

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – BACHAREL

TAYNÁ DE OLIVEIRA MANCOELHO

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Campomanesia adamantium* POR
MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES ESPÉCIE-ESPECÍFICOS E
TRANSFERÍVEIS**

DOURADOS

2020

TAYNÁ DE OLIVEIRA MANCOELHO

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Campomanesia adamantium* POR
MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES ESPÉCIE-ESPECÍFICOS E
TRANSFERÍVEIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, no Programa de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientadora: Profa. Dra. Alexeia Barufatti

Área de Concentração: Genética Vegetal

DOURADOS

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

M268a Mancoelho, Tayna De Oliveira

Análise da diversidade genética em *Campomanesia adamantium* por meio de marcadores microssatélites espécie-específicos e transferíveis [recurso eletrônico] / Tayna De Oliveira Mancoelho. -- 2020.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Alexeia Barufatti.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Guavira. 2. SSR espécie-específico. 3. SSR transferíveis. 4. Variabilidade genética. I. Barufatti, Alexeia. II. 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.

TAYNÁ DE OLIVEIRA MANCOELHO

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM *Campomanesia adamantium* POR
MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES ESPÉCIE-ESPECÍFICOS E
TRANSFERÍVEIS

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado
pela Banca Examinadora como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia, da Universidade Federal da
Grande Dourados.

Orientadora: Profa. Dra. Alexeia Barufatti

Área de Concentração: Genética Vegetal

Aprovado em: 23/10/2020

BANCA EXAMINADORA



PROFA. DRA. ALEXEIA BARUFATTI
Presidente



PROF. DR. BRUNO DO AMARAL CRISPIM
Membro



PROFA. DRA. MARIA DO CARMO VIEIRA
Membro

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, que fez com que meus objetivos fossem alcançados, por ter permitido ultrapassar todos os obstáculos.

À minha família, por me incentivarem e darem todo o apoio necessário para a conclusão desta etapa.

À Professora Dra. Alexeia Barufatti, por ter sido minha orientadora e ter realizado tal função com dedicação e amizade.

À Juliana dos Santos Fernandes, por ter me auxiliado desde o início.

Ao Dr. Bruno do Amaral Crispim, por me auxiliar em momentos de dúvidas.

A todos os professores da FCBA, por todo o conhecimento que puderam transmitir durante esses anos.

A todos os amigos que ganhei durante a graduação, pela amizade e convívio, pelo apoio, por estarem comigo nos momentos bons e difíceis.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realização do curso de graduação e por todas as oportunidades concedidas.

À Fundect, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho e conclusão desta etapa.

RESUMO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupa 24% do território nacional e possui uma rica flora com 33% de espécies endêmicas. No entanto, é um dos biomas mais ameaçados devido à expansão agrícola, causando riscos para espécies nativas. Dentre essas podemos destacar a *Campomanesia adamantium* O. Berg (Myrtaceae) que apresenta potencial alimentício, medicinal e importância ambiental por auxiliar a restauração de áreas degradadas. Considerando o desmatamento que o Cerrado vem sofrendo e a importância dessa espécie, torna-se relevante o desenvolvimento de pesquisas que gerem conhecimentos relacionados a aspectos de conservação; no entanto, há poucos estudos que caracterizam a variabilidade genética da *Campomanesia adamantium*. Marcadores moleculares como os microssatélites são os indicados para análise de diversidade genética, porém necessitam do desenvolvimento de *primers* específicos. A fim de reduzir custo e tempo, existe a alternativa de transferibilidade de marcadores entre espécies relacionadas. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar padrões de diversidade genética em populações de *C. adamantium* utilizando marcadores microssatélites transferíveis de *Eucalyptus* sp. e marcadores microssatélites espécie-específicos. Amostras foliares de 124 indivíduos de cinco populações de *C. adamantium* destinadas à análise foram coletadas e tiveram seu DNA extraído e quantificado. Posteriormente, a PCR foi realizada com marcadores microssatélites de *Eucalyptus* spp. e espécie-específicos. Os amplicons dos microssatélites transferíveis foram submetidos a eletroforese capilar em sequenciador automático ABI-3500 e os microssatélites espécie-específicos avaliados no equipamento *Fragment Analyzer*. As análises foram realizadas nos *softwares* *GeneMapper* (5.0) e *PROSize Data Analysis* (2.0), respectivamente. Ambos marcadores identificaram níveis de diversidade genética em *C. adamantium*, porém os marcadores espécie-específicos foram os que mostraram maiores números de alelos e riqueza alélica. Além disso os espécie-específicos exibiram maiores níveis de endogamia em relação aos marcadores transferíveis. Esse método de acasalamento pode estar relacionado à escassez de agentes polinizadores promovida pelo uso extensivo de agrotóxicos em áreas agrícolas onde essas plantas foram coletadas, promovendo também reprodução vegetativa da espécie e endogamia. Desse modo, a utilização de marcadores transferíveis pode ocultar dados relevantes como esses revelados no presente estudo e dessa maneira demonstrar que o uso de marcadores espécie-específicos são mais indicados para análises de diversidade genética.

Palavras-chaves: Guavira, SSR espécie-específico, SSR transferíveis, variabilidade genética

ABSTRACT

The Cerrado is the second largest Brazilian biome, occupying 24% of the national territory and has a rich flora with 33% of endemic species. However, it is one of the most threatened biomes due to agricultural expansion, causing risks for native species. Among these, we can highlight *Campomanesia adamantium* O. Berg (Myrtaceae), which has potential for food, medicine and environmental importance for helping to restore degraded areas. Recognizing the deforestation that the Cerrado has been suffering and the importance of this species, it is relevant to develop researches that adds knowledge related to conservation aspects, however, there are few studies that characterize the genetic variability of *Campomanesia adamantium*. Molecular markers such as microsatellites are indicated for the analysis of genetic diversity, but they need the development of specific primers. In order to reduce cost and time, there is an alternative for transferring markers between related species. Therefore, the objective of this study was to evaluate patterns of genetic diversity in populations of *C. adamantium* using transferable microsatellite markers from *Eucalyptus* sp. and species-specific microsatellite markers. Leaf samples from 124 subjects belonging to five populations of *C. adamantium* for analysis were collected and had their DNA extracted and quantified. Subsequently, the PCR was performed with microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. and species-specific. The amplicons of the transferable microsatellites were subjected to capillary electrophoresis in an automatic sequencer ABI-3500 and the species-specific microsatellites evaluated in the Fragment Analyzer equipment. The analyses were performed using the GeneMapper (5.0) and PROSize Data Analysis (2.0) software, respectively. Both markers identified levels of genetic diversity in *C. adamantium*, however the species-specific markers were those that showed higher number of alleles and allelic richness. In addition, species-specific types exhibited higher levels of inbreeding compared to transferable markers. This mating method may be related to the scarcity of pollinating agents promoted by the extensive use of pesticides in agricultural areas where these plants were collected, also promoting vegetative reproduction of the species and inbreeding. Thereby, the use of transferable markers can hide relevant data such as those revealed in the present study and thus demonstrate that the use of species-specific types of markers are more suitable for analyzes of genetic diversity.

Keywords: Guavira; Species-specific SSR; Transferable SSR; Genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) Indivíduos de <i>C. adamantium</i> . (b) Flores de <i>C. adamantium</i> . (c) Frutos de <i>C. adamantium</i> . (d) Folhas de <i>C. adamantium</i>	16
Figura 2. Exemplo de marcador molecular microssatélite ou SSR dinucleotídeo (AC) _n ...	19
Figura 3. Construção de biblioteca genômica enriquecida de microssatélites através de hibridização seletiva.....	22
Figura 4. Locais de coletas das amostras de <i>C. adamantium</i>	26
Figura 5. Variabilidade genética de 10 marcadores microssatélites transferíveis e 7 espécie-específicos em populações de <i>C. adamantium</i>	35
Figura 6. Variabilidade genética de marcadores microssatélites transferíveis e espécie-específicos em 5 populações de <i>C. adamantium</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de marcadores moleculares e suas principais características.....	18
Tabela 2. Classificação dos microssatélites.....	20
Tabela 3. Marcadores microssatélites transferíveis utilizados e detalhes de amplificação por PCR.	28
Tabela 4. Marcadores microssatélites espécie-específicos utilizados e detalhes de amplificação por PCR.	30
Tabela 5. Variação genética de microssatélites transferíveis e espécie-específicos nas populações de <i>Campomanesia adamantium</i>	33
Tabela 6. Estimativas de variabilidade genética para as cinco populações de <i>Campomanesia adamantium</i> utilizando marcadores microssatélites espécie-específicos e transferíveis.	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Objetivos	12
1.2 Hipóteses	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Bioma Cerrado.....	14
2.2 Aspectos gerais de <i>Campomanesia adamantium</i>	15
2.3 Marcadores moleculares.....	17
2.4 Marcadores microssatélites	19
2.5 Desenvolvimento de marcadores microssatélites	21
2.6 Transferibilidade dos marcadores microssatélites	23
2.7 Análise de Diversidade Genética em Populações.....	23
2.8 Medidas de Diversidade Genética	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Material vegetal	26
3.2 Extração de DNA do tecido foliar	26
3.3 Genotipagem dos marcadores.....	27
3.3.1 Marcadores microssatélites transferíveis	27
3.3.2 Marcadores microssatélites espécie-específicos.....	29
3.4 Análises de dados	32
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, ocupa 24% do território brasileiro, possui uma abundante flora que soma mais de 12.000 espécies, sendo cerca de 33% endêmica (FORZZA *et al.* 2012; DURIGAN *et al.* 2018). Apresenta diversas espécies frutíferas e medicinais; no entanto, o crescente desmatamento relacionado à expansão agrícola, está promovendo a redução da variedade das espécies existentes nesse bioma. Dentre essas, podemos destacar a *Campomanesia adamantium*, utilizada como fonte de recurso natural e de importância socioeconômica e ambiental. Apresenta fácil propagação, precocidade para o início da produção e grande disponibilidade de sementes (KLINK e MACHADO, 2005).

C. adamantium O. Berg, conhecida como guabiroba, gabiroba, guavira, guabiroba-do-campo ou guariroba, é uma frutífera nativa e não cultivada (SANO *et al.* 2006). Pertence à família Myrtaceae, que representa uma das maiores famílias da flora brasileira (MORAIS *et al.* 2014). Seus frutos são utilizados tanto na alimentação *in natura* quanto na produção de sucos, geleias, doces, sorvetes, também utilizados como matéria-prima para licores e vinhos, além de servirem como fonte de alimento para aves e répteis (SANO *et al.* 2006). Estudos etnobotânicos mostraram que a *C. adamantium* possui um potencial medicinal, sendo utilizada a infusão de suas folhas no tratamento de gripe, além de apresentar efeito anti-inflamatório e antidiarreico (RAMOS *et al.* 2007). A espécie também possui capacidade de regeneração de áreas degradadas do Cerrado. Sendo assim, devido à importância cultural, socioeconômica e ambiental, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que promovam a conservação dessa espécie (GOMES e MOURA, 2010)

Em razão da degradação do bioma, seja por extração intensiva inadequada ou pelo aumento das fronteiras agrícolas, que podem afetar a variabilidade genética na *C. adamantium*, a avaliação da diversidade genética da espécie é necessária para estudos de genética populacional, apoiando programas de conservação e melhoramento (MIRANDA *et al.* 2016)

Apesar de escassos, existem alguns estudos que caracterizem a variabilidade genética da *C. adamantium*, como Miranda *et al.* (2016), Crispim *et al.* (2018), Crispim *et al.* (2019) e Fernandes (2019). Com o intuito de avaliar a diversidade genética desta espécie torna-se relevante a utilização de técnicas de análises de polimorfismos genéticos utilizando marcadores moleculares. Estes possibilitam gerar conhecimentos sobre identidade genética, diversidade, frequência gênica, caracterização e mapeamento genético (FALEIRO *et al.* 2011). Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares podemos destacar os

microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), marcadores multialélicos, codominantes, que apresentam alto nível de aleatoriedade e estão frequentemente distribuídos no genoma. Porém uma de suas principais desvantagens é a dificuldade para o desenvolvimento de marcadores espécie específicos (GUIMARÃES *et al.* 2009, CAMACHO, 2016).

