



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Curso de Ciências Biológicas Bacharelado



Noelia Vitória de Jesus Batista

Genotipagem com base em sequenciamento de regiões microssatélites para a identificação de clones em *Eugenia klotzschiana* O. BERG. (MYRTACEAE)

GOIÂNIA

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, 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.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Noelia Vitória de Jesus Batista

Título do trabalho: "Genotipagem com base em sequenciamento de regiões microssatélites para a identificação de clones em *Eugenia klotzschiana* O. BERG. (MYRTACEAE)"

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

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

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Thannya Nascimento Soares, Professora do Magistério Superior**, em 13/12/2024, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Noelia Vitória De Jesus Batista, Discente**, em 18/12/2024, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5022652** e o código CRC **71DA3859**.

Noelia Vitória de Jesus Batista

Genotipagem com base em sequenciamento de regiões microssatélites para a identificação de clones em *Eugenia klotzschiana* O. BERG. (MYRTACEAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas Bacharelado do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito para obtenção do título de Bacharel(a) em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof.^a Dra. Thannya Nascimento Soares

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

Batista, Noelia Vitória de Jesus
Genotipagem com base em sequenciamento de regiões
microsatélites para a identificação de clones em *Eugenia klotzschiana*
O. BERG. (MYRTACEAE) [manuscrito] / Noelia Vitória de Jesus
Batista. - 2024.
XXVII, 27 f.: il.

Orientador: Prof. Thannya Soares Nascimento.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Ciências
Biológicas, Goiânia, 2024.

Bibliografia.

Inclui gráfico, tabelas.

1. Pêra do Cerrado. 2. diversidade genética. 3. reprodução
assexuada. 4. sequenciamento de nova geração. I. Nascimento,
Thannya Soares, orient. II. Título.

CDU 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos cinco dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e quatro iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “Genotipagem com base em sequenciamento de regiões microssatélites para a identificação de clones em *Eugenia klotzschiana* O. BERG. (MYRTACEAE)” de autoria de Noelia Vitória de Jesus Batista, do curso de Ciências Biológicas Bacharelado, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Dra. Thannyá Nascimento Soares - Instituto de Ciências Biológicas/ UFG com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Dra. Carmen Elena Barragán Ruiz - Instituto de Ciências Biológicas/ UFG e Dra. Kássia Marques Corrêa Miranda - Instituto de Ciências Biológicas/ UFG. Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do(a) estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de **9,7**, tendo sido o TCC considerado **aprovado**.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Carmen Elena Barragán Ruiz, Usuário Externo**, em 23/01/2025, às 13:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kássia Marques Corrêa Miranda, Usuário Externo**, em 23/01/2025, às 13:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thannyá Nascimento Soares, Professora do Magistério Superior**, em 29/01/2025, às 15:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5114342** e o código CRC **5771E81F**.

DEDICATÓRIA

A minha família pelo apoio incondicional, amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Ma. Sylluana Ribeiro Corrêa por ter cedido os dados utilizados neste estudo, os quais são provenientes de sua dissertação de mestrado. Ao Prof. Alexandre Siqueira Guedes Coelho por ter gentilmente cedido o *script* utilizado na análise dos dados. À minha orientadora Prof. Dra. Thannya Nascimento Soares pela oportunidade, pela orientação, pelos ensinamentos e principalmente por acreditar que eu faria um bom trabalho, mesmo quando até eu tinha dúvidas. Meus sinceros agradecimentos. Ao Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio - UFG) pelo suporte e pelos recursos disponibilizados durante o desenvolvimento deste projeto. Agradeço imensamente a toda a equipe do laboratório, em especial a Kássia Miranda, Fernanda Rosa e Juliana Brito por contribuírem com o meu aprendizado.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Kássia Marques Corrêa Miranda, Dra. Carmen Elena Barragán e Ma. Amanda Ximenes Melo pela disponibilidade em compor a banca e por suas respectivas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para minha formação ao longo dos anos de graduação, que compartilharam seus conhecimentos, experiências e dedicação. Agradeço especialmente a Dra. Vera Lúcia Gomes-Klein, ao Dr. Aristônio Magalhães Teles, a Dra. Jascieli Carla Bortonili e a Dra. Mariana Pires de Campos Telles, cujas aulas e ensinamentos foram fundamentais para minha formação.

Aos meus amigos que estiveram comigo durante esse percurso, me apoiando, compartilhando risadas e bons momentos que tornaram este caminho mais leve. Agradeço especialmente a Bruna Nunes e ao Renan Gabriel, que escutaram minhas reclamações/divagações pessimistas e ainda assim não desistiram de mim.

