



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**Variabilidade genética em populações naturais e desenvolvimento de
marcadores microssatélites de *Campomanesia adamantium* O. Berg
(Myrtaceae)**

**DOURADOS - MS
2017**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia

BRUNO DO AMARAL CRISPIM

Variabilidade genética em populações naturais e desenvolvimento de marcadores microssatélites de *Campomanesia adamantium* O. Berg (Myrtaceae)

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados, por Bruno do Amaral Crispim, para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia Ambiental, sob a orientação da Prof^a Dr^a Alexéia Barufatti Grisolia.

DOURADOS-MS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C932v Crispim, Bruno Do Amaral

Variabilidade genética em populações naturais e desenvolvimento de marcadores microssatélites de *Campomanesia adamantium* O. Berg (Myrtaceae) / Bruno Do Amaral Crispim -- Dourados: UFGD, 2017.
45f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Alexeia Barufati Grisolia

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.
Inclui bibliografia

1. biblioteca genômica. 2. genética de populações. 3. SSR. 4. transferibilidade. 5. diversidade genética. I. Título.

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

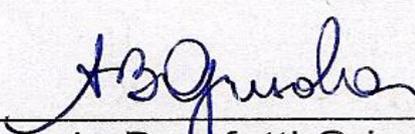
©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

“Variabilidade genética em populações naturais e desenvolvimento de marcadores microssatélites de *Campomanesia adamantium* O. Berg (Myrtaceae)”

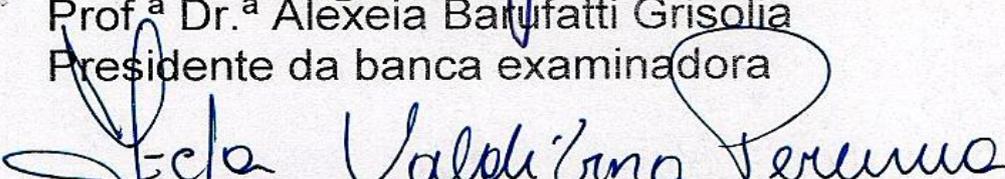
Por

BRUNO DO AMARAL CRISPIM

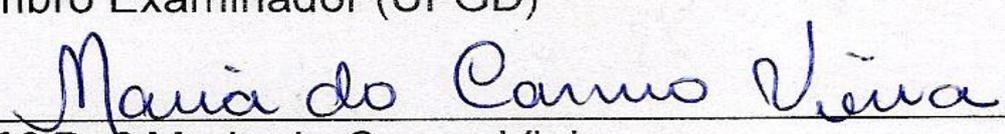
Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL - Área de Concentração: “Ciência Ambiental”



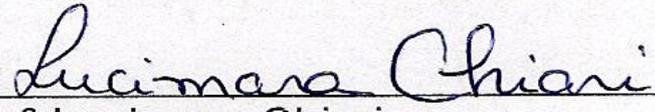
Prof.^a Dr.^a Alexeia Barufatti Grisolia
Presidente da banca examinadora



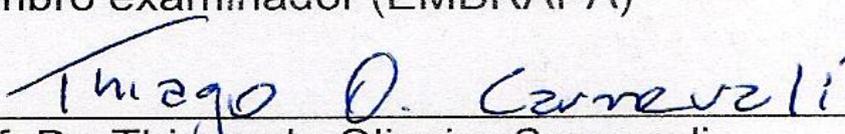
Prof.^a Dr.^a Zefa Valdivina Pereira
Membro Examinador (UFGD)



Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Vieira
Membro Examinador (UFGD)



Prof.^a Dr.^a Lucimara Chiari
Membro examinador (EMBRAPA)



Prof. Dr. Thiago de Oliveira Carnevali
Membro Examinador (UFGD)

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2017

Aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado me fornecendo amparo e ajuda emocional para que eu pudesse seguir sempre com otimismo, força e fé no Senhor nosso Deus.

AGRADECIMENTOS

Esse é um momento que nos tira o peso de tanto trabalho e escrita e nos faz reconhecer o quanto estive cercado de pessoas que compartilharam comigo esta experiência e fizeram dela um processo coletivo.

Antes de agradecer às pessoas que foram significativas para a concretização deste trabalho, agradeço primeiramente a Deus por ter me dado o dom da perseverança. Sim! Agradeço sim a Deus, pois tantas vezes quando o cansaço e o desânimo me abateram eu sentia que Ele cuidava de mim, renovava minhas forças e me fazia persistir diante dos obstáculos.

Agradeço à minha família, sobretudo, à minha mãe, que sempre apoiou os meus sonhos e me incentivou a seguir com os meus projetos em todos os sentidos. Mais do que isso, na escola da vida, ela foi e é a minha maior instrutora: ensinou-me a ser digno, honesto, honrado, corajoso, determinado e a nunca, mas nunca desistir daquilo que me propus a conquistar.

A meus grandes amigos do grupo de pesquisa: Alexandre, André, Ândrea, Adriele, Danielly, Deborah, Héline, Joyce, Juliana Fernandes, Juliana Spósito, Jessica Cristina, Jessica Pereira, Luiza, Marcia, Rafaela Tambasco e Thamiris que durante todos estes anos sempre estiveram ao meu lado, me ajudando, me dando força e coragem para prosseguir, trazendo momentos de descontração e palhaçadas para me alegrarem quando as coisas não estavam indo muito bem, enfim...Foram de extrema importância tê-los como amigos, companheiros e irmãos.

Agradeço aos meus amigos do Programa de pós graduação Nayara Garcia, Nayara Maranhão Heberth, Poliana, Caroline Froes que foram pessoas que puderam desfrutar comigo de muitos momentos de estudos e descontrações e que na hora certa conseguimos superar todos os nossos limites e sonhos que ainda serão alcançados. A todos os meus colegas do Programa de Pós-graduação.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Alexéia Barufatti Grisolia. MUITÍSSIMO Obrigado pela confiança, por ter acreditado em mim e ter me orientado pelo princípio da humanidade e da coerência. Obrigado pelos momentos de descontração, noites escrevendo e o vai e vem de correções de artigos durante madrugadas infinitas, mas sempre com sua paciência em me ajudar e ensinar, fez dessa trajetória um marco importantíssimo na minha vida, uma maravilhosa caminhada de muito esforço, dedicação e trabalhos. A senhora sabe o quanto a concretização de mais essa etapa é significativamente importante em minha vida.

A Profa. Dra. Maria do Carmo Vieira, muito obrigado por ter confiado a mim o desenvolvimento deste maravilhoso projeto ao qual sem seu auxílio financeiro e a logística de

viabilizar as coletas bem como o desenvolvimento do mesmo seria impossível eu estar nesse ponto hoje.

Ao Dr. Thiago de Oliveira Carnevalli por auxílio nas coletas e toda a ajuda na descrição e realização das atividades de campo relacionadas a esse trabalho, sem sua colaboração esse trabalho não seria concretizado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da UFGD reitero não somente os meus agradecimentos, mas o reconhecimento pelos saberes partilhados, pela competência, empenho e dedicação que empreenderam o ofício docente.

Agradeço imensamente a Dr.^a Mariana Campos Teles da Universidade Federal de Goiás Corte, pela tamanha gentileza em me disponibilizar o seu laboratório bem como a sua aluna Ramilla para me auxiliar nas análises dos marcadores utilizados no primeiro artigo, que foram de fundamental importância para a obtenção dos resultados e desenvolvimento do artigo apresentado neste documento.

Agradeço também imensamente aos membros da minha banca (Maria do Carmo, Thiago, Zefa e a Dra. Lucimara Chaiari) por terem se disposto em deixar seus inúmeros afazeres para participar de minha banca de defesa desse projeto de doutorado. Não me sinto apenas agradecido, mas honrado pelas contribuições e apontamentos tão valiosos.

RESUMO

Campomanesia adamantium O. Berg (Myrtaceae), conhecida como guavira ou gabioba, é uma planta endêmica do Cerrado que apresenta potencial produtivo relacionado ao uso de seus frutos na culinária e propriedades medicinais. Pesquisas que avaliem a diversidade genética desta espécie utilizando marcadores moleculares tornam-se relevantes para gerar informações que sirvam de base para programas de genética de conservação e melhoramento. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar a variabilidade genética de populações de *C. adamantium* por meio de sete marcadores microssatélites derivados de EST transferíveis de *Eucalyptus*, bem como, isolar e caracterizar loci de microssatélites do genoma de *C. adamantium* por meio da construção de biblioteca genômica enriquecida em microssatélites espécie-específicos. Para as análises de variabilidade genética foram utilizados 207 indivíduos pertencentes a sete populações localizadas em Dourados-MS, Bonito-MS, Ponta Porã-MS, Jardim-MS, Três Ranchos-GO e Mineiros-GO no Brasil e Cerro Corá no Paraguai. Os resultados possibilitaram a caracterização da alta diversidade genética entre as diferentes populações analisadas, destacando-se a de Bonito-MS e Jardim-MS. Foi possível também, verificar que a metodologia empregada para obtenção de loci de microssatélites permitiu o isolamento de 41 pares de *primers*, dos quais 36 resultaram em amplificação e indicaram a existência de polimorfismos em população de *C. adamantium*. Assim sendo, concluímos que os dados gerados por meio de marcadores transferíveis demonstraram alta variabilidade genética entre as populações estudadas. Além disso, os marcadores microssatélites isolados espécie-específicos possibilitarão a realização de pesquisas futuras tanto na área de genética de conservação como melhoramento de populações nativas desta espécie.

Palavras-chave: biblioteca genômica, genética de populações, guavira; SSR; transferibilidade, variabilidade genética.