A fim de reduzir tempo empregado no desenvolvimento desses marcadores, estudos têm apresentado como alternativa a transferibilidade de marcadores entre espécies filogeneticamente próximas (FORTES *et al.* 2016). O uso da transferibilidade foi aplicada em *C. adamantium* utilizando marcadores microsatélites derivados de EST (*Expressed Sequence Tags*) de *Eucalyptus* sp. (MIRANDA *et al.* 2016). No entanto, recentemente foram desenvolvidos marcadores microsatélites espécie-específicos de *C. adamantium* por meio de biblioteca genômica enriquecida em microsatélites (CRISPIM *et al.* 2019).

Considerando a existência de marcadores microsatélites transferíveis de *Eucalyptus* sp. que foram validados em *C. adamantium* e desenvolvimento de marcadores espécie-específicos, torna-se relevante avaliar a existência de padrões diferenciais de parâmetros que caracterizem a variabilidade genética dessa espécie para ambos marcadores.

1.1 Objetivos

Geral:

- Comparar padrões diferenciais de diversidade genética em *Campomanesia adamantium* utilizando marcadores microssatélites transferíveis de *Eucalyptus* sp e espécie-específicos.

Específicos:

- Avaliar número médio de alelos, heterozigosidade esperada e observada, riqueza alélica, coeficiente de endogamia, número de *loci* em equilíbrio de Hardy-Weinberg em *Campomanesia adamantium* utilizando marcadores microssatélites transferíveis.
- Avaliar número médio de alelos, heterozigosidade esperada e observada, riqueza alélica, coeficiente de endogamia, número de *loci* em equilíbrio de Hardy-Weinberg em *Campomanesia adamantium* utilizando marcadores microssatélites espécie-específicos.
- Comparar padrões diferenciais de parâmetros de diversidade genética como: número médio de alelos, heterozigosidade esperada e observada, riqueza alélica, coeficiente de endogamia, número de *loci* em equilíbrio de Hardy-Weinberg em *Campomanesia adamantium* utilizando marcadores microssatélites transferíveis e espécie-específicos.

1.2 Hipóteses

- **H0:** Os dois conjuntos de marcadores microssatélites, espécie-específico e transferíveis não apresentam padrões diferenciais de diversidade genética em populações de *Campomanesia adamantium*.
- **H1:** Os dois conjuntos de marcadores microssatélites estudados, espécie-específico e transferíveis, apresentam padrões diferenciais de diversidade genética em populações de *Campomanesia adamantium*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bioma Cerrado

O Cerrado brasileiro é considerado como um dos 25 “hot spots” de biodiversidade no mundo. É o segundo maior bioma, dispõe de mais de 12.000 espécies vegetais (angiospermas, gimnospermas, samambaias e licófitas), das quais cerca de 4.000 são endêmicas, sendo caracterizado como a savana mais rica do mundo. Ocupa 24% (2,01 milhões de km²) do território nacional, perdendo em tamanho apenas para a Floresta Amazônica, que ocupa 49% (4,19 milhões de km²) do território. Seu ambiente varia entre áreas campestres, florestais e savânicas. O bioma apresenta grande importância social, onde muitas populações utilizam seus recursos naturais para sobreviver, além de possuir cerca de 220 espécies com potencial medicinal e cerca de 440 utilizadas para regeneração de solos degradados (MEDEIROS, 2011; DURIGAN *et al.* 2018).

No entanto, o Cerrado está entre os mais ameaçados do Brasil, pois mais da metade de sua área original foi convertida em áreas para pastagens e agricultura, ocasionando fragmentação dos habitats e extinção de espécies. Além de prejudicar sua biodiversidade, as funções do ecossistema também são afetadas, como a ciclagem de nutrientes, regulação climática, ciclo da água, dentre outros (MMA, 2011)

Invasões biológicas de plantas exóticas, como as do gênero *Pinus*, também vem causando perda da biodiversidade, modificando o habitat com excesso de sombreamento e acúmulo de acículas no solo, dificultando o desenvolvimento de plantas nativas pequenas. (SANTOS, 2014; DURIGAN *et al.* 2018).

Estudos sobre o manejo do fogo nessas regiões confirmam a importância de seu papel para a conservação do habitat. Apesar de ser visto como um agente de destruição, o fogo é um distúrbio importante para alguns ecossistemas, dentre eles o Cerrado. Sem sua passagem, campos e savanas tendem a se transformar em florestas densas, modificando sua fisionomia e diversidade, provocando extinção local de plantas pequenas que dependem de luz solar direta. Estudos recentes buscam medidas para que o uso do fogo possibilite a manutenção da sua estrutura e biodiversidade desse bioma (FIDELIS e PIVELLO 2011; SILVA, 2018; DURIGAN *et al.* 2018).

Dentre as espécies nativa do Cerrado, inclui-se a *Campomanesia adamantium*, pertencente à família Myrtaceae, que representa uma das maiores famílias da flora brasileira,

possui cerca de 140 gêneros e 3500 espécies encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. (SANTOS, 2014; DURIGAN *et al.* 2018).

2.2 Aspectos gerais de *Campomanesia adamantium*

Campomanesia adamantium O. Berg é popularmente conhecida como guavira, guabiroba, gabiroba, guabiroba-do-campo ou guariroba (CAMPOS, 2018). Como espécie nativa do Cerrado pode ser encontrada em várias regiões do Brasil como nos estados de São Paulo, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Distrito Federal, Bahia, Santa Catarina e regiões próxima do Paraná (ARAÚJO e SOUZA, 2018). Foi dispersa por viajantes para outros países da América do Sul, como Argentina, Paraguai e Uruguai (SANO *et al.* 2006).

O gênero *Campomanesia* é constituída de subarbustos e arbustos com muitas ramificações, pouco exigentes quanto ao tipo de solo, sendo capaz de crescer facilmente em solos pobres de nutrientes, como é o caso de *C. adamantium* (VALLILO *et al.* 2006). Essa espécie é frutífera e não cultivada, sua altura varia de 0,3 até 2 m (Figura 1), dispõe-se de folhas opostas, simples, inteiras com pontuações translúcidas e ápice agudo, são levemente avermelhadas quando novas e amareladas quando adultas, possuem cerca de 3 a 10 cm de comprimento (SANO *et al.* 2006). Apresentam flores brancas, solitárias, axilares ou terminais que ocorrem entre agosto a novembro. Seus frutos são globosos com cerca de 2 a 2,5 cm de diâmetro, possuem coloração verde escura, verde clara ou amarelada, ocorrendo amadurecimento entre novembro e dezembro (VASCONCELOS, 2016).

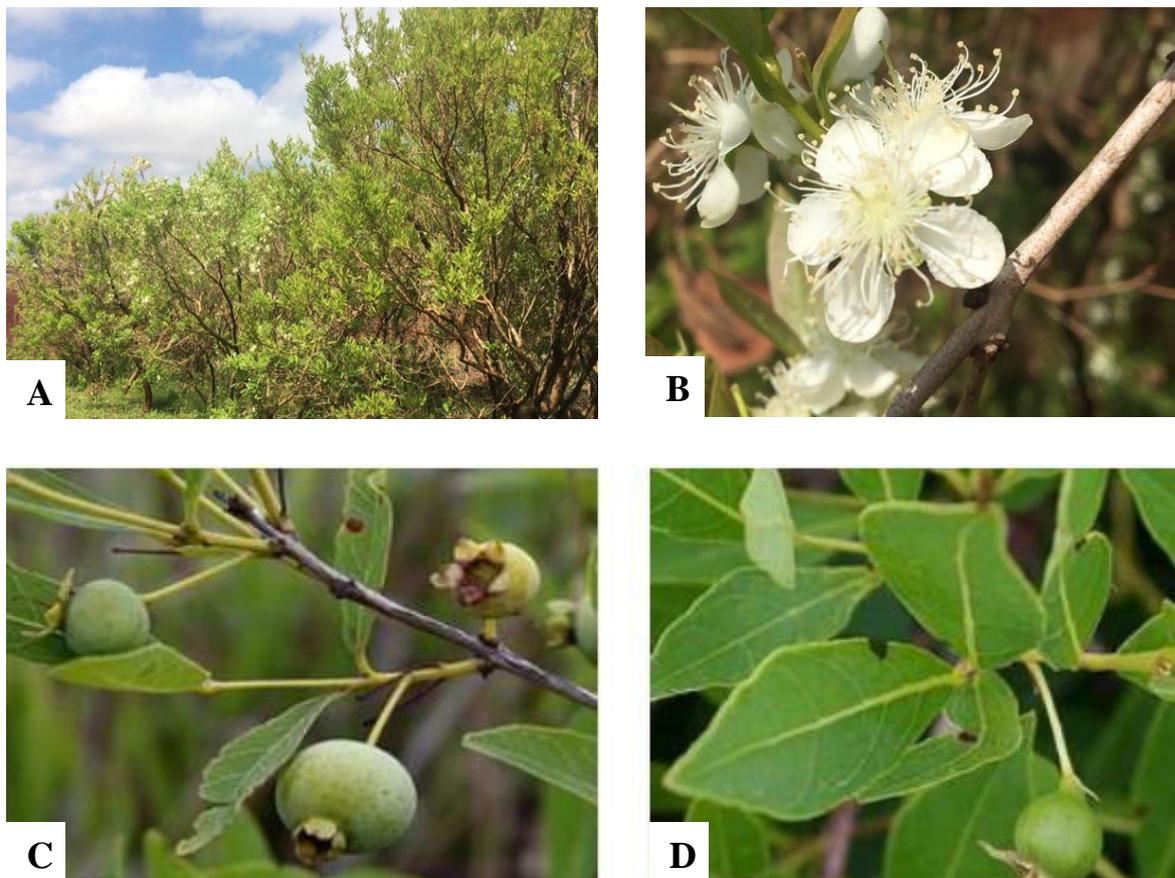


Figura 1. (a) Indivíduos de *C. adamantium*. (b) Flores de *C. adamantium*. (c) Frutos de *C. adamantium*. (d) Folhas de *C. adamantium*.

Fonte: Figuras 1 a) e b): Autora (2019); c) d): Kuhlmann (2012)

C. adamantium se reproduz a partir da polinização cruzada, apresenta eficácia em reprodução por xenogamia (flores de plantas distintas), polinizada por abelhas. No entanto, recentemente foi constatada a ocorrência de reprodução vegetativa na espécie, onde o desenvolvimento de um novo indivíduo dá-se a partir de partes de uma planta adulta (NUCCI e ALVES-JÚNIOR, 2017; FERNANDES, 2019). A dispersão de sementes ocorre por meio de animais, como pássaros e mamíferos, uma vez que seus frutos são de grande importância alimentar (VALLILO *et al.* 2006).

Além de serem consumidos *in natura* pelo homem, os frutos apresentam potencial comercial, na forma de doces, geleias, pudins, pavês, sucos, sorvetes e na utilização como matéria-prima na indústria de bebidas. São de grande aceitação no mercado, devido ao seu sabor aromático e adocicado, sendo fonte de renda para muitas famílias (SANO *et al.* 2006).

Considerada uma planta medicinal, as folhas da *C. adamantium* apresentam cerca de 95 compostos (DE SOUZA *et al.* 2017) possuindo potencial antioxidante, antidiarréica e

antisséptica das vias urinárias (RAMOS *et al.* 2007), anti-inflamatório e antinociceptivo (FERREIRA *et al.* 2013), antimicrobiano (SÁ *et al.* 2018), atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* (PAVAN *et al.* 2009). Estudos também mostraram que o extrato da casca de seus frutos possuem atividades anti-inflamatórias, anti-hiperalgésicas e antidepressivas em roedores (DE SOUZA *et al.* 2017) e, além de saborosos, os frutos considerados fonte de vitamina C (VISCARDI *et al.* 2017). A espécie também possui capacidade de regeneração de áreas degradadas do Cerrado (DURIGAN *et al.* 2011).