Agradeço a Deus por cuidar de mim nos mínimos detalhes e sempre me guiar pelos caminhos difíceis. A minha família, minha mãe Léia de Jesus que é meu maior exemplo de uma mulher forte e corajosa, e que me inspira todos os dias a correr atrás dos meus sonhos. Ao meu pai Silas Lucena, que me ensinou a ler, me ensinou a tabuada e sempre me incentivou a ter sede pelo conhecimento, sou profundamente grata. Aos meus irmãos, David Adolfo e Simara Lucena que estiveram sempre comigo, compartilhando sonhos e angústias, mas acima de tudo apoiando uns aos outros. E por fim, porém não menos importante agradeço ao meu marido Alexssander Gonçalves, que faz de tudo pela minha felicidade e sucesso. Por ser um porto seguro nos momentos difíceis, me apoiando incondicionalmente. Pela paciência, compreensão e encorajamento que foram fundamentais para que eu pudesse me dedicar e alcançar meus objetivos. Amo você!

SUMÁRIO

RESUMO	06
ABSTRACT	07
1. INTRODUÇÃO	08
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DOS ALELOS DOS LOCOS SSR-SEQ	13
3.2 DIVERSIDADE GENÉTICA DOS LOCOS SSR-SEQ	18
3.3 IDENTIFICAÇÃO DOS CLONES	19
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
6. REFERÊNCIAS	24

RESUMO

Eugenia klotzschiana O. Berg (Myrtaceae) apresenta ocorrência principalmente em regiões de Cerrado, caracterizada pelo porte arbustivo e seus frutos comestíveis, que possuem alto valor nutritivo. Os estudos para essa espécie são escassos, com conhecimento limitado acerca de seus hábitos reprodutivos, ainda que sejam um fator de influência para os padrões de diversidade genética. Os marcadores microssatélites são bastante eficientes para análises de discriminação individual e diversidade genética, além disso ao utilizar a técnica de genotipagem por sequenciamento desses marcadores (SSR-GBS) é possível obter informações não só quanto ao tamanho dos alelos, mas também em relação às suas sequências, com maior quantidade dos dados em comparação com o método tradicional. O objetivo deste trabalho foi realizar descrições das sequências dos fragmentos amplificados e a investigar a presença de clones em uma população de *Eugenia klotzschiana*. Para tanto, foram utilizados dados de sequências de 22 locos SSR-Seq, previamente obtidos com o pipeline SSR-GBS, para 37 indivíduos provenientes de uma população natural. Em 60% dos locos foi possível observar mutações pontuais e todos os locos são polimórficos, a média de alelos foi de 3,1, variando de 2 a 5 alelos por loco. A diversidade genética de Nei (H_e) foi de 0,58, heterozigosidade observada (H_o) foi de 0,88 e o índice de fixação intrapopulacional (f) foi de -0,537, indicando excesso de heterozigotos. A análise de probabilidade combinada de exclusão de paternidade (Q) foi de 0,9998 e a probabilidade combinada de identidade (P_i) foi ($1,09 \times 10^{-14}$), sugerindo que a bateria de locos é adequada para a condução de análises de discriminação individual. Foi confirmada a presença de clones na população, formando oito linhagens clonais, sendo que o alcance clonal foi de mais de 300 metros sugerindo reprodução assexuada em longas distâncias.

Palavras-Chave: Pêra do Cerrado; diversidade genética; reprodução assexuada; sequenciamento de nova geração.

ABSTRACT

Eugenia klotzschiana O. Berg (Myrtaceae) occurs mainly in Cerrado regions, described by its shrubby size and edible fruits, which have high nutritional value. Studies for this species are scarce, with limited knowledge about its reproductive habits, although they are an influencing factor for genetic diversity patterns. Microsatellite markers are quite efficient for analyses of individual discrimination and genetic diversity. Furthermore, by using the genotyping technique by sequencing these markers (SSR-GBS), it is possible to obtain information not only about the size of the alleles, but also about their sequences, with a greater amount of data compared to the traditional method. The objective of this work was to investigate the sequences of the amplified fragments and investigate the presence of clones in a population of *Eugenia klotzschiana*. For this purpose, sequence data from 22 SSR-Seq loci, previously obtained with the SSR-GBS pipeline, were used for 37 individuals from a natural population. Point mutations were observed in 60% of the loci and all loci were polymorphic. The average number of alleles was 3.1, ranging from 2 to 5 alleles per locus. Nei's genetic diversity (H_e) was 0.58, the observed heterozygosity (H_o) was 0.88 and the intrapopulation fixation index (f) was -0.537, reducing excess heterozygotes. The combined probability of paternity exclusion (Q) analysis was 0.9998 and the combined probability of identity (P_i) was (1.09×10^{-14}), indicating that a battery of loci is adequate for conducting individual discrimination analyses. The presence of clones in the population was confirmed, forming eight clonal lineages, with a clonal range of more than 300 meters, offering asexual reproduction over long distances.

Keywords: Cerrado pear; genetic diversity; asexual reproduction; next generation sequencing.