ABSTRACT

Campomanesia adamantium O. Berg (Myrtaceae), known as guavira or gabioba, is an endemic plant of the Cerrado that presents productive potential related to the use of its fruits in cooking and medicinal properties. Research that evaluates the genetic diversity of this species using molecular markers becomes relevant to generate information that can serve as a basis for genetic conservation and breeding programs. In this context, the objective of the present study was to investigate the genetic variability of *C. adamantium* populations by means of seven microsatellite markers derived from ESTs transferable from *Eucalyptus*, as well as to isolate and characterize microsatellite loci from the *C. adamantium* genome by means of genomic library enriched in species-specific microsatellites. For the analyzes of genetic variability, 207 individuals belonging to seven populations located in Dourados-MS, Bonito-MS, Ponta Porã-MS, Jardim-MS, Três Ranchos-GO and Mineiros-GO in Brazil and Cerro Corá in Paraguay were used. The results allowed the characterization of the high genetic diversity among the different populations analyzed, especially Bonito-MS. It was also possible to verify that the methodology used to obtain microsatellite loci allowed the isolation of 41 pairs of primers, of which 36 resulted in amplification and indicated the existence of polymorphisms in *C. adamantium* population. Thus, we conclude that the data generated by transferable markers showed high genetic variability among the populations studied. In addition, isolated species-specific microsatellite markers will enable future research in the field of conservation genetics as well as breeding of native populations of this species.

Keywords: Genetic variability; Genomic library; Guavira; Population genetics; SSR; Transferability.

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	06
OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....	15
CAPITULO I - Diversidade genética em populações nativas de <i>Campomanesia adamantium</i> no bioma Cerrado	16
Resumo.....	17
Introdução.....	17
Material e métodos.....	19
Resultados.....	21
Discussão.....	24
Conclusão.....	27
Referências.....	27
ANEXO I.....	31
CAPITULO II - Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em <i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess) O. Berg (Myrtaceae)	32
Resumo.....	33
Introdução.....	34
Métodos e Resultados.....	34
Conclusões.....	36
Literatura Citada.....	36
ANEXO II.....	41

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, ocupando 21% do território (BOULARG, 2002), considerado um dos *hotspots* de biodiversidade do mundo (MYERS et al., 2000), estima-se que contenha aproximadamente 12.000 espécies de plantas, das quais 34,9% (4.208) são endêmicas (FORZZA et al., 2012), representando um total de 13,4% de todas as espécies de plantas na região neotropical e 1,5% de todas as espécies de plantas do mundo.

O bioma Cerrado vem sofrendo transformações contínuas devido ao desmatamento pela ação humana, principalmente pela expansão da agricultura e pecuária que vem se expandindo essas áreas. Estas transformações têm levado a danos ambientais, incluindo a fragmentação de habitats, extinção da biodiversidade e degradação de ecossistemas (DURIGAN et al., 2004; KLINK; MACHADO, 2005).

Plantas pertencentes à família Myrtaceae, uma das maiores famílias da flora brasileira (JORGE et al., 2000), apresentam 26 gêneros e cerca de 1000 espécies (LORENZZI; SOUZA, 2008). Dentre estes, os gêneros *Eugenia*, *Campomanesia*, *Psidium* e *Myrciaria* se destacam por agregarem o maior número de espécies de interesse econômico. No cerrado os gêneros *Psidium* e *Campomanesia* vêm ganhando importância devido a exploração comercial de seus frutos (CASTRO e LORENZZI, 2005).

Dentre as espécies do gênero *Campomanesia*, as espécies *C. adamantium*, *C. xanthocarpa*, *C. pubescens*, *C. sessiliflora* e *C. guazumifolia* ocorrem em maior abundância no Estado do Mato Grosso do Sul, sendo algumas nativas dos ecossistemas Cerrado e Mata Atlântica (SOBRAL et al., 2014).

Campomanesia adamantium (Cambess) O. Berg, pertencente à família Myrtaceae, é popularmente conhecida como guavira, gabirola, guabirola, guariorola, guabirola-do-campo, guabirola-do-Cerrado, guabirola-do-lisa, guabirola-branca dependendo da região a qual é encontrada (SILVA et al., 2001).

Esta espécie é uma planta nativa do cerrado *sensu stricto*, cerradão ou campo sujo. Distribui-se amplamente 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. Também pode ser encontrada nas regiões adjacentes da Argentina e do Paraguai (SILVA et al., 2001; DURIGAN et al., 2004; LORENZI et al., 2006; SOBRAL et al., 2014).

Os frutos desta espécie possuem um sabor ácido e levemente adocicado, com aroma cítrico agradável (VALLILO et al., 2006). Podem ser ingeridos *in natura* e na forma de 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). Seus frutos são comercializados às margens de rodovias e em feiras da região do Cerrado, e possuem grande aceitação pela população (PORTO; GULIAS, 2006).

C. adamantium também é utilizada na medicina popular. Suas folhas e os frutos podem ser empregados no tratamento de doenças do trato urinário e desarranjos intestinais (FERREIRA, 1972; PIVA, 2002). Várias pesquisas relataram 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).

Esta espécie apresenta perspectivas de produção comercial na região do Cerrado, não só pela aceitação da população como a sua ampla densidade, frequência e distribuição no ambiente e vantagens produtivas. Além disso, apresenta facilidade de propagação natural, grande disponibilidade de sementes e produção de frutos de outubro a dezembro (PORTO; GULIAS, 2006).

A espécie é considerada melífera e ornamental, pois no período de floração, suas folhas caem e apenas as delicadas flores brancas permanecem. São polinizadas principalmente por abelhas do gênero *Bombus*, embora seja comum encontrar outros insetos visitando suas flores, como os dípteros, que podem ser considerados polinizadores adicionais (ALMEIDA, 2000).

Existem poucos estudos publicados referentes à variabilidade genética com a guavira. A maioria dos trabalhos infere a variabilidade fenotípica das populações desta planta baseada em resultados de biometria de populações. Resultados referentes a essa biometria 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).

Apenas três estudos utilizaram marcadores moleculares para analisar a diversidade genética em *C. adamantium*, e ambos indicaram alta variabilidade genética nas populações estudadas (ASSIS et al., 2013; MIRANDA et al., 2016; FAGUNDES et al., 2016). Estas pesquisas relataram a diversidade genética por meio de utilização de marcadores microssatélites transferíveis. Dessa forma torna-se necessário, a construção de bibliotecas genômicas específicas para *C. adamantium* por meio da identificação de loci de marcadores de microssatélites específicos para essa espécie. O desenvolvimento desses marcadores possibilitará compreender a variabilidade genética e estrutura das populações de guavira, além de permitir a realização de estudos com um número maior de indivíduos em diferentes populações.

A caracterização de variabilidade genética de populações é fundamental para programas de melhoramento genético de plantas e em estratégias de conservação (SEHGAL; RAINA, 2008). Uma vez que é essencial para que as espécies possam responder positivamente aos efeitos ambientais adversos, como mudanças climáticas e todos os tipos de estresses que podem ser bióticos ou abióticos (MACHADO, 2008). O uso de marcadores moleculares para caracterizar variações genéticas de populações é uma ferramenta útil para avaliar variações genéticas (VARSHNEY et al., 2005).

Existem diversos tipos de marcadores moleculares atualmente, os mais 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 um possua suas vantagens e desvantagens, a escolha do uso é determinada em grande parte pela aplicação desejada, conveniência e custo envolvido (GUPTA et al., 2002).

Dentre os vários tipos de marcadores moleculares destacam-se os microssatélites, SSRs (*Simple Sequence Repeats*) ou STRs (*Simple Tandem Repeats*), que são segmentos de DNA que consistem em unidades curtas de nucleotídeos repetidas em tandem, de 1-6 pares de base de comprimento, sendo encontrados em genomas eucariotos (BECKMANN; WEBER, 1992; GOLDSTEIN; SCHLOTTERER, 1999; GUPTA et al., 2002; ZANE et al., 2002). Essas unidades nucleotídicas de repetição, podem ser repetidos de 5 a 20 vezes (ELLEGRÉN, 2004). Plantas são ricas em repetições do tipo AT, enquanto que animais apresentam repetições de AC em maior frequência (POWELL et al., 1996).

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 principal desvantagem deste tipo de marcador está no custo e tempo necessários para o desenvolvimento de biblioteca genômica enriquecida, o sequenciamento dos clones positivos para microssatélites, o desenho de primers, a seleção de locos informativos e a caracterização da variação. Outro aspecto relevante é a necessidade de mão de obra especializada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; BOWATER; WEELS 2000; OLVEIRA et al., 2006).

Entretanto, por apresentarem propriedades polimórficas, os SSRs têm recebido importância considerável em pesquisa na área de genética de conservação e melhoramento de plantas (GUPTA; VARSHNEY, 2000; ELLIS; BURKE, 2007; PARIDA et al., 2009). Vários trabalhos utilizando microssatélites podem ser encontrados na literatura, indicando a construção de bibliotecas genômicas para espécies pouco estudadas, além da sua aplicabilidade em estudos de variabilidade genética (CHISTIYAKOV et al., 2006; WANG et al., 2009; KALIA et al., 2011).

A transferibilidade, ou seja, a habilidade de transferir marcadores entre espécies filogeneticamente próximas trata-se de estratégia utilizada para reduzir o tempo e o custo investidos no desenvolvimento de marcadores microssatélites para uma espécie (KALIA et al., 2011).

Pesquisas recentes com *C. adamantium* avaliaram diversidade genética utilizando marcadores AFLP (ASSIS et al., 2013); e microssatélites transferíveis de *Eucalyptus* (MIRANDA et al., 2016; FAGUNDES et al., 2016).

Dessa forma, estudos de genética de populações de plantas nativas são necessários para fornecer subsídios para programas de conservação e melhoramento, visto que a degradação do Cerrado, seja pelo extrativismo inadequado ou pela expansão das fronteiras agrícolas, podem afetar a distribuição da espécie nas áreas impactadas .

Nesse contexto, considerando a escassez de pesquisas que avaliem o efeito do avanço das fronteiras agrícolas em diversidade genética de guavira na região do Cerrado, torna-se relevante o uso de marcadores microssatélites transferíveis, bem como a construção e validação de microssatélites espécie-específicos, a fim de avaliar a variabilidade em nível molecular em populações de *C. adamantium* associada a característica ambiental a qual a espécie está inserida.

REFERÊNCIAS

- 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 melífera*) na polinização da gabioba (*Campomanesia* spp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n. 2, p. 25-28, 2000.
- ASSIS, E. S. et al. Genetic diversity of gabioba 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.
- 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.
- BOWATER, R. P.; WEELS, R. D. The intrinsically unstable life of DNA triplet repeats associated with human hereditary disorders. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v.66, p. 159 – 202, 2000.
- BUSO, G. S. C. et al. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 46, 2003.