Por ser planta nativa do Cerrado e considerando que esse bioma vem sofrendo perda de biodiversidade, torna-se a espécie ameaçada. A fim de preservar a *C. adamantium* como fonte de recurso genético, técnicas de biologia molecular proporcionam meios para estudos de genética de populações, dentre estas podemos destacar a utilização de marcadores moleculares. Trata-se de método utilizado para avaliar a variabilidade genética dentro e entre populações que contribui para implantação de estratégias de conservação e melhoramento genético (GOMES e MOURA, 2010; TEIXEIRA *et al.* 2018).

2.3 Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são variações nos nucleotídeos da sequência de DNA, podem ser rastreados e quantificados, são herdados geneticamente e não sofrem influência do meio ambiente (ZOLET *et al.* 2017).

Os principais marcadores moleculares são classificados de acordo com sua metodologia: a) baseados em hibridização com sondas específicas como no caso de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e os minissatélites ou *loci* VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*); b) baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), Microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (DE AGUIAR, 2012), entre outros, conforme demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Tipos de marcadores moleculares e suas principais características.

Marcador	Nível de polimorfismo	Expressão gênica	Conhecimento prévio da sequência	Custo e esforço no desenvolvimento	Principais aplicações
VNTR	Alto	Co-dominante/dominante (no caso de sonda para vários <i>loci</i>)	Sim	Alto	<i>Fingerprinting</i> , diversidade genética, análise filogenética
RAPD	Baixo-médio	Dominante	Não	Baixo-médio	<i>Fingerprinting</i> , diversidade genética, mapeamento genético
RFLP	Alto	Codominante	Sim	Alto	Análise filogenética, <i>fingerprinting</i> , diversidade genética, mapeamento genético
SSR	Alto	Codominante	Sim	Alto	Mapeamento genético, <i>fingerprinting</i> , diversidade genética, análise filogenética
AFLP	Baixo	Dominante	Não	Baixo-médio	Mapeamento genético, diversidade genética e <i>fingerprinting</i>
ISSR	Baixo-médio	Dominante	Não	Baixo-médio	<i>Fingerprinting</i> , diversidade genética, análise filogenética

Fonte: Adaptado de Faleiro (2007) e Kalia *et al.* (2011).

Os marcadores moleculares são distinguidos por características como reprodutibilidade, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos *loci*, abundância genômica, requerimentos técnicos, custo e facilidade de uso (OLIVEIRA *et al.* 2007). Eles têm sido ferramentas fundamentais para programas de melhoramento genético, auxiliando melhoristas na caracterização molecular, na construção de mapas genéticos de ligação e na seleção assistida por marcadores (AGUIAR, 2015). Além de proporcionar caracterização de germoplasma, são utilizados em estudos de diversidade genética entre indivíduos, dentro e entre populações ou em espécies relacionadas, para análises de filogenia, ligação gênica, identificação de variedades, dentre outros, sendo os marcadores microssatélites os mais indicados para esse tipo de análise. (SOUZA, 2015)

2.4 Marcadores microssatélites

Dentre os vários tipos de marcadores moleculares, existem os marcadores nomeados microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Simple Tandem Repeats*), que são sequências simples de DNA repetidas em tandem, de 1 a 6 nucleotídeos (Figura 2). Estão distribuídos aleatoriamente em regiões não codantes do genoma, com uma frequência relativamente alta e são flanqueados por regiões conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie (GUIMARÃES, 2009). Se destacam na genética vegetal por apresentarem diversas características favoráveis, como, herança codominante, que permite distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos, são seletivamente neutros, multialélicos, possuem alta reprodutibilidade, abundância no genoma e alto grau de polimorfismo (ALCÁNTARA, 2007; BARATELI, 2018).



Figura 2. Exemplo de marcador molecular microssatélite ou SSR dinucleotídeo (AC)_n.

Fonte: Adaptado de Camacho (2016).

Essas repetições são classificadas pelo tamanho do motivo de repetição (Tabela 2): mononucleotídeo, dinucleotídeo, trinucleotídeo, tetranucleotídeo, pentanucleotídeo e hexanucleotídeo; pelo tipo de sequência repetitiva, como: i) perfeitos: quando a sequência repetida não é interrompida; ii) imperfeitos: quando há, entre os motivos, pares de bases que não correspondem a repetição; iii) interrompidos: quando possuem em sua constituição uma sequência curta que não corresponde ao seu motivo original; iv) compostos: quando a sequência contém duas sequências repetidas distintas. Também são classificados de acordo com a localização no genoma, sendo divididos em microssatélites nucleares, quando localizados no DNA nuclear; microssatélite cloroplastidiais, localizados no DNA de cloroplastos e microssatélite mitocondriais, localizados no DNA de mitocôndrias (OLIVEIRA, 2007; BARATELI, 2018).

Tabela 2. Classificação dos microssatélites.

A. Baseado no número de nucleotídeos por repetição	
Mononucleotídeos	(A)n
Dinucleotídeos	(CA)n
Trinucleotídeos	(CGT)n
Tetranucleotídeos	(CAGA)n
Pentanucleotídeos	(AAATT)n
Hexanucleotídeos	(CTTTAA)n
B. Baseado no arranjo de nucleotídeos dentro dos motivos de repetição	
Perfeito	(CA)n
Imperfeito	(AAC)n ATC (AAC)n
Interrompido	(CCA)n TT (CCA)n
Composto	(CA)n (GA)n
C. Baseado na localização de SSRs no genoma	
Nuclear	nuSSR
Cloroplastidial	CpSSR
Mitocondrial	mtSSR

n= número de vezes que o motivo se repete

Fonte: Kalia *et al.* (2011)

A variação no número de unidades repetidas em conjunto está diretamente ligada às taxas de mutações que ocorrem nessa região do genoma. Existem alguns modelos que evidenciam essas taxas de mutação, como o *crossing-over* desigual, o *slippage* durante a replicação, sendo ambos resultados de pareamento incorreto de bases de DNA, gerando

implicações como inserção ou deleção de unidade de repetição (OLIVEIRA, 2006; AGARWAL, 2008). A frequência e distribuição dos microssatélites variam entre diversas classes, apresentando predominância de repetições de dinucleotídeos em plantas (BERNARDES, 2014).

A principal desvantagem dos marcadores microssatélites é a necessidade de desenvolver *primers* específicos, principalmente quando se trata de espécies nativas, onde existem poucas ou nenhuma sequência em bancos de dados, tornando-se uma técnica que necessita de mão-de-obra qualificada. No entanto, devido a presença de regiões que flanqueiam os microssatélites serem altamente conservadas entre espécies relacionadas, torna-se possível a utilização de *primers* desenvolvidos para uma espécie em outras espécies que são filogeneticamente próximas ou também denominado transferíveis (GUIMARÃES, 2009; CAMACHO, 2016).

Uma das primeiras técnicas utilizadas para isolamento e obtenção de marcadores microssatélites era a partir do desenvolvimento de biblioteca genômica enriquecidas ou não. No entanto, devido aos avanços nas últimas décadas, o método de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) tem disponibilizado através de milhares de dados gerados, o desenvolvimento de marcadores SSRs, que possibilitam reduzir custo e tempo (ZOLET *et al.* 2017).

2.5 Desenvolvimento de marcadores microssatélites

A técnica de isolamento de *loci* microssatélites se iniciou a partir da construção de uma biblioteca genômica por meio de hibridização de colônias, que é um procedimento trabalhoso e caro. Dentre os métodos para o desenvolvimento de bibliotecas genômicas enriquecidas de microssatélites, o protocolo descrito por Kijas *et al.* (1994) e Billote *et al.* (1999) são os mais utilizados por apresentar uma maior eficiência e utilizar pouco recurso (CAMACHO, 2016; MOREIRA, 2017).

A técnica compreende a digestão do DNA com enzimas de restrição, ligação de adaptadores aos fragmentos de DNA selecionado e pré-amplificação por PCR. Posteriormente, o produto é enriquecido pela hibridização de sondas biotinizadas que se ligam às regiões de microssatélites dos fragmentos selecionados, microesferas magnéticas recobertas por estreptavidina são utilizadas para recuperar esses fragmentos através da atração por um ímã. Os fragmentos são amplificados via PCR, clonados e transformados, e

posteriormente é feito o sequenciamento e o desenho de *primers* específicos para a amplificação de cada loco de SSR (Figura 3) (GRANDO, 2009; ZOLET *et al.* 2017).

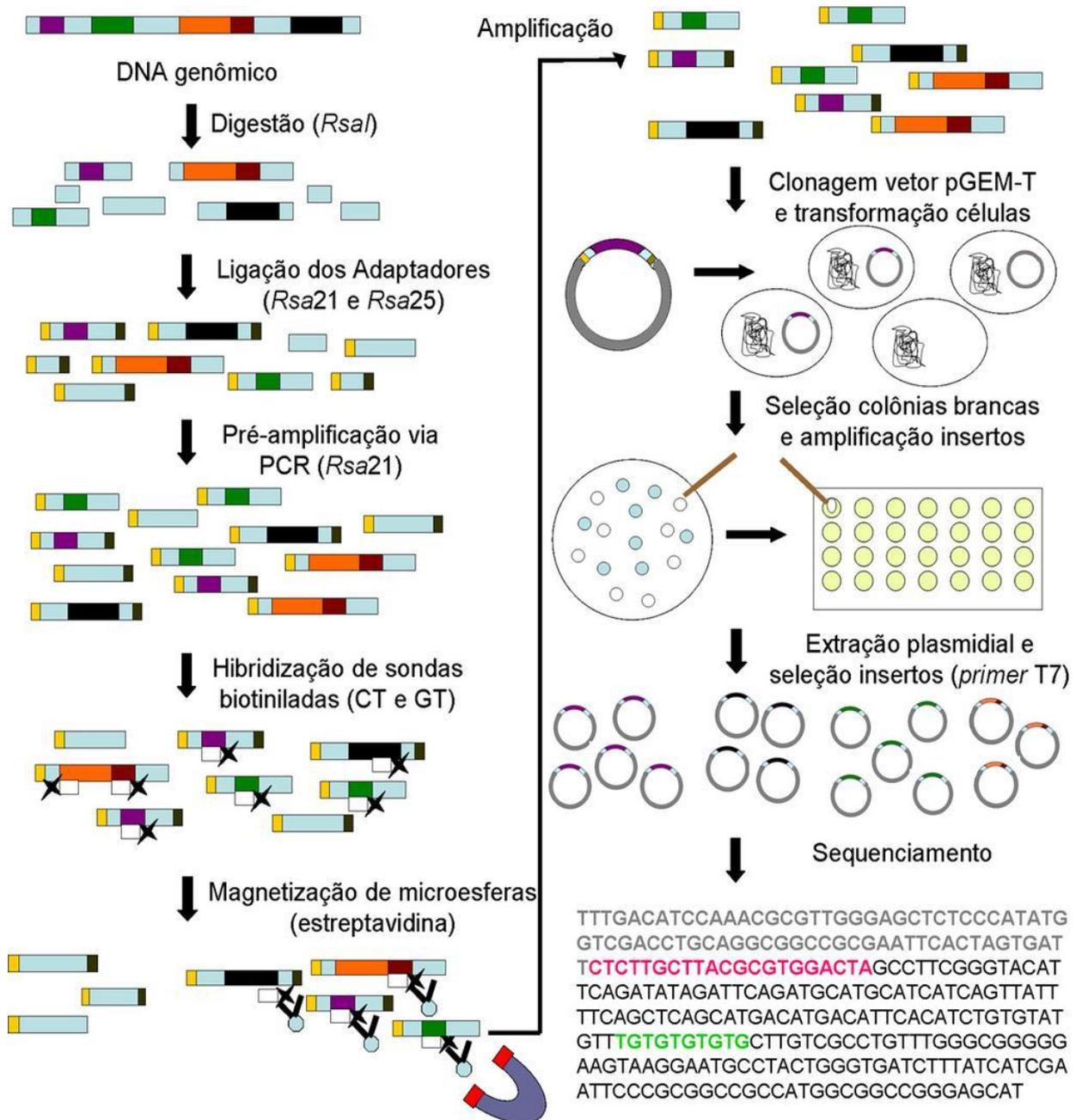


Figura 3. Construção de biblioteca genômica enriquecida de microssatélites através de hibridização seletiva.