1. INTRODUÇÃO

Eugenia klotzschiana O. Berg é uma planta da família Myrtaceae, que possui porte arbustivo, flores brancas aromáticas e frutos comestíveis. É uma planta endêmica do Brasil e comumente conhecida como Pêra-do-Cerrado. É uma planta de clima tropical e que se adapta melhor aos solos drenados e permeáveis, como regiões de cerrado (Vieira et al, 2018). Os óleos essenciais extraídos das folhas e flores da *Eugenia* possuem atividade antimicrobiana promissora contra algumas bactérias cariogênicas, além disso, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais dessa espécie a qualifica como potencial agente antimicrobiano natural contra patógenos orais (Carneiro et al. 2017). Seu fruto demonstrou possuir alto valor nutricional, rico em fibras e ferro, revelou ser uma fruta complexa quanto às suas composições e com atividade antioxidante que desempenham papéis importantes na saúde humana. Portanto, a Pêra-do-Cerrado pode ser considerada uma rica fonte de nutrientes a ser consumida (Carneiro et al. 2019).

A Pêra-do-Cerrado tem como característica suas partes aéreas, que a princípio parecem ser plantas independentes, entretanto, formam touceiras de clones interligadas subterraneamente. O que destaca a possibilidade de sua aplicação na prática vegetativa para o controle da erosão do solo, considerando uma perspectiva de exploração econômica (Oliveira, 1999). Plantas se reproduzem de duas maneiras: sexuada, compreendendo a alternância de gerações haploide e diploide e mecanismos que formam gametas haploides masculinos e femininos e assexuada, envolvendo vários métodos de propagação vegetativa (Dubová; Hejátko & Friml, 2006). A reprodução assexuada possui diferentes classificações de acordo com sua origem de propagação, sendo todas elas caracterizadas por promover a produção de clones, indivíduos iguais ou muito parecidos à planta mãe em termos genéticos, em função da ausência de fusão de gametas. Esse tipo de reprodução pode ocorrer vegetativamente, quando partes da planta são utilizadas, como caules, raízes, folhas e inflorescências, ou por apomixia, que é a formação de embriões a partir de células do óvulo, que produz sementes viáveis. Tal mecanismo é comum em algumas espécies, como mandioca e cana-de-açúcar, e é essencial para a propagação de plantas agrícolas, além de ser uma estratégia de reprodução fundamental para populações pequenas, em ambientes não nativos e locais onde a reprodução sexuada é restrita (Caetano & Cortez, 2014). Poucos estudos abordaram o sistema reprodutivo de *E. klotzschiana* e, apesar de Oliveira (1999) relatar a possibilidade de formação de clones na espécie, foi ressaltada a necessidade de uma análise mais aprofundada.

Uma forma bastante eficiente de se identificar clones em populações é utilizando os marcadores microssatélites, que são sequências curtas de DNA repetidas em série e, por isso, são

também conhecidos como SSRs (*Simple Sequence Repeats*). Por serem marcadores codominantes, com alto nível de polimorfismo são bastante vantajosos para a discriminação individual (Faleiro, 2007). Inicialmente, a obtenção de marcadores SSRs exigia técnicas demoradas, como a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas para regiões repetitivas, entretanto, nas últimas décadas houve avanços notáveis no desenvolvimento e genotipagem desses marcadores. A tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS), aliada às ferramentas de bioinformática, permitem a identificação de regiões alvo e o desenho de centenas a milhares de pares de primers de marcadores SSR (Turchetto-Zolet et al. 2017).

Comumente os locos de SSRs são genotipados medindo a variação do comprimento dos fragmentos via eletroforese capilar. Essa técnica foca apenas na variação do comprimento, e portanto pode deixar de lado outras informações valiosas sobre as sequências amplificadas. Ao usar as técnicas de NGS para genotipagem por sequenciamento de regiões microssatélites é possível acessar não só os tamanhos dos alelos, como também as suas sequências e obter mais informações genéticas. Somado a isso, a genotipagem por sequenciamento dos SSR (SSR-Seq) oferece benefícios como automação na identificação de alelos, minimizando erros e aumentando a qualidade dos dados, o que torna o método mais reprodutível e informativo, quando comparado ao método tradicional (Tibihika et al. 2019).

Em 2014, Siqueira (2014) realizou a transferibilidade de marcadores microssatélites gênicos desenvolvidos para *Eucalyptus* em *E. klotzschiana* e caracterizou a variabilidade genética em populações da Pêra-do-Cerrado. Entretanto, possivelmente por serem marcadores de regiões gênicas e transferidos, os níveis de diversidade genética foram muito baixos, dificultando a realização de análises de discriminação individual com esses locos. Corvalán et al. (2023) disponibilizaram informações sobre o primeiro genoma parcialmente montado de *E. klotzschiana* e dois conjuntos de primers de SSR para a amplificação em sistemas multiplex e genotipagem por sequenciamento de alto rendimento em plataforma Illumina. Esses primers foram testados por Corrêa (2023), dos quais 22 amplificaram com sucesso e 20 foram selecionados com base no nível de polimorfismo. A autora demonstrou que esses locos apresentaram bom polimorfismo, com base nos tamanhos dos alelos, entretanto, não foram analisadas as sequências desses alelos.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar os 22 marcadores padronizados por Corrêa (2023), descrever as sequências dos fragmentos amplificados e estimar os parâmetros genéticos de diversidade dos locos, cujos genótipos foram obtidos com base nas