- 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.
- CASTRO, V. S.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. p. 260-261.
- 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**, v. 20, n. 3, p. 322-327, 2010.
- 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
- 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.
- ESPINDOLA, P. P. T. et al. Antioxidant and Antihyperlipidemic Effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg Root. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- FAGUNDES, B.S. et al. Transferability of microsatellite markers among Myrtaceae species and their use to obtain population genetics data to help the conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Tropical Conservation Science**, v. 9 n.1, p. 408-422, 2016.
- 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
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p

- FORZZA, R.C. et al. 2012. New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. **BioScience**, v.62, p.39-45.
- GOLDSTEIN, D. B. Schlötterer et al. **Microsatellites: evolution and applications**. 1999
- 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.; VARSHNEY, R. K.; PRASAD, M. **Molecular markers: principles and methodology**. In: **Molecular techniques in crop improvement**. Springer Netherlands, 2002. p. 9-54.
- JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. L. P. Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia punicifolia* – Myrtaceae). **Acta Amazonica**, Manaus, n.30, p.49-57, 2000.
- KALIA, R. K. et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation biology**, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005.
- 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.
- MACHADO, A. B.M. et al. (Eds.). 2008. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008.
- MELCHIOR, S. J. et al. Colheita e armazenamento de sementes de gabiroba (*Campomanesia adamantium* Camb.-Myrtaceae) e implicações na germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.
- 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.
- 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, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

- 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 bioactivityguided 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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: Acesso em: 20 Set. 2016

- SOUZA, J. C. de et al. Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and antiinflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. **Nutritional Neuroscience**, 2014.
- VALLILO, M. I. et al. Chemical composition of *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg'fruits. **Food Science and Technology**, 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.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005.
- WANG, Z. et al. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and applied genetics**, v. 88, n. 1, p. 1-6, 1994.
- 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.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

OBJETIVOS

Geral

- Fornecer subsídios para caracterização da variabilidade genética de *Campomanesia adamantium*;

Específicos

- Avaliar a eficiência discriminatória alélica de sete locos de marcadores moleculares microsatélites transferíveis EST derivados de *Eucalyptus* para avaliação de diversidade genética em *C. adamantium* de sete populações naturais do bioma Cerrado;
- Determinar a variabilidade genética nas populações de *C. adamantium* coletadas no Cerrado Sul-Mato-Grossense (Bonito, Jardim, Ponta Porã, Dourados), Goiano (Três Ranchos, Mineiros) e Paraguaio (Cerro Corá) utilizando marcadores microsatélites transferíveis EST derivados de *Eucalyptus*;
- Analisar os parâmetros populacionais referentes à variabilidade genética e a estrutura de populações;
- Construir biblioteca genômica de *C. adamantium* enriquecida com sequências microsatélites;
- Desenhar primers e selecionar os locos informativos para *C. adamantium*;
- Caracterizar a diversidade alélica da população de *C. adamantium*. utilizando marcadores microsatélites espécie específicos.

CAPITULO I

Diversidade genética em populações nativas de *Campomanesia adamantium* no bioma Cerrado

Artigo em elaboração:

Genetics and Molecular Biology

ISSN 1415-4757 in press

ISSN 1678-4685 on-line

GENETIC DIVERSITY IN NATIVE POPULATIONS of *Campomanesia adamantium* IN CERRADO BIOME

Bruno do Amaral Crispim¹, Adrielle Ayumi de Vasconcelos², Ramilla dos Santos Braga³, Mariana Pires de Campos Telles³, Maria do Carmo Vieira⁴, Thiago de Oliveira Carnevali⁴ and Alexeia Barufatti Grisolia^{1-2*},

¹Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados/MS, Brasil

²Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados/MS, Brasil

³Laboratório de Genética & Biodiversidade, Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

⁴Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados/MS, Brasil

Autor correspondente: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br

Resumo

Campomanesia adamantium O. Berg (Myrtaceae), conhecida como guavira ou gabioba, é uma planta endêmica do bioma Cerrado. Tem um potencial de produção devido ao uso de seus frutos na culinária e suas propriedades medicinais. Estudos de diversidade genética utilizando marcadores moleculares com espécies nativas do bioma Cerrado são necessários para fornecer a base para programas de conservação e melhoramento. Neste contexto, este trabalho foi realizado para investigar a variabilidade genética de sete populações de *C. adamantium* utilizando marcadores microssatélites derivados de EST transferidos de *Eucalyptus* spp. Um total de 207 indivíduos foram amostrados em populações nativas do bioma Cerrado utilizando sete marcadores polimórficos. A análise genética mostrou que a variabilidade dentro das populações (94%) foi maior do que entre as populações (6%). Foi possível identificar dois grupos diferentes pelo método de inferência bayesiana empregado, permitindo distinguir entre as populações do bioma cerrado Sul-mato-Grossense e Goiano. Utilizando marcadores transferíveis de SSR foi possível obter um perfil molecular das populações avaliadas, mostrando que esses marcadores foram efetivos e exibiram polimorfismo suficiente para estimar a variabilidade genética de populações de *C. adamantium*. Assim, a conservação e a coleta de germoplasma de populações de guavira tornam-se importantes para preservar sua alta variabilidade genética, que são importantes para a conservação da espécie e do bioma.

Palavras-chave: guavira; SSR; variabilidade genética; amplificação heteróloga, genética populacional.

Introdução

O Cerrado brasileiro é considerado a segunda maior reserva genética de espécies nativas do país, devido à alta biodiversidade encontrada neste bioma. A flora apresenta riqueza notável, com frutos e espécies medicinais, vários destes recursos vegetais são explorados pelos seres humanos (Klink e Machado, 2005; Forzza *et al.*, 2012).

Campomanesia adamantium O. Berg (Myrtaceae), também conhecida como guavira, gabiropa, guabiroba, guabiroba-do-campo ou guariroba, é uma planta nativa amplamente encontrada no Cerrado (Silva *et al.*, 2001). Os frutos podem ser consumidos *in natura* ou utilizados na preparação de doces, tais como geléias, sorvetes e sucos. As folhas e frutos destas plantas também são amplamente utilizados na medicina popular (Porto e Gulias, 2006; Cardoso *et al.*, 2010). Vários estudos estão sendo realizados para caracterizar as propriedades químicas e medicinais visando a domesticação desta planta, indicando também a existência de grande variabilidade genética, inferida através da avaliação de padrões fenotípicos (Agostini-Costa *et al.*, 2006; Melchior *et al.*, 2006, Oliveira *et al.*, 2011, Dresch *et al.*, 2013, Wesp *et al.*, 2013, Resende e Teixeira, 2009).

A variabilidade genética é fundamental para programas de melhoramento genético e estratégias de conservação (Sehgal e Raina, 2008). Uma das ferramentas úteis para avaliar as variações genéticas são os marcadores moleculares, que também são meios eficientes de relacionar variações fenotípicas e genotípicas (Varshney *et al.*, 2005). Os marcadores de microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) têm sido amplamente utilizados para o estudo da genética em plantas, uma vez que são tipicamente codominantes, multialélicos, polimórficos e têm uma elevada heterozigosidade (Brondani *et al.*, 1998; Parida *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2011).

Para reduzir o tempo e o custo investidos no desenvolvimento de marcadores de microssatélites para uma espécie, a capacidade de transferência de marcadores entre espécies filogeneticamente próximas é uma estratégia amplamente utilizada (Fagundes *et al.*, 2016), a transferibilidade já foi realizada para *C. adamantium* a partir de marcadores microssatélite derivados de EST de *Eucalyptus* spp. (Miranda *et al.*, 2016, Fagundes *et al.*, 2016).

A pesquisa com marcadores moleculares em guavira ainda é escassa (Assis *et al.*, 2013, Miranda *et al.*, 2016). Assim, estudos de genética populacional são necessários para apoiar programas de conservação e melhoramento, já que a degradação do bioma Cerrado, por extração inadequada ou pela expansão das fronteiras agrícolas, pode afetar a variabilidade genética na *Campomanesia* (Miranda *et al.*, 2016).

Considerando que existe um grande interesse por plantas na região do Cerrado e que poucos estudos de diversidade genética têm sido realizados com estas espécies, o uso de marcadores

microsatélites transferíveis para avaliar a variabilidade no nível molecular de populações de *C. adamantium*. Neste contexto, este trabalho foi realizado para investigar a variabilidade genética de sete populações nativas de *C. adamantium* através de marcadores de microsatélites derivados de EST transferidos de *Eucalyptus*.

Material e métodos

Material vegetal

Amostras de folhas jovens foram coletadas de 207 indivíduos pertencentes a sete populações de *C. adamantium* localizadas no bioma Cerrado. A localização das populações, o número de indivíduos amostrados e as coordenadas geográficas são mostradas na Figura 1 e Tabela 1.