Fonte: Grando (2009).

Outro método de desenvolvimento de marcadores microssatélites é o sequenciamento de nova geração (NGS - *Next Generation Sequencing*), uma técnica promissora e de menor custo, abrange ampla cobertura e possibilita o isolamento de milhares de *loci* SSRs, além de não requerer a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas. Pode gerar dados de milhões de pares de bases em uma única corrida, capaz de identificar regiões microssatélites

no genoma para a escolha e desenho dos *primers* de uma maneira rápida e eficaz (ZOLET *et al.* 2017; BARATELI, 2018).

A técnica consiste no sequenciamento e identificação dos SSRs, desenvolvimento dos pares de *primers* específicos das regiões que flanqueiam os microssatélites, padronização da reação de PCR para cada *locus* microssatélite e, por fim, a análise e caracterização do polimorfismo de cada loco para a validação das regiões microssatélites (BARATELI, 2018).

No entanto, apesar do avanço das técnicas de desenvolvimento dos marcadores microssatélites, a transferibilidade destes em espécies relacionadas ainda é utilizada, principalmente em espécies em que o DNA não foi sequenciado.

2.6 Transferibilidade dos marcadores microssatélites

Regiões microssatélites constituem grande parte do DNA não codificante, no entanto, também ocorrem em regiões codificantes, a partir de dados de sequências expressas marcadas (*Expressed Sequence Tags* ou ESTs), apesar de serem de menor número quando comparados com de regiões não codificantes (KALIA *et al.* 2011). Marcadores microssatélites derivados de EST (SSR-EST), apresentam maiores níveis de transferibilidade entre espécies relacionadas, uma vez que são localizadas em regiões expressas, possuindo um alto grau de conservação evolutiva. Assim, facilitando o desenvolvimento de estudos com marcadores microssatélites, em razão da diminuição de custo que é requerido com o desenvolvimento de bibliotecas genômicas (FERRÃO, 2013; CAMACHO, 2016). Contudo, os SSR derivados de regiões não codificantes apresentam maior grau de polimorfismo em comparação aos SSR-EST, tornando-os mais eficientes para estudos de diversidade genética (MIRANDA, 2014).

Segundo Barbará *et al.* (2007) a taxa de sucesso de transferibilidade de marcadores microssatélites em espécies de plantas dentro do mesmo gênero é próximo de 60% em dicotiledôneas e 40% em monocotiledôneas. Apesar de não serem taxas de total sucesso, ainda são de suma importância para espécies nativas cujo DNA não foi sequenciado, pois servirá de plataforma inicial para a caracterização, desenvolvimento de mapas genéticos, análise de diversidade genética, entre outras aplicações que auxiliam o melhoramento genético e a conservação de germoplasma (FALEIRO, 2011; KALIA *et al.* 2011).

2.7 Análise de Diversidade Genética em Populações

A diversidade genética pode ser definida pela variação no conjunto de genes em uma população que expressa diferentes características morfológicas, fisiológicas e

comportamental e que pode ser mantida dentro ou dividida entre populações (ERTEKIN, 2012; CAMACHO, 2016). A distribuição da variabilidade genética em populações naturais é influenciada pelo tamanho da população, sistema de reprodução, distribuição espacial na área de ocorrência da espécie e fluxo gênico. Estudos de diversidade genética são fundamentais para o conhecimento da estrutura populacional das espécies (PEREZ, 2008).

A estrutura genética das espécies naturais tem sido afetada devido a fragmentação da vegetação causada pela exploração intensiva e irracional, o que torna informações sobre diversidade genética fundamental para estabelecer estratégias de coleta e conservação dos recursos genéticos, assim como, aprimorar programas de melhoramento genético, tanto em plantas como em animais. A análise de diversidade genética mede a similaridade ou variações genéticas, seja relações entre indivíduos, populações, variedades ou raças (ROMERO *et al.* 2009; MACIEL, 2014).

Essas variações são resultado de processos que envolvem mutação, migração, deriva genética e seleção, permitindo que as populações se mantenham em processos evolutivos, essencial para a sobrevivência das espécies (GIBBON, 2016). Eventos que reduzem a diversidade genética podem afetar a reprodução de muitas espécies, ocasionando endogamia e diminuindo a capacidade das populações se adaptarem a um ambiente em constante mudança, sejam elas devido ao aquecimento global, poluição, pragas ou parasitas, entre outros, aumentando o risco de extinção (FRANKHAM *et al.* 2014).

A migração é o processo central que afeta a evolução, sua ausência causa diminuição na taxa de fluxo gênico e frequência dos alelos, ocasionando diferenciação genética e populações geneticamente distintas ao longo do tempo. Outro fator que altera a diversidade genética é a mutação, que corresponde em mudanças na sequência de nucleotídeos que formam o genoma dos indivíduos, através da inserção de novos alelos (DIAZ, 2013).

Parâmetros como frequência alélica, número de alelos, alelos efetivos, raros e exclusivos, heterozigosidade esperada e observada, dentre outros, podem ser observados a partir de análises de diversidade genética utilizando marcadores moleculares. Dados que levam a compreensão do fluxo gênico e deriva genética, desequilíbrio de ligação, efeito gargalo, onde ocorre queda do tamanho da população por pelo menos uma geração, dentre outros, servindo de apoio para outros parâmetros analisados em genética de populações (FERREIRA NETO, 2016).

2.8 Medidas de Diversidade Genética

A utilização de marcadores moleculares possibilitou analisar e quantificar a diversidade genética usando parâmetros como: riqueza alélica (RA), porcentagem de *loci* polimórficos (P), número de alelos (A), número de alelos efetivos, raros e exclusivos, frequências alélicas, heterozigiosidade observada (H_o) e heterozigiosidade esperada (H_E), coeficiente de endogamia (F_{IS}), dentre outros (FERREIRA NETO, 2016; CAMACHO, 2016).

A análise de heterozigiosidade revela a frequência total de heterozigotos do gene, podendo ser determinada pela heterozigiosidade observada (HO), onde o número de heterozigotos em um determinado *locus* é dividido pelo número total de indivíduos amostrados (CAMACHO, 2016). A heterozigiosidade esperada (HE) mostra a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto para um certo *locus*, e utiliza-se a frequência média de indivíduos heterozigotos, que é estimada pelo cálculo da frequência de heterozigotos para cada *locus* dividido pelo número total de *loci*. Assim, quanto maior a diversidade de alelos, maiores chances de um indivíduo daquela população ser heterozigoto. A relação entre a heterozigiosidade observada e esperada é relevante para o cálculo Hardy-Weinberg, pois uma população encontra-se em equilíbrio quando as frequências alélicas permanecem constantes ao longo das gerações, sendo assim, quando a HO e HE são estatisticamente semelhantes indicam equilíbrio populacional (FERREIRA NETO, 2016).

A autofecundação ou cruzamento entre indivíduos aparentados podem levar a população a um declínio de heterozigiosidade, ocasionando desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg e promovendo a endogamia. É utilizado o coeficiente de endogamia (FIS) para medir este desvio, podendo variar de -1 a 1, onde de -1 a 0 indica maiores níveis de heterozigotos e acasalamento ao acaso, quando comparados a valores de 0 a 1, que aponta menores níveis de heterozigotos (RODRIGUES, 2015; CAMACHO, 2016).

Segundo o princípio de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), para uma população se manter constante é necessário que ocorra acasalamento ao acaso e que não haja processos evolutivos, presumindo em uma população isolada, em que o acasalamento ocorra apenas entre indivíduos daquela população, assim, mantendo os alelos constantes (BARBOSA, 2014; CAMACHO, 2016). Conhecer a estrutura genética da população permite entender possíveis eventos ecológicos, genéticos e reprodutivos que acontecem na mesma, sendo a utilização de marcadores moleculares ferramentas indispensáveis para caracterização molecular (MACIEL, 2014).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Amostras de folhas jovens foram coletadas de 124 indivíduos de cinco populações de *C. adamantium*, sendo provenientes de quatro locais no estado de Mato Grosso do Sul (Bonito, Jardim, Dourados e Ponta Porã) e outro no Paraguai (Cerro Corá), no ano de 2011. As populações de Bonito – MS (BO) e Jardim – MS (JD), estão localizadas em áreas de reserva ambiental e apresentam pouca influência antrópica; as de Dourados – MS (DO) e Ponta Porã – MS (PP), próximos de áreas agrícolas; e de Cerro Corá – Py (CC) no Parque Nacional de Cerro Corá; (Figura 4).

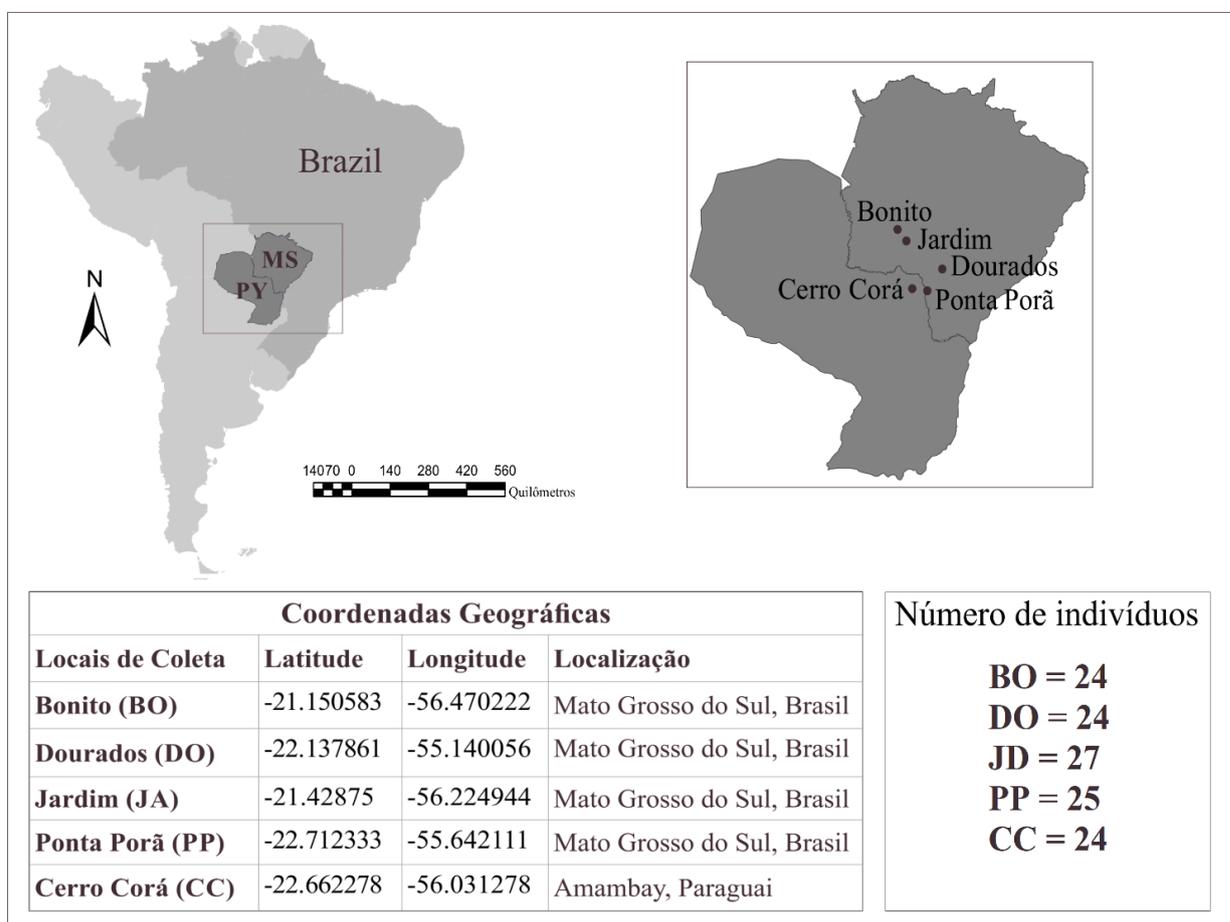


Figura 4. Locais de coletas das amostras de *C. adamantium*.