sequencias dos alelos. Além disso, os marcadores foram utilizados para investigar a presença de clones em uma população de *Eugenia klotzschiana* O. Berg.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os dados utilizados neste estudo são provenientes da dissertação de mestrado de Corrêa (2024), na qual foram utilizados 37 indivíduos de uma única população de *Eugenia. klotzschiana* provenientes de uma coleta realizada em outubro de 2010 no município de Senador Canedo – GO (latitude 16°37 '32,197 " S e longitude 49°4 '22,696" W). Foram analisados com 22 locos SSR-Seq, sequenciados na plataforma illumina MiSeq. A análise da qualidade das sequências foi realizada no FastQC e a chamada dos alelos utilizando o pipeline SSR-GBS (Tibihika et al. 2019).

Os arquivos *fasta* resultantes do pipeline foram utilizados para a análise das sequências dos alelos de cada loco e indivíduo, utilizando o software BioEdit (Hall, 1999), que permite a visualização, edição e análise das sequências de DNA. Foi aplicada a função de alinhamento automático na maioria dos locos, salvo algumas exceções (5, 30 e 27) para os quais foi necessário o alinhamento manual das sequências. Os locos microssatélites alinhados foram descritos quanto à composição do motivo, ao número de repetições e quanto à presença, localização e composição de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs).

A matriz de genótipos foi construída atribuindo-se um número para cada alelo, identificado a partir das diferenças entre as sequências. Foram estimados os seguintes parâmetros de diversidade genética para cada loco e para o conjunto total: número médio de alelos por loco, diversidade genética de Nei (Nei, 1973), estimada com base na heterozigosidade esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigosidade observada e índice de fixação intrapopulacional (Wright, 1969). Essas análises foram conduzidas utilizando um *script* gentilmente cedido pelo professor Alexandre Siqueira Guedes Coelho, que utiliza funções dos pacotes hierfstat e ggplot2 do software R (R Core Team, 2023). Foram realizadas análises de probabilidade combinada de exclusão de paternidade (Q) e de probabilidade combinada de identidade (Pi) através do software GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2006, 2012), um pacote de análise genética populacional dentro do espaço Microsoft Excel.

Para a identificação dos clones foi usado o pacote “Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction” (Kamvar; Tabima & Grünwald, 2014), que é uma ferramenta eficaz na análise de populações com reprodução mista (reprodução sexuada e/ou clonal). O estudo consistiu na análise de distância genética, utilizando uma medida de distância discreta, baseada na estimativa da proporção de alelos diferentes entre todos os indivíduos da população. Para a observação da matriz de distância, foi realizada a análise

de agrupamento do tipo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (Sokal & Michener, 1958).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das sequências dos alelos nos locos SSR-Seq de *Eugenia. klotzschiana*

A seguir são apresentadas as informações gerais sobre as sequências dos alelos de cada loco e um resumo das informações pode ser verificado na tabela 1.

EKL-NGS2: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição CT a partir da posição 43. O alelo 187 possui uma sequência microssatélite com 11 motivos de repetição, o alelo 189 é formado por 12 motivos de repetição, enquanto o alelo 197 é formado por 16 motivos de repetição. Não são observados SNPs na região microssatélite, porém, foi observado um SNP na posição 157.

EKL-NGS3: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição CT a partir da posição 72. O alelo 182 possui uma sequência microssatélite com 11 motivos de repetição, enquanto o alelo 184 é formado por 12 motivos de repetição. Não são observados SNPs.

EKL-NGS5: Foram observadas duas regiões microssatélites amplificadas simultaneamente para o mesmo par de primers, o que provavelmente se configura como um “loco duplicado”, aqui denominados como 05_01 e 05_02. O loco 05_01 apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição CT a partir da posição 53. O alelo 131 possui uma sequência microssatélite com 12 motivos de repetição e o alelo 135 é formado por 14 motivos de repetição. O alelo 129 uma sequência microssatélite com 11 motivos de repetição, enquanto o alelo 135 é formado por 14 motivos de repetição. O indivíduo 31 possui no alelo 129 uma sequência microssatélite com 11 motivos de repetição e se diferencia dos demais por possuir o alelo 137 que é formado por 15 motivos de repetição. Com presença de um SNP na posição 57. O loco 05_02 apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição AG a partir da posição 122. O alelo 189 possui uma sequência microssatélite com 13 motivos de repetição e o alelo 191 é formado por 14 motivos de repetição. O alelo 187 uma sequência microssatélite com 12 motivos de repetição, enquanto o alelo 201 é formado por 19 motivos de repetição. Não são observados SNPs.

EKL-NGS6: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição AG a partir da posição 101. O alelo 181 possui uma sequência microssatélite com 11 motivos de repetição e o alelo 183 é formado por 12 motivos de repetição. O alelo 183 uma sequência microssatélite com 12 motivos de repetição, enquanto o alelo 185 é formado por 13 motivos de repetição. Não são observados SNPs.

