente subdivididas em unidades menores devido a fatores geográficos, ecológicos e comportamentais. O nível de conectividade genética entre subpopulações pode variar dependendo primariamente da quantidade de fluxo gênico geneticamente efetivo que ocorre entre essas subpopulações ou subgrupos. Existem três níveis de estrutura de populações: organismos individuais, subpopulações e populações. Uma

população pode ter subestruturas, ou seja, diferenças na variação genética entre suas partes constitutivas, por diversas razões evolucionárias (VICENTE et al., 2003; HEDRICK, 2011).

As frequências alélicas se diferem, em muitos loci, de uma população para outra, de maneira que a variação intrapopulacional pode se transformar em variação interpopulacional (FUTUYMA, 1992). Uma abordagem geral para medir a extensão das diferenças entre grupos é a distância genética. A medida da distância genética pode consolidar a grande quantidade de dados de vários loci e populações em proporções manejáveis e ajudar na visualização das relações gerais entre populações. Uma distância genética igual a zero é equivalente a nenhuma diferença entre grupos e a medida aumenta de acordo com a quantidade de diferenças entre os grupos (HEDRICK, 2011).

A estimativa de fluxo gênico é de difícil realização na maioria dos casos. Estimativas diretas da quantidade de fluxo gênico podem ser obtidas em organismos quando diferentes indivíduos podem ser identificados. Medidas indiretas usando marcadores genéticos são muito úteis e utilizam técnicas para avaliar a estrutura da população, tais como a estatística F (HEDRICK, 2011). Em escalas espaciais dentro ou entre populações, a presença ou ausência de estrutura na distribuição de um marcador altamente variável como os microssatélites pode possibilitar a introspecção sobre a quantidade de fluxo gênico. Em grandes escalas geográficas, os mesmos marcadores podem revelar um conjunto de alelos em uma população e outro conjunto não-sobreposto em outra população distante, indicando que essas populações são completamente diferenciadas (OUBORG et al., 1999).

A estatística F, desenvolvida por Wright (1949, 1965), é uma abordagem que particiona a variação genética em uma população subdividida e fornece uma descrição óbvia da diferenciação, e é muito utilizada porque permite a inferência de vários parâmetros populacionais (HEDRICK, 2011; JARNE; LAGODA, 1996). A estatística F consiste em três coeficientes F diferentes usados para alocar a variabilidade genética ao nível total da população (T), subpopulações (S), e indivíduos (I). Esses três coeficientes F_{ST} , F_{IT} e F_{IS} , são inter-relacionados de modo que F_{ST} é uma medida de diferenciação genética entre subpopulações e é sempre positiva. F_{IS} e F_{IT} são medidas dos desvios das proporções de Hardy-Weinberg dentro das subpopulações e na população total, respectivamente, onde valores positivos indicam uma deficiência de heterozigotos e valores negativos indicam excesso de heterozigotos (HEDRICK, 2011).

Abordagens que agrupam indivíduos em grupos baseados nos seus genótipos, evitando o potencial problema de predefinir as populações, têm se tornado populares. A mais utilizada é o software de agrupamento Bayesiano disponível pelo STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000). No geral, o STRUCTURE realiza a atribuição probabilística dos indivíduos baseada nos seus genótipos multilocus, para um a K diferentes grupos, onde o K ótimo é inicialmente desconhecido. Análises recentes utilizando o STRUCTURE frequentemente analisam vários marcadores SNP ou microssatélites, e um grande número de indivíduos, que são frequentemente agrupados em um número de grupos diferentes. Para ilustrar as descobertas desses estudos, diferentes cores são usadas para representar a ancestralidade de diferentes grupos para cada indivíduo (HEDRICK, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Amostras de folhas jovens foram coletadas de 167 plantas identificadas como *C. adamantium* localizados em cinco populações no Cerrado. Desse total, 33 indivíduos eram provenientes de uma mesma população de Bonito-MS (21°09'02.1'' S, 56°28'12.8'' O), 35 indivíduos eram de Jardim-MS (21°25'43.5'' S, 56°13'29.8'' O), 35 indivíduos de Cerro Corá-PY (22°39'44.2'' S, 56°01'52.6'' O), 35 de Ponta Porã-MS (22°42'44.4'' S, 55°38'31.6'' O) e 29 indivíduos de Dourados-MS (22°08'16.3'' S, 55°08'24.2'' O). Em cada local, a coordenada geográfica foi marcada em um ponto central, a partir de onde foram determinados quatro quadrantes no espaço, e em cada quadrante foram coletadas amostras de cerca de 10 plantas. A **Figura 4** indica as localizações geográficas das populações. As amostras foram maceradas em N₂ líquido e armazenadas a -20°C no freezer no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal (FCA/UFGD).