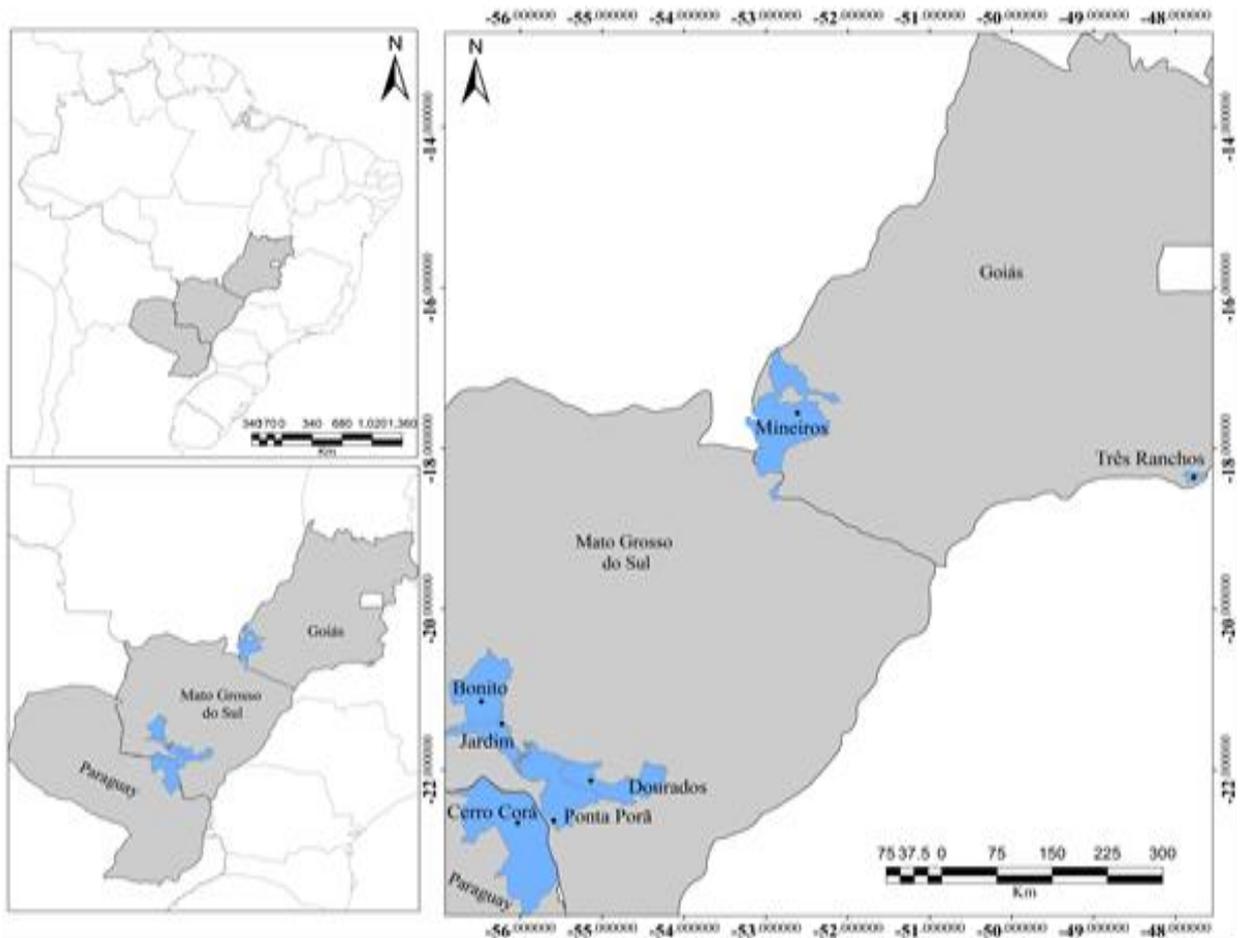


Fig. 1. Mapa indicando os pontos de coleta das amostras de *C. adamantium*.

Tabela 1. Localização de populações de *C. adamantium*, número de amostras de indivíduos, coordenadas geográficas e caracterização da área.

Populações	Número de indivíduos	Localidade	Coordenadas geográficas	Caracterização da área
Bonito (BO)	33	MS, Brasil	21°09'02.1''S 56°28'12.8''O	Ausência de Fragmentação; Elevado número de indivíduos; Reserva Particular de Patrimônio Natural
Jardim (JA)	35	MS, Brasil	21°25'43.5''S 56°13'29.8''O	Ausência de Fragmentação; Elevado número de indivíduos; Reserva Particular de Patrimônio Natural
Cerro Corá (CC)	35	Paraguai	22°39'44.2''S 56°01'52.6''O	Parque Nacional de Conservação
Ponta Porã (PP)	35	MS, Brasil	22°42'44.4''S 55°38'31.6''O	Fragmentação média; Número médio de indivíduos; Presença de Pecuária e Agricultura
Dourados (DO)	29	MS, Brasil	22°08'16.3''S 55°08'24.2''O	Alta Fragmentação; Baixo número de indivíduos; Área Agrícola
Mineiros (MI)	20	GO, Brasil	17°33'88.5''S 52°36'78.6''O	Alta Fragmentação; Baixo número de indivíduos; Área Agrícola
Três Ranchos (TR)	20	GO, Brasil	18°21'88.7''S 47°46'49.7''O	Alta Fragmentação; Baixo número de indivíduos; Área Agrícola

Análise de microssatélites

O DNA genômico foi extraído a partir de tecido foliar utilizando o método CTAB (Doyle e Doyle, 1987) e a quantidade de DNA foi obtida em nanophotômetro (DS-11® Denovix). Sete marcadores de microssatélites derivados de EST transferíveis desenvolvidos por Grattapaglia *et al.* (2015) para *Eucalyptus* ssp. (EMBRA 1076, 1335, 1363, 1364, 1374, 1470, 1811) para amplificação por PCR de acordo com as condições descritas por Miranda *et al.* (2016). O comprimento dos fragmentos amplificados foi detectado em sequenciador automatizado (ABI3500) e a análise dos dados foram realizadas utilizando o software GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems).

Análise de dados

A frequência de alelos foi estimada por contagem direta. Os parâmetros de diversidade genética, incluindo heterozigosidade esperada (HE) e observada (HO), conteúdo de informação polimórfico (PIC) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram estimados utilizando o software CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007). O software FSTAT foi utilizado para calcular a riqueza alélica e a estatística F. O valor de P foi ajustado usando o procedimento de Bonferroni (GOUDET, 2002) com o mesmo pacote estatístico. A estrutura populacional foi avaliada por análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000). O

dendrograma foi construído por análise de cluster usando o método Neighbor-Net com o auxílio do programa Sliptree, baseado em cálculos das distâncias genéticas de Reynold (FST) usando FSTAT.

Os indivíduos foram agrupados em um determinado número de populações probabilísticas atribuídos em grupos inferidos pelo método Bayesiano no software STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Os testes foram realizados utilizando um modelo de adição onde as frequências alélicas foram correlacionadas. Para selecionar o número apropriado de populações inferidas, foram realizadas várias análises com K (número de populações inferidas) variando de 2 a 10, com 300.000 interações (período de queima de 3000), com três repetições independentes para cada análise. Os valores reais de K foram inferidos a partir da magnitude de ΔK e dados em função de K, com o auxílio do programa Harvester de estrutura (Earl e VonHoldt, 2012) seguindo o modelo proposto por Evanno *et al.* (2005).

Resultados

Os parâmetros genéticos observados a partir da genotipagem das 207 amostras das sete populações analisadas com sete loci de microssatélites estão descritos na Tabela 2. Detectamos 71 alelos e o tamanho dos fragmentos variou de 197 a 396 pares de bases nos sete loci analisados. Todos os loci foram polimórficos, apresentando uma média de $10,14 \pm 6,12$ alelos por locus. O locus Embra 1376 apresentou o maior número de polimorfismos (21 alelos) eo Embra 1076 apresentou o menor número de polimorfismos (3 alelos) (Tabela 2).

Tabela 2. Variação genética de microssatélites em *Campomanesia adamantium* (n = 207)

Locus	N	Ho	He	PIC
Embra 1076	3	0,99	0,51	0,39
Embra 1335	4	0,42	0,36	0,32
Embra 1363	16	0,80	0,89	0,88
Embra 1364	21	0,78	0,93	0,92
Embra 1374	12	0,58	0,80	0,77
Embra 1470	6	0,53	0,52	0,47
Embra 1811	9	0,19	0,36	0,34
Média±DP	10,14±6,12	0,61±0,24	0,62±0,22	0,58±0,24

Número de alelos por locus (N), Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He), Conteúdo de informação polimórfica (PIC)

Considerando as análises genéticas realizadas neste estudo, a população de Bonito apresentou o maior número médio de alelos por locus (6,14) e a maior riqueza alélica (5,67) em relação às demais populações. A população de Três Ranchos apresentou os valores mais baixos (4,57 e 4,50, respectivamente) (Tabela 3).

Tabela 3. Diversidade genética em populações de *Campomanesia adamantium*

Populações	N	ANA	Ho	He	PA	F _{IS}	AR	HWE
Bonito/MS	33	6,14±3,18	0,73±0,03	0,63±0,08	0,04	-0,15	5,64	2
Jardim/MS	35	6,00±3,21	0,73±0,03	0,64±0,07	0,01	-0,14	5,48	1
Ponta Porã/MS	35	5,86±4,06	0,61±0,03	0,61±0,08	0,03	0,00	5,21	2
Dourados/MS	29	5,14±2,73	0,61±0,03	0,59±0,08	0,03	-0,03	4,77	4
Três Ranchos/GO	20	4,57±4,16	0,44±0,04	0,44±0,15	NA	0,00	4,50	2
Mineiros/GO	20	4,86±3,76	0,42±0,04	0,46±0,13	0,04	0,08	4,81	2
Cerro Corá/PY	35	5,86±4,38	0,62±0,03	0,61±0,08	0,03	-0,01	5,47	4

Número de indivíduos (N), Número médio de alelos (ANA), Heterozigosidade observada (Ho), Heterozigosidade esperada (He), Frequência de alelos privados (PA) Coeficiente de endogamia (FIS), Riqueza alélica (AR), Diversidade genética), Número de Loci no equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE), NA- Não apresentou.

Quando todas as populações foram analisadas em conjunto, todos os loci de microssatélites foram encontrados no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) (Tabela 2). No entanto, quando a análise estatística foi realizada para cada população, Jardim tinha apenas um marcador em equilíbrio. As populações de Dourados e Cerro Corá apresentaram o maior número de marcadores em equilíbrio, 4 (Tabela 3). O índice de endogamia (FIS) foi baixo em todas as populações e algumas populações apresentaram índice negativo (Tabela 3).

A matriz de diferenciação genética entre populações, com base nos índices FST, foi apresentada na Tabela 4. Pode-se observar que as maiores taxas de diferenciação genética foram entre as populações Dourados/MS e Três Ranchos/GO (0,111). Por outro lado, os valores mais baixos foram entre as populações Jardim/MS e Bonito/MS (0,009). Utilizando a diferenciação populacional, foi identificado que as populações de Mato Grosso do Sul e Paraguai são geneticamente mais próximas do que as populações de Goiás.

Tabela 4. Estimativa em pares da diferenciação genética entre populações de *C. adamantium* estudadas.