EKL-NGS9: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição AG a partir da posição 122. O alelo 189 possui uma sequência microssatélite com 13 motivos de repetição e o alelo 191 é formado por 14 motivos de repetição. O alelo 187 uma sequência microssatélite com 12 motivos de repetição, enquanto o alelo 201 é formado por 19 motivos de repetição. Não são observados SNPs.

EKL-NGS10: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição AG a partir da posição 101. O alelo 185 possui uma sequência microssatélite com 13 motivos de repetição e o alelo 201 é formado por 21 motivos de repetição. O alelo 181 uma sequência microssatélite com 11 motivos de repetição, enquanto o alelo 199 é formado por 20 motivos de repetição. O indivíduo 29 possui no alelo 183 sequência microssatélite com 12 motivos de repetição, enquanto o alelo 185 é formado por 13 motivos de repetição. Com presença de sete SNPs nas posições 72, 92, 99, 100, 102, 147 e 182.

EKL-NGS12: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição TTCG a partir da posição 87. O alelo 178 possui uma sequência microssatélite com 6 motivos de repetição e o alelo 182 é formado por 7 motivos de repetição. O alelo 178 uma sequência microssatélite com 6 motivos de repetição. O indivíduo 11, possui no alelo 178 uma sequência microssatélite com 6 motivos de repetição, enquanto o alelo 186 é formado por 8 motivos de repetição. Não são observados SNPs.

EKL-NGS13: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição TC a partir da posição 48. O alelo 160 possui uma sequência microssatélite com 8 motivos de repetição e o alelo 172 é formado por 14 motivos de repetição. O alelo 160 uma sequência microssatélite com 8 motivos de repetição. Não são observados SNPs na região microssatélite, porém, foi observado um SNPs na posição 90.

EKL-NGS16: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição TC a partir da posição 68. O alelo 137 possui uma sequência microssatélite com 12 motivos de repetição e o alelo 141 é formado por 14 motivos de repetição. O alelo 133 uma sequência microssatélite com 10 motivos de repetição, enquanto o alelo 137 é formado por 12 motivos de repetição. O indivíduo 14 possui no alelo 137 uma sequência microssatélite com 12 motivos de repetição, enquanto o alelo 139 é formado por 13 motivos de repetição. Não são observados SNPs na região microssatélite, porém, foram observados dois SNPs nas posições 55 e 61.

EKL-NGS17: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição TC a partir da posição 75. O alelo 193 possui uma sequência microssatélite com 12 motivos de repetição e o alelo 195 é formado por 13 motivos de repetição. O alelo 203 uma sequência microssatélite com 17 motivos de repetição, enquanto o alelo 205 é formado por 18 motivos de repetição. Não são observados SNPs na região microssatélite, porém, foram observados quatro SNPs nas posições 73, 127, 129 e 169.

EKL-NGS18: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição TC a partir da posição 92. O alelo 168 possui uma sequência microssatélite com 11 motivos de repetição e o alelo 170 é formado por 12 motivos de repetição. O alelo 166 uma sequência microssatélite com 10 motivos de repetição, enquanto o alelo 168 é formado por 11 motivos de repetição. Não são observados SNPs na região microssatélite, porém, foi observado um SNPs na posição 50.

EKL-NGS27: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição AG a partir da posição 54. O alelo 136 possui uma sequência microssatélite com 13 motivos de repetição e o alelo 138 é formado por 14 motivos de repetição. O alelo 132 possui uma sequência microssatélite com 11 motivos de repetição, enquanto o alelo 144 é formado por 17 motivos de repetição. Com presença de dois SNPs nas posições 76 e 78, com exceção do alelo 132 em que não é possível observar SNPs.

EKL-NGS29: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição CT a partir da posição 126. O alelo 199 possui uma sequência microssatélite com 12 motivos de repetição e o alelo 201 é formado por 13 motivos de repetição. O alelo 201 uma sequência microssatélite com 13 motivos de repetição, enquanto o alelo 209 é formado por 17 motivos de repetição. Não são observados SNPs.

EKL-NGS30: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição CTCC a partir da posição 45, com uma interrupção de CTTC na posição 49 e 7 motivos de repetição. Os alelos 169 possuem uma sequência microssatélite com 7 motivos de repetição. Não são observados SNPs na região microssatélite, porém, foi observado um SNPs na posição 32.

EKL-NGS31: O loco apresenta uma sequência microssatélite formada pelo motivo de repetição TC a partir da posição 103. O alelo 193 possui uma sequência microssatélite com 14 motivos de repetição e o alelo 200 é formado por 18 motivos de repetição. O alelo 191 uma sequência microssatélite com 13 motivos de repetição, enquanto o alelo 193 é formado por 14

motivos de repetição. Não são observados SNPs na região microsatélite, porém, foram observados três SNPs nas posições 41, 76 e 84.

EKL-NGS32: O loco apresenta uma sequência microsatélite formada pelo motivo de repetição GA a partir da posição 69. O alelo 197 possui uma sequência microsatélite com 13 motivos de repetição e o alelo 205 é formado por 17 motivos de repetição. O alelo 195 uma sequência microsatélite com 12 motivos de repetição, enquanto o alelo 197 é formado por 13 motivos de repetição. Não são observados SNPs.