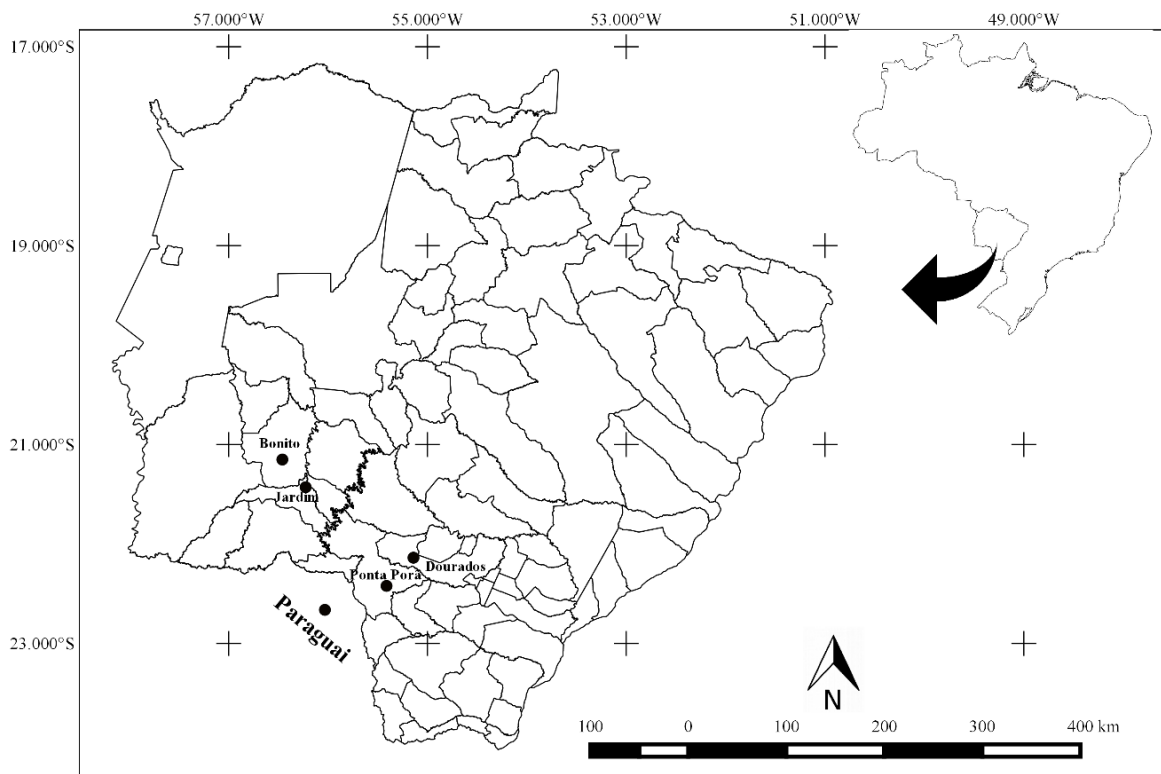


Figura 4. Mapa das localizações geográficas das populações de guavira coletadas.

3.2 Extração de DNA do tecido foliar

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados

A extração de DNA total das folhas foi realizada utilizando o método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações. Para isso, as folhas foram higienizadas com solução de hipoclorito de sódio a 2%, enxaguadas com água destilada, secas, e em seguida maceradas com N₂ líquido. Para cada indivíduo coletado, utilizaram-se cerca de 200 mg do tecido foliar macerado, ao qual foram adicionados 800 µL de tampão de extração (CTAB 3% (p/v), Tris-HCl 100 mM; NaCl 2M, EDTA 25 mM, 5% PVP) e 16 µL de β-mercaptoetanol. Em seguida, incubou-se em banho-maria a 65°C por 30 minutos, agitando-se a cada 10 minutos e depois deixando-se resfriar à temperatura ambiente. Adicionaram-se então 600 µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), agitou-se por inversão por 5 minutos e centrifugou-se a 13000 rpm por 6 minutos. Em seguida, a fase aquosa superior foi transferida para novo microtubo, adicionando-se 600 µL de isopropanol. As amostras foram agitadas por inversão e incubadas a -20°C de um dia para o outro. No dia seguinte, centrifugou-se por 12 minutos a 12000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. Realizou-se a lavagem do precipitado com 500 µL de etanol 70% por 2 vezes e etanol 95% por 1 vez, realizando-se a centrifugação por 3 minutos a cada lavagem. Deixou-se secar por 15 minutos e ressuspendeu-se o precipitado em 50 µL de tampão TE pH 8,7 [10 mM Tris - HCl (1 M) pH 7,61 e 1 mM EDTA (0,1 M)] com RNase (Fermentas®). As amostras foram incubadas em banho-maria por 1 h a 37°C e em seguida armazenadas a -20°C.

Para a avaliação da qualidade do DNA extraído, realizou-se a eletroforese das amostras em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Para obtenção da concentração e pureza do DNA, a quantificação foi realizada em nanofotômetro DS-11® (Denovix).

3.3 Marcadores Microsatélites

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Genética & Biodiversidade do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (Goiânia-GO).

Foram utilizados sete marcadores microsatélites de *Eucalyptus spp.* derivados de EST (*Expressed Sequence Tags*) desenhados por Grattapaglia et al. (2015) e validados em *C.*

adamantium por Miranda et al. (2016). Os loci de microssatélites utilizados, tipo de repetição, sequência dos primers (oligonucleotídeos iniciadores) e outros detalhes de amplificação por PCR (Reação em cadeia pela polimerase) encontram-se na **Tabela 3**.

Tabela 3. Marcadores microssatélites utilizados e detalhes de amplificação por PCR.

Locus	Repetição	Sequências dos Primers	TA	MF	GA
Embra 1076	(AGG) ₄	F-5'-GCTGAACCTGATGGACCAGT-3' R-5'-CTTAGGGACCACCACCTTGA-3'	56	HEX	313/331
Embra 1335	(GTT) ₅	F-5'-TTGCTCCCATGATTACTCCC-3' R-5'-GTCTTCATCCTGGCAAGAGC-3'	56	HEX	314/338
Embra 1363	(GCC) ₁₅	F-5'-CCATAGCCCTCTGCTGATTC-3' R-5'-AATGGAAAATGGGTTCCCTCC-3'	58	HEX	304/322
Embra 1364	(CTCC) ₁₅	F-5'-CGTTTTTCGCTCCTCTCTCTC-3' R-5'-TGTAGAGATCGGGGTCCTTG-3'	59	FAM	305/345
Embra 1374	(CGCCGT) ₂₆	F-5'-GTCTGAACTCGGCTTCCTTG-3' R-5'-TTCTTCCCGTTGTAATCCG-3'	55	FAM	354/384
Embra 1470	(AG) ₁₀	F-5'-GCCAACCCTCTAAAAGACC-3' R-5'-CAACTGCTACGACGTCCAAA-3'	56	FAM	321/325
Embra 1811	(CTCCTG) ₂₆	F-5'-GTCGAGTTGAGTTCGCTTCC-3' R-5'-AGTGAATCGGGAGAGGAGGT-3'	62	NED	199/203

TA = Temperatura de anelamento (°C); MF = marcador de fluorescência do primer; GA = gama esperada do tamanho dos alelos (pb). Fonte: adaptado de Miranda et al. (2016).

A PCR foi realizada em volume final de 10 µL para cada amostra, contendo 7,5 ng de DNA, 0,22 µM de primers (*foward+reverse*), 0,23 µM dNTPs, 3,25 mg de albumina sérica bovina (25 mg/mL), tampão de reação 1X (Tris HCl 10 mM, pH 8,3 e MgCl₂), e 1 U de Taq DNA polimerase. A PCR consistiu em uma etapa inicial de 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 55° a 62°C por 1 min (dependendo do primer) e 72°C por 1 min, e por fim extensão final a 72°C por 45 min. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado utilizando o sequenciador automático ABI-3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). A discriminação dos alelos foi realizada no programa GeneMapper 5.0 (*Applied Biosystems*) (MIRANDA et al., 2016).

3.4 Análises Populacionais

A frequência alélica foi estimada por contagem direta e os parâmetros de diversidade dos loci foram estimados para todos os microssatélites em todas as populações utilizando o

programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007). Os parâmetros foram: heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e o equilíbrio de Hardy–Weinberg (HWE).