Fonte: Julio César Jut Solórzano, 2018.

3.2 Extração de DNA do tecido foliar

A extração de DNA seguiu o protocolo de CTAB (*Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) segundo a metodologia de Doyle e Doyle (1987) com modificações. As

folhas de cada indivíduo foram higienizadas com solução de hipoclorito de sódio a 2%, enxaguadas com água destilada e secas, posteriormente maceradas em nitrogênio líquido. Foram utilizados cerca de 200 mg do material macerado para cada indivíduo e adicionaram-se 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, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 30 min, agitando-se a cada 10 min; após esse período, esfriou-se em temperatura ambiente. Adicionaram-se 600 µL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e posteriormente homogeneizado por inversão por 5 min e centrifugado a 13000 rpm por 6 min. A fase aquosa superior foi retirada e transferida para outro microtubo onde foram adicionados 600 µL de isopropanol gelado e agitado por inversão. Incubou-se em freezer -80°C por 1h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 12 min a 12000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol 70% por duas vezes e com etanol 95% uma vez, realizando a centrifugação por 3 min a cada lavagem. Os tubos foram secos em temperatura ambiente por 20 min e o *pellet* foi ressuspensionado com 50 µL 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.

A verificação da qualidade do DNA foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (10 mg/mmol) e a análise da concentração e pureza foi verificada por meio de quantificação em nanofotômetro DS-11 (Denovix®).

3.3 Genotipagem dos marcadores

3.3.1 Marcadores microssatélites transferíveis

Foram utilizados sete marcadores microssatélites de *Eucalyptus* spp. derivados de EST (*Expressed Sequence Tags*) desenvolvidos por Grattapaglia *et al.* (2015) e validados em *C. adamantium* por Miranda *et al.* (2016). Os *loci* de microssatélites utilizados e detalhes da PCR (Reação em cadeia da polimerase) foram demonstrados na Tabela 3.

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

LOCUS	Repetição	Sequência dos Primers	NA	T	TA	MF
EMBRA 1335	(GTT) ₅	F-5'-TTGCTCCCATGATTACTCCC-3' R-5'-GTCTTCATCCTGGCAAGAGC-3'	GF101881.1	56	314/338	HEX
EMBRA 1076	(AGG) ₄	F-5'-GCTGAACCTGATGGACCAGT-3' R-5'-CTTAGGGACCACCACCTTGA-3'	GF110053.1	56	313/331	HEX
EMBRA 1470	(AG) ₁₀	F-5'-GCCAACCCCTCTAAAAGACC-3' R-5'-CAACTGCTACGACGTCCAAA-3'	GF110178.1	56	321/325	FAM
EMBRA 1364	(CTCC) ₁₅	F-5'-CGTTTTTCGCTCCTCTCTCTC-3' R-5'-TGTAGAGATCGGGGTCCTTG-3'	GF101858.1	59	305/345	FAM
EMBRA 1363	(GCC) ₁₅	F-5'-CCATAGCCCTCTGCTGATTC-3' R-5'-AATGGAAAATGGGTTCCTCC-3'	GF101882.1	58	304/322	HEX
EMBRA 1374	(CGCCGT) ₂₆	F-5'-GTCTGAACTCGGCTTCCTTG-3' R-5'-TTCTTCCCGTTGTAAATCCG-3'	GF101859.1	55	354/384	FAM
EMBRA 1811	(CTCCTG) ₂₆	F-5'-GTCGAGTTGAGTTCGCTTCC-3' R-5'-AGTGAATCGGGAGAGGAGGT-3'	GF101862.1	62	199/203	NED

NA: Número de acesso dos *loci* de microssatélites obtidos do GenBank no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*); T: Temperatura de anelamento (°C); TA: tamanho dos alelos (pb); MF: marcador de fluorescência do *primer*.

Fonte: Adaptado de Miranda *et al.* (2016).

As amostras foram preparadas para um volume final igual a 10 μ L, onde foram adicionados 7,5 ng de DNA, 0,22 μ M de primers (*foward+reverse*), 0,23 μ M 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. As reações de PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) e as etapas consistiram em: 94°C por 5 min para a desnaturação do DNA; 35 ciclos de 94°C por 30 s; 1 min para o anelamento dos primers (temperatura específica para cada um), 72°C por 1 min, e por fim extensão final a 72°C por 45 min.

Para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o sequenciador automático ABI-3500 (Applied Biosystems), por meio de corantes de fluorescência e detecção por feixe de laser. E, para a discriminação dos alelos foi usado *software* GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems) (MIRANDA *et al.* 2016).

3.3.2 Marcadores microssatélites espécie-específicos

Para a amplificação por PCR dos microssatélites espécie-específicos, foram utilizados dez marcadores microssatélites espécie-específicos desenvolvidos por meio de biblioteca genômica enriquecida em SSR por Crispim *et al.* (2019). Os *loci* de microssatélites utilizados foram demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Marcadores microssatélites espécie-específicos utilizados e detalhes de amplificação por PCR.

LOCUS	Repetição	Sequência dos Primers	NA	T	TA
CAMP 1	(TG) ₁₆	F 5'-TATCAAGTCACGAAGGTGGG-3' R 5'-TGGCAAGTATATCCTGCTCA-3'	MF280931.1	60	128/172
CAMP 3	(TG) ₈	F 5'-GTTGGCTCAACAGTTAGCAG-3' R 5'-TCTAGAACTCGGCATTTCCC-3'	MF280933.1	60	144/178
CAMP 4	(GA) ₁₀ (CA) ₆	F 5'-CTTAATGCACATCCGCAACA-3' R 5'-GGATGAATTATGTCACGACACA-3'	MF280934.1	60	202/240
CAMP 8	(TC) ₂₄	F 5'-AATAGCTTCCAGACTGCTCC-3' R 5'-AAAAGAGAATTTGGAGCGCC-3'	MF280938.1	60	228/266
CAMP 13	(TG) ₈	F 5'-AGTCGAGTGGGCTCTAGTAT-3' R 5'-ATGTGCTGCTCAGAAAGAGT-3'	MF280943.1	60	210/240
CAMP 17	(AC) ₉	F 5'-TCATCTTCGGCTACATAACGT-3' R 5'-TCCATGCCTTTTCCTCTTTAGA-3'	MF280947.1	60	112/138
CAMP 24	(TG) ₇	F 5'-CAAGTCCTACATGGCTGGAT-3' R 5'-AGTGCACGAAAACCTGGTCTA-3'	MF280954.1	60	222/264
CAMP 25	(TG) ₉	F 5'-TCCATGCCTTTTCCTCTTTAGA-3' R 5'-TCATCTTCGGCTACATAACGT-3'	MF280955.1	60	118/138
CAMP 28	(GA) ₂₁	F 5'-CGTGATGAAGAGTGATGGGA-3' R 5'-TCATTGATAACTGCGGGTGA-3'	MF280958.1	60	190/226
CAMP 36	(CA) ₅	F 5'-TCCCAAACACTTCTGTATGCT-3' R 5'-TGGTTCCTAAGATCTCCCCA-3'	MF280966.1	60	108/128

NA: Número de acesso dos loci de microssatélites obtidos do GenBank no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*); T: Temperatura de anelamento (°C); TA: tamanho dos alelos (pb) com base na genotipagem do Fragment Analyzer.

Fonte: Crispim *et al.* 2019

A amplificação dos marcadores foi realizada em volume final de 10 μL , sendo 4,2 μL de água ultrapura (Integrated DNA Technologies, Inc.), 0,9 μL (10 pmol/ μL) dos *primers forward e reverse* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 3 μL de 5X FIREPol[®] Master MIX (Solis BioDyne, Tartus, Estônia) e 10 ng de DNA. O protocolo da PCR consistiu em um passo inicial à 94°C por 6 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min e, extensão final a 72°C por 10 min. A amplificação das amostras foi realizada usando o termociclador MyCyclerTM thermal cycler (BIORAD[®]).

Após a amplificação, os produtos da PCR foram preparados para a corrida na eletroforese capilar no equipamento Fragment Analyzer (Advanced Analytical Technologies, Inc.), utilizando-se o kit de genotipagem DNF-905-55 (DNA 1-500 pb). A genotipagem foi realizada em parceria com o Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento na Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz (ESALQ/USP Piracicaba), onde foi disponibilizado o equipamento Fragment Analyzer para a utilização.

Utilizaram-se 5 μL do produto amplificado de cada amostra, onde foram colocados em uma placa de 96 poços e adicionados 19 μL de Dilution Buffer, totalizando um volume de 24 μL . O último poço da placa foi reservado para o marcador de peso molecular (24 μL). Foram utilizadas duas placas com 96 poços de 1 mL, onde em uma adicionou-se em todos os seus poços 1 mL de solução tampão Inlet Buffer 5X 930 dsDNA (20 mL da solução + 80 mL de água ultrapura) e em outra placa preparou-se a solução do marcador com tamanho de 1-500 pb (30 μL da solução do marcador + 20 μL de óleo mineral).

As placas foram colocadas no equipamento Fragment Analyzer da seguinte maneira: na gaveta W foi colocada uma placa de 96 poços de 1 mL vazia para ser utilizada como descarte dos capilares (*waste*); na gaveta B colocou-se a placa do tampão (*buffer*); na gaveta M foi colocada a placa do marcador (*ladder*); e nas gavetas 1 e 2, as placas com as amostras.

Para a corrida de cada placa foram utilizados 40 mL da solução de gel (adicionando-se 4 μL do corante/dye) e 40 mL da solução condicionante (8 mL da solução condicionante + 32 mL de água ultra-pura), que também foram devidamente colocadas no equipamento.

Para as análises da eletroforese capilar foi utilizado o *software* Fragment Analyzer. A opção para 96 capilares e o kit DNF-905-55 1-500 pb foi selecionada e iniciou-se a corrida. A injeção das amostras foi feita a 7,5 kV por 7 s e a corrida de separação por 9 kV por 80 min. O software PROSize[®] Data Analysis (versão 2.0) foi utilizado para visualizar e analisar os alelos, além de gerar o arquivo com os dados de cada amostra.

3.4 Análises de dados

A diversidade genética das populações foi analisada por meio dos seguintes parâmetros para os conjuntos de marcadores microssatélites transferíveis e espécie-específicos: número médio de alelos (N), heterozigosidade esperada (H_E), heterozigosidade observada (H_O), riqueza alélica (RA), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e número de *loci* em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Para o cálculo de riqueza alélica (RA) foi utilizado o *software* FSTAT e para os demais parâmetros foram utilizados dois *software*: GenAlEx versão 6.5 e R versão 3.4.4 (R Development Core Team, 2019), utilizando os pacotes adegenet (Jombart, 2008), poppr (Kamvar *et al.*, 2014), diveRsity (Keenan *et al.*, 2013) e PopGenKit (Rioux Paquette, 2011). Para o teste de significância foi utilizado o teste exato de Fisher, Teste t e intervalos de confiança ao nível de 95% de probabilidade.

4. RESULTADOS

A quantidade e pureza do DNA genômico obtido foram satisfatórios para a realização da PCR e posterior genotipagem dos marcadores microssatélites.

Na Tabela 5 estão os resultados referentes às análises estatísticas para os dois conjuntos de marcadores microssatélites, transferíveis e espécie-específicos, para todas as populações de *C. adamantium* estudadas.

Tabela 5. Variação genética de microssatélites transferíveis e espécie-específicos nas populações de *Campomanesia adamantium*.