EKL-NGS33: O loco apresenta uma sequência microsatélite formada pelo motivo de repetição GA a partir da posição 122. O alelo 198 possui uma sequência microsatélite com 11 motivos de repetição e o alelo 200 é formado por 12 motivos de repetição. Não são observados SNPs.

EKL-NGS34: O loco apresenta uma sequência microsatélite formada pelo motivo de repetição AG a partir da posição 41. O alelo 164 possui uma sequência microsatélite com 12 motivos de repetição e o alelo 166 é formado por 13 motivos de repetição. O alelo 164 uma sequência microsatélite com 12 motivos de repetição, enquanto o alelo 166 é formado por 13 motivos de repetição. Com presença de dois SNPs nas posições 42 e 142.

EKL-NGS38: O loco apresenta uma sequência microsatélite formada pelo motivo de repetição TC a partir da posição 48. O alelo 124 possui uma sequência microsatélite com 13 motivos de repetição e o alelo 126 é formado por 14 motivos de repetição. Não são observados SNPs.

EKL-NGS41: O loco apresenta uma sequência microsatélite formada pelo motivo de repetição TC a partir da posição 41. O alelo 160 possui uma sequência microsatélite de 12 motivos de repetição. O alelo 158 uma sequência microsatélite com 11 motivos de repetição, enquanto o alelo 160 é formado por 12 motivos de repetição. Não são observados SNPs.

EKL-NGS42: O loco apresenta uma sequência microsatélite formada pelo motivo de repetição AG a partir da posição 132. O alelo 191 possui uma sequência microsatélite com 9 motivos de repetição e o alelo 197 é formado por 12 motivos de repetição. O alelo 191 apresenta uma sequência microsatélite de 9 motivos de repetição. Com presença de dois SNPs nas posições 56 e 145.

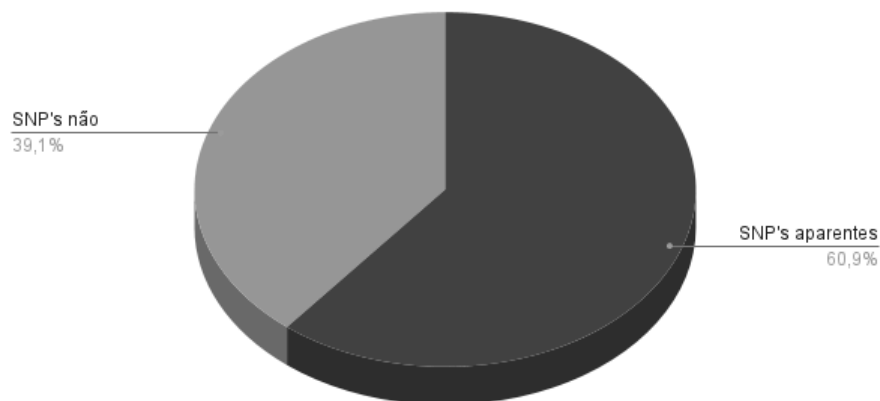
Tabela 1. Caracterização das sequências dos alelos dos locos SSR-Seq, resumo das informações gerais sobre as sequências dos alelos de 21 locos de *Eugenia klotzschiana*

Loco	Motivo esperado*	Motivo detectado	Amplitude de tamanho dos alelos	SNP na região microssatélite (alelos-posição)	SNP fora da região microssatélite (alelos-posição)
EKL-NGS2	AG12	CT	187 a 197	-	T/C-157
EKL-NGS3	AG12	CT	182 a 184	-	-
EKL-NGS5_01	AG13	CT	129 a 137	-	A/C- 57
EKL-NGS5_02	AG13	AG	187 a 201	-	-
EKL-NGS6	AG13	AG	181 a 185	-	-
EKL-NGS9	AG14	AG	187 a 201	-	-
EKL-NGS10	AG12	AG	181 a 201	C/G -102	C/T-72; T/C-92; T/A-99; A/G-100; A/G-147; C/G-182
EKL-NGS12	AACG6	TTCG	178 a 186	-	-
EKL-NGS13	AG14	TC	160 a 172	-	G/T-90
EKL-NGS16	AG12	TC	133 a 141	-	C/T-55; A/G-61
EKL-NGS17	AG13	TC	193 a 205	-	G/T-73; A/G-127; T/A-129; G/A-169
EKL-NGS18	AG13	TC	166 a 170	-	C/T-50
EKL-NGS27	AG12	AG	132 a 144	G/A-76; A/G-78	-
EKL-NGS29	AG12	CT	199 a 209	-	-
EKL-NGS30	AGGG6	CTCC	169	-	A/T-32
EKL-NGS31	AG14	TC	191 a 200	-	G/C-41; T/C-76; T/C-84
EKL-NGS32	AG13	GA	195 a 205	-	-
EKL-NGS33	AG12	GA	198 a 200	-	-
EKL-NGS34	AG12	AG	164 a 166	C/G-42	G/C-142
EKL-NGS38	AG14	TC	124 a 126	-	-
EKL-NGS41	AG12	TC	158 a 160	-	-
EKL-NGS42	AG12	AG	191 a 197	A/G-145	T/G-56