Para calcular a riqueza alélica (RA) e as estimativas das estatísticas F de Wright (F_{IT} , F_{IS} e F_{ST}) foi utilizado o programa FSTAT. O valor de P foi ajustado pelo procedimento de Bonferroni (GOUDET, 2002) utilizando o mesmo pacote estatístico. As estruturas populacionais foram avaliadas pelo método de análise da variância molecular (AMOVA) implementado no programa ARLEQUIN (SCHNEIDER et al., 2000).

O dendrograma foi construído por meio da análise de agrupamento (cluster) UPGMA com o programa Sliptree baseado em cálculos de distâncias genéticas de Reynolds (F_{ST}) por meio do FSTAT.

Os indivíduos foram agrupados em um determinado número de populações e assinalados probabilisticamente a grupos inferidos pela metodologia Bayesiana implementada no programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000) com base na frequência alélica dos 7 loci microssatélites. Os testes foram realizados pelo modelo de miscigenação (admixture model) onde as frequências alélicas foram correlacionadas. Para escolher o número apropriado de populações inferidas, foram realizadas várias análises com k (número de populações inferidas) variando de 2 a 7 e 300.000 interações (período “burn-in” de 3000), com três repetições independentes para cada uma das análises. Os valores reais de K foram inferidos a partir da magnitude de ΔK dada em função de K, com o auxílio do programa Structure Harvester (EARL; VONHOLDT et al., 2012) seguindo o modelo proposto por Evanno et al. (2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diversidade Genética

No total, a genotipagem dos 167 indivíduos de *C. adamantium* detectou 61 alelos e o tamanho dos fragmentos variou de 197 a 396 pares de base nos sete loci analisados. Todos os loci foram polimórficos, apresentando média de nove alelos por locus. O locus Embra1076 foi o que apresentou o menor número de polimorfismos (3 alelos), e o locus Embra 1364 foi o que apresentou o maior número de polimorfismos (20 alelos). O PIC médio (Conteúdo de Informação Polimórfica) foi 0,594, considerado muito informativo para as análises populacionais (MCMANUS et al., 2011). Foi constatado pelo programa CERVUS que alguns alelos foram detectados apenas uma vez, indicando que possivelmente algumas populações possuem alelos privados.

O número de alelos obtidos para os sete loci foi maior que o número obtido por Miranda et al (2016), que obteve em média 7 alelos por locus para a mesma espécie. Isso poderia ser explicado por vários fatores, como por exemplo a diferença no número amostral entre os dois experimentos, visto que Miranda et al. (2016) testaram os marcadores em apenas duas populações do estado de Goiás com cerca de 40 indivíduos no total, pelo maior número de marcadores utilizados (12), ou ainda, por possíveis diferenças genéticas das populações.

Os parâmetros genéticos analisados para a caracterização da variabilidade genética das cinco populações de *C. adamantium*, com base nos sete marcadores microssatélites, foram demonstrados na **Tabela 4**. A população de Bonito apresentou o maior número médio de alelos (6,14) e maior riqueza alélica (5,83), enquanto que a população de Dourados apresentou o menor número de alelos (5,14) e menor riqueza alélica (4,96). Os valores de heterozigosidade observada (H_O) foram altos e similares aos valores de heterozigosidade esperada (H_E) para todas as populações. A maior diversidade genética encontrada foi em Jardim (0,730) e Bonito (0,727), e a menor em Dourados (0,593). Pode-se observar que a variação entre as populações foi pequena para esses parâmetros.

Tabela 4. Estimativas de variabilidade genética para as cinco populações de guavira com base em sete marcadores microsatélites

População	NA	H_E	H_O	RA	F_{IS}	HWE
Bonito	6,14 ± 3,18	0,634 ± 0,078	0,727 ± 0,029	5,83	-0,148	2
Jardim	6,00 ± 3,21	0,642 ± 0,075	0,730 ± 0,029	5,66	-0,14	1
Cerro Corá	5,86 ± 4,38	0,623 ± 0,077	0,613 ± 0,031	5,64	0,017	4
Ponta Porã	5,86 ± 4,06	0,613 ± 0,077	0,611 ± 0,031	5,43	0,004	2
Dourados	5,14 ± 2,73	0,593 ± 0,085	0,609 ± 0,034	4,96	-0,028	4

NA = número médio de alelos; H_E = heterozigosidade esperada; H_O = heterozigosidade observada; RA = riqueza alélica; F_{IS} = coeficiente de endogamia; HWE = número de loci em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As populações de Bonito e Jardim apresentaram os maiores valores possivelmente devido à maior disponibilidade de arredores cobertos de vegetação e menor presença de áreas agrícolas vizinhas, em comparação com a população de Dourados. A população de Dourados apresentou os menores valores de riqueza alélica e número de alelos por locus. Este fato pode ser explicado pela perda de alelos devido à deriva genética causada pela ação antrópica, pois a população se localiza em região circunvizinhada por áreas agrícolas. Outra explicação estaria relacionada a distância geográfica entre as populações que afeta diretamente o fluxo gênico, ocorrendo o chamado isolamento por distância (HEDRICK, 2011).

A alta variabilidade genética em *C. adamantium* também foi revelada em outros estudos. Miranda et al. (2016) também observaram diversidade genética alta em duas populações de Goiás (H_O=0,504); porém, menor em comparação com as deste trabalho. Nesse caso, essa diferença pode novamente ser causada pelos fatores citados anteriormente. A elevada diversidade genética de guavira também foi detectada por Assis et al. (2013), que verificaram altos índices de polimorfismos em populações de Goiás por meio de marcadores RAPD. Além disso, os resultados de alta variabilidade genética encontrados por meio de marcadores moleculares vem a corroborar com a alta variabilidade fenotípica encontrada na guavira em trabalhos que utilizaram biometria (MELCHIOR et al., 2006; PELLOSO, 2011; OLIVEIRA et al., 2011; AJALLA, 2012; DRESCH et al., 2013; RESENDE; TEIXEIRA, 2015). Segundo Hamrick et al. (1979), elevados níveis de variação genética são esperados em espécies de ampla distribuição, altos níveis de reprodução cruzada e fecundidade, sistemas de polinização por vento, longos tempos de geração, e que ocorram em habitats que representam antigos estágios de sucessão. A guavira apresenta a maioria dessas características, com exceção da sua polinização que é realizada por insetos e seu tempo de geração não é longo.