	BO	JD	CC	PP	DO	MI	TR
BO							
JD	0,009						
CC	0,046	0,021					
PP	0,050	0,021	0,011				
DO	0,073	0,035	0,038	0,018			
MI	0,051	0,081	0,012	0,104	0,109		
TR	0,074	0,084	0,010	0,103	0,111	0,051	

BO – Bonito/MS; JD – Jardim/MS; CC – Cerro Corá/PY; PP – Ponta Porã/MS; DO - Dourados; MI – Mineiros/GO; TR - Três Ranchos/GO.

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que as populações apresentam baixa estrutura genética entre populações de 6% e estimativas de diferenciação baseadas em F_{ST} (0,06) foram significativas ($p < 0,001$). A análise dos dados do método de Neighbor-Joining indicou que a população de Bonito e Jardim/MS ocupou uma posição intermediária em relação a outras populações. As populações de Três Ranchos e Mineiros do Estado de Goiás se agruparam, mostrando sua proximidade genética quando comparadas com outras populações. As populações de Goiás apresentaram a maior distância em relação a outras populações (Fig. 2).

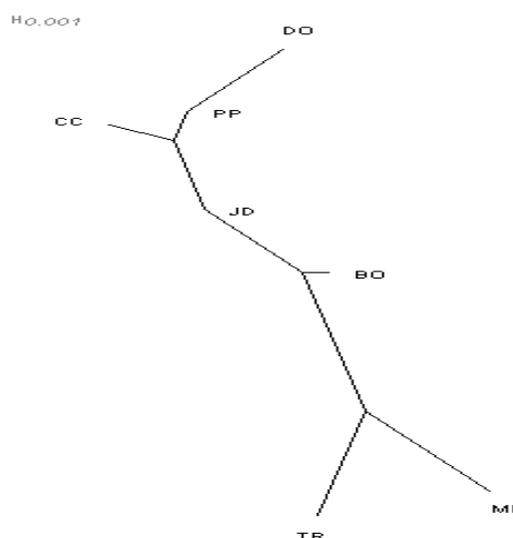


Fig. 2 - Neighbor-Joining dendrograma baseado na distância genética de Reynold (F_{ST}) de sete loci de microssatélites. O gráfico mostra as relações genéticas entre as sete populações de *C. adamantium* (BO – Bonito/MS; JD – Jardim/MS; CC – Cerro Corá/PY; PP – Ponta Porã/MS; DO - Dourados; MI – Mineiros/GO; TR - Três Ranchos/GO).

A Tabela 5 mostra as proporções de cada população atribuídas aos três grupos inferidos pelo programa Structure, com variância mínima.

Tabela 5. Número de indivíduos (N) por população e proporção de associação de cada população em cada um dos 3 grupos inferidos pelo programa Structure a. Associações superiores a 0,5 estão em negrito.

Populações	Agrupamentos Inferidos			N
	1	2	3	
Bonito/MS	0,35	0,27	0,38	33
Jardim/MS	0,41	0,10	0,48	35
Ponta Porã/MS	0,57	0,02	0,40	35
Dourados/MS	0,40	0,02	0,57	29
Três Ranchos/GO	0,02	0,97	0,01	20
Mineiros/GO	0,01	0,96	0,02	20
Cerro Corá/PY	0,56	0,08	0,35	35

Pode-se observar na Tabela 5 que o agrupamento 2 representa as populações do Estado de Goiás com 97% para Três Ranchos/GO e 96% para Mineiros/GO, de alocação correta de seus indivíduos em suas respectivas populações. O agrupamento 1 representa as populações de Cerro Corá (Paraguai) e Ponta Porã, que é a região mais próxima deste país, com uma alocação correta de 56% e 57%, respectivamente. A população de Dourados é a única alocação no agrupamento 3 (57%) com significância estatística ($p > 0,05$).

A estrutura genética das populações foi analisada utilizando estatísticas bayesianas com o auxílio do programa Structure. O agrupamento de $k = 3$ (Fig. 2) corresponde ao k real, de acordo com a metodologia proposta por Evanno *et al.* (2005), onde se observaram padrões complexos de miscigenação para todas as populações de Mato Grosso do Sul e Paraguai analisadas. O diagrama mostrou similaridade entre populações de Três Ranchos e Mineiros do Estado de Goiás. Apesar de ter uma proporção menor do que os outros grupos, para Mato Grosso do Sul e Paraguai as populações parecem compartilhar o mesmo *pool* genético, sendo visível a ocorrência de mestiçagem dentro dessas populações.

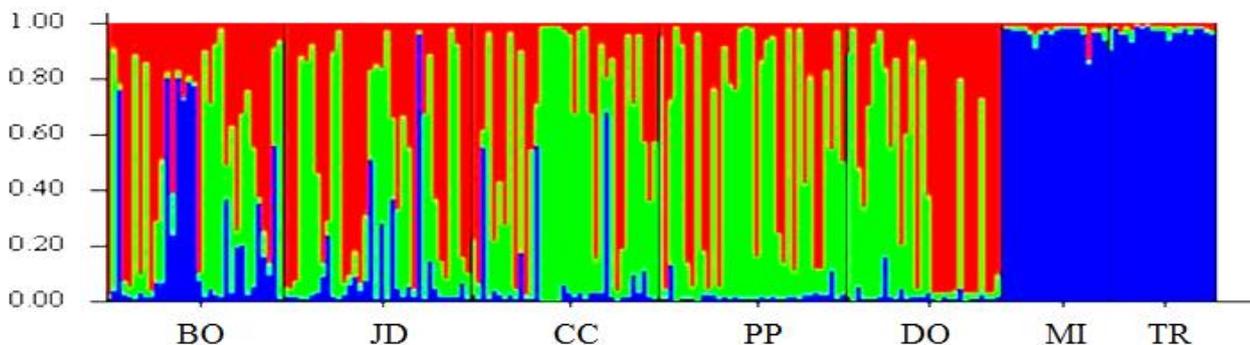


Fig. 3 - Agrupamento individual de sete populações diferentes analisado por método estatístico bayesiano utilizando o programa Structure. Cada amostra foi representada por uma linha vertical dividida em segmentos classificados de acordo com o tamanho e a cor. Estes resultados correspondem à proporção relativa do genoma das amostras em relação à população deduzida pelo programa. Diferentes populações são separadas pelas linhas pretas. (BO – Bonito/MS; JD – Jardim/MS; CC – Cerro Corá/PY; PP – Ponta Porã/MS; DO - Dourados; MI – Mineiros/GO; TR - Três Ranchos/GO).

Discussão

O número de alelos obtidos para os sete loci foi maior que o número obtido por Miranda *et al.* (2016), que utilizaram os mesmos marcadores obtendo uma média de 7 alelos por locus em duas populações de *C. adamantium* no estado de Goiás. A maior média de alelos (10,14) encontrada em nosso estudo pode ser explicada por vários fatores, como uma diferença no número de amostras

entre os dois experimentos, uma vez que Miranda *et al.* (2016) testaram os marcadores em apenas duas populações do mesmo estado usando 40 indivíduos. Este estudo foi realizado com seis populações de dois estados diferentes (Mato Grosso do Sul e Goiás) e uma população de Cerro Corá localizada em um Parque Nacional de conservação do Paraguai. A discrepância entre os resultados da variabilidade pode estar relacionada à pressão seletiva diferencial que pode ocorrer em cada um dos ambientes naturais (áreas agrícolas, pastagens ou parque nacional).

A alta variabilidade genética em *C. adamantium* também foi revelada em outros estudos. Miranda *et al.* (2016) também observaram alta diversidade genética em duas populações de Goiás ($HO = 0,50$). No entanto, menor em comparação com a média encontrada nas populações analisadas neste estudo ($HO = 0,60$). A alta diversidade genética da guavira também foi detectada por Assis *et al.* (2013), que verificaram altas taxas 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 corroboram a alta variabilidade fenotípica já encontrada na guavira em estudos que utilizaram biométrica (Melchior *et al.*, 2006; Resende e Teixeira, 2009; Oliveira *et al.*, 2011; Dresch *et al.*, 2013).

As populações de Bonito e Jardim apresentaram maior riqueza alélica quando comparadas às demais populações (Tabela 2). Isto é possivelmente devido ao maior número de indivíduos nos arredores, ausência de fragmentação e ambientes agrícola, uma vez que estes locais de referência em turismo ecológico no estado do Mato Grosso do Sul. Pode ainda citar que nesses locais existe uma educação ambiental mais conciente, existindo eventos que destacam e valorizam frutos de espécies nativas, não ocorrendo assim a extração extrativista desses frutos.

Dourados, Três Ranchos e Mineiros apresentaram os menores valores de riqueza alélica, número de alelos por locus e valores mais elevados de HO que de HE . Este fato pode ser explicado pela perda de alelos devido à deriva genética causada pela ação antrópica, baixo número de indivíduos nos arredores, uma vez que a população está localizada em uma região com alto nível de fragmentação e cercada por áreas agrícolas e pastagens.

A ação antrópica e a crescente expansão da agricultura, vem causando a perda de habitat que pode resultar na redução do tamanho da população (Phong *et al.*, 2015). O uso constante de agrotóxicos tem contribuído para o declínio de insetos, como os polinizadores, principalmente as

abelhas (Kremen *et al.*, 2007; Cresswell, 2001; Henry *et al.*, 2012). Esses fatores também podem ajudar na perda de diversidade genética em populações com níveis mais altos de perturbação humana uma vez que o número de plantas é reduzido nesses ambientes.

Pode-se observar, a partir do dendrograma (Fig. 2), que as populações próximas geograficamente estavam mais próximas geneticamente, como populações do estado de Goiás e as demais populações do estado do Mato Grosso do Sul e do Paraguai. Esse fato pode ser explicado pelo compartilhamento de semelhanças genéticas, proporcionando similaridade genética e proximidade, como indicado no gráfico pelo método Neighbor-Joining. As populações de Jardim e Bonito foram posicionadas medianamente no gráfico, o que pode mostrar um alto grau de miscigenação com as demais populações analisadas. As distância geográfica entre as populações podem afetar diretamente no fluxo gênico, ocorrendo o chamado isolamento por distância (Hedrick, 2011).

