



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
MELHORAMENTO DE PLANTAS

---

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES  
MICROSSATÉLITES PARA *Stryphnodendron  
adstringens* (barbatimão - Fabaceae)**

**LUCIANA OLIVEIRA BARATELI**

Orientador(a):  
**Dr<sup>a</sup> Mariana Pires de Campos Telles**

---

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

---

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico:    ☒ Dissertação    ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

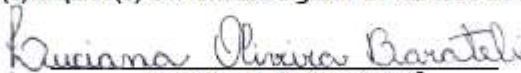
Nome completo do autor: Luciana Oliveira Barateli

Título do trabalho: **DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES  
PARA *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão - Fabaceae)**

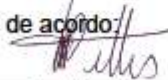
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM    ☐ NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 18/10/2018

---

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

**LUCIANA OLIVEIRA BARATELI**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA  
*Stryphnodendron adstringens* (barbatimão - Fabaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador(a):  
Dr<sup>a</sup> Mariana Pires de Campos Telles

Goiânia - Goiás

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Barateli, Luciana Oliveira  
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES  
PARA *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão - Fabaceae)  
[manuscrito] / Luciana Oliveira Barateli. - 2018.  
LIX, 59 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola  
de Agronomia e Engenharia de Alimentos (EAEA), Programa de Pós  
Graduação em Genética & Melhoramentos de Plantas, Cidade de  
Goiás, 2018.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui siglas, mapas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas,  
lista de figuras, lista de tabelas.

1. Barbatimão. 2. Cerrado. 3. Planta medicinal. 4. SSR. I. Telles,  
Mariana Pires de Campos, orient. II. Título.

CDU 575





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE AGRONOMIA  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
MELHORAMENTO DE PLANTAS**



**ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE LUCIANA OLIVEIRA BARATELI.**

Aos vinte e sete dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezoito (27.08.2018), às 14h, na sala de reuniões do I.N.C.T., no Bloco ICB 1, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os membros da Banca Examinadora: Dr.<sup>a</sup> Mariana Pires de Campos Telles - Orientadora/Presidente, Dr.<sup>a</sup> Thannya Nascimento Soares e Dr.<sup>a</sup> Cíntia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito. Sob a presidência da orientadora, em sessão pública, procedeu-se à avaliação da defesa da Dissertação intitulada: **“Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão - Fabaceae)”**, de autoria de **Luciana Oliveira Barateli**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, no nível de Mestrado, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora, Dr.<sup>a</sup> Mariana Pires de Campos Telles, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da Dissertação que, em 40 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a mestranda, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu à avaliação da defesa. A Dissertação foi considerada aprovada pela Banca Examinadora, cumprindo integralmente este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, pela Universidade Federal de Goiás, em conformidade com o estabelecido pela resolução nº 1403/2016, do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura da UFG (CEPEC/UFG), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Para fins de publicação eletrônica, a mestranda poderá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar à Secretaria do PGMP, respeitando-se o prazo máximo de 30 dias após a data da Defesa. A conclusão do curso e a emissão do diploma dar-se-ão em conformidade com o estabelecido pela Resolução CEPEC nº 1403/2016. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16h a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar, eu, Dr. Sérgio Tadeu Sibov, Coordenador do PGMP, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.

Dr.<sup>a</sup> Mariana Pires de Campos Telles  
Orientadora / Presidente

Dr.<sup>a</sup> Thannya Nascimento Soares  
Membro Interno

Dr.<sup>a</sup> Cíntia Pelegrineti Targueta de Azevedo Brito  
Membro Externo

As minhas irmãs Lais, Leticia e Beatriz,  
Pelo apoio incondicional e por acreditarem em mim.  
*OFEREÇO*

Aos meus pais, João Jorge e Edileusa, e meu filho Victor Hugo,  
Por todo amor e incentivo  
*DEDICO*

## **AGRADECIMENTOS**

Para a produção de uma dissertação é necessário um trabalho extenuante, que não poderia ser realizado individualmente. Primeiramente gostaria de agradecer de forma especial minha orientadora Mariana Telles por toda a atenção, paciência, e por ser uma grande líder, servindo de inspiração pessoal e profissional.

Aos docentes do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da UFG (PGMP) por todo conhecimento que foi compartilhado. À coordenação do PGMP por ter atendido prontamente a todas as solicitações enviadas, tornando possível a realização de um sonho.

Aos órgãos de fomento, um agradecimento especial, uma vez que esses recursos financeiros foram imprescindíveis para a realização de toda a parte experimental deste projeto. Sendo assim, agradeço ao CNPq (Processo: nº 402178/2016-5 e FAPEG (Chamada: nº 07/2014, Processo: nº 201410267001736) pelo financiamento com recursos para custeio, capital e bolsas de apoio técnico. À Capes pela concessão da bolsa de estudos que me permitiu dedicar integralmente ao curso e aprimorar a minha formação profissional.

À equipe do Laboratório de Genética & Biodiversidade do ICB/UFG pela convivência e aprendizagem. Um agradecimento especial aos bolsistas DTI e de apoio técnico vinculados aos projetos do CNPq e ao INCT\_EECBio, pela disponibilidade em organizar o espaço físico, a logística e o gerenciamento dos reagentes, além de auxiliar na capacitação para a execução desse projeto.

Aos amigos da Pós-Graduação que me ajudaram a tornar esse sonho realidade, e todos os dias mais leves e produtivos. Em especial, Ariany Rosa, Priscila Zei, Ramilla Braga, e Ueric José pelas colaborações e aprendizagem.

Aos membros da banca, por todas as considerações, correções e contribuições que aprimoraram esse trabalho e o meu crescimento profissional.

Aos meus amigos, Ricardo Oliveira, Nathalia Bastos e Raiza Marinho que sempre me colocaram para cima quando a vontade era desistir de tudo. Pela admiração e o incentivo que sempre me impulsionaram ao sucesso.

Quero agradecer aos meus pais, João Jorge e Edileusa, por estarem sempre ao meu lado me oferecendo apoio e me incentivando nos momentos mais difíceis. Ao meu filho Victor Hugo por todos os gestos de carinho e apoio que foram tão importantes durante essa jornada.

Às minhas irmãs, Lais Barateli, Letícia Barateli e Beatriz Raika, por acima de tudo serem exemplos de dedicação e superação todos os dias de minha vida. Por estarem do meu lado e me apoiarem nas minhas decisões.

Ao grande arquiteto do universo por enviar energias que foram de suma importância para o meu crescimento pessoal durante esse projeto de vida.

## SUMÁRIO

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO .....</b>                                                                      | <b>10</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                    | <b>12</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                | <b>13</b> |
| <b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                                     | <b>15</b> |
| 3.1 ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Stryphnodendron</i> .....                                      | 15        |
| 3.2 MARCADORES MOLECULARES .....                                                         | 18        |
| 3.3.1 Marcadores microssatélites .....                                                   | 20        |
| 3.3.2 Desenvolvimento de microssatélites utilizando sequenciamento de nova geração ..... | 23        |
| 3.3 VARIABILIDADE GENÉTICA EM ESPÉCIES SILVESTRES .....                                  | 25        |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                        | <b>28</b> |
| 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA .....                            | 28        |
| 4.2 DESENHO DE PRIMERS PARA REGIÕES MICROSSATÉLITES.....                                 | 29        |
| 4.3 PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS DE REGIÕES MICROSSATÉLITES .....                            | 30        |
| 4.4 VARIABILIDADE GENÉTICA.....                                                          | 31        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                    | <b>32</b> |
| 5.1 DESENHO DOS PRIMERS PARA REGIÕES MICROSSATÉLITES.....                                | 32        |
| 5.2 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE .....                                 | 34        |
| 5.2.1 Ajuste de parâmetros para a reação em cadeia da polimerase.....                    | 34        |
| 5.3 CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA .....                                       | 36        |
| <b>6 CONCLUSÃO .....</b>                                                                 | <b>42</b> |
| <b>7 REFERÊNCIAS .....</b>                                                               | <b>43</b> |



## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Classificação das regiões microssatélites segundo suas características (Adaptado de Kalia et al., 2011) .....                                                                                                                                                                                                                                    | 20 |
| <b>Tabela 2.</b> Exemplos de algumas espécies arbóreas de importância econômica que já tiveram sua diversidade genética descrita em algum nível por pelo menos um tipo de marcador molecular (Adaptado Mendonça, 2011).....                                                                                                                                       | 25 |
| <b>Tabela 3.</b> Localização das populações naturais de <i>Stryphnodendron adstringens</i> utilizadas na etapa de caracterização da variabilidade genética.....                                                                                                                                                                                                   | 27 |
| <b>Tabela 4.</b> Reagentes e suas respectivas concentrações utilizados nas reações de PCR para cada amostra de <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....                                                                                                                                                                                                           | 29 |
| <b>Tabela 5.</b> Pares de primers desenhados nas regiões flangeadoras dos microssatélites identificados no genoma de <i>Stryphnodendron adstringens</i> com a quantidade de cada motivo de repetição e o tamanho do fragmento.....                                                                                                                                | 32 |
| <b>Tabela 6.</b> Temperatura específica de anelamento e amplitude alélica dos 20 marcadores padronizados em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% para <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....                                                                                                                                                                 | 35 |
| <b>Tabela 7.</b> Estimativas de diversidade genética para 16 locos microssatélites utilizados para genotipagem de 48 indivíduos de 3 subpopulações de <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....                                                                                                                                                                    | 39 |
| <b>Tabela 8.</b> Valores estimados e intervalo de confiança para os parâmetros: índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), coeficiente de endogamia total ( $F$ ) e diferenciação interpopulacional ( $\theta$ ) geradas pela análise de variância das frequências alélicas com 16 locos microssatélites para a espécie <i>Stryphnodendron adstringens</i> .... | 40 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Área de ocorrência do gênero <i>Stryphnodendron</i> (Scalon, 2007) .....                                                                                                                                                                                            | 14 |
| <b>Figura 2.</b> Hierarquia taxonômica da espécie <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Scalon, 2007).....                                                                                                                                                                             | 15 |
| <b>Figura 3.</b> Estruturas anatômicas de <i>Stryphnodendron adstringens</i> . (a). Frutos: vagens cilíndricas; (b). Folhas bipinadas; (c). Flores creme-esverdeadas em inflorescências em forma de espigas (Scalon 2007).....                                                       | 17 |
| <b>Figura 4:</b> Porcentagem dos motivos de repetição dos 20 marcadores microsatélites que foram selecionados para <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....                                                                                                                          | 31 |
| <b>Figura 5.</b> Gel de agarose 3% para a verificação do teste inicial da PCR na temperatura de 52°C para todos os <i>primers</i> desenhados para <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....                                                                                           | 34 |
| <b>Figura 6.</b> Padrão de amplificação e polimorfismo de alguns dos marcadores desenvolvidos para <i>Stryphnodendron adstringens</i> em gel de acrilamida 6% corado com nitrato de prata. Os locos SadH_02, SadH_03, SadH_04 e SadH_06 são os 4 locos monomórficos encontrados..... | 34 |
| <b>Figura 7.</b> Número de alelos amostrados para cada um dos 16 locos microsatélites polimórficos avaliados em 3 populações de <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....                                                                                                             | 36 |
| <b>Figura 8.</b> Frequências alélicas de 16 locos microsatélites utilizados para genotipagem de 3 populações de <i>Stryphnodendron adstringens</i> .....                                                                                                                             | 37 |

## RESUMO

BARATELI, L. O. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão - Fabaceae)**. 2018. 63 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.<sup>1</sup>

*Stryphnodendron adstringens* apresenta ampla distribuição geográfica, sendo predominante em regiões de Cerrado *stricto sensu* e é conhecida popularmente como “barbatimão”. É uma espécie utilizada na medicina fitoterápica por seu potencial anti-inflamatório, antibacteriano e antiulcerogênico. A retirada de cobertura vegetal do Cerrado diminui significativamente o número de diversas espécies nativas, dentre elas *S. adstringens*. Dessa forma, é importante que sejam traçadas estratégias eficientes para o uso e a conservação dessa espécie. A fim de disponibilizar ferramentas moleculares para estudos de diversidade genética e conservação de *S. adstringens*, o objetivo desse estudo foi desenvolver marcadores microssatélites e estimar o potencial informativo desses marcadores para subsidiar estudos de genética populacional da espécie. A identificação das regiões microssatélites e o desenho dos *primers* foram realizados usando o programa QDD. Inicialmente, foram utilizados quatro indivíduos para os testes de padronização do protocolo de PCR e temperaturas de anelamento. Posteriormente, foram selecionados 48 indivíduos, provenientes de três populações, para avaliação de polimorfismo via gel de poliacrilamida a 6%. A partir das regiões microssatélites identificadas, foram desenhados 20 pares de *primers*, sendo que 14 flanqueiam regiões microssatélites compostas por dinucleotídeos, quatro por tetranucleotídeos e dois por pentanucleotídeos. Dos 20 pares de *primers* avaliados, 16 apresentaram produtos de amplificação polimórficos e quatro monomórficos. Considerando os 16 marcadores polimórficos, o número de alelos variou entre dois (SadH19) e 13 (SadH13), com uma média igual a sete alelos por loco. Os valores das médias da heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e do PIC foram iguais a 0,506, 0,543, 0,635 respectivamente. A proporção da diversidade máxima encontrada foi de 65%, o que indica valores de diversidade genética que podem ser considerados medianos para esse conjunto de locos avaliados em três populações de *S. adstringens*. Por outro lado, embora a diversidade genética seja mediana, esse conjunto de 16 marcadores polimórficos exibiu uma probabilidade de exclusão de paternidade combinada alta (0,999983) e uma probabilidade de identidade combinada baixa ( $3,49 \times 10^{-15}$ ). A análise de variância das frequências alélicas apresentou valores significativos para duas das três estatísticas estimadas com  $f$  não significativo 0,050,  $\theta$  significativo igual a 0,329 e  $F$  no valor global também significativo 0,360. Assim, pode-se concluir que o painel de marcadores polimórficos desenvolvidos para *S. adstringens* é altamente informativo e indicado para estudos genéticos populacionais para a espécie. Outro fator importante é que esses marcadores podem ser testados em outras espécies próximas evolutivamente para possível disponibilização de marcadores microssatélites, sem a necessidade de desenvolvimento de novos *primers*.

**Palavras chave:** Barbatimão, Cerrado, Planta medicinal, SSR.

---

<sup>1</sup>Orientadora: Mariana Pires de Campos Telles

## ABSTRACT

BARATELI, L. O. **Development of microsatellite markers for *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão - Fabaceae)**. 2018. 63p. Dissertation (Master of Science in Genetics and Plant Breeding) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.<sup>1</sup>

*Stryphnodendron adstringens* presents a wide geographical distribution, being predominant in regions of Cerrado sensu stricto and is popularly known as "barbatimão". It is a species widely used in herbal medicine because of its anti-inflammatory, antibacterial and antiulcerogenic potential. The Cerrado's removal of vegetation cover reduces significantly the number of several native species, among them *S. adstringens*. Thus, it is important that efficient strategies for the use and conservation of this species are drawn. In order to provide molecular tools for studies of genetic diversity and conservation of *S. adstringens*, the present work had the objective of developing microsatellite markers for the species. Genomic DNA was obtained from leaf tissue using the CTAB protocol. The identification of the microsatellite regions and the design of the primers were performed using the QDD program modules. From the identified microsatellite regions, 20 pairs of primers were designed, 14 of which flank microsatellite regions composed of dinucleotides, four by tetranucleotides and two by pentanucleotides. Initially, four individuals were used for the standardization tests of the PCR protocol and annealing temperatures. Subsequently, 48 individuals were selected, distributed in three populations, to evaluate polymorphism via 6% polyacrylamide gel. Of the 20 pairs of primers evaluated, 16 presented polymorphic amplification products and four monomorphic amplification products. Considering the 16 polymorphic markers, the number of alleles varied between two (SadH19) and 13 (SadH13), with a mean of seven alleles per locus. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) and PIC values were 0.506, 0.543, 0.635, respectively. The mean  $H_{max}$  value founded (65,519) indicates values of genetic diversity that can be considered medians for this set of loci evaluated in three populations of *S. adstringens*. On the other hand, although genetic diversity is median, this set of 16 polymorphic markers exhibited a combined probability of paternity exclusion high (0.9999983) and combined probability of genetic identity low ( $3,49 \times 10^{-15}$ ). The analysis of variance of allelic frequencies presented significant values for two of the three estimated statistics with  $f$  not significant 0.050, significant  $\theta$  equal to 0,329 and  $F$  in the overall value also significant 0.360. Thus, it can be concluded that the panel of polymorphic markers developed for *S. adstringens* is highly informative and indicated for population genetic studies for the species. Another important factor is that these markers can be tested in other evolutionarily close species for the availability of microsatellite markers, without the need to develop new primers.

**Keywords:** Barbatimão, Cerrado, Medicinal plant, SSR.

---

<sup>1</sup>Advisor: Mariana Pires de Campos Telles



## 1 INTRODUÇÃO

A partir da década de 70 os estudos em genética de populações tiveram significativos avanços, dado o desenvolvimento das técnicas em biologia molecular que proporcionaram novas ferramentas com o desenvolvimento de algumas classes de marcadores moleculares. Os marcadores moleculares podem ser definidos como sendo regiões identificáveis no genoma que permitem a localização de variações na sequência de DNA, encontram-se em pontos específicos do genoma e podem ser passados para as próximas gerações seguindo os princípios básicos da hereditariedade (Semagn et al., 2006).

Diversas são as classes de marcadores moleculares existentes, que se distinguem nos seus princípios e metodologias, dentre essas classes os marcadores do tipo microssatélites possuem alto grau de polimorfismo, o que favorece a sua utilização em estudos de populações naturais, permitindo a obtenção de conhecimentos acerca da distribuição da variabilidade genética, o que é indispensável para a adoção de estratégias de conservação de germoplasma *in situ* e *ex situ* (Oliveira et al., 2006).