Os índices de endogamia (F_{IS}) foram baixos em todas as populações, e algumas populações apresentaram índices negativos (**Tabela 4**). Esse baixo nível de endogamia é esperado para a espécie, que se reproduz por polinização cruzada, realizada principalmente por abelhas (ALMEIDA et al., 2000). Além disso, as flores da *C. adamantium* possuem o estigma em posição central e mais elevado que as anteras, o que evita a autofecundação (LANDRUM, 1986; SOUZA et al., 2015).

O F_{IS} é uma medida dos desvios das proporções de Hardy-Weinberg dentro das subpopulações, onde valores positivos indicam uma deficiência de heterozigotos e valores negativos indicam excesso de heterozigotos (HEDRICK, 2011). Os valores negativos de F_{IS} para as populações de Dourados, Bonito e Jardim revelam que há mais indivíduos heterozigotos do que o esperado, o que pode ser confirmado pelos valores de H_O e H_E , sendo as diferenças maiores para Bonito e Jardim ($F_{IS} = -0.14$) (**Tabela 4**). Os valores negativos podem indicar um recente aumento na heterozigosidade, o que pode acontecer nas primeiras gerações de populações que realizaram cruzamentos interpopulacionais recentes. O excesso de heterozigotos poderia significar que a sobrevivência destes é maior que a dos homozigotos (FUTUYMA, 1992). No geral, heterozigotos em espécies de polinização cruzada tem efeitos mais favoráveis. A reprodução cruzada contribui para o aumento de heterozigotos, enquanto que a endogamia leva a perda de vigor pois aumenta a proporção de homozigotos, de modo a permitir que alelos recessivos raros e prejudiciais se tornem expressivos (VICENTE et al., 2003; HEDRICK, 2011; PIERCE, 2011). A população de Cerro Corá, que apresentou o maior valor de F_{IS} , situa-se no Parque Nacional do Cerro Corá, que constitui uma reserva ambiental, e, portanto, encontra-se mais conservada e não vem sofrendo ações antrópicas, sendo mais sujeita à endogamia pelas próprias condições.

A maioria dos loci foram detectados fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O locus que se apresentou em equilíbrio em todas as cinco populações foi o Embra 1076. Além deste locus, também estavam em equilíbrio o locus Embra 1374 na população de Bonito; os loci Embra 1470, Embra 1364 e Embra 1811 na população de Cerro Corá; o locus 1811 na população de Ponta Porã; e os loci Embra 1335, Embra 1363 e Embra 1374 na população de Dourados. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ser causados por diversos fatores, tais como reprodução direcionada, subdivisões dentro das populações, seleção, mutação, migração/fluxo de genes de uma população externa, amostragem incorreta, e presença de alelos nulos não detectáveis experimentalmente (PIERCE, 2011; MCMANUS et al., 2011). A lei de Hardy-Weinberg não requer reprodução aleatória e ausência de seleção, migração e mutação para todas

as características/loci, ela aplica-se apenas para o locus considerado, portanto, uma população pode estar em equilíbrio para um locus, mas não para os outros. Uma população não pode evoluir se ela atende aos requisitos da lei, pois a evolução consiste em mudança nas frequências alélicas; e loci em equilíbrio significa apenas que nenhum mecanismo evolutivo agiu neles desde a última vez que ocorreu reprodução aleatória (FUTUYMA, 1992; PIERCE, 2011).

Visto que as populações apresentaram baixo nível de endogamia, os desvios do equilíbrio podem estar sendo causados por fluxos de genes de outras populações próximas, o que também contribui para a alta diversidade genética. A guavira é encontrada em abundância no Cerrado, e, portanto, populações podem ser encontradas muito próximas, o que facilita o fluxo gênico na espécie, facilitado pela polinização por insetos e dispersão de sementes por aves e mamíferos. A alta heterozigosidade encontrada em todas as populações pode estar relacionada ao maior vigor dos heterozigotos, conferindo maior adaptabilidade às condições ambientais do Cerrado.

4.2 Estrutura populacional

A análise de estrutura genética das populações por AMOVA (**Tabela 5**) revelou que as populações possuem baixa estrutura genética. Um baixo grau de diferenciação entre as populações ($F_{ST} = 0,028$) foi detectado, sendo a variação genética de apenas 2,88%. O coeficiente F_{ST} indica o grau de diferenciação gênica entre populações em termos de frequências alélicas (FUTUYMA, 1992; VICENTE et al., 2003). O baixo valor significa que as populações têm frequências de alelos similares. Isso reforça a pequena diferença encontrada entre as populações nos valores de diversidade genética. A variação intrapopulacional revelou um valor negativo (-14,26), que significa excesso de heterozigotos na população total (HEDRICK, 2011).

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) interpopulacional e intrapopulacional das cinco populações de guavira.

Fonte de variação	G. L.	Varição (%)	FI
Interpopulacional	4	2,88	$F_{ST} = 0,02878^*$
Intrapopulacional	162	-14,26	

G.L. = grau de liberdade; FI = índice de fixação. * $P < 0,001$.

O F_{ST} está correlacionado ao fluxo gênico entre populações (JARNES; LAGODA, 1996). Quando a quantidade de fluxo gênico é alta, o fluxo gênico tem o efeito de homogeneizar a variação genética entre as populações, causando pouca diferenciação genética interpopulacional. Quando o fluxo gênico é baixo, a deriva genética, seleção e até mesmo mutação nos grupos separados pode levar a diferenciação genética (FUTUYMA, 1992; HEDRICK, 2011). Assim, pode se constatar que o fluxo gênico e reprodução cruzada aleatória contribuíram para a elevada diversidade genética em guavira e a baixa diferenciação entre as populações.

A matriz de diferenciação genética entre populações, baseada no índice F_{ST} (**Tabela 6**), revelou que a maior taxa de diferenciação genética foi entre as populações de Dourados e Bonito (0,0604), e que as populações mais similares foram as de Bonito e Jardim (0,00676).

Tabela 6. Estimativa par a par da diferenciação genética entre as cinco populações de guavira.

	Bonito	Jardim	Cerro Corá	Ponta Porã	Dourados
Bonito	0	-	-	-	-
Jardim	0,00676	0	-	-	-
Cerro Corá	0,03593	0,01373	0	-	-
Ponta Porã	0,05080	0,02355	0,01248	0	-
Dourados	0,06040	0,02595	0,02824	0,01043	0

O dendograma da **Figura 5** também mostra a proximidade genética entre as populações de Bonito e Jardim, que juntamente apresentam a maior distância genética das outras populações. As populações de Dourados e Ponta Porã também foram agrupadas por apresentarem baixa diferenciação genética, sendo a de Cerro Corá alocada próxima a elas.