*Conforme tabela de desenho de primers de Corvalán et al. (2023)

As regiões microssatélites analisadas apresentam unidades de repetição classificada como perfeita simples, com exceção do loco 30 que é interrompida. Apenas em 9 deles não foi possível observar SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) assim como detalhado na descrição dos locos (Figura 1). O loco 35 apresentou uma região amplificada que não é compatível com região microssatélite, portanto, ele não foi incluído nas análises.

Figura 1. Porcentagem de locos em que foi possível observar SNP's. Os locos com SNPs aparentes (60,9%) foram 21,8% a mais do que os locos com SNPs não observáveis (39,1%).



Cabe salientar que as mutações pontuais observadas nessas regiões estavam associadas aos alelos de diferentes tamanhos. Apesar disso, ocasionalmente, foram encontrados alelos de mesmo tamanho que apresentam diferentes sequências (mutações pontuais), como no caso dos locos 18, 30 e 34. O que sugere que basear-se apenas no tamanho dos fragmentos pode não ser suficiente para captar toda a variabilidade genética existente, uma análise mais detalhada das sequências pode revelar dados adicionais importantes e aumentar significativamente a quantidade de informações dentro dos locos.

3.2 Diversidade genética dos locos SSR-Seq

Dos 22 locos analisados na população todos são polimórficos, revelando um nível maior de polimorfismo em comparação com a tradicional medição do tamanho dos fragmentos de DNA, no qual Correa (2023) encontrou 20 locos polimórficos. No referido estudo, loco 30 não apresentou variabilidade no tamanho dos alelos, ainda assim ele apresenta diferentes sequências, devido a

mutações pontuais (SNPs). O que demonstra que a utilização do método SSR-GBS fornece dados mais completos, em comparação com o método convencional, assim como descrito por Tibihika et al. (2019). A média de alelos foi de 3,1, variando de 2 a 5 alelos por loco, não houve grande variação na diversidade genética de Nei (He) entre os locos, com exceção do loco 30 que apresentou a menor taxa (0,257), a heterozigosidade observada (Ho) foi alta em 20 dos locos, apenas dois deles (loco 30 e 35) apresentaram valores abaixo da média (0,297), o mesmo padrão se refletiu no coeficiente de endogamia total (f) (Tabela 2). Contudo, levando em conta a possibilidade de haver clones nessa espécie, o número de alelos por loco pode ser maior ao se estudar mais de uma população.

3.3 Identificação dos clones

A diversidade genética de Nei (He) média da população foi de 0,58 o que sugere uma quantidade razoável de variação genética dentro da população estudada, a heterozigosidade observada (Ho) média da população, em contrapartida, foi consideravelmente alta (0,88), com muitos indivíduos heterozigotos. Já o coeficiente de endogamia total (f) foi de -0,537 (Tabela 2) indicando excesso de heterozigotos em relação ao esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (Hardy, 1908; Weinberg, 1908). É importante ressaltar que o modo de reprodução predominante em uma determinada população é um fator de influência nos índices de diversidade genética. A reprodução sexuada promove a combinação de diferentes genes o que tende a índices de diversidade genética maiores, já na reprodução assexuada exclusiva os indivíduos são geneticamente idênticos, portanto, a menos que ocorram mutações, a diversidade genética é baixa. (Nybom, 2004; Lozada-Gobilard et al. 2021).

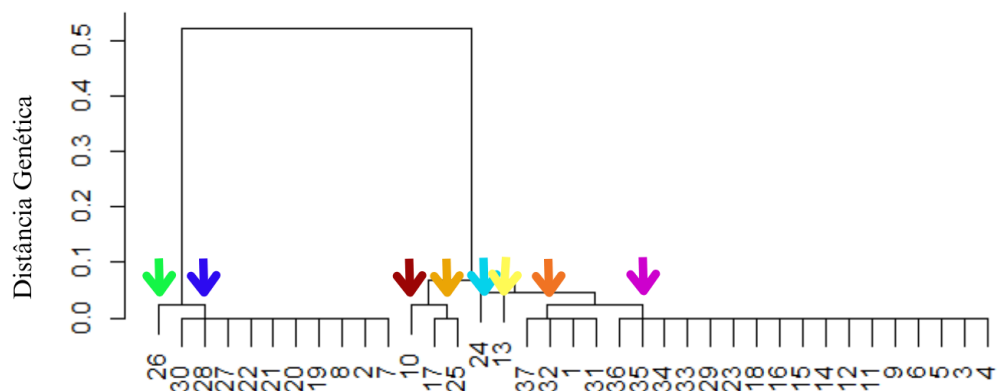
As análises de probabilidade combinada de exclusão de paternidade (Q) demonstrou valores altos, próximos de um (0,9998) e valores de probabilidade combinada de identidade (Pi) próximos de zero ($1,09 \times 10^{-14}$). Esses valores indicam que o conjunto de locos analisados é eficiente para investigar a presença de clones de uma população. Foram identificadas oito linhagens multiloci na população estudada, confirmando a existência de clones na espécie. Os 37 indivíduos formaram dois grupos distintos na população, que apresentam 50% dos alelos diferentes entre si (Figura 2). Apesar da reprodução assexuada ser um importante mecanismo para pequenas populações (Silvertown, 2008), a redução na reprodução gamética pode levar a diminuição da dispersão e do fluxo de genes tanto dentro de uma população quanto entre populações diferentes, além disso,