Marcadores microssatélites transferíveis							
	N	NA	RA	HE	HO	FIS	HWE
EMBRA 1335	124	3	4,00	0,50	0,98	-0,937	0,000***
EMBRA 1076	124	4	2,91	0,42	0,53	-0,242	0,027*
EMBRA 1470	112	9	5,90	0,83	0,76	0,078	0,002**
EMBRA 1364	119	20	19,76	0,91	0,77	0,152	0,000***
EMBRA 1363	118	10	9,00	0,77	0,66	0,134	0,000***
EMBRA 1374	124	8	9,94	0,44	0,22	0,494	0,000***
EMBRA 1811	124	6	7,69	0,55	0,60	-0,087	0,000***
MÉDIA±	120,70	8,57±	8,45±	0,63±	0,65±	-0,05±	
DP	± 1,75	2,13	5,18	0,07	0,09	0,17	
Marcadores microssatélites espécie-específicos							
CAMP 1	115	20	19,66	0,89	0,37	0,583	0,000***
CAMP 3	111	15	14,61	0,88	0,70	0,207	0,000***
CAMP 4	123	15	13,65	0,87	0,71	0,185	0,000***
CAMP 8	111	16	15,73	0,83	0,30	0,632	0,000***
CAMP 13	110	15	14,96	0,89	0,25	0,717	0,000***
CAMP 17	122	14	13,31	0,82	0,68	0,171	0,000***
CAMP 24	123	17	16,10	0,88	0,48	0,451	0,000***
CAMP 25	121	12	11,40	0,80	0,63	0,208	0,000***
CAMP 28	90	19	18,00	0,90	0,23	0,742	0,000***
CAMP 36	97	9	8,92	0,83	0,63	0,233	0,000***
MÉDIA±	112,30	15,20±	14,60±	0,86±	0,50±	0,41±	0,07
DP	± 3,56	1,00	2,93	0,01	0,06		

Para ambos os conjuntos de marcadores microssatélites foram genotipados 124 indivíduos de *C. adamantium*.

Teste Exato de Fisher significativo para as proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg (* P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001).

N: número de indivíduos; NA: número médio de alelos; HE: heterozigosidade esperada; HO: heterozigosidade observada; RA: riqueza alélica; FIS: coeficiente de endogamia; HWE: equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Todos os sete *loci* de microssatélites transferíveis apresentaram polimorfismo, resultando em um total de 60 alelos. Os valores médios de alelos por *loci* e riqueza alélica foram de 8,57 e 8,45, respectivamente, sendo o marcador EMBRA 1364 o que teve maiores valores (20 e 19,36, respectivamente), diferente do marcador EMBRA 1335, que apresentou os menores valores (3 e 2,91, respectivamente). Os resultados de heterozigosidade esperada e observada revelaram médias similares, onde a HE exibiu uma média de 0,63 e a HO 0,65. A maioria dos marcadores apresentaram coeficiente de endogamia positivo, exceto EMBRA 1335, EMBRA 1076 e EMBRA 1811. Para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, todos os *loci* foram significativos pelo Teste Exato de Fisher, portanto nenhum *locus* encontra-se em equilíbrio.

Os dez *loci* de marcadores microssatélites espécie-específicos também se mostraram polimórficos, apresentando um total de 152 alelos e uma média de 15,20 de número de alelos e 14,60 de riqueza alélica. O *locus* CAMP 1 foi o que exibiu maior polimorfismo (20) e também maior riqueza alélica (19,66), já o *locus* menos polimórfico foi o CAMP 36 (9), que também mostrou uma menor riqueza alélica (8,92). Foi observada maior média para HE quando comparado a HO, sendo 0,86 e 0,50, respectivamente. Todos os *loci* foram positivos para o coeficiente de endogamia e significativos para o Teste Exato de Fisher no Equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo assim, não apresentaram equilíbrio.

Na Figura 5 encontram-se as médias de cada parâmetro para os dois conjuntos de marcadores microssatélites, para todas as populações de *C. adamantium* estudadas.

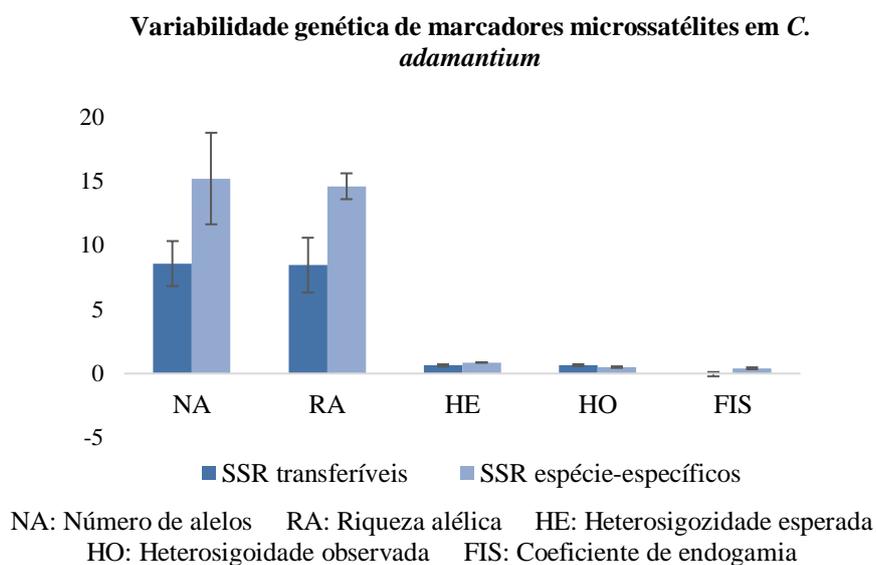


Figura 5. Variabilidade genética de 10 marcadores microssatélites transferíveis e 7 espécie-específicos em populações de *C. adamantium*.

Quando observadas as médias dos parâmetros para os dois marcadores, é possível notar diferenças significativas entre eles. Os marcadores espécie-específicos apresentaram médias superiores nos parâmetros NA, RA, HE e FIS (15,20, 14,60, 0,86 e 0,41, respectivamente) em relação aos transferíveis (8,57, 8,45, 0,63 e -0,05, respectivamente), sendo estatisticamente diferentes pelo teste t ($p < 0,05$). Apenas a média do parâmetro de HE foi superior para os marcadores transferíveis (0,65) em comparação aos espécie-específicos (0,50), no entanto foram estatisticamente iguais pelo teste t ($p > 0,05$).

Na Tabela 6 encontram-se os resultados das análises de diversidade genética para as cinco populações de *C. adamantium* e para os dois conjuntos de marcadores microssatélites.

Tabela 6. Estimativas de variabilidade genética para as cinco populações de *Campomanesia adamantium* utilizando marcadores microssatélites espécie-específicos e transferíveis.

Marcadores microssatélites transferíveis							
POP	N	NA	RA (IC 95%)	HE (IC 95%)	HO (IC 95%)	FIS (IC 95%)	HWE
BO	168	4,3	5,56 (5,00 – 6,00)	0,63 (0,58 – 0,64)	0,71 (0,65 – 0,77)	- 0,13 (-0,22 – -0,04)	4
JD	176	4,1	5,19 (4,57 – 5,71)	0,53 (0,57 – 0,64)	0,72 (0,65 – 0,78)	- 0,14 (-0,22 – -0,07)	4
CC	163	4,0	5,18 (4,57 – 5,57)	0,61 (0,55 – 0,63)	0,59 (0,52 – 0,65)	0,03 (-0,07 – 0,12)	3
PP	173	3,7	4,75 (4,28 – 4,14)	0,60 (0,55 – 0,61)	0,63 (0,57 – 0,67)	- 0,04 (-0,14 – 0,06)	4
DO	165	3,6	4,58 (3,86 – 5,14)	0,59 (0,53 – 0,61)	0,61 (0,55 – 0,65)	- 0,03 (-0,18 – 0,08)	1
Marcadores microssatélites espécie-específicos							
BO	225	9,4	8,28 (7,30 – 9,00)	0,82 (0,75 – 0,82)	0,51 (0,43 – 0,59)	0,37 (0,28 – 0,46)	7
JD	238	10,5	8,98 (7,90 – 9,80)	0,85 (0,79 – 0,84)	0,58 (0,51 – 0,64)	0,32 (0,24 – 0,38)	3
CC	215	9,6	8,25 (7,40 – 9,00)	0,83 (0,78 – 0,82)	0,50 (0,40 – 0,59)	0,40 (0,28 – 0,51)	2
PP	212	9,8	8,24 (7,40 – 9,00)	0,83 (0,77 – 0,83)	0,53 (0,46 – 0,60)	0,37 (0,28 – 0,45)	4
DO	233	9,0	7,47 (6,50 – 8,30)	0,80 (0,73 – 0,80)	0,40 (0,32 – 0,46)	0,50 (0,41 – 0,58)	1

N: número de indivíduos; NA: número médio de alelos; H_E: heterozigossidade esperada; H_o: heterozigossidade observada; RA: riqueza alélica; FIS: coeficiente de endogamia; HWE: Número de loci no equilíbrio de Hardy Weinberg; IC: intervalo de confiança à 95%. Populações: BO (Bonito); JD (Jardim); CC (Cerro Corá); PP (Ponta Porã); DO (Dourados).

Em relação às populações avaliadas utilizando microssatélites transferíveis, a população de Bonito foi a que apresentou maior número médio de alelos por *locus* (4,3) e maior riqueza alélica (5,56), ao contrário de Dourados, cuja a população apresentou os menores valores (3,6 e 4,58, respectivamente) (Tabela 6, Figura 5). A heterozigosidade esperada e observada das populações variou de 0,53 a 0,63 para HE e 0,71 a 0,59 para HO. Considerando parâmetro de coeficiente de endogamia (FIS), os resultados foram negativos para todas as populações, exceto para a de Cerro Corá (0,03). As populações de Bonito, Jardim e Ponta Porã foram as que revelaram maior número de *loci* em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (4) e a de Dourados foi a que exibiu menor número de *loci* em equilíbrio (1).

Para as análises de variabilidade genética utilizando microssatélites espécie-específicos, a população que apresentou maior número médio de alelos e maior riqueza alélica foi a de Jardim (10,5 e 8,98, respectivamente). Diferente de Dourados, que continuou apresentando menores resultados em relação ao número de alelos e riqueza alélica (9,0 e 7,47, respectivamente). Heterozigosidade esperada variou de 0,80 a 0,85 e heterozigosidade observada de 0,40 a 0,58, onde Jardim mostrou a maior média para a HE e HO (0,85 e 0,58, respectivamente) e Dourados menor (0,80 e 0,40, respectivamente). O coeficiente de endogamia foi positivo para todas as populações, sendo a maior média para Dourados (0,50) e menor para Jardim (0,32). Todas as populações apresentaram pelo menos um *loci* em Equilíbrio de Hardy-Weinberg, no entanto, a população de Bonito foi a que exibiu maior número (7) entre os 10 *loci* estudados.

Na Figura 6 encontram-se as médias de diversidade genética das cinco populações de *C. adamantium* para os dois conjuntos de marcadores microssatélites.