Os marcadores microssatélites tem sido a ferramenta molecular mais utilizada nas últimas décadas para estudos de diversidade genética, entretanto, para espécies nativas que não apresentam interesse econômico imediato, a disponibilização desses marcadores é bem mais escassa do que para as espécies cultivadas que apresentam maior interesse econômico (Kalia et al., 2011).

Diversas metodologias para o desenvolvimento de marcadores microssatélites foram utilizadas ao longo dos últimos anos (Castoe et al., 2010). Mais recentemente, o surgimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) possibilitou análises de maiores porções do genoma, tornando a identificação de um grande número de regiões microssatélites de modo mais rápido e em maior escala, permitindo que o pesquisador tenha uma gama muito maior de opções no momento do desenho dos *primers*, além de permitir opções de escolha dos melhores motivos de repetição e tamanhos dessas regiões microssatélites (Castoe et al., 2010; Silva et al., 2013).

Após desenvolvidos, os marcadores microssatélites produzem informações importantes para inferir sobre os processos microevolutivos que estão ocorrendo nas populações e que são responsáveis pela variabilidade genética atual. Com isso, é possível quantificar a diversidade genética de populações, os padrões de fluxo gênico, incidência de deriva genética, geração de vizinhança genética e, portanto, torna possível a identificação de possíveis unidades de conservação e a produção de bancos de germoplasma (Heywood & Iriondo, 2003).

A espécie *Stryphnodendron adstringens* MART. COVILLE (Fabaceae), conhecida popularmente como Barbatimão, ocorre com frequência em fitofisionomias de Cerrado típico (*stricto sensu*), campo sujo e cerradão. Em função das suas propriedades medicinais tem sido alvo de exploração. Práticas tradicionais de extração da casca podem oferecer riscos a espécie, pois a coleta desse material normalmente é feita de maneira desordenada e sem nenhum critério de escolha do indivíduo com relação ao porte (Felfili, 2000; Souza & Felfili, 2006)

Considerando a importância de conservação da espécie, o desenvolvimento de marcadores microssatélites específicos para *S. adstringens* é fundamental para disponibilizar ferramentas moleculares que possibilitem a realização de estudos genético populacionais, permitindo o melhor conhecimento da organização da variabilidade genética entre indivíduos dentro de populações e entre populações e sobre o sistema reprodutivo predominante na espécie. Com isso, será possível gerar informações que podem ser utilizadas para a implementação ou manejo de coleções de germoplasma, assim como o estabelecimento de programas de melhoramento genético para essa espécie que é explorada atualmente de forma exclusivamente extrativista.

Diante disso, esse trabalho teve como principal objetivo desenvolver e avaliar o potencial informativo de um conjunto marcadores microssatélites específicos para *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão - Fabaceae), disponibilizando ferramentas moleculares que possam subsidiar estudos de genética populacional da espécie.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ESPÉCIES DO GÊNERO *Stryphnodendron*

O gênero *Stryphnodendron* foi descrito pela primeira vez por Martius (1837) a partir de três espécies coletadas no Brasil, *Stryphnodendron barbadetimam*, *Stryphnodendron polyphyllum* e *Stryphnodendron rotundifolium*. O gênero reúne 36 táxons conforme a revisão taxonômica realizada por Scalon (2007).

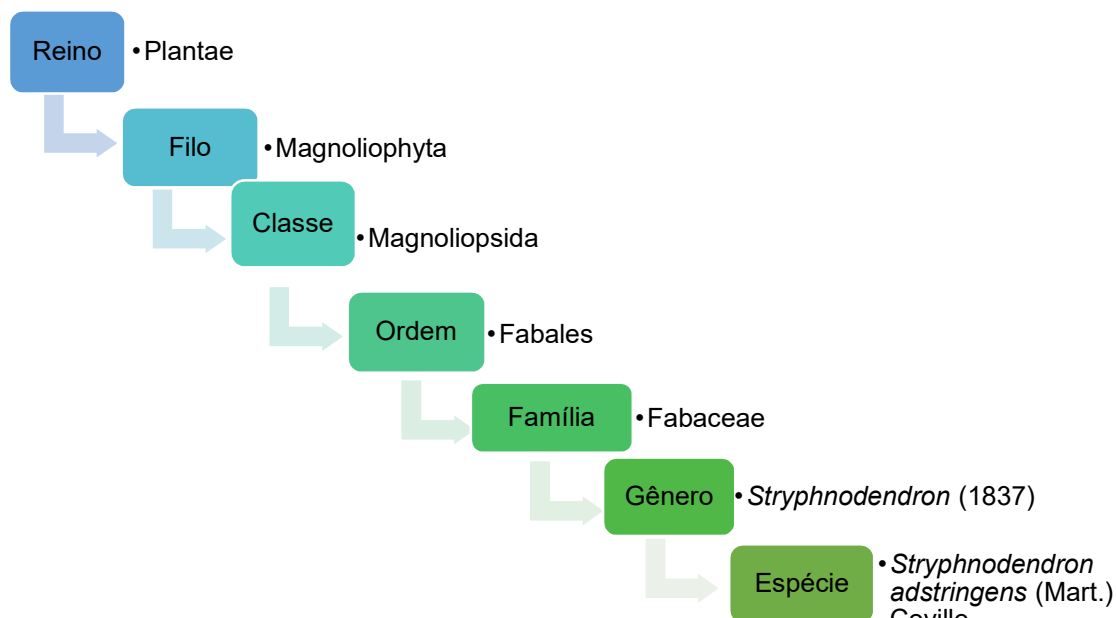
O gênero apresenta ampla distribuição na região neotropical, estando predominantemente distribuído na América do Sul, com exceção da espécie *S. excelsum*, que tem sua ocorrência apenas na América Central (Nicarágua, Costa Rica e Panamá). Os limites da distribuição geográfica do gênero têm ao norte a Nicarágua e ao sul a área de Cerrado do norte do Paraná no Brasil, não tendo sua ocorrência relatada na América do Sul austral e nos Andes (Figura 1) (Scalon, 2007).

Dos 36 táxons de *Stryphnodendron* descritos por Scalon em 2007, cerca de 89% ocorrem em território brasileiro, sendo que, 18 desses táxons são endêmicos dessa região. Não há uma distribuição uniforme do gênero por toda a Região Neotropical. Conforme os padrões de distribuição, foram reunidos em táxons amazônicos, aproximadamente 58%, e táxons extra-amazônicos 42% (Scalon, 2007).



**Figura 2.** Área de ocorrência do gênero *Stryphnodendron* (Scalon, 2007).

Dentre as espécies que são de ampla ocorrência no Brasil Central estão *Stryphnodendron adstringens*, *Stryphnodendron coriaceum*, *Stryphnodendron rotundifolium* var. *rotundifolium* e *Stryphnodendron rotundifolium* var. *villosum*, sendo *Stryphnodendron adstringens* o objeto de estudo do presente trabalho. Sua hierarquia taxonômica encontra-se descrita na Figura 2.



**Figura 2.** Hierarquia taxonômica da espécie *Stryphnodendron adstringens* (Scalon, 2007).

*Stryphnodendron adstringens* é conhecida popularmente como “barbatimão”, “barba-de-timão” ou “casca-da-virgindade”, variando de acordo com a região (Soares et al., 2008). A espécie tem ocorrência predominante em regiões de Cerrado, em especial Cerrado *stricto sensu*, principalmente em Goiás, Bahia, Minas Gerais e São Paulo. A espécie apresenta hábito arbustivo e arbóreo de pequeno a médio porte, atingindo altura máxima de 7 a 12 m. Apresenta caule tortuoso geralmente ramificado à altura do peito. Observa-se variação do hábito relacionada a formação vegetal ocorrendo em hábito arbustivo quanto presente em altitudes elevadas e quando presentes em Cerrados, cerradões e caatingas comportam-se como árvores e arvoretas (Scalon, 2007).

A formação dos frutos ocorre entre novembro e junho, com frutos em forma de vagens cilíndricas de 6 a 9 cm de comprimento (Figura 3A) contendo inúmeras sementes, de coloração verde quando imaturas ou pardas quando maduras. As folhas da espécie são bipinadas, entre 5 e 8 pares de pinas e 6 a 8 pares de folíolos cada pina (Figura 3B). Sua floração acontece entre setembro e novembro, ocorrendo

pequenas flores creme-esverdeadas em inflorescências que são em forma de espigas (Figura 3C) (Lorenzi & Matos, 2002). O amadurecimento dos frutos ocorre entre agosto e setembro. A espécie também apresenta como característica a preferência por solos arenosos e de drenagem rápida (Lorenzi & Matos, 2002; Felfili et al., 1999).

O potencial medicinal do barbatimão foi identificado inicialmente pelos povos indígenas no Brasil, que chamaram a planta de *ibatimó*, que significava árvore que aperta, em função da sua característica adstringente. Posteriormente, foi levada para a Europa denominada como “casca brasileira adstringente” (Glasenapp et al., 2014)

Santana e colaboradores em 2016 realizaram um estudo sobre plantas medicinais utilizadas em uma comunidade quilombola da costa atlântica da Bahia. Uma das espécies de potenciais farmacológicos mais interessantes identificadas nesse estudo foi *Stryphnodendron adstringens*, demonstrando aplicação medicinal no tratamento de feridas, diabetes, problemas de próstata, gastrite, problemas hepáticos, e inflamações em geral (Santana et al., 2016).

No final da década de 80 iniciaram-se estudos com espécies arbóreas nativas, onde os grandes centros de pesquisa começaram a dar visibilidade à importância da conservação desses recursos genéticos (Freitas et al., 2005). As plantas medicinais representam uma classe de grande importância dentre as espécies ameaçadas de extinção (Sebastian et al., 2010). Um instrumento fundamental para a elaboração de estratégias de conservação de recursos genéticos é a avaliação da diversidade disponível. A conservação das espécies em seus locais de ocorrência é fundamental para a conservação dos processos evolutivos atuantes nessas populações (Glasenapp et al., 2014).



**Figura 3.** Estruturas anatômicas de *Stryphnodendron adstringens*. Frutos em forma de vagens cilíndricas (A); Folhas bipinadas (B); Flores creme-esverdeadas em inflorescências em forma de espigas (C) (Scalon 2007).

### 3.2 MARCADORES MOLECULARES

Apenas o fenótipo não fornece informações suficientes para a diferenciação entre plantas. Essa informação pode ser fornecida pelo seu material genético (King & Stansfield, 1997). A variação que ocorre na sequência dos genomas é bastante relevante no momento de se adotar métodos de produção e/ou conservação de espécies (Sehgal & Raina, 2008). Neste aspecto os marcadores moleculares se

tornaram ferramentas bastante úteis fornecendo meios de estabelecer uma ligação entre as variações fenotípicas e as genotípicas (Varshney et al., 2005).

Marcadores moleculares podem ser definidos como sendo sequências de DNA identificáveis que se encontram em regiões específicas do genoma e seguem um padrão de herança conhecido, ou seja, são transmitidos de uma geração para outra conforme determina os princípios da hereditariedade (Semagn et al., 2006). Sendo assim, são amplamente utilizados para a identificação da variação genética por meio da detecção de polimorfismos em diferentes níveis. A maioria dos marcadores moleculares são amplamente empregados em estudos de mapeamento genético, diversidade genética, associação marcador-fenótipo e em programas de seleção assistida por marcadores (Semagn et al., 2006).

O desenvolvimento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pelo pesquisador britânico Kary Mullis no final da década de 80 foi o que alavancou o uso dos marcadores moleculares baseados em DNA. A técnica baseia-se no processo simples de amplificação em escala exponencial de uma quantidade inicial de DNA através do uso de temperatura, enzimas termo sensíveis, e substratos suficientes para a síntese de novas fitas de DNA (Mullis & Faloona, 1987).

O desenvolvimento de tais técnicas colocou à disposição dos geneticistas uma gama de marcadores a serem utilizados, o que levou a estudos comparativos em culturas como soja, trigo e cevada (Powell et al., 1996; Russell et al., 1997; Bohn et al., 1999). Dentre os marcadores comparados, os microssatélites ganharam destaque na genética vegetal em função de diversas características que se mostraram favoráveis, tais como, natureza multialélica, herança codominante, alta reprodutibilidade, abundância no genoma (incluindo genoma organelares), facilidade de automação e genotipagem de alto rendimento, como em cana de açúcar (Parida et al., 2009).

Os marcadores podem se diferenciar quanto a características como abundância no genoma, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, capacidades técnicas, e custos (Buso et al., 2003).

Os marcadores moleculares são classificados principalmente como: i) com base em hibridação RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). ii). com base na técnica de PCR, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams et al., 1990), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ISSR (*Inter Simple*

*Sequence Repeats*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou microssatélites; iii) e porlismo de nucleotídeo único SNPs (Varshney et al., 2007).

### 3.3.1 Marcadores microssatélites

Em 1982, foi relatada e caracterizada a existência de regiões microssatélites em eucariotos, desde leveduras até vertebrados (Hamada et al., 1982). Posteriormente os microssatélites foram identificados em grande número nas plantas e em diversos outros eucariotos por Delseny et al. (1983) e por Tautz & Renz (1984).

Nos genomas vegetais são encontrados principalmente mononucleotídeos em relação aos outros tipos de repetição, sendo A/T o motivo mais frequente. Os dinucleotídeos ficam em segundo lugar com os motivos mais frequentes GA/TC e AT/TA. Os trinucleotídeos ocorrem em uma frequência bem menor, sendo mais comuns em regiões codificantes (Bhargava & Fuentes, 2010; Myburg et al., 2014).

Para serem considerados regiões microssatélites, elas precisam apresentar algumas características em sua estrutura e composição, tais como serem compostas por nucleotídeos arranjados em número que varia entre 1 e 6, organizados em tandem na sequência de DNA, com ocorrência frequente no genoma de procariotos e eucariotos (Agarwal et al., 2008). Essas regiões, após descobertas e descritas começaram a ser utilizadas como marcadores microssatélites, também denominados de sequências simples repetidas (SSRs; Tautz, 1989) ou repetições curtas em *tandem* (STRs; Edwards et al., 1991).

As regiões microssatélites são divididas em grupos segundo algumas características como, o tamanho do motivo de repetição, arranjo dos nucleotídeos nos motivos de repetição e local no genoma (Tabela 1). Segundo o elemento de repetição as regiões microssatélites são subdivididas em -mono, -di, -tri, -tetra, -penta e -hexanucleotídicas. De acordo com a localização no genoma, estão subdivididos em microssatélites nucleares (nuSSR), quando localizados no DNA nuclear; microssatélites cloroplastidiais (cpSSR), no DNA dos cloroplastos; e microssatélites mitocondriais (mtSSR), no DNA das mitocôndrias (Kalia et al., 2011). Segundo o arranjo dos nucleotídeos no motivo de repetição, são classificados em perfeitos ou imperfeitos, interrompidos ou compostos. Os perfeitos são aqueles possuem apenas os nucleotídeos pertencentes ao motivo da sequência, enquanto o imperfeito apresenta bases que não corresponde ao motivo. Os interrompidos possuem em sua



constituição uma sequência curta que não correspondem ao seu motivo original. Os compostos são constituídos de dois motivos de repetição arranjados em tandem (Bhargava & Fuentes, 2010; Oliveira et al., 2012).

**Tabela 1.** Classificação das regiões microssatélites segundo suas características (Adaptado de Kalia et al., 2011).

|                                                                              |                          |                            |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>A. Segundo número de elementos repetitivos (n)</b>                        |                          |                            |
| Mononucleotídeos                                                             | (A)n                     | ...AAAAAAAAA...            |
| Dinucleotídeos                                                               | (CA)n                    | ...CACACACACACA...         |
| Trinucleotídeos                                                              | (CGT)n                   | ...CGTCGTCGTCGTCGT...      |
| Tetranucleotídeos                                                            | (CAGA)n                  | ...CAGACAGACAGACAGA...     |
| Pentanucleotídeos                                                            | (AAATT)n                 | ...AAATTAAATTAAATTAAATT... |
| Hexanucleotídeos                                                             | (CTTTAA)n                | ...CTTTAACTTTAACTTTAA...   |
| <b>B. Segundo o local no genoma</b>                                          |                          |                            |
| Nuclear                                                                      | nuSSR                    |                            |
| Cloroplastidial                                                              | cpSSR                    |                            |
| Mitocondrial                                                                 | mtSSR                    |                            |
| <b>C. Segundo o arranjo dos nucleotídeos dentro dos motivos de repetição</b> |                          |                            |
| Perfeito                                                                     | (CA)n                    |                            |
| Imperfeito                                                                   | (AAC)n ACT (AAC)n        |                            |
| Interrompido                                                                 | (CTTTAA)n CGGA (CTTTAA)n |                            |
| Composto                                                                     | (CGT)n (AAT)n            |                            |

n= número de vezes que o motivo se repete

Yu e colaboradores em 2004 realizaram um estudo com trigo identificando que 19% dos motivos dinucleotídeos estão localizados em regiões codificadoras, enquanto 74% dos trinucleotídeos encontram-se em regiões codificadoras. Essa maior frequência de repetições de trinucleotídeos encontrada em regiões codificantes em relação aos outros tipos de repetição pode ser explicada baseada na pressão seletiva existente, o que leva a supressão de microssatélites não triméricos nas regiões codificadoras, isso ocorre devido à mudança no quadro de leitura de um gene que pode ser causada, com aumento ou um decréscimo no número de unidades de repetição (Kalia et al., 2011).

Em função dessas características, os microssatélites localizados em regiões codificantes e não codificantes recebem denominações distintas, sendo os localizados em regiões intrônicas ou em sequências intergênicas classificados como microssatélites genômicos (SSR) e os localizados nas regiões transcritas como microssatélites gênicos (EST-SSR) (Varshney et al., 2005).