De modo geral, quanto mais distantes estão as populações, mais diferentes elas são em frequências alélicas (FUTUYMA, 1992). Assim, ambos resultados de proximidade genética podem ser correlacionados às reais proximidades geográficas das populações, visto que as populações de Bonito e Jardim estão mais próximas entre si (39 km), enquanto que as populações de Dourados e Bonito estão mais distantes (175 km). Apesar das populações de Cerro Corá e Ponta Porã estarem mais próximas entre si (48km) do que Ponta Porã e Dourados (78km), estas últimas foram agrupadas e consideradas mais similares. Possivelmente, isso se deve pelo fato de que a população de Cerro Corá se encontra em região mais conservada,

enquanto que as populações de Dourados e Ponta Porã se encontram circunvizinhadas por terras agrícolas, sofrendo a pressão antrópica.

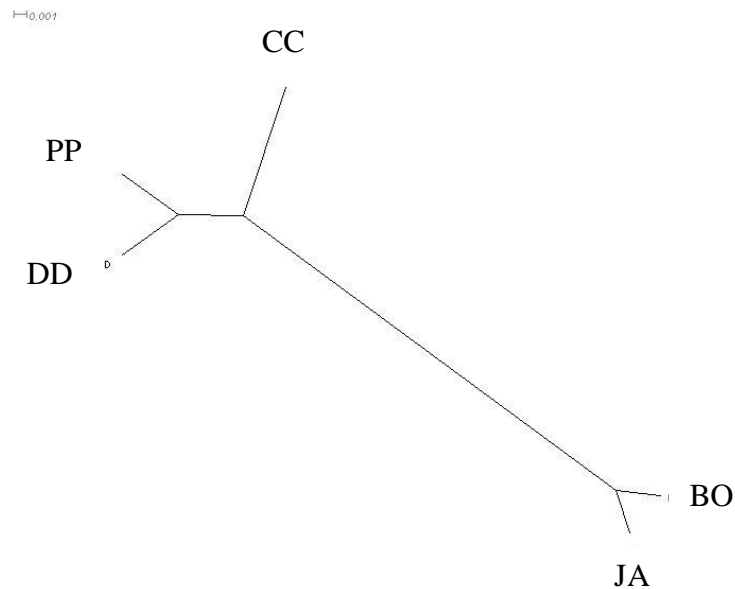


Figura 5. Dendrograma Neighbor-Net baseado na distância de Reynold (F_{ST}) de sete loci microssatélites. O gráfico apresenta as relações de proximidade gênica entre as cinco populações de *C. adamantium* estudadas. BO = Bonito, JA = Jardim, DD = Dourados, CC = Cerro Corá, PP = Ponta Porã.

As proporções de cada população atribuídas aos cinco grupos inferidos pelo programa Structure estão descritos na **Tabela 7**. Todas populações foram alocadas dentro dos grupos de maneira muito uniforme, com índices de alocação inferiores a 0,5. Isso indica pouca diferenciação genética entre as populações, que possuem um grande número de alelos em comum.

Tabela 7. Número de indivíduos (N) por população e proporção de associação de cada população de *C. adamantium* em cada um dos cinco grupos inferidos pelo programa Structure.

População	N	Grupos Inferidos				
		1	2	3	4	5
Bonito	33	0,106	0,223	0,045	0,494	0,133
Jardim	35	0,14	0,339	0,138	0,201	0,182
Cerro Corá	35	0,232	0,187	0,215	0,1	0,266
Ponta Porã	35	0,206	0,189	0,185	0,095	0,325
Dourados	29	0,077	0,126	0,406	0,047	0,344

A baixa variação interpopulacional também pode ser observada na **Figura 6**, que representa a estrutura das populações em forma de diagrama. O agrupamento de $K = 5$ corresponde ao K real, de acordo com Evanno et al. (2005), onde complexos padrões de miscigenação podem ser observados em todas as populações. A formação de grupos não é clara, evidenciando a alta diversidade genética dentro das populações.

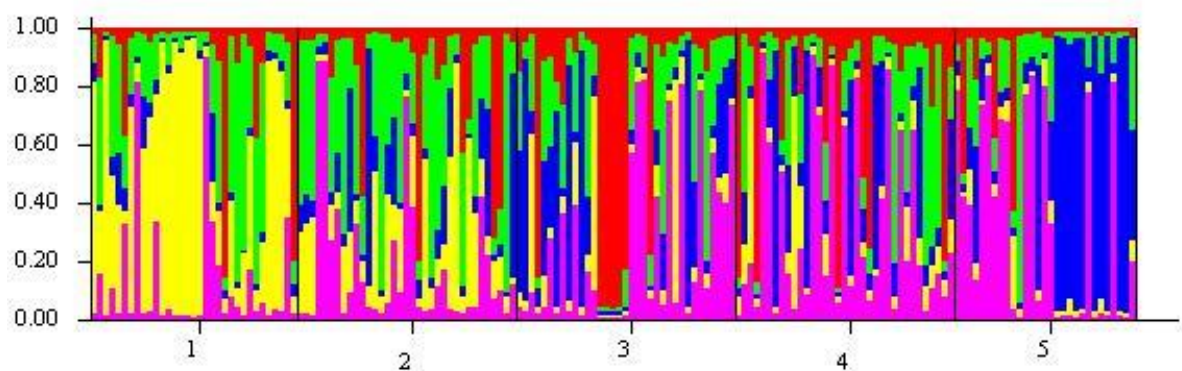


Figura 6. Grupamento de 167 acessos de cinco populações de *C. adamantium*, analisados pelo programa STRUCTURE utilizando o método Bayesiano com $K=5$. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical dividida em cores, baseado na semelhança genotípica em relação às populações inferidas pelo programa. 1 = Bonito, 2 = Jardim, 3= Cerro Corá, 4= Ponta Porã, 5=Dourados.