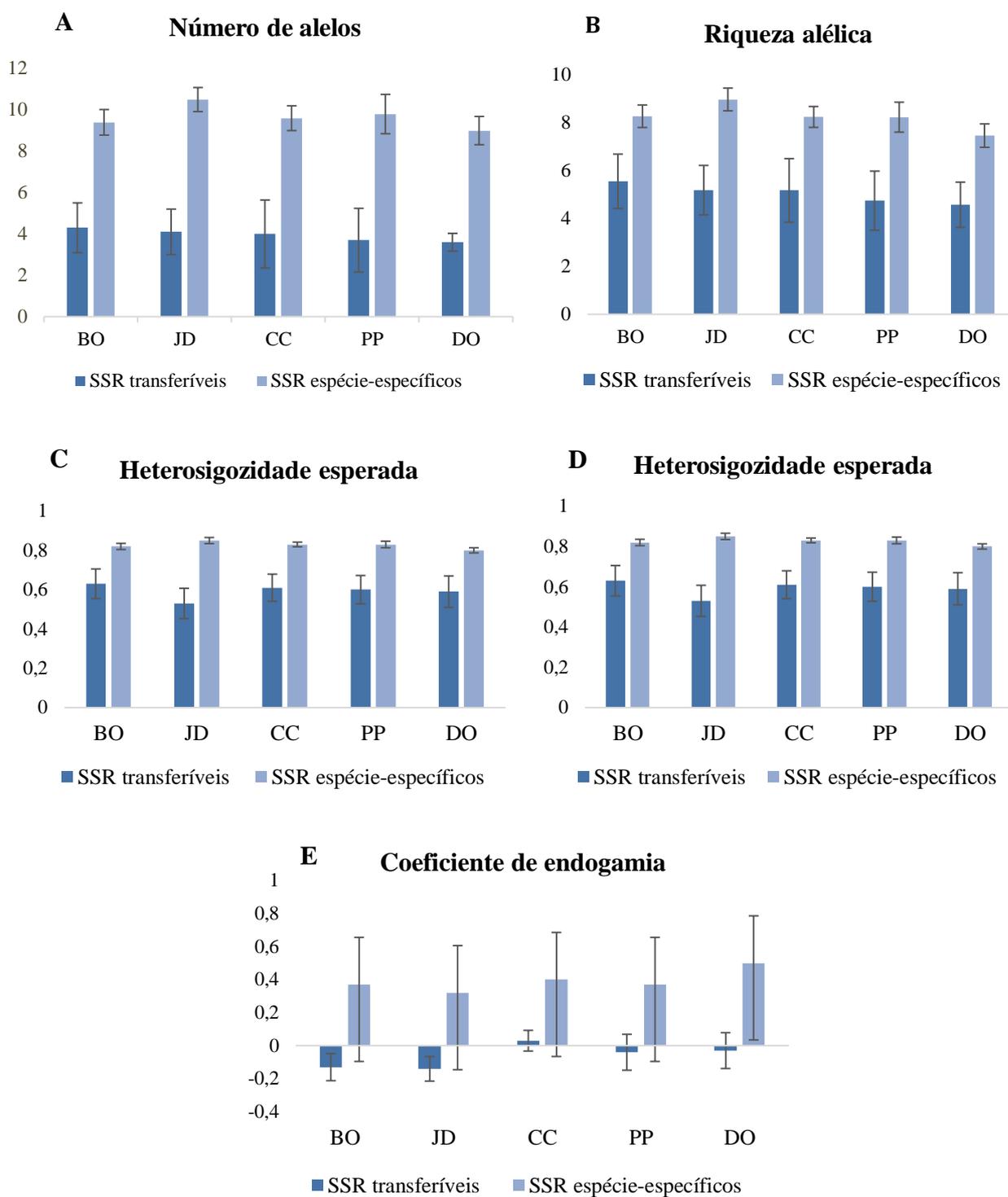


Figura 6. Variabilidade genética de marcadores microssatélites transferíveis e espécie-específicos em 5 populações de *C. adamantium*. A) Número de alelos. B) Riqueza alélica. C) Heterosigozidade esperada. D) Heterosigozidade observada. E) Coeficiente de endogamia. Populações: BO (Bonito); JD (Jardim); CC (Cerro Corá); PP (Ponta Porã); DO (Dourados).

Analisando individualmente cada população por marcador, os resultados das médias foram superiores para os marcadores espécie-específicos em todos os parâmetros, com 95%

de confiança que as médias dos dois marcadores foram diferentes. Apenas o parâmetro de HO para a população de Cerro Corá não apresentou diferença estatística, havendo uma sobreposição dos intervalos de confiança.

5. DISCUSSÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, sua biodiversidade ainda é pouco conhecida, tornando estudos referentes a variabilidade genética que utilizem marcadores moleculares importantes para a compreensão de processo evolutivos que ocorrem em uma população, além de fornecer informações para estratégias de manejo, conservação e melhoramento (BUENO *et.al.* 2018).

No presente estudo as análises de diversidade genética em cinco populações de *C. adamantium* utilizando os marcadores microssatélites transferíveis e espécie-específicos apresentaram resultados distintos, em que os marcadores espécie-específicos mostraram maior variabilidade genética quando comparado aos transferíveis (Tabela 5 e Figura 5). Souza (2018) analisou a diversidade genética de *Hevea brasiliensis*, *H. pauciflora* e *H. rigidifolia* utilizando microssatélites espécie-específicos de *H. brasiliensis* e obteve um número de alelos total superior quando utilizado para a espécie no qual o marcador foi desenvolvido (348) e inferior para *H. pauciflora* (105) e *H. rigidifolia* (16), diferença entre as duas últimas resultante ao número de acessos. Resultados similares também ocorreram em pesquisas realizadas por Priori *et al.* (2013), que transferiram os microssatélites de *Cucurbita pepo* para *C. argyrosperma* e *C. ficifolia*. Apresentando maior variabilidade genética para a espécie *C. pepo* comparada as outras. Segundo Queirós *et al.* (2015), devido aos marcadores transferíveis exibirem polimorfismos apenas em regiões genômicas, sua utilização pode limitar a detecção de diversidade genética.

A diversidade genética foi investigada utilizando os parâmetros: número médio de alelos, riqueza alélica, heterozigosidade esperada e observada, coeficiente de endogamia e equilíbrio de Hardy-Weinberg. As análises foram feitas por marcador (transferíveis e espécie-específicos) e por populações (Bonito, Jardim, Cerro Corá, Ponta Porã e Dourados).

A diferença no número médio de alelos entre os marcadores microssatélites transferíveis (8,56) e espécie-específicos (15,20) pode estar relacionada ao grau de polimorfismo destes marcadores. Estudos tem mostrado que marcadores derivados de EST tendem a apresentar menor polimorfismo quando comparado aos marcadores espécie-específicos (FERREIRA NETO, 2008; SOUSA *et al.* 2019). Segundo Vieira *et al* (2016), quanto maior a repetição, maior a frequência de mutação e, conseqüentemente há a formação de diferentes alelos em um determinado *locus* caso não haja mecanismo de reparo do DNA nestas alterações.

A média do número de alelos para os marcadores transferíveis nesta pesquisa foi superior (8,57) ao estudo de Miranda *et al.* (2016) (6,83), que validaram marcadores específicos de *Eucalyptus* sp. em *C. adamantium*, sendo que 7 destes transferíveis foram utilizados neste estudo. Essa diferença pode ser explicada devido ao número amostral, visto que Miranda *et al.* (2016) utilizaram menores números amostrais (40) e apenas duas populações do estado de Goiás, inferior ao presente estudo, onde foram utilizadas 124 amostras em 5 populações de *C. adamantium*. Além disso utilizaram maior número de marcadores microssatélites (12), quando comparado ao nosso estudo (7).

A diversidade média de alelos por *locus* é avaliada por meio da riqueza alélica, que corresponde ao número de diferentes alelos que segregam um determinado *locus*. Parâmetro importante para tomadas de decisões nos programas de conservação, pois pode indicar como deve ser direcionado o fluxo gênico de uma população. Os marcadores microssatélites que exibiram maior média de riqueza alélica foram os espécie-específicos, além de apresentarem também maior média heterozigosidade esperada (14,60 e 0,86, respectivamente) em relação aos marcadores transferíveis (8,45 e 0,63, respectivamente). Dessa maneira, quanto maior riqueza alélica, maior a probabilidade de ocorrência de um indivíduo heterozigoto (MELO *et al.* 2012; SERROTE *et al.* 2015; FERREIRA NETO, 2016).

No entanto, para o parâmetro de heterozigosidade observada, a média para os espécie-específicos foi inferior aos dos transferíveis (0,50 e 0,65, respectivamente), resultando em um coeficiente de endogamia positivo para os espécie-específicos e negativo para os transferíveis (0,41 e -0,05, respectivamente). O cálculo do coeficiente de endogamia (FIS) pode variar de -1 a 1, onde de -1 a 0 indica maiores níveis de heterozigotos e acasalamento ao acaso, quando comparados a valores de 0 a 1, que aponta menores níveis de heterozigotos. Sendo assim, os marcadores espécie-específicos apresentaram maior endogamia quando comparado aos transferíveis, mostrando maiores níveis de homozigotos (RODRIGUES, 2015; CAMACHO, 2016).

Todos os *loci* microssatélites foram significativos para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto para os marcadores transferíveis quanto para os espécie-específicos. Resultando em um desequilíbrio, onde as populações podem estar sofrendo processos evolutivos, assim, os alelos não irão permanecer constantes nas próximas gerações. No entanto, esse resultado é esperado quando se calcula por *locus* e todas as populações como uma só (LOPERA-BARRERO *et al.* 2010).

Conforme o exposto, marcadores espécie-específicos podem revelar de uma maneira mais fidedigna a variabilidade genética de uma população, observada pelas diferenças entre os parâmetros populacionais que foram avaliados no presente estudo.

Em relação as análises de diversidade genética das populações de Bonito, Jardim, Cerro Corá, Ponta Porã e Dourados para os marcadores transferíveis e espécie-específicos, também foi possível observar diferenças nos resultados relacionados aos parâmetros analisados (Tabela 6 e Figura 6).

A população de Dourados foi a que apresentou menor número de alelos (NA) em relação às outras, tanto para os marcadores transferíveis quanto para os espécie-específicos (9,0 e 3,6, respectivamente). Também foi observada riqueza alélica (RA) inferior às outras populações (7,87 para os espécie-específicos e 4,58 para os transferíveis). Diferentemente, as populações de Bonito e Jardim apresentaram maior número de alelos e riqueza alélica para os marcadores transferíveis e espécie-específicos, respectivamente (NA 4,3 e RA 5,56, para os marcadores transferíveis, NA 10,5 e RA 8,98 para os espécie-específicos).

Essas diferenças podem estar relacionadas à localização das populações de *C. adamantium*, sendo que as de Dourados estavam próximo a áreas agrícolas, o que pode ter afetado sua variabilidade genética. Por outro lado, as de Bonito e Jardim estavam localizadas em áreas de reserva ambiental, onde há preservação dos recursos naturais com pouca ou quase nenhuma influência antrópica, importantes para a conservação e reabilitação dos processos ecológicos, preservando o fluxo gênico da flora e fauna (CAMPANILI e SCHÄFFER, 2010).

Para os marcadores transferíveis, a população de Cerro Corá foi a única que apresentou heterozigosidade observada (HO), inferior à heterozigosidade esperada (HE) (0,59 e 0,61, respectivamente), exibindo coeficiente de endogamia positivo (FIS) (0,03), diferente das outras populações, que apresentaram HO superior a HE e FIS negativo. Para os marcadores espécie-específicos, todas exibiram um HO inferior a HE, apresentando FIS positivo para todas as populações, o que indica maiores níveis de endogamia resultantes da baixa diversidade genética (RODRIGUES, 2015; CAMACHO, 2016).

A endogamia revelada pelos marcadores espécie-específicos pode ser resultante do aumento da fragmentação florestal, em decorrência a ocupação humana e atividades antrópicas, causando redução e divisão de habitat. Sendo estes, fatores que ocasionam a diminuição de polinizadores e dispersores de sementes e promovem o aumento da probabilidade do acasalamento entre indivíduos aparentados. Esse fato resulta em aumento

de homozigose que provoca a redução de vigor, adaptação e capacidade de sobrevivência, tornando indispensável a manutenção do fluxo gênico para a conservação das espécies (GOMES e MOURA, 2010)

Apesar da *C. adamantium* ser autoincompatível, formando frutos somente após a polinização cruzada, sendo a polinização por xenogamia mais predominante (flores pertencentes a plantas distintas), também foi constatada a ocorrência de polinização por geitonogamia (flores pertencentes à mesma planta) e reprodução vegetativa. Esses sistemas reprodutivos aumentam a taxa de endogamia da espécie. Dessa forma, a endogamia relatada pode ser devido a esses fatores, sendo a ocorrência de reprodução vegetativa consequência da intensificação da agricultura e exposição dos polinizadores a agrotóxicos, prejudicando a polinização natural, levando a espécie a se reproduzir por meio de brotamentos, ocasionando endogamia e confirmando os resultados vistos no presente estudo (GOULSON *et al.* 2015; NUCCI *et al.* 2017; FERNANDES, 2019).