As altas taxas de polimorfismo nos microssatélites estão diretamente relacionadas às altas taxas de mutação que ocorrem nessa região do genoma. Os principais mecanismos que causam mutação então divididos em dois, o deslizamento da polimerase durante a replicação, conhecida como *strand-slippage* e a recombinação desigual. Nos dois casos a mutação é resultado do pareamento incorreto de bases do DNA, tendo como consequência inserção ou deleção de unidades de repetição. Modelos alternativos estão sendo constantemente estudados para explicar como ocorre a evolução dos microssatélites (Ellegren, 2004).

As taxas de mutação existentes para os microssatélites podem variar desde entre espécies, alelos, até entre locos. Os fatores que influenciam a variação dessa taxa são características como número de motivos de repetição, comprimento da repetição e o tipo de motivo repetido. Regiões que possuem um elevado número de repetições em tandem tem maior chance de ocorrer deslizamento, se tornando mais susceptíveis à mutação (Bhargava & Fuentes, 2010).

O polimorfismo que ocorre nas regiões microssatélites pode ser observado a partir do uso de marcadores específicos, esse polimorfismo ocorre em função da variação no número de motivos de repetição que compõe a região microssatélite. Essa informação pode ser facilmente recuperada por reação em cadeia da polimerase. É possível realizar a genotipagem com níveis diferentes de automação, o que torna essa uma técnica robusta para análise de paternidade, construção de mapas genômicos, seleção assistida por marcadores e para estabelecer relações genéticas evolutivas entre espécies e populações (Parida et al., 2009).

Em uma aplicação prática, o uso de marcadores moleculares microssatélites se mostram eficientes na produção de informações importantes para o reconhecimento de potenciais unidades de conservação, além de fornecer dados sobre os processos genéticos que ocorrem com as populações como a diversidade genética, fluxo gênico e deriva genética (Heywood & Iriondo, 2003). Como exemplo podemos citar os trabalhos de caracterização genética de bancos de germoplasma de *Dipteryx alata* (Guimaraes, et al., 2017) e *Hymenaea Stigonocarpa* (Gonçalves, 2016),

Algumas desvantagens estão associadas ao uso de marcadores microssatélites, como por exemplo a necessidade da utilização de *primers* (sequências de regiões que flanqueiam os microssatélites) específicos para cada espécie, sendo este um processo que requer disponibilidade de investimento financeiro e recursos humanos especializados. O ganho em tempo e recursos financeiros está na praticidade e

reprodutibilidade da técnica que utiliza a Reação em Cadeia da Polimerase para realizar a identificação de polimorfismo das populações (Caixeta et al., 2006; Zalapa et al., 2012).

Uma característica interessante e muito vantajosa que pode reduzir os custos em análises populacionais utilizando marcadores microsatélites é a possibilidade de transferibilidade de *primers*. Os *primers* desenvolvidos para uma espécie podem ser transferidos para outras espécies que são filogeneticamente próximas. Isso ocorre porque existe homologia entre as regiões que flanqueiam os microsatélites, por serem fortemente conservadas entre táxons (Varshney et al., 2005; Barbará et al., 2007).

### 3.3.2 Desenvolvimento de microsatélites utilizando sequenciamento de nova geração

As novas tecnologias para sequenciamento de DNA começaram a ser comercializadas no início dos anos 2000, e desde então não pararam de se desenvolver. Todas têm em comum a capacidade de gerar dados de milhões de pares de bases de DNA em uma única corrida (Carvalho & Silva, 2010), que geram informações suficientes para a identificação de regiões microsatélites no genoma para escolha e desenhos de *primers* (Abdelkrim et al., 2009; Zhu et al., 2012). Pode-se destacar como benefícios dessa metodologia o potencial de gerar um grande número de informações realizando sequenciamento de alta cobertura genômica, possibilitando grandes quadros de leitura, contribuindo para o procedimento de montagem dos genomas (Carvalho & Silva, 2010).

A principal vantagem do sequenciamento de nova geração (NGS) para o desenvolvimento de microsatélites é a possibilidade de análises do genoma parcial, ou mesmo de uma fração do genoma, tornando-se possível a identificação de um grande número e tipos de regiões microsatélites. Tal riqueza de informações beneficia principalmente o desenho de *primers* para espécies que contém poucas regiões microsatélites no genoma, além de oferecer ao pesquisador a opção de escolha dos melhores motivos de repetição (Castoe et al., 2010; Silva et al., 2013).

A alta quantidade informação gerada torna importante que se considere cuidadosamente as opções relacionadas ao processamento dos dados do sequenciamento de nova geração para a identificação das regiões microsatélites. Após a obtenção dos dados brutos a primeira etapa é a montagem das sequências

para a obtenção dos *contigs*. Como já mencionado a identificação dos microssatélites pode ser realizada em genomas parciais ou em pedaços do genoma, podendo acontecer já nessa etapa. No entanto para realizar a montagem do genoma é necessário o conhecimento sobre algumas informações como, por exemplo, o tipo de dado gerado (tecnologia 454 x illumina e/ou genoma x transcriptase), além de exigir também o conhecimento de bioinformática por parte do pesquisador (Zalapa et al., 2012). Outro fator para ser levado em consideração é o software a ser utilizado para a montagem dos dados de NGS, pois existem diversos programas que realizam a montagem de *contigs* (Shendure & Ji, 2008; Taheri et al., 2018).

Uma vez que o NGS é uma ferramenta altamente eficaz na descoberta de microssatélites torna-se um desafio para o pesquisador à padronização da reação de PCR nessa etapa do desenvolvimento. Estudos de NGS sequenciam milhares de regiões microssatélites, sendo assim exige-se uma análise cuidadosa no momento de selecionar essas regiões com potencial para se tornarem marcadores, sendo os parâmetros utilizados no momento da pesquisa um fator primordial (Zalapa et al., 2012). Durante o desenvolvimento, outro fator relevante que deve ser levado em consideração é que, microssatélites com maiores taxas de polimorfismo em geral são associados com motivos de repetição mais curtos e com maior número de repetições. Tal característica pode ser atribuída as suas altas taxas de mutação quando comparados a motivos de repetição mais longos e com menor número de repetições (Kelkar et al., 2008). Por fim deve-se dar prioridade a classe dos microssatélites perfeitos, pois apresentam maior variabilidade alélica que os compostos ou imperfeitos (Buschiazzo & Gemmell, 2006). Vários são os programas para realizar a busca por motivos microssatélites em dados de sequenciamento de nova geração, sendo que muitos podem ser utilizados independentemente ou em conjunto (Zalapa et al., 2012).

Após a identificação das regiões microssatélites o desenvolvimento segue com as etapas de: (i) desenho dos pares de *primers* específicos das regiões que flanqueiam os microssatélites; (ii) a padronização da reação PCR para cada *loco* microssatélite visando o máximo de quantidade e qualidade de DNA na amplificação; (iii) análise e caracterização do polimorfismo de cada *loco* para a validação das regiões microssatélites para a disponibilização dos mesmos como marcadores para a espécie em estudo (Roder et al., 1998; Semagn et al., 2006).

### 3.3 VARIABILIDADE GENÉTICA EM ESPÉCIES SILVESTRES

A variabilidade genética que é verificada nos mais diversos tipos de populações naturais, sejam elas plantas ou animais, é resultante de uma relação intrincada entre os processos de mutação, recombinação, fluxo gênico, deriva genética e seleção natural. Além disso, aspectos tais como tamanho populacional, padrões de cruzamento e distribuição geográfica dos indivíduos também contribuem para a manutenção e organização da variabilidade genética. A estrutura genética pode ser moldada a partir da disposição dos alelos e dos genótipos no espaço e no tempo e as forças evolutivas atuando do contexto de cada espécie e de suas populações (Hamrick, 1982; Beja-Pereira & Almeida, 2005; Borém, 2005; Hartl, 2008).

A estrutura genética de uma população é fortemente influenciada por aspectos ecológicos que afetam a reprodução e a dispersão dos genes. A reprodução tem seu papel fundamental de repassar a informação genotípica para a próxima geração, mantendo o fenótipo e a dispersão de pólen e sementes (Loveless & Hamrick, 1984).

Ao se considerar a dificuldade de estudar todas as espécies do ecossistema devido à grande diversidade existente, os estudos populacionais do ponto de vista genético tornaram-se um grande aliado dos pesquisadores (Kageyama et al., 2003). Nesse sentido tais estudos permitiram que algumas espécies pudessem servir como modelos para outras em função das suas características biológicas semelhantes (Kageyama et al., 2003; Freire et al., 2007). A partir de estudos populacionais foram observados que padrões de estrutura genética se associam a padrões reprodutivos e demográficos (Kageyama et al., 2003).

Sabe-se também que o conhecimento acerca do fluxo gênico e a variabilidade dentro e entre as populações são relevantes no momento de definir métodos de conservação, sendo assim, diversos são os estudos onde são realizadas análises da diversidade genética das populações e a caracterização dos níveis de diversidade genética. Nesses estudos, dependendo dos marcadores utilizados, são avaliados porcentagem de locus polimórficos, número de alelos por locus e heterozigosidade média (Zucchi, 2002). Muitos são os marcadores moleculares disponíveis para estimar padrões de variabilidade genética em populações naturais, com a finalidade de tomada de decisões para conservação de recursos genéticos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A partir de um levantamento na literatura é possível verificar que algumas espécies já foram estudadas do ponto de vista genético populacional partir do uso de diferentes marcadores moleculares (Tabela 2), mas que se comparado ao número de espécies existentes, por exemplo, no bioma Cerrado, muito ainda deve ser realizado a fim de conhecer a magnitude e a distribuição da variabilidade genética nessa espécies.

**Tabela 2.** Exemplos de algumas espécies arbóreas de importância econômica que já tiveram sua diversidade genética descrita em algum nível por pelo menos um tipo de marcador molecular (Adaptado Mendonça, 2011).

| <b>Espécie</b>                 | <b>Marcador molecular</b> | <b>Referência</b>                                                                                    |
|--------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Anacardium humile</i>       | SSR                       | Soares et al., 2013                                                                                  |
| <i>Annona crassiflora</i>      | SSR                       | Collevatti et al., 2014                                                                              |
| <i>Araucaria angustifolia</i>  | AFLP, SSR, nuSSR, cpSSR   | Souza, 2006; Stefenon et al., 2003; Bittencourt; Sebben, 2008; Patreze & Tsai, 2010; Klabunde, 2012. |
| <i>Aspidosperma polyneuron</i> | AFLP, SSR, ISSR           | Almeida et al., 2015; Damasceno et al., 2011; Reis et al., 2011                                      |
| <i>Byrsonima cydoniifolia</i>  | SSR                       | Bernardes et al., 2014                                                                               |
| <i>Cabralea canjerana</i>      | SSR; ISSR                 | Alegre, 2015; Melo et al., 2015; Pereira et al., 2011                                                |
| <i>Caesalpinia echinata</i>    | AFLP, RAPD                | Cardoso et al., 2005; Cupertino & Correcirc, 2013                                                    |
| <i>Calophyllum brasiliense</i> | AFLP, cpDNA, RAPD         | Carnavale-Bottino, 2006; Mendonça et al., 2014; Neri, 2011; Silveira et al., 2016.                   |
| <i>Cariniana estrellensis</i>  | SSR                       | Guidugli et al., 2016.                                                                               |
| <i>Copaifera langsdorffii</i>  | SSR                       | Antiqueira et al., 2014; Carvalho et al., 2010; Martins et al., 2008; Tarazi et al., 2010.           |
| <i>Dipteryx alata</i>          | SSR                       | Guimaraes, R. A. et al., 2017. Soares et al., 2015                                                   |
| <i>Eugenia dysenterica</i>     | RAPD, SSR                 | Aguiar et al., 2011; Telles et al., 2013; Zucchi, 2002.                                              |

|                                    |                                                  |                                                                            |
|------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <i>Eugenia uniflora</i>            | AFLP, SSR, RAPD                                  | Franzon et al., 2010; Ferreira-Ramos et al., 2008; Slaviero, 2009.         |
| <i>Gmelina arborea</i>             | AFLP, ISSR, SSR                                  | Araya et al., 2005; Naik et al., 2009; Wee et al., 2012.                   |
| <i>Hancornia speciosa</i>          | SSR                                              | Costa, et al., 2017; Rodrigues, et al., 2015                               |
| <i>Hymenaea courbaril</i>          | SSR, ISSR                                        | Ciampi et al., 2008; Feres et al., 2009; Silva, 2010.                      |
| <i>Myracrodruon urundeuva</i>      | AFLP, fAFLP, SSR                                 | Freitas et al., 2005; Souza, 2017; Viegas et al., 2011.                    |
| <i>Myrcia splendens</i>            | ISSR                                             | Brandão et al., 2015; Brandão et al., 2011.                                |
| <i>Plathymenia reticulata</i>      | RAPD, SSR                                        | Cruz et al., 2012; Lacerda et al., 2001; Oliveira et al., 2012.            |
| <i>Schizolobium parahyba</i>       | RAPD, SSR, AFLP                                  | Canchignia-Martínez et al., 2007; Freire et al., 2007; Kamau et al., 2003. |
| <i>Stryphnodendron adstringens</i> | RAPD, Isoenzimas, AFLP, Transferibilidade de SSR | Camilo et al., 2001; Glasenapp, 2007; Branco et al., 2010; Mendonça, 2011  |
| <i>Tabebuia aurea</i>              | SSR                                              | Braga et al., 2007                                                         |
| <i>Tabebuia roseoalba</i>          | SSR                                              | Feres et al., 2009; Martinez, 2008; Ribeiro, 2011.                         |
| <i>Tibouchina papyrus</i>          | SSR                                              | Lima et al., 2015; Telles et al., 2011; Telles et al., 2010                |

Para *Stryphnodendron adstringens* pode-se verificar na literatura alguns trabalhos que realizaram análises de variabilidade genética populacional com marcadores RAPD (Camilo et al., 2001), Isoenzimas (Glasenapp, 2007), AFLP e transferibilidade de microssatélites (Branco et al., 2010; Mendonça, 2011). Atualmente, não se tem disponível na literatura um painel de marcadores microssatélites, que seja espécie específico para *Stryphnodendron adstringens*, que possa subsidiar estudos genético populacionais utilizando essa classe de marcador, o que justifica o desenvolvimento do presente trabalho.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Para a realização do presente estudo foram amostradas folhas de *S. adstringens*, coletadas em sílica gel e acondicionadas em freezer - 80°C no laboratório de Genética & Biodiversidade (LGBio), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. O DNA de cada indivíduo foi extraído, a partir do tecido foliar, seguindo o protocolo que utiliza o detergente CTAB (*brometo de cetil-trimetil amônio*) descrito por Doyle & Doyle (1987), adaptado por Ferreira & Grattapaglia (1998).

A amostragem de indivíduos em cada etapa do trabalho foi organizada da seguinte forma: 1) um indivíduo foi utilizado na etapa de sequenciamento e obtenção parcial do genoma. A partir da obtenção dos dados desse indivíduo foi realizada a pesquisa e identificação das regiões microssatélites; 2) para a etapa dos testes de amplificação cruzada e padronização da temperatura dos primers desenhados para *Stryphnodendron adstringens* foram utilizados apenas 4 indivíduos oriundo de diferentes localidades; 3) na etapa de identificação de polimorfismo foram utilizados 8 indivíduos oriundos de diferentes localidades; e 4) na etapa de caracterização da variabilidade genética, os marcadores considerados padronizados foram avaliados em 48 indivíduos distribuídos em três populações (Tabela 3).

**Tabela 3.** Localização das populações naturais de *Stryphnodendron adstringens* utilizadas na etapa de caracterização da variabilidade genética.

| Localidade                 | Código | Nº Indivíduos | Latitude  | Longitude |
|----------------------------|--------|---------------|-----------|-----------|
| Candeias (MG)              | CAN-MG | 16            | -20,68917 | -45,21638 |
| Posse (GO)                 | POS-GO | 16            | -14,18185 | -46,34372 |
| Chapada dos Guimarães (MT) | CHG-MT | 16            | -15,48030 | -55,68783 |

A qualidade e integridade das amostras de DNA extraídas foram verificadas por eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, coradas com brometo de etídio (10



mg/ml). Cada amostra foi preparada com 3  $\mu\text{L}$  de DNA e 4  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento. A eletroforese foi realizada com o gel submerso no tampão TBE (*Tris Borato-EDTA*) na concentração 1x, o padrão de voltagem utilizada para conduzir a eletroforese foi de 70V. Foram utilizados padrões de massa molecular, DNA de fago *Lambda* ( $\lambda$ ), em concentrações conhecidas (10 ng/  $\mu\text{L}$ , 20 ng/  $\mu\text{L}$ , 50 ng/  $\mu\text{L}$ , 100 ng/  $\mu\text{L}$  e 200 ng/  $\mu\text{L}$ ). Ao final da eletroforese os géis foram visualizados com luz ultravioleta e fotografados por fotodocumentador seguindo a quantificação visual de cada amostra através da comparação com os padrões de peso molecular lambda.

Para a etapa de padronização das condições da reação em cadeia da polimerase (PCR), as amostras foram normalizadas para uma concentração de aproximadamente 2,5 ng/ $\mu\text{L}$ . Para tanto, as amostras foram diluídas com água ultrapura. Após a diluição, uma nova eletroforese horizontal foi realizada para a verificação da concentração da amostra diluída.