Realizando novo grupamento considerando $K=3$, é possível visualizar melhor a diferenciação de grupos (**Figura 7**). Ainda que o compartilhamento de alelos seja aparente entre as populações, as populações de Bonito e Jardim formam um grupo de indivíduos mais similares geneticamente, e as populações de Cerro Corá e Ponta Porã formam um segundo grupo, sendo que Dourados aparenta ser uma transição do segundo grupo para outro grupo, sendo mais divergente do primeiro. A partir disso, no entanto, não é possível dizer que os grupos formados constituem populações distintas, pois suas constituições genéticas não são únicas. Possivelmente, isso se deve à elevada taxa de fluxo gênico por pólen e sementes dentro e entre as populações, condicionada pela alta densidade e arranjo espacial contínuo da espécie (MARTINS, 1987). Se os mesmos marcadores fossem usados para o estudo de populações de guavira em maiores escalas geográficas, um conjunto de alelos em uma população e outro conjunto não-sobreposto em outra população distante poderiam ser revelados, indicando populações completamente diferenciadas (OUBORG et al., 1999).

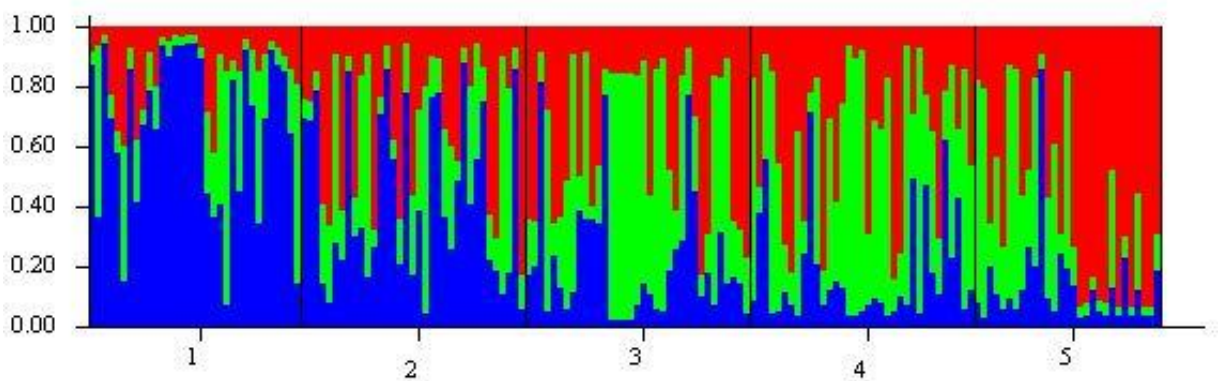


Figura 7. Grupamento de 167 acessos de cinco populações de *C. adamantium*, analisados pelo programa STRUCTURE utilizando o método Bayesiano, com $K=3$. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical dividida em cores, baseado na semelhança genotípica em relação às populações inferidas pelo programa. 1 = Bonito, 2 = Jardim, 3= Cerro Corá, 4= Ponta Porã, 5=Dourados.

De acordo com Hedrick (2011), populações estão distribuídas no espaço em um padrão relacionado a distribuição de habitats adequados, e o fluxo gênico entre elas é dependente da distância entre elas. A subestrutura pode não ser óbvia, mas se há fluxo gênico dependente da distância, então os padrões esperados de variação genética podem ser no geral similar aos modelos *stepping stone* ou isolamento por distância. No modelo *stepping-stone*, cada população recebe migrantes somente de populações vizinhas, e no modelo de isolamento por distância, o fluxo gênico ocorre localmente entre os vizinhos, em uma população de distribuição contínua (FUTUYMA, 1992). Nesses modelos, espera-se uma variação genética clinal, ou seja, uma mudança gradual na frequência de alelos de acordo com a distância geográfica (HEDRICK, 2011). Considerando que a variabilidade genética entre as populações de *C. adamantium* estudadas demonstra um padrão de diferenciação aparentemente correlacionado com a distância geográfica, possivelmente estes são os modelos de fluxo gênico que correspondem a diferenças da estrutura da população. A ampla densidade, frequência e distribuição no ambiente da espécie também são características que suportam esses modelos de fluxo gênico (AGOSTINI-COSTA et al., 2006).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, ocupando 21% do território (BOULARG, 2002). É considerado um dos *hotspots* de biodiversidade do mundo (MYERS et al., 2000), possuindo um número de espécies de plantas vasculares superior ao encontrado na

maioria das regiões do mundo, com cerca de 50% de espécies endêmicas (MENDONÇA et al., 1998; DURIGAN et al., 2004). No entanto, esse bioma vem sofrendo transformações contínuas devido ao desmatamento ou ação humana, principalmente pela expansão agrícola, o que tem levado a grandes danos ambientais, incluindo a fragmentação de habitats, extinção da biodiversidade e degradação de ecossistemas (DURIGAN et al., 2004; KLINK; MACHADO, 2005).

Visto a elevada diversidade genética encontrada nas populações de guavira neste e em outros trabalhos, torna-se de grande importância a conservação *in situ* dessa espécie e do Cerrado, além da coleta e manutenção de bancos de germoplasma. As populações estudadas apresentam-se de elevado valor para a conservação, visto que a diversidade genética é de extrema importância para a sobrevivência da espécie, sobretudo nas condições ambientais do Cerrado. Destaca-se também a necessidade da conservação das populações devido a possível existência de alelos exclusivos.

O conhecimento de como a variação genética está dividida nas populações pode ter implicações importantes na biologia evolutiva, ecológica e na conservação da espécie. Como foi observada a existência de baixa diferenciação interpopulacional e padrões de fluxo gênico relacionados com a distância geográfica, pode-se inferir a presença de iguais mecanismos de manejo para a conservação das populações estudadas e a importância de evitar a fragmentação e isolamento de populações. A rápida fragmentação do Cerrado poderá afetar a dinâmica das populações e poderá resultar em perdas de alelos.

A variabilidade genética também é essencial para o melhoramento genético de plantas. O estudo da diversidade genética é uma etapa indispensável, principalmente para espécies em fase inicial de domesticação, como a *C. adamantium*, pois serve de base para a seleção de genótipos superiores. A alta variabilidade fenotípica reportada em outras pesquisas pode estar correlacionada a alta variabilidade genética revelada em nível molecular neste trabalho. Assim, estudos de correlação entre características fenotípicas de interesse e variações genéticas detectadas por marcadores moleculares podem ser realizados para auxiliar na seleção de genótipos superiores. Além disso, as populações investigadas neste trabalho constituem reservas úteis de variabilidade para programas de melhoramento da guavira.

6. CONCLUSÃO

As análises com os sete marcadores microsatélites derivados de EST transferidos de *Eucalyptus* possibilitaram estimar parâmetros de diversidade genética nas cinco populações de *C. adamantium* e investigar o nível de diferenciação genética entre elas, de modo os resultados obtidos confirmaram a hipótese H1.