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) mostraram que a variação entre as populações foram baixa (Yeh, 2000) e significativa, com índice de fixação ($F_{ST} = 0,06$). Com base neste critério, é possível inferir que as populações podem ser consideradas geneticamente semelhantes. Portanto, só têm uma maior distinção nas populações do Estado de Goiás com as demais populações estudadas e com grau de miscigenação dentro das populações de Mato Grosso do Sul e Paraguai (Figuras 1 e 4).

Em geral, a distância geográfica entre as populações foi diretamente proporcional à distância genética, o que pode estar relacionado com a dificuldade de compartilhar alelos (Futuyma, 1992, Phong *et al.*, 2015). Assim, ambos os resultados de proximidade genética podem ser correlacionados com a proximidade geográfica real das populações, uma vez que as populações do estado de Mato Grosso do Sul e do Paraguai, devido à sua proximidade geográfica, como Bonito e Jardim estão mais próximos uns dos outros (39 km), enquanto as populações de Dourados e Bonito são mais distantes (175 km). Ao comparar as populações do estado de Goiás também estavam próximas uma da outra, apresentando-se em um clado distinto das demais populações.

O número de populações, bem como a estrutura populacional gerada pelo programa Structure (Figura 3), também confirmaram que existe um grau de miscigenação dentro das populações do Mato Grosso do Sul e do Paraguai e que as populações de Goiás são geneticamente

distintas. Embora haja uma partilha de alelos com outras populações inferida, é necessário mais estudos, incluindo um maior número de marcadores, pois o uso de marcadores transferíveis pode não estar mostrando a informação real da diversidade genética nas populações analisadas. O presente estudo é o primeiro a caracterizar diferentes populações do bioma Cerrado *C. adamantium* utilizando marcadores microssatélites.

Considerando que a variabilidade genética entre as populações de *C. adamantium* demonstra um padrão de diferenciação aparentemente correlacionado com a distância geográfica, possivelmente esse fluxo genético que corresponde a diferenças na estrutura populacional. A ampla densidade, frequência e distribuição do ambiente dessas espécies também são características que suportam esses modelos de fluxo gênico (Agostini-Costa *et al.*, 2006).

A alta diversidade genética encontrada nas populações de *C. adamantium* neste e em outros estudos mostra a importância da conservação *in situ* desta espécie e do bioma Cerrado. As populações estudadas apresentam alto valor para a conservação, uma vez que a diversidade genética é extremamente importante para a sobrevivência da espécie, também destaca a necessidade de conservação das populações devido à possível existência de alelos privados. O conhecimento de como a variação genética é dividida em populações pode ter implicações importantes na biologia evolutiva, ecologia e conservação da espécie.

A existência de baixa diferenciação entre populações, padrões de fluxo genético relacionados à distância geográfica e a alta variabilidade fenotípica relatada em outros estudos (Resende e Teixeira, 2009, Dresch *et al.*, 2013, Wesp *et al.*, 2013) pode ser correlacionada com a alta variabilidade genética revelada no nível molecular neste estudo. Assim, estudos de correlação entre características fenotípicas de interesse e variações genéticas detectadas por marcadores moleculares podem ser realizadas para auxiliar na seleção de genótipos superiores. Além disso, as populações investigadas neste estudo constituem reservas de variabilidade úteis para programas de melhoramento de *C. adamantium*.

Conclusão

A diversidade genética foi elevada em todas as populações, e estas apresentaram baixos níveis de diferenciação devido ao compartilhamento de alelos principalmente em populações de

Mato Grosso do Sul e Paraguai, sendo as populações geograficamente mais próximas maior a semelhança genética.

A importância da conservação e coleta de germoplasma de populações de guavira para evitar a perda de diversidade genética, que além de ser de extrema importância para a sua sobrevivência, pode servir como fonte de seleção de genótipos superiores para a reprodução desta espécie promissora para o Bioma Cerrado.

Referências

Agostini-costa TS et al (2006) Espécies de maior relevância para a região Centro-Oeste. In: Vieira RF et al. Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 12-25 pp.

Assis ES, Reis EF, Pinto JF, Contim LA, Dias LA (2013) Genetic diversity of gabioba based on random amplified polymorphic DNA markers and morphological characteristics. *Genet Mol Res* 12:3500-3509.

Brondani RPV, Brondani C, Tarchini R, Grattapaglia D (1998) Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theor Appl Genet* 97:816-827.

Cardoso CA, Salmazzo GR, Honda NK, Prates CB, Vieira Mdo C, Coelho RG (2010) Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic fruits of *Campomanesia* species (Myrtaceae). *J Med Food* 13:1273-1276.

Chiang YC et al. (2011). Isolation of 16 polymorphic microsatellite markers from an endangered and endemic species, *Podocarpus nakaii* (Podocarpaceae). *Am. J. Bot.* 98:e306-e309.

Cresswell JE. (2011) A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (Imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology* 20:149–157.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15.

Dresch DM, Scalon SPQ, Masetto TE, Vieira MC (2013). Germination and vigor of *Campomanesia adamantium* seeds according to fruit and seed size. *Pesqui Agropecu Trop* 43:262-271.

Earl DA, Vonholdt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359–361.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14:2611–2620.

Fagundes BS, Silva LF, Giacomini RM, Secco D, Díaz-Cruz JÁ, Da-Silva PR (2016) Transferability of microsatellite markers among Myrtaceae species and their use to obtain population genetics data to help the conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Trop Conserv Sci* 9:408-422.

- Forzza RC. et al. (2012) New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. *BioScience*, 62:39-45.
- Futuyma DJ (1992) *Biologia evolutiva*. Trad. de M. de Vivo e coord. De F.M. Sene. 2. ed. Riberão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq.(Texto original publicado em 1986). 646pp.
- Goudet J (2002) 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. Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Grattapaglia D, Mamani EM, Silva-Junior OB, Faria DA (2015) A novel genome-wide microsatellite resource for species of *Eucalyptus* with linkage- to- physical correspondence on the reference genome sequence. *Mol Ecol Resour* 15:437-448.
- Hamrick JL, Linhart YB, Mitton JB (1979) Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annu Rev Ecol Evol* 10:173-200.
- Hedrick PW (2011) *Genetics of populations*. 4. ed. Jones and Bartlett, Boston. 675 pp.
- Henry M et al. (2012) A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336:348–350.
- Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh, R, Dhawan AK (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177:309-334.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16:1099-1106.
- Klink CA, Machado RB (2005) Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conserv Biol* 19:707-713.
- Kremen C et al. (2007). Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land use change. *Ecol Lett* 10:299–314.
- Melchior SJ, Custódio CC, Marques TA, Machado Neto NB (2006) Colheita e armazenamento de sementes de gabirola (*Campomanesia adamantium* Camb.-Myrtaceae) e implicações na germinação. *Rev Bras Sementes* 28:141-150.
- Miranda EA, Boaventura-Novaes CR, Braga RS, Reis EF, Pinto JF, Telles MP (2016) Validation of EST-derived microsatellite markers for two Cerrado-endemic *Campomanesia* (Myrtaceae) species. *Genet Mol Res* 15: gmr.15017658.
- Oliveira MC, Santana DG, Santos CM (2011) Biometrics of fruits and seeds and seedling emergence of two species fruit of the *Campomanesia* genus. *Rev Bras Frut* 33:446-455.
- Parida SK et al. (2009) Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theor Appl Genet* 118:327-338.
- Phong DT, Lieu TT, Hien VTT, Hiep NT (2015) Genetic diversity of the endemic flat needle pine *Pinus krempfii* (Pinaceae) from Vietnam revealed by SSR markers. *Genet Mol Res* 14(3):7727–7739.
- Porto AC, Gulias APM (2006) Gabirola. In: Vieira RF, Agostini-costa TS, da Silva TB, Sano SN, Ferreira FR (Eds.), *Frutas nativas da região Centro Oeste do Brasil*. Embrapa, Brasília, 184pp.

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Resende HC, Teixeira TA (2009) Diversidade genética em *Campomanesia* (MYRTACEA) estimada por análise multivariada de características fenotípicas. *Ceres* 56 85-92.
- Savolainen O, Pyhajarvi T and Knurr T (2007). Gene flow and local adaptation in trees. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 38:595-619.
- Schneider CW et al. (2012) RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7: e30023.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin: a software for population genetics data analysis. User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Sehgal D, Raina SN (2008) 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, 39–54 pp.
- Silva DB, Silva JA, Junqueira NTV, Andrade LRM (2001) Frutas do Cerrado. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. 179 pp.
- Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology* 23:48-55.
- Wesp CL, Santana MA, Gasparetto BF, Barros IBI (2013) Caracterização física de frutos de guabirobeiras (*Campomanesia* spp.) coletados no estado do Rio Grande do Sul. *Cad Agroecologia* 8:1-4.
- Yeh FC. (2000) Population genetics. In: Forest conservation genetics: principles and practice. A. Young, D. Boshier & T. Boyle (eds.) pp. 21=37. Collingwood: CSIRO Publishing.

ANEXO I

A revista que pretende-se publicar é a **Genetics and Molecular Biology** que apresenta fator de impacto de 1,341 e Qualis B2 para Interdisciplinar.

Objetivos e Escopo: O Jornal publica contribuições que apresentam os resultados de pesquisas originais em genética, evolução e disciplinas científicas relacionadas. Os manuscritos que apresentem apenas métodos e aplicações, sem uma análise de dados genéticos, não será considerado para publicação.

As normas para publicação podem ser acessadas através do link: <
<http://www.gmb.org.br/submission-of-papers> >

CAPITULO II

**Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites em
Campomanesia adamantium (Cambess) O. Berg (Myrtaceae)**

Short Communications submetida e em fase de correções:

Applications in Plant Sciences

Online ISSN: 2168-0450

Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em
Campomanesia adamantium (Cambess) O. Berg (Myrtaceae)

Bruno do Amaral Crispim¹⁻², **Thamiris Gatti Déo**², **Adrielle Ayumi de Vasconcelos**², **Maria do Carmo Vieira**³, **Thiago de Oliveira Carnevali**² and **Alexeia Barufatti Grisolia**¹⁻²,

¹ Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados/MS, Brasil

² Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados/MS, Brasil

³ Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados/MS, Brasil

E-mails: BAC: brunocrispim.bio@gmail.com; TGD: thamirisdeo@hotmail.com; AAV: adriayumi@gmail.com; MCV: mariavieira@ufgd.edu.br; TOC: thiagocarnevali@live.com; ABG: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br

Número de palavras:

Manuscrito recebido em _____; Aceito em _____.