#### 4.2 DESENHO DE *PRIMERS* PARA REGIÕES MICROSSATÉLITES

A identificação de regiões microssatélites no genoma de *S. adstringens* foi realizada a partir da utilização de conjunto de sequências de DNA geradas por Souza e colaboradores (2018 - dados não publicados). Com base nesse conjunto de sequências foi realizada a busca por regiões microssatélites utilizando o programa QDD versão 3.1.2 (Megléczy et al., 2014). Para tanto, foram utilizados parâmetros de busca para o número mínimo de vezes que cada tamanho de motivo microssatélite se repete numa mesma região, foram usados, dez para dinucleotídeos, seis para trinucleotídeos e tetranucleotídeos e cinco para pentanucleotídeos e hexanucleotídeos. Para a realização dessa etapa as regiões microssatélites que estavam associadas a elementos transponíveis (TEs) foram descartadas.

A partir das regiões microssatélites que atendiam as características mínimas desejadas que foram identificadas utilizando o software QDD, foram desenhados *primers* no programa Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Para tanto, foram considerados os seguintes parâmetros para o desenho dos *primers*: tamanho do *amplicon* variando entre 150bp e 400bp, proporção de GC variando entre 30% e 60%, valor de temperatura de *melting* ( $T_m$ ) variando entre 56°C e 62°C e tamanho do *primer* permanecendo no intervalo entre 22bp e 25bp.

#### 4.3 PADRONIZAÇÃO DOS PRIMERS DE REGIÕES MICROSSATÉLITES

Cada par de *primer* desenhado foi testado em diferentes reações de PCR alterando a temperatura de anelamento do *primers* para mais ou para menos, a fim de encontrar a temperatura de anelamento ideal. As PCRs foram conduzidas no termociclador *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)*.

As reações de PCR foram preparadas seguindo as condições de concentração de reagentes descritas na Tabela 4. O programa utilizado para todas as reações no termociclador foi: (1) desnaturação a 94°C durante 5 minutos, (2) desnaturação a 94°C durante 1 minuto; (3) temperatura específica de anelamento do par de *primers* ao fragmento de DNA durante 1 minuto, (4) extensão da molécula Taq polimerase a 72°C por 1 minuto, (5) extensão a 72°C durante 45 minutos. As etapas de 2 a 4 ocorreram em 30 ciclos. As temperaturas de anelamento foram ajustadas especificamente para cada par de *primers* com o objetivo de maximizar a qualidade do produto amplificado e, conseqüentemente, diminuir os produtos de amplificações inespecíficas.

**Tabela 4.** Reagentes e suas respectivas concentrações utilizados nas reações de PCR para cada amostra de *Stryphnodendron adstringens*.

| Reagente                               | Concentração | Volume (µl) |
|----------------------------------------|--------------|-------------|
| H <sub>2</sub> O ultrapura             | -            | 2,65        |
| DNA                                    | 2,5 ng/µl    | 1,5         |
| Primer (F e R)                         | 0,9 µM       | 1,5         |
| Tampão da enzima com MgCl <sub>2</sub> | 10 X         | 1,0         |
| BSA                                    | 25 mg/ml     | 1,3         |
| dNTP's                                 | 2,5 µM       | 0,9         |
| Taq polimerase                         | 5 U          | 0,15        |
| TOTAL                                  | -            | 10          |

Os produtos de PCR foram avaliados, quanto a qualidade da amplificação, em eletroforese horizontal em gel de agarose 3% sob TBE 1X, submetidos a uma corrente elétrica de 70V, durante 1 hora. Os fragmentos amplificados (bandas) foram visualizados em um fotodocumentador de luz Ultravioleta.

Em seguida, os produtos de PCR foram avaliados em gel de poliacrilamida a 6% para avaliar com maior precisão a qualidade do produto de amplificação e a detecção do polimorfismo. Este processo de eletroforese ocorreu aproximadamente por 2 horas a 65W. Para a visualização das amostras foi utilizado o sistema de coloração por nitrato de prata, conforme descrito por Creste et al. (2001). O tamanho de cada alelo foi determinado por comparação com marcadores de padrão

moleculares (Ladder 10 bp e/ou 50 pb da Invitrogen) que foram aplicados em cada gel, ao lado das amostras. Após a secagem das placas de vidro contendo os géis corados, os mesmos foram analisados sobre uma luz branca para estimar os tamanhos dos alelos em cada loco. As regiões polimórficas foram utilizados para avaliar a variabilidade genéticas nas três populações.

#### 4.4 VARIABILIDADE GENÉTICA

A variabilidade genética foi estimada a partir dos genótipos de 48 indivíduos oriundos das três populações de *S. adstringens* (Tabela 3). Foram utilizados os marcadores que apresentaram polimorfismo na etapa anterior de padronização avaliado em gel de poliacrilamida, uma vez que esses apresentaram potencial para estudos genético-populacionais.

Para a descrição do polimorfismo e dos índices de diversidade genética foram calculados os seguintes parâmetros genéticos: frequência alélica, número médio de alelos por loco ( $A$ ); heterozigosidade observada ( $H_o$ ), média aritmética do número total de heterozigotos em relação ao número total de indivíduos; heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg (E.H.W), que se refere a probabilidade de pegar dois gametas em uma população e eles terem alelos diferentes em um determinado loco, definida por Nei (1973) como diversidade genética. Todas essas estimativas foram realizadas no programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi obtido por meio do programa Cervus v.3.0 (Kalinowski et al., 2007). Além disso, foram estimados a probabilidade de identidade genética ( $I$ ) e a probabilidade de exclusão de paternidade ( $Q$ ) no programa IDENTITY 1.0 (Wagner & Sefc, 1999).

Para estimar a máxima diversidade genética disponível, em cada loco, foi realizado um cálculo a partir do número de alelos observados, em que:  $H_{MAX} = (A - 1)/A$ . O número efetivo de alelos por loco ( $A_e$ ) foi calculado a partir de  $A_e = 1/(1-H_e)$ . A proporção da diversidade máxima  $H_e/H_{MAX}(\%)$  foi calculada a partir de  $H_e/H_{MAX}(\%) = (H_e/H_{MAX}) \times 100$ .

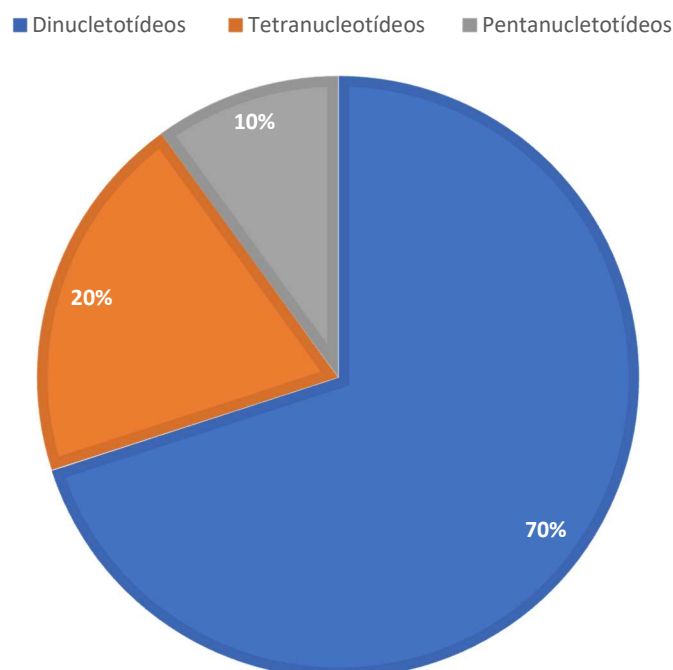
Com o objetivo de avaliar a magnitude e a distribuição da variabilidade entre e dentro das populações, foram estimados os parâmetros de estrutura genética por meio de uma análise de variância de frequências alélicas (Weir & Cockerham, 1984).

Foram utilizadas 10000 reamostragens para estabelecer os intervalos de confiança a 95% para os valores de  $f$ ,  $F$  e  $\theta$ . As estimativas foram obtidas no programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DESENHO DOS *PRIMERS* PARA REGIÕES MICROSSATÉLITES

Considerando as características indicativas de potencial para o desenho de primers, foi possível selecionar 20 regiões microsatélites do genoma de *Stryphnodendron adstringens* (Tabela 5). Os pares de primers foram desenhados para 14 regiões microsatélites compostas por dinucleotídeos, quatro por tetranucleotídeos e duas por pentanucleotídeos (Figura 4). Cada loco recebeu o prefixo “SAD\_H” em que “SAD” é a abreviação de *Stryphnodendron adstringens* e “H” remete ao tipo de sequenciamento utilizado para a obtenção da sequência genômica, HiSeq (Souza et al., 2018 – dados ainda não publicados).



**Figura 4.** Porcentagem dos diferentes motivos de repetição nas 20 regiões microsatélites que foram selecionados para *Stryphnodendron adstringens*.

**Tabela 5.** Pares de *primers* desenhados para regiões flangeadoras de microssatélites identificados no genoma de *Stryphnodendron adstringens* com a quantidade de cada motivo de petição e o tamanho do fragmento.

| Marcador | Sequência                                                 | Motivo de repetição  | Tamanho do fragmento (pb) |
|----------|-----------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------|
| SadH_01  | F - AGTGCCTCTACTGATTTATGACCC<br>R - CCAGGCGATTCAACCATATC  | (GT) <sub>5</sub>    | 163                       |
| SadH_02  | F - AAGCCGTAGCTTGGAAGTGA<br>R - TGTCCATAGATCCAAACGAGG     | (AG) <sub>6</sub>    | 320                       |
| SadH_03  | F - TCGGCTACTTCTTCTGCATCT<br>R - CAGGTTGTGGTTGGCCTATT     | (AC) <sub>5</sub>    | 250                       |
| SadH_04  | F - TCAGAGAGGTGGTTTGAGCA<br>R - CACCAAATCAATCATGTTCCA     | (TG) <sub>6</sub>    | 350                       |
| SadH_05  | F - GTGGTCTCTCTGCTGCCTTC<br>R - ACAGGGATGAGCCAGAGCTA      | (CT) <sub>14</sub>   | 286                       |
| SadH_06  | F - ACGATATTAAGAAGGGACTAGCAG<br>R - AGGTTTGAAGGCTCATCAGTT | (AG) <sub>5</sub>    | 321                       |
| SadH_07  | F - TAAAGGGTCATTATATGTGGCAA<br>R - TTTCTGTAACCCTTCGACCA   | (AC) <sub>14</sub>   | 170                       |
| SadH_08  | F - TACAGCTTCAGCAACAACCC<br>R - GTGTCGCTGGAGAATCACAT      | (AG) <sub>14</sub>   | 167                       |
| SadH_09  | F - AGTGGAAGAAGAGCCACAG<br>R - CCTGGAAAGGTTGGAGAGTG       | (CT) <sub>11</sub>   | 204                       |
| SadH_10  | F - GAAGAAGCAGAGGGTTGTCAG<br>R - GAATACATGGGCAAATGATGG    | (AG) <sub>14</sub>   | 264                       |
| SadH_11  | F - TTAAGTCACGCCTCTTCGTC<br>R - CTGTATAGTGAAGGCATGTTTCC   | (AG) <sub>15</sub>   | 327                       |
| SadH_12  | F - AACACCTCCCTAGTCCCTCC<br>R - TCAGAAATGTGCTTCTTTGCG     | (CT) <sub>16</sub>   | 158                       |
| SadH_13  | F - CTTCCAGGTGCCTTGCTTAC<br>R - TGCTCATCTGTTTCTTTGGTTC    | (TG) <sub>14</sub>   | 220                       |
| SadH_14  | F - GAGACATCGTCCGAGGCTAA<br>R - CTGACCCAAATCAGCACAGA      | (TC) <sub>14</sub>   | 250                       |
| SadH_15  | F - TGAGTTGGGTGCTCTACCTT<br>R - AAGAACGAAGAAATGGCAAA      | (AACG) <sub>7</sub>  | 237                       |
| SadH_16  | F - TGGAGGAGGGAGTATAGGTGA<br>R - ACTAGGGACACTGACGAGGC     | (AACG) <sub>8</sub>  | 242                       |
| SadH_17  | F - GTCTCGGATTTGATTTGCT<br>R - AATTTAGACAGCATTGTGGAGC     | (AAAG) <sub>6</sub>  | 220                       |
| SadH_18  | F - ATGAGCTTGGATGGTTGATG<br>R - TGGAAGGCTACGTGGAATTA      | (AAAT) <sub>6</sub>  | 267                       |
| SadH_19  | F - GGCGTGGAGAAGACAAGTTC<br>R - AGAGGAAACCGAACGTCAAA      | (AATAG) <sub>5</sub> | 180                       |
| SadH_20  | F - TTGTGTTTGGCTATGGAGAAGA<br>R - TGTAGAGACAAGGTGTGGCG    | (ACCTC) <sub>5</sub> | 148                       |

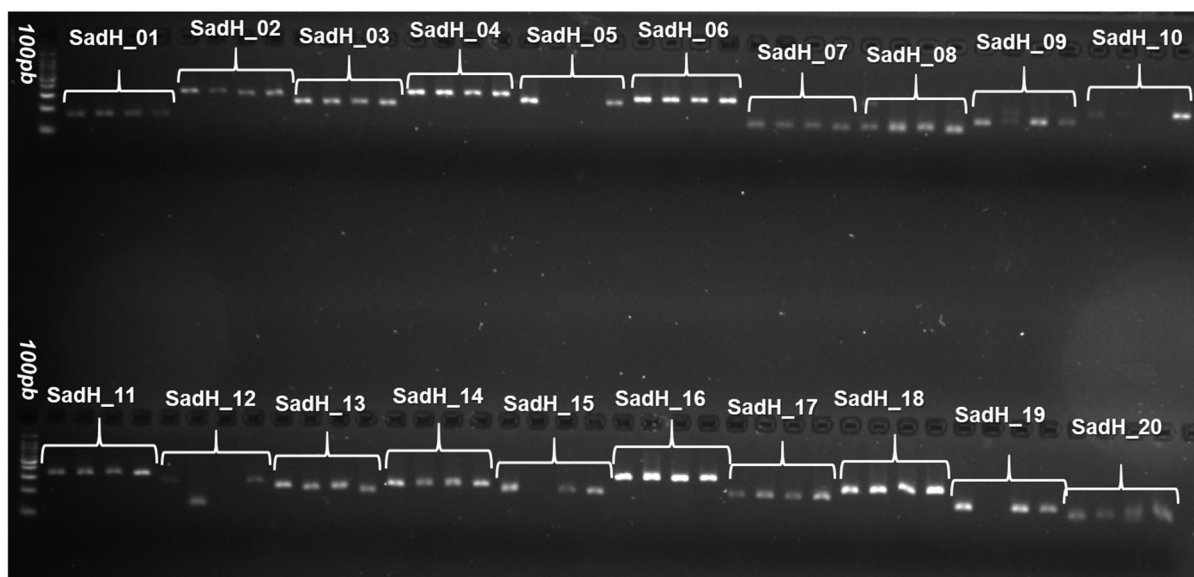
## 5.2 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

### 5.2.1 Ajuste de parâmetros para a reação em cadeia da polimerase

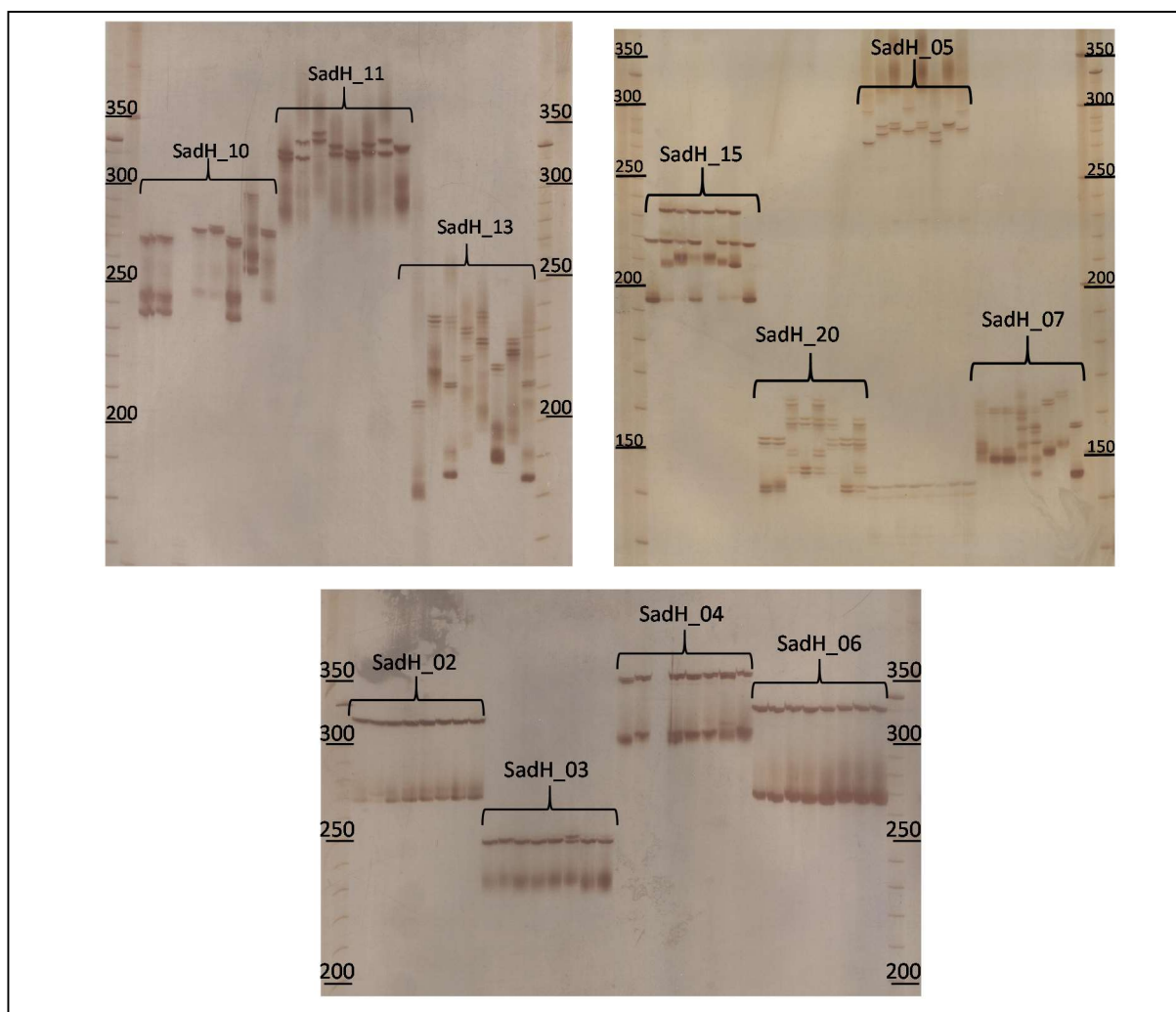
Com base na etapa inicial de ajuste da temperatura durante a verificação na eletroforese horizontal em gel de agarose foi possível verificar a amplificação em todos os indivíduos para 15, dos 20 primers testados inicialmente. Cinco apresentaram amplificação parcial de alguns indivíduos, três amplificaram pelo menos em três indivíduos (SadH\_12; SadH\_15; SadH\_19) e dois amplificaram no mínimo dois indivíduos com bandas fortes (SadH\_05; SadH\_10) (Figura 5). Tal avaliação permite verificar que a maioria apresentou um bom padrão de amplificação nos testes iniciais, considerando o conjunto de *primers* desenhados para *S. adstringens*, uma vez que foi utilizada inicialmente uma única temperatura para todos os *primers*. Os *primers* que não amplificaram em todos os indivíduos com a temperatura inicial posteriormente amplificaram com o ajuste de temperaturas e avaliação em gel de poliacrilamida.