Portanto, análises de diversidade utilizando marcadores transferíveis podem não mostrar a situação real referente à variabilidade genética, o que pode ser devido à limitação na detecção, pelo fato de os marcadores transferíveis apresentarem polimorfismos apenas nas regiões genômicas, conduzindo à ocultação de dados (Crispim *et al.* 2019). Desta forma, o uso de marcadores espécie-específicos refletiu melhor fidedignidade de diferentes parâmetros (número de alelos, riqueza alélica, heterozigosidade esperada e observada, coeficiente de endogamia e equilíbrio de Hardy-Weinberg) para mensurar a variabilidade genética de *C. adamantium*.

6. CONCLUSÃO

Análises utilizando marcadores microssatélites transferíveis e espécie-específicos permitiram estimar parâmetros de diversidade genética em populações de *Campomanesia adamantium*. No entanto, apesar de ambos os marcadores terem apresentado diversidade genética, os marcadores espécie-específicos foram os que mostraram maior fidedignidade nos resultados desta espécie quando comparado aos transferíveis. Portanto, torna-se relevante a necessidade de desenvolvimento de marcadores espécie-específicos para avaliar a variabilidade genética de uma determinada espécie.

7. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 4, p. 617-631, 2008.
- AGUIAR, J. L. N., *et al.* RAPD-PCR na identificação molecular de plantas medicinais regulamentadas pelo Sistema Único de Saúde do Brasil. 2015.
- ALCÁNTARA, M. R. Breve revisión de los marcadores moleculares. **Ecología molecular**, p. 541-566, 2007.
- ARAÚJO, E. F. L.; SOUZA, E. R. B. Phenology and reproduction of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n. 2, p. 166-175, 2018.
- BARATELI, L. O., *et al.* Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão-Fabaceae). 2018.
- BARBARÁ, T., *et al.* Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 18, p. 3759-3767, 2007.
- BARBOSA, A. C. O. F., *et al.* Estrutura genética e sistema de cruzamento em *Eugenia dysenterica* DC.(Mvrtaceae). 2014.
- BERNARDES, V., *et al.* Isolamento, caracterização e transferibilidade de marcadores microssatélites de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. (Malpighiaceae). 2014.
- BILLOTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v.54, p.277-88, 1999
- BITTERCOURT, C. B. Estudo de diversidade genética em populações naturais de *Pilocarpus* spp. da região nordeste setentrional por meio de marcadores ISSR e RAPD. 2020.
- BRASIL; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas: cerrado. 2011.
- BUENO, M. L., *et al.* Flora arbórea do Cerrado de Mato Grosso do Sul. Iheringia. **Série Botânica.**, v. 73, p. 53-64, 2018.
- CAMACHO, L. M. D. Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da diversidade genética de populações de *Chrysoleaena obovata* (asteraceae). 2016. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica.
- CAMPANILI, M.; SCHÄFFER, W. B. Mata Atlântica: manual de adequação ambiental. 2010.
- CAMPOS, J. F., *et al.* Perfil químico e potencial farmacológico de *Senna velutina* (Fabaceae) e *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). 2018.

CRISPIM, B. A., *et al.* Development and characterization of microsatellite markers in *Campomanesia adamantium*, a native plant of the Cerrado ecoregions of South America. **Applications in Plant Sciences**, v. 7, n. 9, p. e11287, 2019.

DE AGUIAR, M. S. Marcadores moleculares como ferramenta no melhoramento genético de plantas. marcadores moleculares, p. 10, 2012.

DE SOUZA, C. S. Caracterização da diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de seringueira. Embrapa Acre-Tese/dissertação (ALICE), 2018.

DE SOUZA, J. C., *et al.* Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. **Nutritional neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 23-31, 2017.

DIAZ, V. S. Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) em dois fragmentos florestais na área de entorno do Parque Nacional do Iguazu. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DURIGAN, G. Manual para recuperação da vegetação de cerrado. São Paulo, 2011, 19f. 3.ed.rev.

DURIGAN, G. Plantas pequenas do cerrado: biodiversidade negligenciada. Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, Instituto Florestal, 2018.

ERTEKIN, M. Genetic diversity of seed orchard crops. **The molecular basis of plant genetic diversity**, p. 165-180, 2012.

FALEIRO, F. G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.

FALEIRO, F. G.; DE ANDRADE, S. R. M.; DOS REIS JUNIOR, F. B. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. **Embrapa Cerrados-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2011.

FERNANDES, J. S. Diversidade genética em *Campomanesia adamantium* (myrtaceae) e implicações da fragmentação do Cerrado sobre a variabilidade da espécie. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) - Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

FERRÃO, L. F. V. Marcadores microssatélites em estudo de diversidade, mapeamento genético e análises de QTLs em *Coffea canephora*. 2013.

FERREIRA NETO, C. A. Análise de estrutura genética de populações de *Canthon (Peltecanthon) sataigi* (Coleoptera) no domínio de Mata Atlântica. 2016.

FERREIRA NETO, J. R. C. Análise *IN SILICO* DE EST-SSR em *Phaseolus vulgaris* E *Glycine max* E Transferibilidade de Marcadores para *Vigna unguiculata*. 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

FERREIRA, L. C., *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 100-108, 2013.

FIDELIS, A.; PIVELLO, V. R. Deve-se usar o fogo como instrumento de manejo no Cerrado e Campos Sulinos? **Biodiversidade Brasileira-BioBrasil**, n. 2, p. 12-25, 2011.

FORTES, A. C. R., *et al.* Transferibilidade de locos microssatélites desenvolvidos em outras espécies de palmeiras para *Astrocaryum vulgare* Mart. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 59, n. 1, p. 80-86, 2016.

FORZZA, R. C., *et al.* New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. **BioScience**, v. 62, n. 1, p. 39-45, 2012.

FRANKHAM, R.; BRADSHAW, C. JA; BROOK, B. W. Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses. **Biological Conservation**, v. 170, p. 56-63, 2014.

GIBBON, C. A. Diversidade genética, estrutura populacional e conservação de *Cavia magna* (Ximenez, 1980) no extremo sul do Brasil. 2016. Dissertação de Mestrado.

GOMES, C. C.; MOURA, T. M. Estrutura genética em populações de plantas do Cerrado. **Revista Agrotecnologia**, v. 1, p. 33-51, 2010.

GOULSON, D., *et al.* Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.

GRANDO, C. Aspectos da demografia do cajueiro-do-campo (*Anacardium humile*) em áreas de Cerrado do Estado de São Paulo e construção de bibliotecas enriquecidas de microssatélites para a espécie. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GUIMARÃES, C. T., *et al.* Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2009.

KALIA, R. K., *et al.* Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.

KIJAS, J.M., *et al.* Enrichment of microssatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. **Biotechniques**, v.16, 656-662, 1994.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KUHLMANN, M. Frutos e Sementes do Cerrado Atrativos para a Fauna. **Rede de Sementes do Cerrado**. Campus da UnB, Brasília, 2012.360p.

LOPERA-BARRERO, N. M. *et al.* Avaliação genética de populações naturais e de estoques de um programa de repovoamento de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando marcadores microssatélite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 954-963, 2010.

MACIEL, K. J. S., *et al.* Análise da diversidade e divergência genética em clones de *Eucalyptus* spp. potencialmente importantes para Goiás. 2014.

MEDEIROS, J. de D. Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies. 2011.

MELO, A. T. O. Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás; Goiânia, 2012.

MIRANDA, E. A. G. C. Transferibilidade e validação de marcadores microsatélites derivados de EST para duas espécies de *Campomanesia* (Myrtaceae) do Cerrado. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

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, p. 15017658-15017658, 2016.

MORAIS, L. M. F.; CONCEIÇÃO, GM da; NASCIMENTO, J. de M. Família Myrtaceae: Análise morfológica e distribuição geográfica de uma coleção botânica. **Agrarian Academy**, v. 1, n. 1, p. 317-346, 2014.

MOREIRA, R. O. Desenvolvimento de marcadores microsatélites e análise da diversidade e estrutura genética de populações de cambuci (*Campomanesia phaea*). 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NUCCI, M; ALVES-JUNIOR, V. V. Biologia floral e sistema reprodutivo de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) o. Berg-myrtaceae em área de cerrado no sul do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Interciência**, v. 42, n. 2, p. 127-131, 2017.

OLIVEIRA, A. C. B., *et al.* Aplicação técnica de marcadores moleculares no melhoramento de plantas. **Documentos IAC, Campinas: Instituto Agrônomo**, n. 81, 2007.

OLIVEIRA, E. J. Desenvolvimento e uso de marcadores microsatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

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.

PEREZ, C. C. M. Measures of genetic differentiation in simulate populations under inbreeding and divergent selection. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Análises quantitativas e moleculares do Genoma; Biologia das células e dos tecidos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

PRIORI, D., *et al.* Diversidade genética de *Cucurbita pepo*, *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* empregando marcadores microsatélites. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 361-368, 2013.

QUEIRÓS, J., *et al.* Effect of microsatellite selection on individual and population genetic inferences: an empirical study using cross-specific and species-specific amplifications. **Molecular ecology resources**, v. 15, n. 4, p. 747-760, 2015.

RAMOS, D. D.; CARDOSO, C. A. L. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S2, p. 774-776, 2007.

RODRIGUES, E. B., *et al.* Variabilidade genética populacional em variedades botânicas de *Hancornia speciosa* Gomes (*Apocynaceae*): estratégias para conservação no cerrado. 2015.

ROMERO, G.; ADEVA, C.; BATTAD, Z. Genetic fingerprinting: Advancing the frontiers of crop biology research. *Philipp. Sci. Lett*, v. 2, p. 8-13, 2009. SÁ, Stone et al. Phytochemistry and antimicrobial activity of *Campomanesia adamantium*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 3, p. 303-311, 2018.

SANO, S. M.; BRITO, M. A.; RIBEIRO, J. F. Frutas nativas da região centro-oeste do Brasil. **Brasília: Embrapa**, 2006.

SANTOS, A. A. D. A. Levantamento das espécies de plantas ameaçadas do Cerrado. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia), Departamento de biologia, Pontificia Universidade Católica de Goiás, Goiás 2014.

SERROTE, C. M. L., *et al.* Um estudo de simulação a partir de dados de marcadores microsatélites em fragmentos de *Luehea divaricata* mart. & zucc. no bioma Pampa. 2015.

SILVA, L. G. Comportamento e efeito do fogo sobre os ecossistemas do bioma cerrado: modelos baseados em processos. 2018

SILVA, S. M. M., *et al.* Parâmetros genéticos para a conservação de *Hymenaea courbaril* L. na Amazônia Sul-Occidental. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, p. 87-95, 2014.

SOUSA, R. C. B., *et al.* Caracterização de microsatélites e desenvolvimento de marcadores SSR em *Khaya grandifoliola* C. DC. 2019.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 495-503, 2015.

SOUZA, F. P., *et al.* Transferability of heterologous microsatellite primers in *Brycon gouldingi*. **Ciência Rural**, v. 48, n. 11, 2018.

TEIXEIRA, F. F.; ARÁUJO, G. R.; COELHO, R.. Caracterização de acessos do banco de germoplasma de milho com grãos brancos. In: Embrapa Milho e Sorgo-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: **CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO**, 32., 2018, Lavras.

VALLILO, M. I., *et al.* Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 4, p. 805-810, 2006.

VASCONCELOS, A. A. Análise de diversidade genética em populações de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (MYRTACEAE) por meio de marcadores microssatélites transferíveis. 2016.

VIEIRA, M. L. C., *et al.* Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 3, p. 312-328, 2016.

VISCARDI, D. Z., *et al.* Anti-inflammatory, and antinociceptive effects of *Campomanesia adamantium* microencapsulated pulp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 2, p. 220-227, 2017.

ZOLET, A. C. T., *et al.* Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações. 2017.