A diversidade genética foi alta em todas as populações, e estas apresentaram baixo nível de diferenciação entre si devido ao compartilhamento de alelos, sendo que populações geograficamente mais próximas foram mais similares geneticamente. Isso indica ocorrência de elevado fluxo gênico possivelmente por padrões *stepping stone* ou isolamento por distância, suportados pela ampla distribuição, densidade e frequência da espécie e seus padrões de dispersão estáveis por polinizadores e animais.

Assim, tem-se a importância da conservação e coleta de germoplasma de populações de guavira visando evitar a perda da sua elevada diversidade genética, que além de ser de extrema importância para sua sobrevivência, pode servir de fonte para seleção de genótipos superiores para o melhoramento genético dessa espécie promissora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Espécies de maior relevância para a região Centro-Oeste. In: VIEIRA, RF et al. **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 12-25, 2006.
- AJALLA, A. C. A. **Desenvolvimento e produtividade da *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg proveniente de mudas submetidas a diferentes substratos e níveis de sombreamento**. 2012. 46f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2012.
- ALMEIDA, M. J. O. F.; NAVES, R. V.; XIMENES, P. A. Influência das abelhas (*Apis mellífera*) na polinização da Gabiroba (*Campomanesia spp.*). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 30, n. 2, p. 25-28, 2000.
- ASSIS, E. S. et al. Genetic diversity of gabiroba based on random amplified polymorphic DNA markers and morphological characteristics. **Genetics & Molecular Research**, v. 12, p. 3500-3509, 2013.
- BECKMANN, J. S.; WEBER, J. L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, v. 12, n. 4, p. 627-631, 1992.
- BIET, E.; SUN, J. S.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 2, p. 596-600, 1999.
- BORLAUG, N. E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, n. 2, p. 221-228, 2002.
- BRONDANI, R. P. V. et al. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 5-6, p. 816-827, 1998.
- BROWN, ANTHONY HD; WEIR, BRUCE S. Measuring genetic variability in plant populations. **Isozymes in plant genetics and breeding, part A**, p. 219-239, 1983.
- BUSO, G. S. C. et al. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 46, 2003.
- CANAPA, A. et al. A centromeric satellite DNA may be involved in heterochromatin compactness in gobiid fishes. **Chromosome Research**, v. 10, n. 4, p. 297-304, 2002.
- CARDOSO, C. A. L. et al. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 5, p. 1273-1276, 2010.

- CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1, p. 1-29, 2006.
- COUTINHO, I. D. et al. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Ecletica química**, v. 33, n. 4, p. 53-60, 2008.
- COUTINHO, I. D. et al. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 767-776, 2009.
- COUTINHO, I. D. et al. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 322-327, 2010.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, n.1, p.11-15, 1987
- DRESCH, D. M. et al. Germination and vigor of *Campomanesia adamantium* seeds according to fruit and seed size. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 3, p. 262-271, 2013.
- DURIGAN, G. et al. **Plantas do cerrado paulista: Imagens de uma paisagem ameaçada**. São Paulo: Páginas & Letras, 2004. 475 p
- EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetic Resources**, v.4, p.359–361, 2012.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature reviews genetics**, v. 5, n. 6, p. 435-445, 2004.
- ELLIS, J. R.; BURKE, J. M. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. **Heredity**, v. 99, n. 2, p. 125-132, 2007.
- EPPLEN, J. T.; KYAS, A.; MÄUELER, W. Genomic simple repetitive DNAs are targets for differential binding of nuclear proteins. **FEBS letters**, v. 389, n. 1, p. 92-95, 1996.
- ESPINDOLA, P. P. T. et al. Antioxidant and Antihyperlipidemic Effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg Root. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p.2611–2620, 2005.
- FERNANDES, T. et al. *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) fruits protect HEPG2 cells against carbon tetrachloride-induced toxicity. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 184-193, 2014.
- FERREIRA, L. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 100-108, 2013.

FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis nativos do D.F.: gabiobas, pitangas e araçás. **Cerrado**, Brasília, v. 4 n. 18, p. 11-16, 1972.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Trad. de M. de Vivo e coord. De F.M. Sene. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq.(Texto original publicado em 1986), 1992. 646p.

GOLDSTEIN, D. B. Schlötterer et al. **Microsatellites: evolution and applications**. 1999.

GOUDET, J. **FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices** (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution. 2002. Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>

GRATTAPAGLIA, D. et al. A novel genome-wide microsatellite resource for species of *Eucalyptus* with linkage-to-physical correspondence on the reference genome sequence. **Molecular ecology resources**, v. 15, n. 2, p. 437-448, 2015.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução a Genética**. 9 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2009. 712p.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v. 113, n. 3, p. 163-185, 2000.

GUPTA, P. K. et al. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. **Molecular genetics and genomics**, v. 270, n. 4, p. 315-323, 2003.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K.; PRASAD, M. Molecular markers: principles and methodology. In: **Molecular techniques in crop improvement**. Springer Netherlands, 2002. p. 9-54.

HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B.; MITTON, J. B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual review of ecology and systematics**, v. 10, p. 173-200, 1979.

HARDT, E. et al. Plantios de restauração de matas ciliares em minerações de areia da bacia do rio Corumbataí: eficácia na recuperação da biodiversidade. **Scientia Florestalis**, v. 70, p. 107-123, 2006.

HEDRICK, P. W. **Genetics of populations**. 4. ed. Boston: Jones and Bartlett, 2011. 675p.

JAIN, S. M.; BRAR, D. S.; AHLOOWALIA, B. S. (Ed.). **Molecular techniques in crop improvement**. London/New York: Springer, 2010.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in ecology & evolution**, v. 11, n. 10, p. 424-429, 1996.

JEFFREYS, A. J.; NEIL, D. L.; NEUMANN, R. Repeat instability at human minisatellites arising from meiotic recombination. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 14, p. 4147-4157, 1998.