Em seguida, todos os *primers* foram avaliados de forma mais detalhada, na etapa seguinte, em gel de poliacrilamida para o ajuste fino da temperatura de anelamento ideal. As temperaturas de anelamento dos primers desenhados nesse estudo ficaram padronizadas variando entre 52°C e 58°C (Tabela 6). Dos 20 locos avaliados, 16 apresentaram polimorfismo enquanto quatro foram monomórficos (Apêndice 1). Os alelos que foram identificados apresentaram tamanhos variando entre 138 pb e 350 pb (Tabela 6).

A análise dos géis de poliacrilamida mostrou que existem alguns locos que exibem duas faixas de tamanho de produto amplificado, provavelmente uma duplicação no genoma em função da paleopoliploidia que é comum em plantas do Cerrado (Vanneste et al., 2014). Esses produtos de amplificação em duas regiões distintas, produzem alelos de tamanhos um pouco diferentes, mas com o mesmo padrão de segregação. Sendo assim, para a obtenção dos genótipos, o critério de escolha foi utilizar a região dos fragmentos (alelos) que estavam na faixa de amplitude de tamanho que foi identificado no indivíduo sequenciado, que foi utilizado para o desenho dos primers (Figura 6).



**Figura 5.** Gel de agarose 3% para a verificação do teste inicial da PCR na temperatura de 52°C para todos os *primers* desenvolvidos para *Stryphnodendron adstringens*.



**Figura 6.** Padrão de amplificação e polimorfismo de alguns dos marcadores desenvolvidos para *Stryphnodendron adstringens* em gel de acrilamida 6% corado com nitrato de prata. Os locos SadH\_02, SadH\_03, SadH\_04 e SadH\_06 são os 4 monomórficos encontrados.

**Tabela 6.** Temperatura específica de anelamento e amplitude alélica dos 20 marcadores padronizados em gel desnaturante de poliacrilamida a 6% *Stryphnodendron adstringens*.

| Marcador | Temperatura de anelamento (°C) | Amplitude alélica (bp) |
|----------|--------------------------------|------------------------|
| SadH_01  | 58                             | 161-165                |
| SadH_02* | 56                             | 320                    |
| SadH_03* | 56                             | 250                    |
| SadH_04* | 56                             | 350                    |
| SadH_05  | 54                             | 272-306                |
| SadH_06* | 56                             | 330                    |
| SadH_07  | 54                             | 222-268                |
| SadH_08  | 58                             | 154-262                |
| SadH_09  | 58                             | 196-208                |
| SadH_10  | 56                             | 162-272                |
| SadH_11  | 56                             | 314-332                |
| SadH_12  | 52                             | 138-162                |
| SadH_13  | 56                             | 206-256                |
| SadH_14  | 58                             | 240-266                |
| SadH_15  | 56                             | 214-242                |
| SadH_16  | 58                             | 330-342                |
| SadH_17  | 52                             | 160-174                |
| SadH_18  | 58                             | 260-270                |
| SadH_19  | 58                             | 174-180                |
| SadH_20  | 56                             | 140-168                |

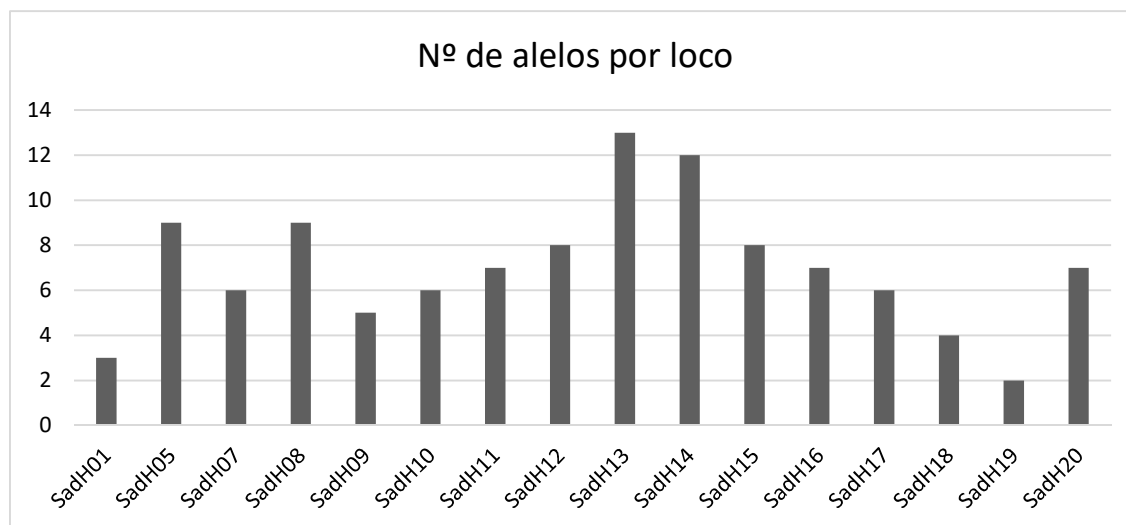
\*Locos monomórficos para os 8 indivíduos analisados

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA

Dos 20 marcadores padronizados e avaliados na eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, 16 apresentaram polimorfismo (Tabela 6), com uma média de 7 alelos por loco. Foi encontrado um total de 112 alelos e a quantidade de alelos por loco variou de dois (loco SadH19) a 13 alelos (loco SadH13). Os locos SadH13 e SadH14 foram os que apresentaram o maior número de alelos, 13 e 12 respectivamente (Figura 8). O número médio de alelos por loco foi próximo ao encontrado em outras espécies nativas do Cerrado utilizando marcadores

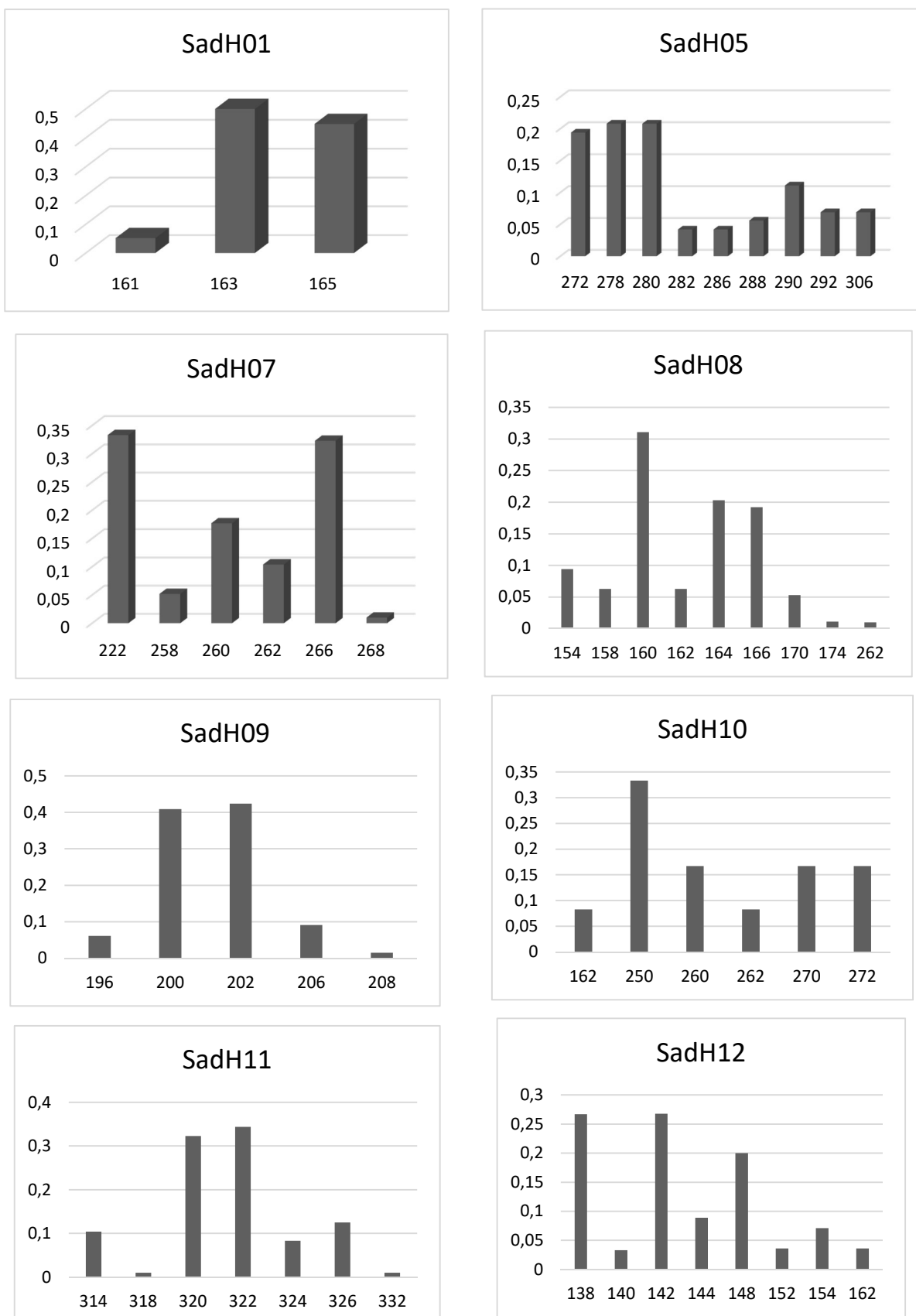


microssatélites, como *Dipteryx alata* com 5,5 alelos por loco em um estudo onde foram avaliados 9 locos microssatélites em 25 subpopulações.

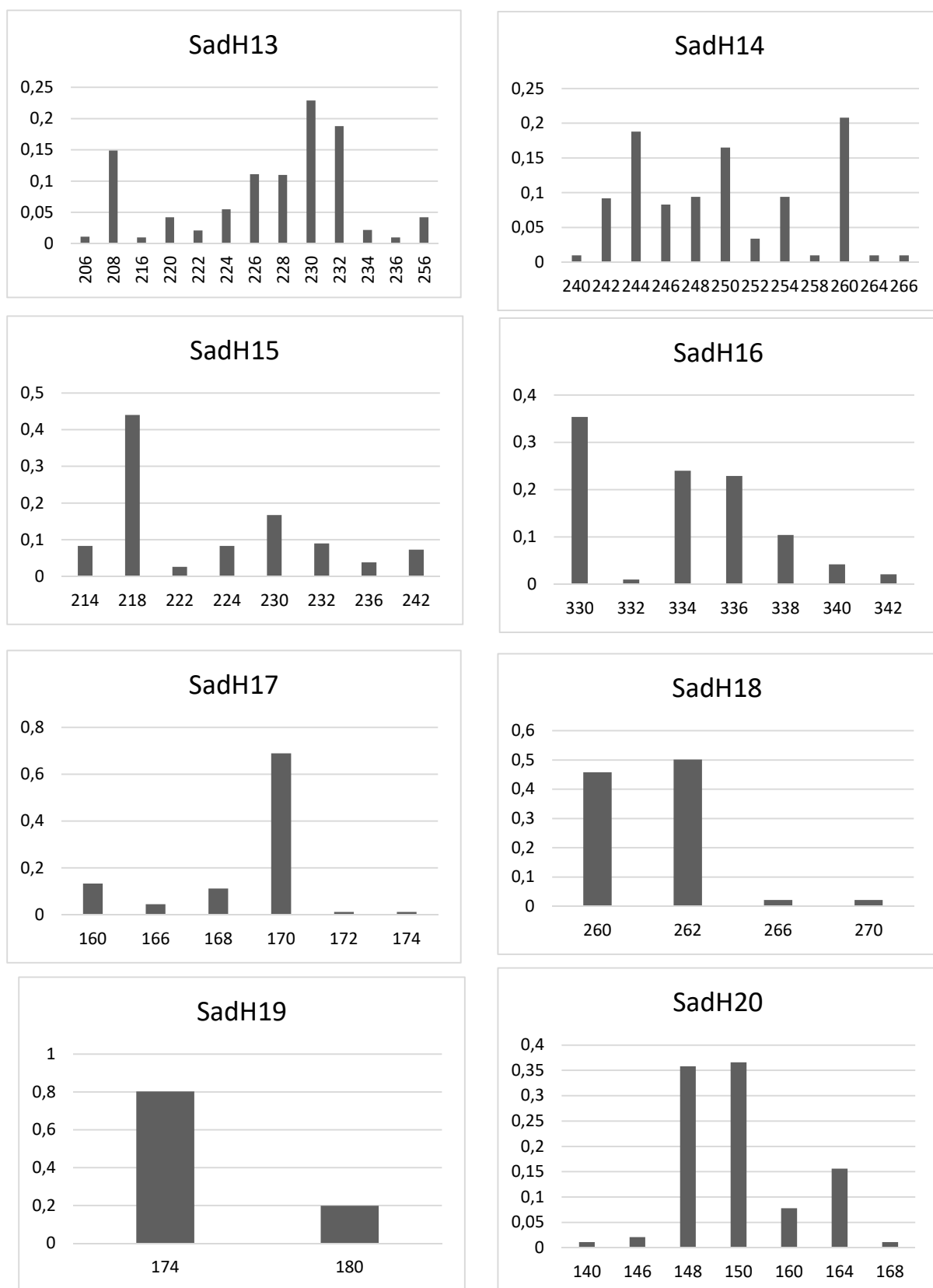


**Figura 7.** Número de alelos amostrados em cada um dos 16 marcadores microssatélites polimórficos avaliados em 3 populações de *Stryphnodendron adstringens*.

De um modo geral o padrão de distribuição das frequências alélicas variou entre os marcadores polimórficos (Figura 8).



**Figura 8.** Frequências alélicas de 16 locos microssatélites utilizados para genotipagem de 3 populações de *Stryphnodendron adstringens*.



**Figura 8.** Continuação.

Os valores das médias da Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e do PIC foram iguais a 0,506, 0,543, 0,635 respectivamente. Branco e colaboradores (2010) avaliaram 23 locos microssatélites transferidos de diversas espécies arbóreas em cinco populações de *Stryphnodendron adstringens* e observaram uma média para Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) de 0,476 e esperada ( $H_e$ ) de 0,678, valores próximos ao encontrado nesse estudo, e que, segundo eles, está dentro do que é observado para outras espécies arbóreas tropicais.

A diversidade genética máxima ( $H_{MAX}$ ) representa o valor máximo teoricamente esperado da diversidade gênica ( $H_e$ ), de acordo com o número observado de alelos. No presente estudo, os marcadores microssatélites utilizados detectaram cerca de 65% da diversidade máxima possível (Tabela 7) indicando uma diversidade genética que pode ser considerada mediana.

Por outro lado, embora a diversidade genética seja mediana, esse conjunto de 16 marcadores polimórficos padronizados exibiram uma probabilidade de exclusão de paternidade combinada alta e igual a 0,999983 e uma probabilidade de identidade combinada baixa e igual a  $3,49 \times 10^{-15}$  (Tabela 7).