Autor correspondente: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br

- *Premissa do estudo:* Desenvolveram-se iniciadores microssatélites e caracterização para investigar a estrutura genética da população em *Campomanesia adamantium*.
- *Métodos e Resultados:* Construímos uma biblioteca genômica enriquecida em microssatélites e desenhamos 41 pares de iniciadores para loci de repetições de sequência única, dos quais 36 foram amplificados com sucesso e polimórficos. O número de alelos variou de dois a oito, com uma média de 4,73 alelos por locus. Os valores de heterozigotidade observada e esperada variaram de 0,09 a 1,00 e 0,09 a 0,85, respectivamente. Os valores de conteúdo da informação polimórfica variaram de 0,08 a 0,78, com uma média de 0,56 mostrando altos níveis de polimorfismo. Todos os loci não mostraram desvio significativo de HWE.
- *Conclusões:* Este é o primeiro conjunto de marcadores de microssatélites para *C. adamantium* que será útil para estimar parâmetros de diversidade genética e estrutura populacional. Esses marcadores podem ser uma ferramenta valiosa para estratégias de manejo eficientes em ambientes naturais e programas de melhoramento.

Palavras-chave: guavira; Estrutura genética; Loci de microssatélites; SSR, transferibilidade.

INTRODUÇÃO

O bioma Cerrado apresenta grande diversidade de plantas nativas com potencial de inclusão no mercado econômico. No entanto, a variabilidade é cada vez mais ameaçada pelo desmatamento e pela expansão da agricultura (Rocha et al., 2011). Entre as plantas nativas, *Campomanesia adamantium* O. Berg (Myrtaceae), uma árvore de baga também conhecida como guavira ou gabirola, destaca-se pelo alto potencial econômico de comercialização e o uso de seus frutos na produção de alimentos e bebidas (Vallilo et al., 2006). Além disso, muitos estudos têm investigado suas propriedades medicinais, indicando que a planta contém atividade antioxidante (Coutinho et al., 2008), antimicrobiana (Pavan et al., 2009) e antitumoral (Pascoal et al., 2014).

Estudos de genética molecular com essa espécie são escassos (Assis et al., 2013, Miranda et al., 2016) e ainda são insuficientes para fornecer dados sobre a estrutura da população e a variabilidade genética, que são informações valiosas para apoiar a conservação e estratégias de manejo. Os marcadores microsatélites são instrumentos eficientes para a avaliação das variações genéticas a nível individual e populacional devido às suas muitas vantagens (Kalia et al., 2011; Gao et al., 2013; Haq et al., 2014), entretanto, nenhum desenvolvimento de marcadores de microsatélites foi relatado para *C. adamantium*. Portanto, o objetivo foi isolar e caracterizar marcadores microsatélites em *C. adamantium* pela construção de uma biblioteca genômica enriquecida em microsatélites.

MÉTODOS E RESULTADOS

Materiais vegetais e extração de DNA - As folhas jovens foram coletadas de um único acesso de *C. adamantium* localizado no Horto de Plantas Medicinais (22° 11'45.08 " S; 54° 56'7,35" O) da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA / UFGD), Dourados-MS, Brasil. O tecido foliar foi utilizado para extração de DNA genômico de acordo com o método CTAB (Doyle e Doyle, 1987).

Desenvolvimento de SSRs e design de iniciadores - Uma biblioteca genômica enriquecida em microsatélites foi desenvolvida seguindo o protocolo adaptado (Billotte et al., 1999). O DNA genômico foi digerido com a enzima de restrição AfaI (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) e ligado aos adaptadores de cadeia dupla 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' e 5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'. A técnica de enriquecimento consistiu numa captura baseada em hibridização utilizando sondas ligadas a biotina (CT) 8 e (GT) 8 e esferas magnéticas revestidas com estreptavidina (MagneSphere Magnetic Separation Products, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA). Os fragmentos de DNA enriquecidos em microsatélites foram amplificados por PCR, e depois foram clonados em pGEM-T Easy Vector (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA). As células competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue (Promega

Corporation) foram transformadas com os plasmídeos recombinantes e os clones positivos foram seleccionados através de meio de cultura contendo ampicilina e p-galactosidase. Um total de noventa e seis colônias foram seleccionadas utilizando rastreio azul/branco e sequenciadas utilizando um sequenciador ABI 3500xL (Applied Biosystems) com iniciadores T7 e SP6 e o BigDye Terminator versão 3.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer-Applied Biosystems). Um total de 41 clones apresentou sequências de microsátélites adequadas para a concepção de iniciadores utilizando o software Primer3Plus (Untergasser et al., 2012), com os seguintes parâmetros: tamanho dos produtos de amplificação final 100 a 300 pb, percentagem de GC mínimo 40% e máximo 60% Temperaturas de anelamento variando de 57°C a 65°C e a diferença na temperatura de anelamento entre pares de iniciadores de no máximo 3°C.

Validação de Primer - Quarenta e um pares de primers foram desenhados e testados para amplificação em *C. adamantium* (n = 5). Os PCR foram realizados em 25 µL de volumes de reação contendo 50 ng de DNA, 7,5 µL de água ultra-pura (Fermentas, Waltham, MA, EUA), 0,15 µM de *primer forward e reverse*, 12,5 µL de PCR Master MIX (50 U/ml de Taq DNA polimerase, 400 µM de dNTP e 3 mM de MgCl₂) (Fermentas). O programa consistiu numa desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 min, anelamento a 60°C durante 1 min, extensão a 72°C durante 1 min e uma extensão final a 72°C durante 15 min. Os produtos de amplificação foram verificados através de géis de agarose a 2%. A avaliação do polimorfismo e a genotipagem foram realizadas em 15 indivíduos de *C. adamantium*, utilizando géis de poliácridamida 7% corados com nitrato de prata (Creste et al., 2001). As análises estatísticas foram realizadas utilizando CERVUS v. 3.0.7 (Kalinowski et al., 2007) e Microsatellite Toolkit v.3.1.1 (Park, 2001) para calcular o número de alelos por locus (A), a heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).

Detecção de polimorfismo SSR e análise de dados - A construção da biblioteca genômica enriquecida em microssatélites teve uma taxa de sucesso de enriquecimento de 42,71%. Foi desenhado um total de 41 pares de primers, dos quais 37 resultaram em amplificação bem-sucedida. A avaliação do polimorfismo indicou que 36 marcadores eram polimórficos e um era monomórfico (Tabela 1). O número de alelos variou de dois a oito, com uma média de 4,73. Ho e He variou de 0,09 a 1,00 e de 0,09 a 0,85, respectivamente. Os valores de PIC (conteúdo de informação polimórfica) variaram de 0,08 a 0,78, com uma média de 0,56 mostrando níveis elevados de polimorfismo (Tabela 1). Todos os loci não mostraram desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (p <0,05). Estes resultados foram consistentes com nossas expectativas, pois a população estudada é aparentemente pequena e isolada.

CONCLUSÕES

Foi desenvolvido o primeiro conjunto de marcadores de microssatélites para *C. adamantium*, que será útil para estudos de genética populacional. O uso dos loci microssatélites hipervariáveis descritos neste estudo obteve bons resultados uma vez que uma única população foi testada, sugerindo que todos os loci podem ser usados para apoiar a conservação genética e programas de melhoramento de *C. adamantium*.

Agradecimentos:

Os autores agradecem à Dra. Anete Pereira de Souza e à Dra. Maria Imaculada Zucchi e sua equipe qualificada pelo apoio na construção de biblioteca genômica enriquecida em microssatélites de *C. adamantium* e desenho dos *primers*. Agradecemos ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro.

LITERATURA CITADA

- Assis, E.S., Reis, E.F., Pinto, J.F.N., Contim, L.A.S., Dias, L.A.S., 2013. Genetic diversity of gabioba based on random amplified polymorphic DNA markers and morphological characteristics. *Genet. Mol. Res.* 12, 3500-3509.
- Billotte, N., Lagoda, P.J.L., Risterucci, A.M., Baurens, F.C., 1999. Microsatellite-enriched libraries: Applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits.* 54, 277–288.
- Coutinho, I.D., Coelho, R.G., Kataoka, V.M.F., Honda, N.K., Silva, J.R.M., Vilegas, W., Cardoso, C.A.L., 2008. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. *Eclét. Quím.* 33, 53–60.
- Creste, S., Neto, A.T., Figueira, A., 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19, 299–306.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.
- Gao, C., Ren, X., Mason, A.S., Li, J., Wang, W., Xiao, M., Fu, D., 2013. Revisiting an important component of plant genomes: microsatellites. *Funct. Plant Biol.* 40, 645-661.
- Haq, S.U., Jain, R., Sharma, M., Kachhwaha, S., Kothari, S.L., 2014. Identification and characterization of microsatellites in expressed sequence tags and their cross transferability in different plants. *Int. J. Genomics.* 2014, 1-12.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A.K., 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica.* 177, 309-334.

- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16, 1099-1106.
- Miranda, E.A.G.C., Boaventura-Novaes, C.R.D., Braga, R.S., Reis, E.F., Pinto, J.F.N., Telles, M.P.C., 2016. Validation of EST-derived microsatellite markers for two Cerrado-endemic *Campomanesia* (Myrtaceae) species. *Genet. Mol. Res.* 15, 1-6.
- Park, S.D.E., 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. Ph.D. thesis, University of Dublin, Dublin, Ireland.
- Pascoal, A.C.R.F., Ehrenfried, C.A., Lopez, B.G.C., Araujo, T.M., Pascoal, V.D.B., Gilioli, R., Anhê, G.F., Ruiz, A.L.T.G., Carvalho, J.E., Stefanello, M.E.A., Salvador, M.J., 2014. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. *Molecules.* 19, 1843-1855.
- Pavan, F.R., Leite, C.Q.F., Coelho, R.G., Coutinho, I.D., Honda, N.K., Cardoso, C.A.L., Vilegas, W., Leite, S.R.A., Sato, D.N., 2009. Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). *Quím. Nova.* 32, 1222-1226.
- Rocha, G.F., Ferreira, L.G., Ferreira, N.C., Ferreira, M.E., 2011. Detecção de desmatamentos no bioma cerrado entre 2002 e 2009: padrões, tendências e impactos. *Rev. Bras. Cartogr.* 63, 341-349.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, 1-12.
- Vallilo, M.I., Lamardo, L.C.A., Gaberlotti, M.L., Oliveira, E., Moreno, R.H., 2006. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26, 805-810.