- KALIA, R. K. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, p.1099-1106, 2007.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation biology**, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.
- LANDRUM, L. R. Campomanesia, Pimenta, Blepharocalyx, Legrandia, Acca, Myrrhinium, and Luma (Myrtaceae). **Flora Neotropica**, v. 45, p. 1-178, 1986.
- LI, You-Chun et al. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 6, p. 991-1007, 2004.
- LORENZI, H. et al. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura). **São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, p. 382-386, 2006.
- LORENZI, H.; SOUZA, W. C. **Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógmas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Editora Plantarum. 2ª Ed. 640p, 2008.
- MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação in situ. **IPEF**, v. 35, p. 71-78, 1987.
- MCMANUS, C. et al. Estatística para descrever genética de populações. **INCT: Informação genético-sanitária da pecuária brasileira**, 2011.
- MENDONÇA, R. et al. Flora vascular do Cerrado. In: S. Sano & S. Almeida (eds.). **Cerrado: Ambiente e flora**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa - Cerrados, Planaltina, Brasil. p. 288-556, 1998.
- MELCHIOR, S. J. et al. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb.-Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.
- MERCADANTE, M. **MYRTACEA – Campomanesia adamantium**. 2012. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/albums/72157632025663825>>. Acesso em: 20 Set. 2016.
- MIRANDA, E. A. G. C. et al. Validation of EST-derived microsatellite markers for two Cerrado-endemic *Campomanesia* (Myrtaceae) species. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 1, 2016.
- MOHAN, M. et al. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. **Molecular breeding**, v. 3, n. 2, p. 87-103, 1997.
- MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature genetics**, v. 30, n. 2, p. 194-200, 2002.

- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.
- NAVES, M. M. V. et al. Ascorbic Acid Content, Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Brazilian Savannah Native Fruits. **The FASEB Journal**, v. 30, n. 1 Supplement, p. 1176.5-1176.5, 2016.
- OLIVEIRA, M. C.; SANTANA, D. G.; SANTOS, C. M. Biometrics of fruits and seeds and seedling emergence of two species fruit of the *Campomanesia* genus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 446-455, 2011.
- OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, v. 87, n. 4, p. 551-568, 1999.
- PARIDA, S. K. et al. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 2, p. 327-338, 2009.
- PASCOAL, A. C. et al. Free radical scavenging activity, determination of phenolic compounds and HPLC-DAD/ESI-MS profile of *Campomanesia adamantium* leaves. **Natural product communications**, v. 6, n. 7, p. 969-972, 2011.
- PASCOAL, A. C. R. F. et al. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 1843-1855, 2014.
- PAVAN, F. R. et al. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1222-1226, 2009.
- PEARSON, C. E.; EDAMURA, K. N.; CLEARY, J. D. Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 10, p. 729-742, 2005.
- PELLOSO, I. A. O. **Caracterização fenotípica de populações e desenvolvimento inicial de plantas de *Campomanesia adamantium* (CAMBESS.) O. BERG, em Mato Grosso do Sul.** 2011. 54f. Tese (Agronomia - Doutorado) - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2011.
- PIERCE, B. A. **Genética: um enfoque conceitual.** 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2011. 774p.
- PIVA, M. G. **O caminho das plantas medicinais: estudo etnobotânico.** Mondrian, 2002.
- PORTO, A. C., GULIAS, A. P. M. Gabiroba. In: R. F. VIEIRA, T. S. AGOSTINI-COSTA, D. B. DA SILVA, S. M. SANO, F. R. FERREIRA (Eds.), **Frutas nativas da região Centro Oeste do Brasil.** Embrapa, Brasília, p.175-184, 2006.
- POWELL W, MACHRAY GC, PROVAN J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science**, v. 1, n. 7, p. 215-222, 1996.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P. M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 3, p. 142-147, 2001.

RAMOS, D. D.; CARDOSO, C. A. L.; YAMAMOTO, N. T. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 774-776, 2007.

RESENDE, H. C.; TEIXEIRA, T. A. Diversidade genética em *Campomanesia* (MYRTACEA) estimada por análise multivariada de características fenotípicas. **Ceres**, v. 56, n. 1, 2015.

RICH, A.; WANG, A. H. J.; NORDHEIM, A. Chemistry and Biology of Left-Handed Z DNA. **Nucleic acid research: future development**, p. 11, 1983.

ROMERO, G.; ADEVA, C.; BATTAD, Z. Genetic fingerprinting: advancing the frontiers of crop biology research. **Philipp. Sci. Lett**, v. 2, p. 8-13, 2009.

SCHIEVENIN, D. F. et al. Monitoramento de indicadores de uma área de restauração florestal em Sorocaba-SP. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 19, n. 1, p. 95-108, 2012.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin: a software for population genetics data analysis**. User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, 2000.

SEHGAL, D.; RAINA, S. N. DNA markers and germplasm resource diagnostics: new perspectives in crop improvement and conservation strategies. In: Arya, I. D.; Arya, S. (eds) **Utilization of biotechnology in plant sciences**. Microsoft Printech (I) Pvt. Ltd, Dehradun, pp 39-54, 2008.

SILVA, D. B. et al. **Frutas do Cerrado**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 178 p.

SOBRAL, M. et al. Myrtaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10308>>. Acesso em: 20 Set. 2016

SORANZO, N.; PROVAN, J.; POWELL, W. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. **Genome**, v. 42, n. 1, p. 158-161, 1999.

SOUZA, J. C. de et al. Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. **Nutritional Neuroscience**, 2014.

SOUZA, S. M. L. et al. Estudo de Interações entre Insetos e Plantas no Município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, 2015.

- TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome research**, v. 10, n. 7, p. 967-981, 2000.
- VALLILO, M. I. et al. Chemical composition of *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg'fruits. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 26, n. 4, p. 805-810, 2006.
- VARSHNEY, R. K. et al. Genic molecular markers in plants: development and applications. In: **Genomics-assisted crop improvement**. Springer Netherlands, p. 13-29, 2007.
- VARSHNEY, R. K. et al. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 7, n. 2A, p. 537-546, 2002.
- VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005.
- VICENTE, M. C.; LÓPEZ, C.; FULTON, T. Genetic diversity analysis with molecular marker data: learning module. **International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) & Cornell University**, 2003. Disponível em <https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/Molecular_Markers_Volume_2_en.pdf>. Último acesso em 28/8/2016.
- WANG, M. L.; BARKLEY, N. A.; JENKINS, T. M. Microsatellite markers in plants and insects. Part I: Applications of biotechnology. **Genes, Genomes and Genomics**, v. 3, n. 1, p. 54-67, 2009.
- WANG, Z. et al. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and applied genetics**, v. 88, n. 1, p. 1-6, 1994.
- WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n·(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v. 7, n. 4, p. 524-530, 1990.
- WESP, C. et al. 14653-Characterização física de frutos de guabirobeiras (*Campomanesia spp.*) coletados no estado do Rio Grande do Sul. **Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 2, 2013.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of eugenics**, v. 15, n. 1, p. 323-354, 1949.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, p. 395-420, 1965.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.