**Tabela 7.** Estimativas de diversidade genética para 16 locos microssatélites utilizados para genotipagem de 48 indivíduos de 3 subpopulações de *Stryphnodendron adstringens*.

| Loco         | A        | Ae           | He           | Ho           | H <sub>MAX</sub> | He/H <sub>MAX</sub> (%) | PIC          | Q             | I                                        |
|--------------|----------|--------------|--------------|--------------|------------------|-------------------------|--------------|---------------|------------------------------------------|
| SadH1        | 3        | 2,166        | 0,538        | 1,000        | 0,667            | 80,75                   | 0,444        | 0,247         | 0,308                                    |
| SadH5        | 9        | 2,879        | 0,653        | 0,731        | 0,889            | 73,43                   | 0,800        | 0,653         | 0,054                                    |
| SadH7        | 6        | 1,725        | 0,420        | 0,339        | 0,833            | 50,44                   | 0,702        | 0,514         | 0,107                                    |
| SadH8        | 9        | 4,808        | 0,792        | 0,719        | 0,889            | 89,10                   | 0,782        | 0,626         | 0,062                                    |
| SadH9        | 5        | 2,538        | 0,606        | 0,920        | 0,800            | 75,75                   | 0,535        | 0,334         | 0,228                                    |
| SadH10       | 6        | 2,000        | 0,500        | 0,250        | 0,833            | 60,00                   | 0,470        | 0,308         | 0,280                                    |
| SadH11       | 7        | 2,941        | 0,660        | 0,463        | 0,857            | 77,00                   | 0,704        | 0,520         | 0,106                                    |
| SadH12       | 8        | 2,681        | 0,627        | 0,544        | 0,875            | 71,66                   | 0,770        | 0,608         | 0,069                                    |
| SadH13       | 13       | 3,191        | 0,687        | 0,426        | 0,923            | 74,39                   | 0,840        | 0,715         | 0,036                                    |
| SadH14       | 12       | 5,556        | 0,820        | 0,616        | 0,917            | 89,45                   | 0,842        | 0,716         | 0,036                                    |
| SadH15       | 8        | 2,226        | 0,551        | 0,497        | 0,875            | 62,93                   | 0,726        | 0,561         | 0,087                                    |
| SadH16       | 7        | 2,927        | 0,658        | 0,623        | 0,857            | 76,81                   | 0,712        | 0,527         | 0,102                                    |
| SadH17       | 6        | 1,327        | 0,247        | 0,133        | 0,833            | 29,60                   | 0,448        | 0,281         | 0,303                                    |
| SadH18       | 4        | 1,447        | 0,309        | 0,271        | 0,750            | 41,20                   | 0,434        | 0,240         | 0,317                                    |
| SadH19       | 2        | 1,374        | 0,272        | 0,190        | 0,500            | 54,47                   | 0,267        | 0,134         | 0,516                                    |
| SadH20       | 7        | 1,549        | 0,354        | 0,374        | 0,857            | 41,34                   | 0,685        | 0,494         | 0,117                                    |
| <b>Média</b> | <b>7</b> | <b>2,583</b> | <b>0,543</b> | <b>0,506</b> | <b>0,822</b>     | <b>65,519</b>           | <b>0,635</b> | <b>0,9999</b> | <b><math>3,49 \times 10^{-15}</math></b> |

**A:** número de alelos por loco; **Ae:** número efetivo de alelos, por loco; **AR:** riqueza alélica média; **He:** Heterozigosidade esperada sob EHW; **Ho:** Heterozigosidade observada; **H<sub>max</sub>:** máxima diversidade para cada loco; **He/H<sub>max</sub>(%):** proporção da diversidade máxima; **PIC:** Conteúdo de Informação Polimórfica; **Q:** Probabilidade de exclusão de paternidade; **I:** Probabilidade de identidade genética.

O painel de marcadores desenvolvidos para *S. adstringens* apresentou alta probabilidade de discriminação individual, equivalente ao que foi encontrado para outras espécies do Cerrado como por exemplo *Eugenia dysenterica* (cagaita) que foi observado valores de Q iguais a 0,9367 com cinco marcadores analisados (Telles et al., 2012) e *Hymenaea stigonocarpa* com valores iguais a 0,9999 em 10 marcadores avaliados (Gonçalves, 2016). Assim, pode-se considerar que o painel de marcadores microssatélites disponibilizado no presente estudo é bom para discriminar os indivíduos e poderá ser utilizado com eficiência em análises genético-populacionais para a espécie *S. adstringens*.

O parâmetro  $\theta$  foi considerado significativo, e igual a 0,329, o que sugere uma alta estruturação genética entre as populações de *S. adstringens*. O coeficiente de endogamia total ( $F$ ), foi alto e significativo (0,360), indicando uma estruturação da variabilidade genética existente nessas populações (Tabela 8). Por outro lado, o valor global obtido para o coeficiente de endogamia intrapopulacional ( $f$ ) não foi significativo, sugerindo a ocorrência de panmixia nas populações. (Tabela 8).

**Tabela 8.** Valores estimados e intervalo de confiança para os parâmetros: índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ), coeficiente de endogamia total ( $F$ ) e diferenciação interpopulacional ( $\theta$ ) geradas pela análise de variância das frequências alélicas com 16 locos microssatélites para a espécie *Stryphnodendron adstringens*.

| Estimativas           | $f$                 | $F$    | $\theta$ |
|-----------------------|---------------------|--------|----------|
| Média dos locos       | 0,050 <sup>NS</sup> | 0,360* | 0,329*   |
| Limite superior (95%) | 0,190               | 0,502  | 0,432    |
| Limite Inferior (95%) | -0,127              | 0,184  | 0,226    |

\*Valor significativo; <sup>NS</sup>: não significativo

Através dos parâmetros obtidos a partir do presente trabalho pode-se afirmar que o painel de marcadores moleculares microssatélites desenvolvidos para *Stryphnodendron adstringens* é altamente informativo e indicado para subsidiar futuros estudos genético populacionais da espécie, possibilitando a identificação de potenciais materiais para estabelecimento de programas de melhoramento e unidades de conservação. Outro fator importante é que esses marcadores podem ser testados em outras espécies próximas evolutivamente para possível disponibilização de marcadores microssatélites, sem a necessidade de desenvolvimento de novos primers.

## 6 CONCLUSÃO

- a) Foi possível desenhar 20 pares de *primers* flanqueando regiões microssatélites no genoma de *S. adstringens*;
- b) Após padronização foi possível disponibilizar 16 marcadores microssatélites polimórficos para *S. adstringens*;
- c) A diversidade genética é mediana para os 16 marcadores microssatélites avaliados em três populações de *S. adstringens*.
- d) A análise na variância das frequências alélicas permitiu identificar uma alta estruturação genética e baixo índice de endogamia em três populações de *S. adstringens*.
- e) O painel de marcadores polimórficos desenvolvidos para *S. adstringens* apresentou alta probabilidade de discriminação individual, sendo indicado para estudos genético populacionais.

## 7 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Rep**, v. 27, p. 617–631, 2008.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. SciELO. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.3, p.472-508, João Pessoa. 2008.
- AGUIAR, A. V. D., MOURA, N. F., MOURA, M. F., ZUCCHI, M. I., VENCOSKY, R., & CHAVES, L. J. Relation between the genetic variation of quantitative traits and the molecular markers in subpopulations (*Eugenia dysenterica* dc). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33(1), 157-169. (2011).
- AKKAYA, M.S.; SHOEMAKER, R.C.; SPECHT, J.E.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Integration of simple sequence repeat DNA markers into soybean linkage map. **Crop Science**, 35:1439-1445, 1995.
- ALEGRE, E. S. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de cabralea canjerana (Vell.) Martius no espírito santo**. (2015).
- ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. Elsevier. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 76-91, USA. 2007.
- ALMEIDA, S.P.; SANO, S. M. Cerrado: espécies vegetais úteis. Brasília, DF: EMPRAPA Cerrado, 1998. p. 347-351.
- ALMEIDA, F. V.; FERREIRA, R. S.; RODRIGUES, R. A. S.; GOUVÊA C. F.; & FRANCO M, W. Diversidade genética de *Copernicia prunifera* com o uso de marcadores moleculares ISSR. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, 10(4). (2015).
- ANTIQUERA, L. M. O. R., SOUZA, R. G. V. D. C., BAJAY, M. M., & KAGEYAMA, P. Y. Genetic structure and diversity of *Copaifera langsdorffii* Desf. in Cerrado fragments of the São Paulo State, Brazil. **Revista Árvore**, 38(4), 667-675. (2014).
- AVISE, J.C. & HAMRICK, J.L. Conservation genetics, case histories from nature. **Chapman & Hall**, New York: Kluwer Academic Publishers, 1996. 512p.
- BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M.; BERED, F.; FAY, M.F.C.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, 16:3759-3767, 2007.
- BARBOSA, A. C. O. F., COLLEVATTI, R. G., CHAVES, L. J., GUEDES, L. B. S., DINIZ-FILHO, J. A. F., & TELLES, M. P. C. Range-wide genetic differentiation of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) populations in Brazilian Cerrado. **Biochemical Systematics and Ecology**, 59, 288-296. 2015.

BARREIRA et al. Efeitos de diferentes intensidades de corte seletivo sobre a regeneração natural do Cerrado. **Cerne**, v.6, n.1, p.040-051, 2000.

BEJA-PEREIRA, A.; ALMEIDA, N. F. Métodos moleculares na análise da diversidade biológica. **Genética, biotecnologia e agricultura**. Porto: Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005. p. 1-96.

BERNARDES, V.; ANJOS, D. E. D.; GONDIM, S. G. DE C. A.; MURAKAMI, D. M.; BIZÃO, N.; TELLES, M. P. D. C. Isolation and Characterization of Microsatellite Loci in (Malpighiaceae) and Cross-Amplification in. **Applications in Plant Sciences**, v. 2, p. 1400016, 2014

BHARGAVA, A.; FUENTES, F. F. Mutational dynamics of microsatellites. **Molecular Biotechnology**, v. 44, p. 250-266, dez. 2010.

BOHN, M.; UTZ, H.F.; MELCHINGER, A.E. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. **Crop Sci** 39:228–237. (1999).

BORÉM, A. **Considerações sobre fluxo gênico**. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, Brasília, n. 34, p. 86-90, jan. /jun. 2005.

BRAGA, A. C.; REIS, A. M. M.; LEOI, L. T.; PEREIRA, R. W.; COLLEVATTI, R. G. . Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes** (Print), v. 7, p. 53-56, 2007.

BRANCO, L.E.; ZIMBACK, L.; LIMA, A. B.; MORI, E.S.; AOKI, H. **Estrutura genética de populações de *Stryphnodendron adstringens* (mart.)**. IF Sér. Reg., n. 42 p. 31-37 jul. 2010.

BRANDÃO, M. M., VIEIRA, A. F. D., & CARVALHO, D. D. (2011). Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, 35(5).

BRANDÃO, M. M., DE ALMEIDA VIEIRA, F., NAZARENO, A. G., & DE CARVALHO, D. Genetic diversity of neotropical tree *Myrcia splendens* (Myrtaceae) in a fragment–corridor system in the Atlantic rainforest. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, 216, 35-41. (2015).

BUSCHIAZZO, E., & GEMMELL, N. J. (2006). The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **Bioessays**, 28(10), 1040-1050.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZHON, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. **Marcadores microssatélites em espécies vegetais – Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n. 30, p. 46-50, 2003.

CAMILLO, J.; CIAMPI, A.; VIEIRA, R. F. Análise da variabilidade genética em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) usando marcadores RAPD. In: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS



E BIOTECNOLOGIA, 6. 2001, Brasília, DF. **Anais**: resumos dos trabalhos. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001.

CARVALHO, M. C.; SILVA, D. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**. v. 3, p. 735–744, 2010.

CASTOE, T. A.; POOLE, A. W.; KONING, A. P. J.; JONES, K.; TOMBACK, D. F.; OYLER-MCCANCE, S. J.; FIKE, J. A.; LANCE, S. L.; STREICHER, J. W.; SMITH, E. N.; POLLOCK, D. D. Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 2, p. 341–7, 2010.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. **Tipos de Marcadores Moleculares**. In: Aluizio Borém; Eveline Teixeira Caixeta. (Org.). Marcadores Moleculares. 1a.ed. Viçosa, MG: Editora Jard, v. 1, p. 307-374, 2006.

CAMARGO, N. G., DA SILVA G. O. J., & BARBOSA, A. C. D. O. F. Caracterização de marcadores microssatélites em plantas nativas do Cerrado brasileiro. *Multi-Science Journal*, 1(6), 41-47. 2017.

CANCHIGNIA-MARTÍNEZ, H.F; HERNANDEZ-DELGADO, S.; GONZÁLEZ-PAZ, M.; MOTTE, E.; & MAYEK-PEREZ, N. Relações genéticas entre *Schizolobium parahybum* (Vell.) Blake (Leguminosae) ecótipos do Equador e outros países. **Silvae Genética** , 56 (5), 214-221. (2007).

CAVAGNARO, P. F. , D. A. SENALIK , L. YANG , P. W. SIMON , T. T. HARKINS ,C. D. KODRIA , S. HUANG , AND Y. WENG . Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **BMC Genomics** 11: 569 – 586. 2010.

CLEMENT, C.R.; HIGUCHI, N. A floresta amazônica e o futuro do Brasil. **Amazônia Artigos**, p.44-49, 2006.

COLLEVATTI, R. G., GRATTAPAGLIA, D., & HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, 86(1), 60-67. 2001.

COLLEVATTI, R. G., GRATTAPAGLIA, D., & HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, 10(2), 349-356. 2001.

COLLEVATTI, R. G. ; TELLES, M. P. C. ; LIMA, J. S. ; GOUVEIA, F. O. ; Soares, Thannya N. . Contrasting spatial genetic structure in *Annona crassiflora* populations from fragmented and pristine savannas. **Plant Systematics and Evolution**, v. 1, p. on line-first, 2014.

CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA sequence of two-base regions in tropical tree genomes. **Genome**, 34:66-71, 1991.

CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. 6. ed. Rio de Janeiro: **Imprensa Nacional**, 1978. v. B 1, 590 p.

CORRÊA, V.S.C. **Conservação de *Stryphnodendron adstringens* (MART.) Coville em banco ativo de germoplasma e avaliação do potencial antifúngico frente ao dermatófito *Trithophyton rubrum*. 2007.** p. 97. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.

CORRÊA, V. S. et al. Geographical variation and quality assessment of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville within Brazil. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 58, p. 1-8, 2011.

CSENCICS, D., S. BRODBECK, AND R. HOLDEREGGER. Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered dwarf bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. **Journal of Heredity** 101: 789 – 793. 2010.

CREGAN, P.B.; JARKIK, T.; BUSH, A.L; SHOEMAMAKER, R.C.; LARK, K.G.; KAHLER, A.L.; KAYA, N.; VANTOAI, T.T.; LOHNES, D.G.; CHUNG, J.; SPECHT, J.E. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. **Crop Science**, 39:1464-1490, 1999.

CRUZ, M.V; RODRIGUES, J.G; SOUZA, H.A & LOVATO, M.B. Isolamento e caracterização de marcadores de microssatélites para *Plathymenia reticulata* (Fabaceae). **Jornal americano da botânica** , 99 (5), e210-e212. (2012).

CUPERTINO, B. & CORRECIRC, R.X. Semelhança genética entre as árvores de *Caesalpinia echinata* e sua conservação *ex situ*. **Revista Internacional de Biodiversidade e Conservação**, 5 (10), 655-660. (2013).

DEFAVARI, G. R., TARAIZI, R., MORENO, M. A., FERRAZ, E. M., GANDARA, F. B., & KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética espacial intrapopulacional de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne na Estação Ecológica de Itirapina, SP. Spatial genetic structure of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne in the Ecological Station of Itirapina, SP. **Scientia Forestalis**, 37(81), 89-98. 2009.

DELSENY M, LAROCHE M, PENON P (1983) Detection of sequences with Z-DNA forming potential in higher plants. **Biochem Biophys Res Commun** 116:113–120.

DE SOUZA, C.D. & FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, V.20, n.1, p. 135-142, 2006.

DE SOUZA, J. L.; COLLEVATTI, R. G.; SOARES, T. N.; CHAVES, L. J. ; DE CAMPOS T. M. P. Fine-scale genetic structure in *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), an endemic and habitat-restricted species from Central Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, p. 1207-1213, 2015.

EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H. A.; CASKEY, C.T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **Am J Hum Genet**, v.49, p.746–756, 1991.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435-445, jun. 2004.

FELFILI, J.M.; SILVA JÚNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; MACHADO, J.W.B.; WALTER, B.M.T.; SILVA, P.E.N. & HAY, J.D. Análise comparativa da florística e fitossociologia da vegetação arbórea do cerrado sensu stricto da Chapada Pratinha, Brasil. **Acta bot. Brás**, v. 6, v. 27-46, 1993.

FELFILI, J. M. et al. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Covilleno cerrado sensu stricto da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal. Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n.1, p.83-90,1999.

FELFILI, J.M. Perda da diversidade. In. UNESCO. **Vegetação no Distrito Federal: tempo e espaço**. Brasília. p. 33-34. 2000.

FELFILI, J. M.; SILVA JÚNIOR, M. C. Diversidade Alfa e Beta no cerrado sensu stricto da Chapada Pratinha, Brasil. **Acta Botânica Brasília**, v.15, n.2, p.243-254, 2001.

FELFILI, J. M. et al. Composição florística e fitossociológica do cerrado sentido restrito no município de Água Boa, MT. **Acta Botânica Brasília**, v.16, n.1, p.103-112, 2002.

FELFILI, J. M.; BORGES FILHO, H. C. Extrativismo racional da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. Brasília: **Universidade de Brasília**, Departamento de Engenharia Florestal, 2004. 32p.

FERES, J.; MARTINEZ, M.L; MARTINEZ, C.A; MESTRINER, M.A; & ALZATE-MARIN, AL. Transmissibilidade e caracterização de nove marcadores microssatélites para a roseo-alba espécies de árvores tropicais Tabebuia. **Molecular recursos ecologia** , 9 (1), 434-437. (2009).

FERES, J. M. (2013). **Diversidade genética, fluxo gênico e sistema de cruzamento de *Anadenanthera colubrina* (VELL.) Brenan e *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg: duas espécies que ocorrem em alta densidade no interior do Estado de São Paulo**. Tese, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

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

FERREIRA, M.A.J.F; WETZEL, M.M.V.S.; VALOIS, A.C.C. El estado del arte de los recursos genéticos en las Américas: conservación, caracterización y utilización. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología e Programa Cooperativo de Investigación y Transferencia de Tecnología para los Trópicos Suramericanos (PROCITROPICOS)**. 2005.

FRANZON, R. C.; GONÇALVES, R. D. S.; ANTUNES, L. E. C., & RASEIRA, B. M. C. Propagação vegetativa de genótipos de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) do sul do Brasil por enxertia de garfagem. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, 32(1), 262-267. (2010).