Tabela 1. Caracterização de 41 loci de microssatélites em *Campomanesia adamantium*.

Locus	Sequência de primers (5' - 3')	Repetição	FTA	Ta	Na	Ni	Ho	He	PIC	GenBank AN
CAMP 01	F: TATCAAGTCACGAAGGTGGG R: TGGCAAGTATATCCTGCTCA	(TG) ₁₆	150 - 180	60	7	11	0,455	0,835	0,768	
CAMP 02	F: CCAATCATGCGATATCGTGC R: TGGCAAGTATATCCTGCTCA	(TG) ₈	150 - 195	60	4	9	0,333	0,712	0,613	
CAMP 03	F: GTTGGCTCAACAGTTAGCAG R: TCTAGAACTCGGCATTTC	(TG) ₈	160 - 180	60	4	10	0,500	0,753	0,665	
CAMP 04	F: CTTAATGCACATCCGCAACA R: GGATGAATTATGTCACGACACA	(GA) ₁₀ (CA) ₆	250 - 270	60	5	9	0,556	0,660	0,580	
CAMP 05	F: ACAGAATGTCGTACCTGCAA R: GGAGTCGAACTGGGTATCTC	(AC) ₉	150 - 180	60	6	9	0,444	0,843	0,766	
CAMP 06	F: GGTGAGGAACTAGATCGGG R: GGTGACTTCCGAAACCTTTG	(TG) ₁₇	250 - 275	60	4	5	0,200	0,778	0,645	
CAMP 07	F: CTCTCTCCTTTCGCATCCTT R: GCACCTAGTCCCATCAATCA	(GC) ₇	190 - 190	60	2	11	0,091	0,091	0,083	
CAMP 08	F: AATAGCTTCCAGACTGCTCC R: AAAAGAGAATTTGGAGCGCC	(TC) ₂₄	240 - 260	60	3	11	0,273	0,593	0,504	
CAMP 09	F: CATCCCGAGTAGCTACAGAG R: TCACAAACATTGCAAAGGGC	(AG) ₂₀	245 - 270	60	7	9	0,667	0,843	0,770	
CAMP 10	F: GGAGGGTGACATAAGAGCAA R: TCCGACTTAACAAGACATACCA	(TG) ₃₄	175 - 185	60	5	10	0,900	0,742	0,653	
CAMP 11	F: CTGTTCTTGCCACTCTGTTG R: ATAATTCCGCCAACAAGCAC	(TC) ₁₇ (CA) ₁₆	280 - 350	60	6	11	0,364	0,801	0,726	
CAMP 12	F: CATATCGCCTTTTGTAGCCCG R: AAAGTGCAGAGAAAGTTCGC	(TG) ₇	265 - 270	60	3	11	0,091	0,255	0,228	
CAMP 13	F: AGTCGAGTGGGCTCTAGTAT R: ATGTGCTGCTCAGAAAGAGT	(TG) ₈	215 - 290	60	8	10	0,800	0,774	0,708	
CAMP 14	F: TGGTCTTGGTTCCTTTCACA R: ACTGTGGTAGAGTTTGACCA	(GT) ₁₇	290 - 300	60	3	6	0,167	0,439	0,363	
CAMP 15	F: CCAATCATGCGATATCGTGC R: TCACGTGGATTGGCAAGTAT	(TG) ₈	190 - 210	60	4	10	0,300	0,595	0,509	
CAMP 16	F: GAGATCATAGGGCTCTTCGG R: CCTCGCTAAAGCTTGCTTTT	(TG) ₈	185 - 195	60	4	8	1,000	0,717	0,612	

CAMP 17	F: TCATCTTCGGCTACATAACGT R: TCCATGCCTTTTCCTCTTTAGA	(AC) ₉	130 – 160	60	5	9	0,889	0,778	0,692
CAMP 18	F: ACTCGAAGAAGCACTAAGGG R: TGGTGTCTGAATTTGGAAGTG	(AC) ₁₀	270 – 290	60	5	9	0,444	0,745	0,652
CAMP 19	F: GAGAAGAGAGGGAGCCTTTG R: CATGGCAACCCTCTGAATG	(GA) ₂₈	160 – 180	60	3	11	0,091	0,255	0,228
CAMP 20	F: GGGGCCATTTTATCTCTCGA R: TATATAGCGGGTGGTCTCGA	(TA) ₇ (CA) ₁₀		60					
CAMP 21	F: GTAGATTGCTGCTAGCTTGC R: ACCTTCGGTCCCATCAAAAT	(TG) ₉	280 – 310	60	7	11	0,909	0,848	0,784
CAMP 22	F: TGGTTCCTAAGATCTCCCA R: TCCCAAACACTTCTGTATGCT	(TG) ₅	115 – 125	60	4	11	0,727	0,675	0,586
CAMP 23	F: CCCTTGAAAACCTTGTGGTGG R: CATCTATGTACGAGGGAGGC	(GA) ₂₇	150 – 190	60	7	11	0,818	0,779	0,706
CAMP 24	F: CAAGTCCTACATGGCTGGAT R: AGTGCACGAAAACCTGGTCTA	(TG) ₇	200 – 230	60	3	11	1,000	0,567	0,436
CAMP 25	F: TCCATGCCTTTTCCTCTTTAGA R: TCATCTTCGGCTACATAACGT	(TG) ₉	140 – 160	60	4	10	0,800	0,721	0,627
CAMP 26	F: TCTTCGACGAGGTAACAAGG R: ATGACACACGTGAATACCGA	(AC) ₈	180 – 205	60	3	9	0,333	0,621	0,501
CAMP 27	F: ATGAAACGGTGGCATCTTTG R: CGGAAGTTCCATCTCCAAGA	(TC) ₂₂	230 – 250	60	4	8	0,500	0,708	0,616
CAMP 28	F: CGTGATGAAGAGTGATGGGA R: TCATTGATAACTGCGGGTGA	(GA) ₂₁	210 – 235	60	5	10	0,100	0,511	0,460
CAMP 29	F: TCTTTGGAGTAGATTGCTGCT R: ATTTCACCTTCGGTCCCATC	(TG) ₁₀		60					
CAMP 30	F: GAGTCCTAGTGCACAATGGT R: TTTTGGGGCTCACTCTATCG	(TG) ₈ (GA) ₂₀ (AG) ₅	270 – 300	60	4	11	0,545	0,463	0,411
CAMP 31	F: TCTTTGGAGTAGATTGCTGCT R: ATTTCACCTTCGGTCCCATC	(TG) ₉		60					
CAMP 32	F: AAAGTGCAGAGAAAGTTCGC R: CATATCGCCTTTTTCAGCCCG	(CA) ₇	270 – 273	60	3	10	0,100	0,279	0,247
CAMP 33	F: AACTCGTCCAAAATCTCCGT R: GATTTTGCCTGCTCTCTCTC	(GT) ₆	210 – 240	60	3	11	0,091	0,325	0,282

CAMP 34	F: TCCGCCAGACAGAAAATTA R: AGTTGTCCGACTCCAACCTTT	(AC) ₈	210 – 250	60	5	11	0,455	0,468	0,420
CAMP 35	F: ACCAAGTGCCTCTAGCTTT R: AGAACCTAGACCTACCTCCC	(TG) ₁₅ (CTAC) ₅		60					
CAMP 36	F: TCCCAAACACTTCTGTATGCT R: TGGTTCCTAAGATCTCCCCA	(CA) ₅	120 – 150	60	5	10	0,600	0,732	0,643
CAMP 37	F: GCTCGTAAGGATGTTTTCCC R: GAGCTTCAACTTGACCAACC	(GA) ₂₈	150 – 210	60	6	10	0,600	0,632	0,570
CAMP 38	F: CGATAACCGGCAATATCACG R: TCCTCTTTTACCCTCCTCCA	(TG) ₈ (GA) ₁₂	170 – 200	60	5	8	0,875	0,808	0,717
CAMP 39	F: AAAGTAGCTCATGCCCTCTC R: CTCTGGAATTCGCACGAATC	(TC) ₂₁	280 – 310	60	5	7	0,857	0,824	0,726
CAMP 40	F: GCAGCTTAACCACTGGAAAG R: TGAAAGCATAGTCGTGTGGA	(TG) ₂₁ (GA) ₈	270 – 300	60	6	10	0,400	0,621	0,553
CAMP 41	F: AGAAAGTGGATGCCGGTTAA R: TGGACTTTCCTCACAAGACT	(TG) ₈ (GA) ₁₁	250 – 310	60	8	10	0,800	0,847	0,783
Média					4,73	9,68	0,52	0,64	0,56

FTA: Faixa de tamanhos de alelos (pb); Ta: Temperatura de anelamento (°C); Na: Número de Alelos; Ni: número de indivíduos; Ho: heterozigidade observada; He: heterozigidade esperada; PIC: conteúdo de informação polimórfica.

ANEXO II

A revista que pretende-se publicar é a **Applications in Plant Sciences** que apresenta fator de impacto de 0.911 e ainda não está inserida na plataforma scopus, não sendo disponibilizada o seu Qualis para Interdisciplinar.

Escopo: Applications in Plant Sciences (APPS) é uma revista mensal, em linha, de acesso aberto, revisada por pares, promovendo a disseminação rápida de ferramentas inovadoras e protocolos inovadores em todas as áreas das ciências da planta, incluindo genética, estrutura, função e desenvolvimento. , Evolução, sistemática e ecologia. O objetivo de APPS é promover a comunicação dentro da comunidade de ciência de planta para avançar a pesquisa científica. APPS é uma publicação da Sociedade Botânica da América (BSA), e está disponível como parte da BioOne Open Access Collection (www.bioone.org/loi/apps).

As normas para publicação podem ser acessadas através do link: <
<http://cms.botany.org/home/publications/apps/instructions-for-authors.html#AuthorAgreementForm>
>