FREIRE, J. M. et al. Genetic structure of *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvu) populations by RAPD markers. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 74, p. 27-35, jun. 2007.

GARRITANO, G.; JORGE, C. L.; GULIAS, A. P. S. M. MURICI. IN: VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S.; SILVA, D. B.; FERREIRA, F. R.; SANO, S. M. [eds.], Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. 320p. Cap. 14. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Distrito Federal, Brasília, Brasil. 2006.

GLASENAPP, J. S. Estrutura genética e fenóis totais de populações naturais de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). 2007.

GLASENAPP, J. S., CASALI, V. W. D., MARTINS, E. R., CRUZ, C. D., & BARBOSA, P. B. Description of genetic diversity of natural populations of barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (mart.) coville in conservation areas from Minas Gerais. **Revista Árvore**, 38(1), 103-112. 2014.

GONÇALVES, A.R. **Variabilidade genética molecular em uma coleção de germoplasma de *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae)**. 2016. 50 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

GUIDUGLI, M.C; NAZARENO, A.G; FERES, J.M; CONTEL, E.P.B; MESTRINER, M.A & ALZATE-MARIN, A.L. Pequeno, mas não isolado: um levantamento genético populacional da árvore tropical *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae) em um habitat altamente fragmentado. **Hereditariedade** , 116 (3), 339-347. (2016).

GUIMARAES, R.A; TELLES, M. P. C.; ANTUNES, A.M.; CORREA, K.M.; RIBEIRO, C.V.G; COELHO, A. S. G. ; SOARES, T.N. Descoberta e caracterização de novos locos microsateles em *dipteryx alata* vogel (fabaceae) utilizando dados de sequenciamento de nova geração. **Genética E Pesquisa Molecular** , v. 16, p. 1-6 de 2017.

HARTL, D. L. **Princípios de genética de populações**. 3. Ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2008. p. 217.

HAMADA HM, PETRINO MG, KAKUNAGA T (1982) A novel repeated element with Z-DNAforming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proc Natl Acad Sci USA** 79:6465–6469.

HAMIRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American journal of botany**, 1685-1693. 1982.

HEYWOOD, V.H.; IRIONDO, J.M. Plant conservation: Old problems, new perspectives. **Biological Conservation**, v.113, p.321-335, 2003.

JACOBSON, T.K.B. et. al. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 3, p. 163-169, 2005.

KAGEYAMA, P. Y. et al. Genetic diversity in tropical tree species from different successional stages determined with genetic markers. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 93-107, Dec. 2003.

KALIA, R. J.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v.177, p.309–334, 2011.

KAMAU, E. M., MAYES, S., & BARRETT, J. A. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Schizolobium parahyba* (Leguminosae). **Molecular Ecology Resources**, 3(3), 469-470. (2003).

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. 2007. Revising how computer program *Cervus* accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Mol. Ecol.** 16:1099–1106.

KELKAR, Y. D.; TYEKUCHEVA, S.; CHIAROMONTE, F. & MAKOVA, K. D. The genome-wide determinants of human and chimpanzee microsatellite evolution. **Genome research**, 18(1), 30-38, 2008.

KING, R. C.; AND W. D. KLABUNDE, G. H. F. Análise filogeográfica entre populações de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze em sua área de distribuição natural. (2012).

LANES, É. C. M., MOTOIKE, S. Y., KUKI, K. N., NICK, C., & FREITAS, R. D. Molecular characterization and population structure of the macaw palm, *Acrocomia aculeata* (Arecaceae), ex situ germplasm collection using microsatellites markers. **Journal of Heredity**, 106(1), 102-112. 2014.

LIMA, A.B. **Estrutura genética de populações de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão)**. Tese de Doutorado apresentada na Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Botucatu. 2010.

LIMA, J. S. **Diversidade genética e estrutura espacial intrapopulacional em *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo utilizando marcadores microssatélites**. Dissertação, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2011.

LIMA, T. C. D.; CARDOSO, M. V.; MODESTO, T.; DE BRITO, A. L. O.; DA SILVA, M. N., & MONTEIRO, M. C. Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de *Stryphnodendron adstringens* utilizada na Amazônia. **Revista Fitos Eletrônica**, 10(3), 329-338. 2017.

LOPES, M. A.; MELLO, S. D. Estratégias para melhoria, manutenção e dinamização do uso dos bancos de germoplasma relevantes para a agricultura brasileira. In: **Workshop** diretrizes e estratégias para a modernização de coleções biológicas brasileiras e a consolidação de sistemas integrados de informação sobre biodiversidade. 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Plantarum, **Nova Odessa**. 512p. 2002.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p. 65-95, 1984.

MARTINS, D.T.; LIMA, J.C.; RAO, V.S. The acetone soluble fraction from barkextract of *Stryphnodendron adstringens* (mart.) Coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. Wiley. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 427-431. USA. 2002.

MARTIUS, C.F.P. von. Herbarium florae brasiliensis. **Jena, Velag Von Gustav Fisher**. Vol. 20. p. 117.1837.

MELO, A. T. D. O.; COELHO, A. S. G.; PEREIRA, M. F.; BLANCO, A. J. V. & FRANCESCHINELLI, E. V. Genética da conservação de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart.(Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica na APA Fernão Dias. (2015).

MENDONÇA, P. C. D. Caracterização da diversidade genética de *Stryphnodendron adstringens* (mart.) Coville por marcador molecular AFLP e transferência de microssatélites (2011).

MENDONÇA, E. G.; DE SOUZA, A. M.; VIEIRA, F. D. A.; ESTOPA, R. A.; REIS, C. A. F., & CARVALHO, D. D. (2014). Using random amplified polymorphic DNA to assess genetic diversity and structure of natural *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) populations in riparian forests. **International Journal of Forestry Research**, 2014.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA-JÚNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E.; FAGG, C. W. Flora vascular do bioma Cerrado – um “checklist” com 11.430 espécies. In: **Cerrado ambiente e flora**. Brasília, 2.ed. Brasília, DF: Embrapa Informação tecnológica, 2008.

MYBURG, A. A.; GRATTAPAGLIA, D.; TUSKAN, G. A.; HELLSTEN, U.; HAYES, R. D.; GRIMWOOD, J.; et al. The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 5010, n. 7505, p. 356–362, jun. 2014.

MORENO, M. A. **Estrutura genética e diversidade clonal de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) em duas populações no Cerrado do Estado de São Paulo**. Dissertação, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

MOURA, N. F.; CHAVES, L. J.; VENCovsky, R.; NAVES, R. V.; AGUIAR, A. V., & MOURA, M. F. Genetic structure of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) populations in the cerrado region of central Brazil. **Bioscience Journal**, 27(3), 473-481. 2011.

MOURA, T. M.; SEBBENN, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; OLIVEIRA, G. C. X., & KAGEYAMA, P. Y. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. **Scientia Forestalis**, 37(82), p. 143-150. 2009.

MULLIS, K. B.; FALOONA, E.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** v.155, p.335-350, 1987.

- NAIK, D.; SINGH, D.; VARTAK, V.; PARANJPE, S., & BHARGAVA, S. Assessment of morphological and genetic diversity in *Gmelina arborea* Roxb. **New forests**, 38(1), 99-115. (2009).
- NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S. & VALADARES-ILGLIS, M.C. Recursos genéticos e melhoramento – plantas. Rondonópolis: **Fundação MT**. 1183p. 2001.
- NÉRI, J. **Análise dos padrões filogeográficos de *Calophyllum brasiliense* Cambess (Calophyllaceae)**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Escola Nacional de Botânica Tropical, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*. (2011).
- OLIVEIRA, P.E. **The pollination and reproductive biology of a cerrado woody community in Brazil**. 1991. 156 f. Thesis (Ph.D.) - University of St. Andrews, St. Andrews.
- OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307, 2006.
- OLIVEIRA, F.A.; TARAIZI, R.; MENEZES, I.P.; VAN DEN BERG, C.; TSAI, S.M & GAIOTTO, F.A. Marcadores de microssatélites para *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) 1. **Jornal americano de botânica**, 99 (10), e391-e393. (2012).
- PARIDA, S.K.; KALIA, S.K.; SUNITA, K.; DALAL, V.; HEMAPRABHA, G.; SELVI, A.; PANDIT, A.; SINGH, A.; GAIKWAD, K.; SHARMA, T.R.; SRIVASTAVA, P.S.; SINGH, N.K.; MOHAPATRA, T. (2009) Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theor Appl Genet** 118:327–338.
- PATREZE, C. M., & TSAI, S. M. Intrapopulational genetic diversity of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is different when assessed on the basis of chloroplast or nuclear markers. **Plant systematics and evolution**, 284(1-2), 111-122. (2010).
- PERRY, J.C.; ROWE, L. Rapid microsatellite development for water striders by next-generation sequencing. **J. Hered**, v.102, p.125–129, 2011.
- POWELL W, MACHRAY GC, PROVAN J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Sci** 1:215–222.
- PRIMO, B.L. Riqueza tanífera de alguns produtos vegetais brasileiros. An. **Assoc. Quim. Bras**. 4(2):117-120. 1945.
- RAPOSO, A., MARTINS, K., CIAMPI, A. Y., DE OLIVEIRA WADT, L. H., & VEASEY, E. A. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(9), 1291-1298. 2007.
- RASSMANN, K.; SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase in chain reaction-based DNA fingerprinting. **Elektrophoresis**, v.12, p. 113-118, 1991.
- REIS, R. V. D.; OLIVEIRA, E. J. D.; VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G., & SILVA, M. G. D. M. Genetic diversity in recurrent selection of yellow passion fruit

detected by microsatellites markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 46(1), 51-57. (2011).

RESENDE, I. L. M.; SANTOS, F. P.; & CHAVES, L. J. Estrutura de populações de *Mauritia flexuosa* L.F. (Arecaceae) de veredas conservada e antropizadas em Bela Vista de Goiás, GO. **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**. 2009.

RIBEIRO, M. L. Estrutura genética espacial de população de duas espécies simpátricas de *Tabebuia* no parque Estadual Altamiro de Moura Pacheco, GO. (2011).

RÖDER, M. S.; KORZUN, V.; WENDEHAKKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M. H., LEROY, P.; & GANAL, M. W. **A microsatellite map of wheat**. *Genetics*, 149(4), 2007-2023, (1998).

RODRIGUES, J.B. **Hortus Fluminensis**. p. 154-155. 1893.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In S. Misener and S. A. Krawetz [eds.], *Methods in molecular biology*, vol. 132: **Bioinformatics methods and protocols**, p.365–386, 2000. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.

RUSSELL, J.R; FULLER, J.D; MACAULAY, M; HATZ, B.G; JAHOR A, POWELL W, WAUGH R (1997) Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. **Theor Appl Genet** 95: 714–722.

SANGER, F. Sequences, sequences, and sequences. **Annual Review of Biochemistry** 57: 1 – 28. 1988.

SANTANA, B. F.; VOEKS, R.; FUNCH, L. S. Ethnomedicinal survey of a maroon community in Brazil's Atlantic tropical forest. **Journal of ethnopharmacology**, v. 181, p. 37-49, 2016.

SCALON, V.R. Revisão taxonômica do gênero *Stryphnodendron* Mart. (leguminosae-mimosoideae). **Tese apresentada ao instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, USP**, São Paulo. 2007.

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

SEMAGN, K.; BJORNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M.N. An overview of molecular marker methods for plants. **Afr. J. Biotechnol.**, v.5, n.25, p.2540-2568, 2006.

SHENDURE, J., MITRA, R. D., VARMA, C., & CHURCH, G. M. Advanced sequencing technologies: methods and goals. **Nature Reviews Genetics**, 5(5), 335-344, 2004.

SHENDURE, J., AND H. JI. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology** 26: 1135 – 1145. 2008.



SHI, J.; HUANG, S.; FU, D.; YU, J.; WANG, X. Evolutionary Dynamics of Microsatellite Distribution in Plants: Insight from the Comparison of Sequenced *Brassica*, *Arabidopsis* and Other Angiosperm Species. **PLoS ONE**, v.8, n.3, p.e59988, 2013.

SILVA, D.B; SILVA, N.T.V.J; ANDRADE, L.R.M. Frutas do Cerrado. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica**, 18-19. 2001b.

SILVA, P. I.; MARTINS, A. M.; GOUVEA, E. G.; PESSOA-FILHO, M.; FERREIRA, M. E. Development and validation of microsatellite markers for *Brachiaria ruziziensis* obtained by partial genome assembly of Illumina single-end reads. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 17, 2013.

SILVEIRA, S.S; SCHNELL & SCHÜHLI, G.; DEGENHARDT-GOLDBACH, J., & QUOIRIN, M.G.G. Análise da capacidade de roteamento in vitro de *Calophyllum brasiliense* através de marcadores RAPD. **Scientia Forestalis** , 44 (110), 527-535. (2016).

SLAVIERO, L. B. Variabilidade genética de *Eugenia uniflora* L. em áreas conservadas e em regeneração. 2009.

SIMPSON, J. T., WONG, K., JACKMAN, S. D., SCHEIN, J. E., JONES, S. J., & BIROL, I. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data. **Genome research**, 19(6), 1117-1123. 2009.

SOARES, S.P.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. PUC. **Revista Odonto Ciência** v.23, p.141-144, Porto Alegre. 2008.

SOARES, T. N. ; SANT'ANA, L. L. ; OLIVEIRA, LK ; TELLES, M. P. C. ; COLLEVATTI, R. G. . Transferability and characterization of microsatellite loci to *Anacardium humile* A. St. Hil. (Anacardiaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 4609-4616, 2013.

SOARES, THANNYA N.; DINIZ-FILHO, JOSÉ A. F.; NABOUT, JOÃO C.; DE CAMPOS TELLES, MARIANA P.; TERRIBILE, LEVI C.; CHAVES, LÁZARO J. . Patterns of genetic variability in central and peripheral populations of *Dipteryx alata* (Fabaceae) in the Brazilian Cerrado. **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, p. 1315-1324, 2015.

SOARES, T. N., CHAVES, L. J., TELLES, M. P. C., DINIZ-FILHO, J. A. F., & RESENDE, L. V. Distribuição espacial da variabilidade genética intrapopulacional de *Dipteryx alata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43(9), 1151-1158. 2008.

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B. Avaliação da atividade anti séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. SciELO. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p.71-75, João Pessoa. 2007.

TAHERI, S., LEE ABDULLAH, T., YUSOP, M. R., HANAFI, M. M., SAHEBI, M., AZIZI, P., & SHAMSHIRI, R. R. Mining and development of novel SSR markers using next generation sequencing (NGS) data in plants. **Molecules**, 23(2), 399. 2018.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**; p. 6463-6471, 1989.

TAUTZ D; RENZ M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Res** 12:4127–4138. 1984.

TELLES, M. P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; COELHO, A. S. G., & CHAVES, L. J. Auto correlação espacial das frequências alélicas em subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC. Myrtaceae) no sudeste de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, 24(2), 145-154. 2001.

TELLES, M. P. C.; VALVA, F. D.; BANDEIRA, L. F., & COELHO, A. S. G. Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.-Annonaceae) no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, 26(1), 123-129. 2003.

TELLES, M. P. C.; SILVA, S. P.; & ROSA, J. Estrutura genética em populações naturais de *Tibouchina papyrus* (pau-papel) em áreas de campo rupestre no cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, 33(2), 291-300. 2010.

TELLES, M.P.C.; PEIXOTO, F.P.; LIMA, J.S.; RESENDE, L.V.; VIANELLO, R.P.; WALTER, M.E.M.T.; COLLEVATTI, R.G. Development of microsatellite markers for the endangered Neotropical tree species *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 321-325, 2011.

TELLES, M. P. D. C., SILVA, J. B., RESENDE, L. V., VIANELLO, R. P., CHAVES, L. J., SOARES, T. N., & COLLEVATTI, R. G. Development and characterization of new microsatellites for *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). (2013).

VALOIS, A.C.C.; SALOMÃO, A.N.; ALLEM, A.C. Glossário de recursos genéticos vegetais. Brasília, DF: Embrapa-SPI, p.62, 1996.

VANNESTE, K.; MAERE, S.; VAN DE PEER, Y. Tangled up in two: a burst of genome duplications at the end of the Cretaceous and the consequences for plant evolution. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 369, n. 1648, p. 1-13, jun. 2014b.

VARSHNEY, R.K.;BEIER, U.;KHLESTKINA, K. E.;KOTA, R.;KORZUN, V.;GRANER, A.;BORNER, A.Single nucleotide polymorphisms in rye (*Secale cereale* L.): discovery, frequency, and applications for genome mapping and diversity studies. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v.114. p.1105-1116, 2007.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, v.23, n.1, 2005.

VILLALOBOS, V.M.; ENGELMANN, F. Ex situ conservation of plant germoplasm using biotechnology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 11:375-382, 1995.

WANG, M.L.; BARKLEY, N.A.; Jenkins, T.M. **Microsatellite Markers in Plants and Insects**. Part I: Applications of Biotechnology. Genes, Genomes and Genomics, v.3, n.1, p. 54-67, 2009.

WEE, A. K.; LI, C.; DVORAK, W. S., & HONG, Y. Genetic diversity in natural populations of *Gmelina arborea*: implications for breeding and conservation. **New Forests**, 43(4), 411-428. (2012).

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBLELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism's amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.6531-6535, 1990. YU, J.K. ET AL. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers for hexaploid wheat. **Genome**, v.47, p.805–818, 2004.

ZALAPA, J. E.; CUEVAS, H.; ZHU, H.; STEFFAN, S.; SENALIK, D.; ZELDIN, E., & SIMON, P. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. **American Journal of Botany**, 99(2), 193-208, 2012.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol Ecol.**, v.11, p.1–16, 2002.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; COELHO, A. S. G., & VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, 26(4), 449-457. 2003.

ZHU, H.; SENALIK, B. H.; MCCOWN, E. L.; ZELDIN, J.; SPEERS, J.; HYMAN, N. BASSIL, et al. *Mining and validation of pyrosequenced simple sequence repeats (SSRs) from American cranberry (Vaccinium macrocarpon Ait.)*. **Theoretical and Applied Genetics** 10.1007/s00122-011-1689-2. . 2011.

ZIMIN, A. V.; MARÇAIS, G.; PUIU, D.; ROBERTS, M.; SALZBERG, S. L., & YORKE, J. A. The MaSuRCA genome assembler. **Bioinformatics**, 29(21), 2669-2677. 2013.

ZUCCHI, M. I. et al. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 4, p. 449-457, 2003.

## Apêndice

Apêndice 1. Planilha de genótipos dos marcadores microssatélites desenvolvidos e padronizados para *Stryphnodendron adstringens*.

| População | Indivíduo | SadH01 |     | SadH02 |     | SadH03 |     | SadH04 |     | SadH05 |     | SadH06 |     | SadH07 |     | SadH08 |     | SadH09 |     | SadH10 |     |
|-----------|-----------|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|
| 1         | CAN_03    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 222    | 222 | 170    | 262 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_04    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 222    | 222 | 162    | 158 | 200    | 202 | 162    | 262 |
| 1         | CAN_07    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 272    | 280 | 320    | 320 | 222    | 222 | 166    | 160 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_09    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 272    | 280 | 320    | 320 | 222    | 222 | 166    | 160 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_11    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 272    | 272 | 320    | 320 | 222    | 222 | 166    | 162 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_13    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 272    | 280 | 320    | 320 | 222    | 222 | 164    | 154 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_15    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 272    | 280 | 320    | 320 | 222    | 222 | 164    | 164 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_18    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 272    | 280 | 320    | 320 | 222    | 222 | 158    | 154 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_21    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 222    | 222 | 158    | 154 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_22    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 222    | 222 | 166    | 154 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_24    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 272    | 282 | 320    | 320 | 222    | 222 | 170    | 170 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_26    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 272    | 272 | 320    | 320 | ?      | ?   | 160    | 158 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_28    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 272    | 282 | 320    | 320 | 222    | 222 | 170    | 166 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_29    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 272    | 272 | 320    | 320 | ?      | ?   | 162    | 154 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_31    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 272    | 280 | 320    | 320 | 222    | 222 | 164    | 154 | 200    | 202 | 260    | 260 |
| 1         | CAM_32    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 282    | 306 | 320    | 320 | 222    | 222 | 166    | 162 | 200    | 202 | ?      | ?   |
| 2         | POS_03    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 266    | 266 | 166    | 164 | 206    | 206 | ?      | ?   |
| 2         | POS_04    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 266    | 266 | 166    | 164 | 202    | 202 | ?      | ?   |
| 2         | POS_06    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 260    | 266 | 166    | 166 | 206    | 206 | ?      | ?   |
| 2         | POS_08    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 278    | 278 | 320    | 320 | 266    | 266 | 158    | 154 | ?      | ?   | ?      | ?   |
| 2         | POS_12    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 260    | 260 | 166    | 162 | 200    | 208 | ?      | ?   |
| 2         | POS_13    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 266    | 266 | 160    | 154 | ?      | ?   | ?      | ?   |
| 2         | POS_16    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | ?      | ?   | 278    | 306 | 320    | 320 | 266    | 260 | 160    | 160 | 200    | 200 | ?      | ?   |
| 2         | POS_18    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 260    | 260 | 160    | 160 | 206    | 206 | ?      | ?   |
| 2         | POS_19    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 260    | 266 | 160    | 160 |        |     | ?      | ?   |
| 2         | POS_25    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 260    | 266 | 164    | 160 | 200    | 200 | ?      | ?   |
| 2         | POS_26    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 266    | 266 | 166    | 160 | ?      | ?   | ?      | ?   |
| 2         | POS_28    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 266    | 266 | 160    | 160 | ?      | ?   | ?      | ?   |
| 2         | POS_29    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 278    | 286 | 320    | 320 | 260    | 260 | 164    | 160 | 196    | 202 | ?      | ?   |
| 2         | POS_30    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 266    | 266 | 154    | 160 | 196    | 202 | ?      | ?   |
| 2         | POS_31    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 260    | 268 | 158    | 164 | 196    | 202 | ?      | ?   |
| 2         | POS_32    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 278    | 288 | 320    | 320 | 266    | 266 | 164    | 164 | 196    | 202 | 270    | 272 |
| 3         | CHG_07    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | ?      | ?   | 320    | 320 | 262    | 266 | 166    | 166 | 200    | 202 | 250    | 250 |
| 3         | CHG_10    | 163    | 165 | 320    | 320 | 250    | 250 | 350    | 350 | 280    | 292 | 320    | 320 | 258    | 266 | 166    | 160 | 200    | 202 | ?      | ?   |

|   |        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 3 | CHG_13 | 163 | 165 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | ?   | ?   | 320 | 320 | 262 | 266 | 160 | 160 | 200 | 202 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_14 | 163 | 165 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | 288 | 292 | 320 | 320 | 260 | 266 | 160 | 160 | 200 | 202 | 250 | 250 |
| 3 | CHG_15 | 161 | 163 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | 289 | 289 | 320 | 320 | 258 | 260 | 166 | 160 | 200 | 202 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_16 | 161 | 163 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | 280 | 289 | 320 | 320 | 258 | 262 | 160 | 160 | 200 | 202 | 250 | 250 |
| 3 | CHG_18 | 161 | 163 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | 289 | 292 | 320 | 320 | 258 | 262 | 166 | 160 | 200 | 202 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_20 | 163 | 165 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | 289 | 306 | 320 | 320 | 262 | 262 | 170 | 164 | 200 | 202 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_22 | 161 | 163 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | 280 | 292 | 320 | 320 | 266 | 266 | 164 | 160 | 200 | 202 | 250 | 250 |
| 3 | CHG_23 | 163 | 165 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | 280 | 292 | 320 | 320 | 260 | 260 | 164 | 160 | 200 | 202 | 250 | 250 |
| 3 | CHG_24 | 163 | 165 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | ?   | ?   | 320 | 320 | 266 | 266 | 164 | 164 | 200 | 202 | 250 | 250 |
| 3 | CHG_25 | 163 | 165 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | 280 | 280 | 320 | 320 | 262 | 266 | ?   | ?   | 200 | 202 | 250 | 250 |
| 3 | CHG_28 | 161 | 163 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | ?   | ?   | 320 | 320 | 262 | 266 | 174 | 164 | 200 | 202 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_29 | 163 | 165 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | 280 | 280 | 320 | 320 | 260 | 266 | 164 | 160 | 200 | 202 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_30 | 163 | 165 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | 289 | 289 | 320 | 320 | 260 | 262 | 166 | 162 | 200 | 202 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_32 | 163 | 165 | 320 | 320 | 250 | 250 | 350 | 350 | 280 | 290 | 320 | 320 | 258 | 262 | 164 | 160 | 200 | 202 | ?   | ?   |

## Apêndice 1. Continuação

| População | Indivíduo | SadH11 |     | SadH12 |     | SadH13 |     | SadH14 |     | SadH15 |     | SadH16 |     | SadH17 |     | SadH18 |     | SadH19 |     | SadH20 |     |
|-----------|-----------|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|
| 1         | CAN_03    | 314    | 322 | 144    | 144 | 234    | 206 | 244    | 260 | ?      | ?   | 330    | 334 | 168    | 168 | 270    | 270 | 180    | 174 | 168    | 164 |
| 1         | CAN_04    | 322    | 322 | 142    | 142 | 228    | 228 | 244    | 260 | 218    | 218 | 330    | 330 | 160    | 160 | 262    | 262 | 174    | 174 | 160    | 160 |
| 1         | CAN_07    | 314    | 322 | 142    | 142 | 228    | 228 | 260    | 260 | 218    | 218 | 330    | 338 | 170    | 160 | 262    | 262 | 180    | 174 | 164    | 150 |
| 1         | CAN_09    | 314    | 322 | 142    | 142 | 228    | 228 | 260    | 260 | 218    | 218 | 330    | 338 | 174    | 160 | 262    | 262 | 180    | 174 | 164    | 150 |
| 1         | CAN_11    | 322    | 322 | ?      | ?   | 208    | 208 | 244    | 260 | 236    | 218 | 330    | 334 | 160    | 160 | 262    | 262 | 180    | 174 | 164    | 160 |
| 1         | CAN_13    | 324    | 324 | 142    | 152 | ?      | ?   | 244    | 260 | ?      | ?   | 330    | 330 | 168    | 168 | 262    | 262 | 180    | 174 | 164    | 160 |
| 1         | CAN_15    | 320    | 324 | ?      | ?   | 226    | 224 | 240    | 260 | 222    | 222 | 330    | 334 | 168    | 168 | 262    | 262 | 174    | 174 | 164    | 140 |
| 1         | CAN_18    | 322    | 322 | 142    | 152 | 228    | 228 | 242    | 248 | 232    | 218 | 330    | 334 | 166    | 170 | 262    | 262 | 174    | 174 | 150    | 160 |
| 1         | CAN_21    | 322    | 322 | 144    | 144 | 232    | 208 | 242    | 254 | 236    | 232 | 330    | 334 | 168    | 168 | 262    | 266 | 174    | 174 | 164    | 150 |
| 1         | CAN_22    | 322    | 322 | 154    | 154 | 226    | 208 | 260    | 260 | 232    | 232 | 330    | 334 | 166    | 168 | 262    | 262 | 180    | 174 | 164    | 164 |
| 1         | CAN_24    | 314    | 314 | 154    | 154 | 224    | 224 | 250    | 260 | 236    | 218 | 330    | 330 | 160    | 160 | 262    | 262 | 180    | 174 | 164    | 150 |
| 1         | CAN_26    | 314    | 322 | 142    | 142 | 226    | 226 | 246    | 250 | 218    | 218 | 330    | 342 | 166    | 166 | 262    | 266 | 180    | 174 | ?      | ?   |
| 1         | CAN_28    | 314    | 322 | 142    | 142 | 226    | 226 | 248    | 260 | 232    | 232 | 330    | 334 | 168    | 160 | 262    | 262 | 180    | 180 | 164    | 164 |
| 1         | CAN_29    | 314    | 322 | 162    | 162 | 224    | 226 | 250    | 252 | 218    | 218 | 330    | 334 | ?      | ?   | 262    | 262 | 180    | 174 | 164    | 164 |
| 1         | CAN_31    | 314    | 322 | 142    | 144 | 228    | 226 | 264    | 266 | ?      | ?   | 330    | 334 | 160    | 160 | 262    | 262 | 180    | 174 | 160    | 150 |
| 1         | CAM_32    | 314    | 322 | 142    | 142 | 226    | 226 | 246    | 260 | 232    | 218 | 330    | 334 | 172    | 160 | 262    | 262 | 180    | 174 | 160    | 150 |
| 2         | POS_03    | 320    | 318 | 138    | 148 | 208    | 232 | 244    | 248 | 214    | 230 | 334    | 334 | 170    | 170 | 260    | 260 | 174    | 174 | 150    | 150 |
| 2         | POS_04    | 320    | 320 | 138    | 138 | 208    | 220 | 250    | 248 | 214    | 224 | 334    | 334 | 170    | 170 | 260    | 260 | 174    | 174 | 150    | 150 |
| 2         | POS_06    | 320    | 320 | 138    | 148 | 228    | 232 | 250    | 250 | 214    | 230 | 338    | 340 | 170    | 170 | 260    | 260 | 174    | 174 | 150    | 148 |

|   |        |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 2 | POS_08 | 320 | 322 | 138 | 148 | 232 | 256 | 246 | 250 | 214 | 224 | 338 | 338 | 170 | 170 | 260 | 260 | 180 | 180 | 150 | 150 |
| 2 | POS_12 | 322 | 322 | 138 | 138 | 208 | 232 | 246 | 250 | 214 | 214 | 338 | 340 | 170 | 170 | 260 | 260 | 174 | 174 | 150 | 150 |
| 2 | POS_13 | 322 | 332 | 138 | 148 | 232 | 232 | 248 | 260 | 230 | 230 | 338 | 340 | 170 | 170 | 260 | 260 | 174 | 174 | 150 | 150 |
| 2 | POS_16 | 320 | 320 | 140 | 148 | 256 | 256 | 244 | 260 | 214 | 224 | 338 | 338 | 170 | 170 | 260 | 262 | 174 | 174 | 150 | 150 |
| 2 | POS_18 | 322 | 322 | 138 | 148 | 208 | 208 | 244 | 260 | 224 | 224 | 338 | 340 | 170 | 170 | 260 | 260 | 174 | 174 | ?   | ?   |
| 2 | POS_19 | 322 | 324 | 138 | 148 | 208 | 232 | 246 | 248 | 214 | 230 | 334 | 342 | 170 | 170 | 260 | 262 | 180 | 180 | ?   | ?   |
| 2 | POS_25 | 320 | 320 | ?   | ?   | 208 | 232 | 248 | 250 | 224 | 230 | 336 | 336 | 170 | 170 | 260 | 260 | 174 | 174 | ?   | ?   |
| 2 | POS_26 | 320 | 320 | 138 | 148 | 208 | 220 | 248 | 248 | 230 | 230 | 332 | 336 | 170 | 170 | 260 | 262 | 174 | 174 | ?   | ?   |
| 2 | POS_28 | 322 | 324 | 138 | 138 | 232 | 232 | 244 | 244 | 230 | 230 | 336 | 336 | 170 | 170 | 260 | 260 | 174 | 174 | 150 | 150 |
| 2 | POS_29 | 320 | 324 | 140 | 148 | 208 | 208 | 244 | 260 | 224 | 230 | 336 | 336 | 170 | 170 | 260 | 260 | 174 | 174 | 150 | 148 |
| 2 | POS_30 | 320 | 326 | 138 | 148 | 232 | 232 | 246 | 260 | 224 | 230 | 336 | 336 | 170 | 170 | 260 | 260 | 174 | 174 | 150 | 148 |
| 2 | POS_31 | 324 | 326 | 138 | 148 | 220 | 220 | 246 | 260 | 230 | 230 | 334 | 334 | 170 | 170 | 260 | 260 | 174 | 174 | 150 | 150 |
| 2 | POS_32 | 320 | 324 | 138 | 148 | 232 | 256 | 246 | 258 | 230 | 230 | 334 | 334 | 170 | 170 | 260 | 260 | 180 | 180 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_07 | 320 | 320 | ?   | ?   | 224 | 230 | 250 | 250 | 218 | 218 | 330 | 334 | 170 | 170 | 260 | 260 | 174 | 174 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_10 | 320 | 326 | ?   | ?   | 230 | 230 | 250 | 250 | 218 | 242 | 336 | 336 | 170 | 170 | 260 | 262 | 174 | 174 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_13 | 320 | 326 | ?   | ?   | 230 | 230 | 250 | 250 | 218 | 218 | 330 | 334 | 170 | 170 | 260 | 262 | 174 | 174 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_14 | 320 | 320 | ?   | ?   | 230 | 230 | 254 | 254 | 218 | 218 | 330 | 336 | 170 | 170 | 260 | 262 | 174 | 174 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_15 | 326 | 326 | ?   | ?   | 232 | 232 | 242 | 242 | 218 | 242 | 330 | 336 | 170 | 170 | ?   | ?   | 174 | 174 | 148 | 148 |
| 3 | CHG_16 | 320 | 320 | ?   | ?   | 230 | 230 | 242 | 244 | 218 | 218 | 330 | 334 | 170 | 170 | 260 | 262 | 174 | 174 | 148 | 148 |
| 3 | CHG_18 | 320 | 320 | ?   | ?   | 222 | 234 | 254 | 254 | 218 | 218 | 330 | 330 | 170 | 170 | 260 | 262 | 174 | 174 | 148 | 148 |
| 3 | CHG_20 | 320 | 320 | ?   | ?   | 230 | 236 | 252 | 252 | 218 | 218 | 330 | 330 | 170 | 170 | 262 | 262 | 174 | 174 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_22 | 320 | 326 | ?   | ?   | 230 | 230 | 242 | 242 | 218 | 242 | 336 | 336 | 170 | 170 | 260 | 262 | 174 | 174 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_23 | 326 | 326 | ?   | ?   | 222 | 230 | 242 | 244 | 218 | 218 | 330 | 336 | 170 | 170 | 260 | 262 | 174 | 174 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_24 | 326 | 326 | ?   | ?   | 230 | 230 | ?   | ?   | 218 | 242 | 336 | 336 | 170 | 170 | 260 | 262 | 174 | 174 | 148 | 148 |
| 3 | CHG_25 | 322 | 326 | ?   | ?   | 230 | 230 | 244 | 244 | 218 | 218 | 330 | 336 | 170 | 170 | 262 | 262 | 174 | 174 | ?   | ?   |
| 3 | CHG_28 | 322 | 322 | ?   | ?   | 216 | 230 | 254 | 244 | 218 | 218 | 330 | 334 | 170 | 170 | 260 | 260 | 174 | 174 | 148 | 148 |
| 3 | CHG_29 | 322 | 322 | ?   | ?   | 230 | 230 | 244 | 244 | 218 | 242 | 330 | 336 | 170 | 170 | 262 | 262 | 174 | 174 | 148 | 148 |
| 3 | CHG_30 | 320 | 320 | ?   | ?   | 232 | 232 | ?   | ?   | 218 | 242 | 330 | 330 | 170 | 170 | 260 | 260 | 174 | 174 | 148 | 146 |
| 3 | CHG_32 | 322 | 322 | ?   | ?   | 230 | 230 | 254 | 254 | 218 | 242 | 336 | 336 | 170 | 170 | 262 | 262 | 174 | 174 | 148 | 148 |