quando associado a fatores do tamanho do fragmento de habitat, pode influenciar a estrutura genética espacial das populações (Brzyski et al. 2018).

Tabela 2. Análise de diversidade genética para *E. klotzschiana*, n = número de indivíduos analisados; A = número de alelos; He = diversidade genética de Nei; Ho = heterozigosidade observada; f = coeficiente de endogamia total, pois como ele foi estimado com o conjunto de populações ele é o Fit.

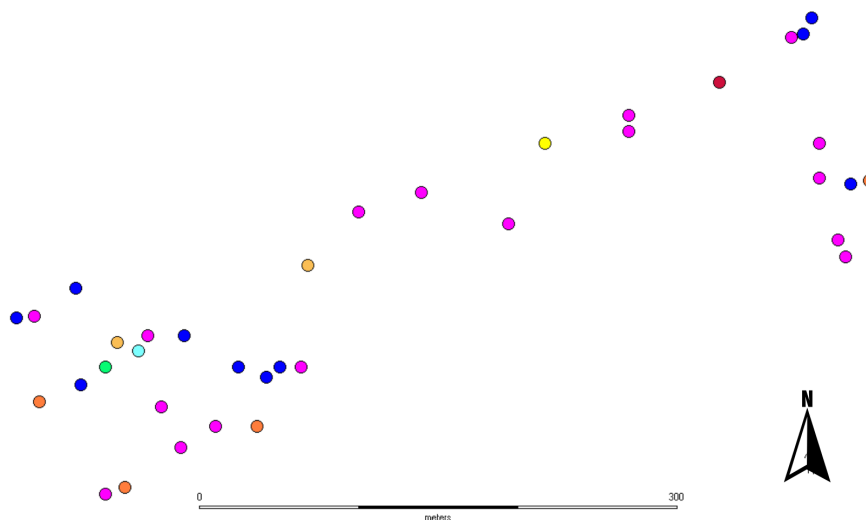
Loco	n	A	He	Ho	f
EKLNGS02	35	3	0,617	1,000	-0,637
EKLNGS03	35	2	0,507	1,000	-1,000
EKLNGS5a	34	4	0,633	1,000	-0,594
EKLNGS5b	34	4	0,730	1,000	-0,378
EKLNGS06	35	3	0,617	1,000	-0,637
EKLNGS09	34	4	0,730	1,000	-0,378
EKLNGS10	37	5	0,728	1,000	-0,381
EKLNGS12	37	3	0,471	0,703	-0,501
EKLNGS13	37	2	0,462	0,703	-0,532
EKLNGS16	37	4	0,622	1,000	-0,621
EKLNGS17	37	4	0,719	1,000	-0,399
EKLNGS18	37	4	0,719	1,000	-0,399
EKLNGS27	36	4	0,719	0,917	-0,280
EKLNGS29	37	3	0,613	1,000	-0,646
EKLNGS30	37	2	0,257	0,297	-0,161
EKLNGS31	37	3	0,613	1,000	-0,646
EKLNGS32	37	3	0,613	1,000	-0,646
EKLNGS33	37	2	0,507	1,000	-1,000
EKLNGS34	33	3	0,615	1,000	-0,642
EKLNGS38	37	2	0,507	1,000	-1,000
EKLNGS41	37	2	0,501	0,892	-0,800
EKLNGS42	31	2	0,444	0,645	-0,463
Geral	36	3	0,588	0,916	-0,570

Figura 2. Dendrograma construído com base na distância genética discreta entre 37 indivíduos de uma população da espécie *E. klotzschiana*, com base em 22 locos SSR-Seq. Cada uma das setas indica uma diferente linhagem clonal.



Analisando os resultados pela perspectiva da disposição espacial desses indivíduos na população, constatou-se que esses clones não estão agrupados espacialmente, o que demonstra que o alcance da formação de clones é de até 300 metros (figura 3). Esses dados sugerem que a reprodução assexuada através do brotamento é pouco provável (Douhovnikoff; Cheng & Dodd, 2004; Pettay et al. 2011; Ricono et al. 2020), sendo a apomixia uma hipótese mais plausível, considerando o alto alcance de formação clonal via dispersão das sementes (Hörandl; Cosendai & Temsch, 2008; Binks & Byrne, 2022). A documentação da apomixia em *Myrtaceae* é relativamente escassa, as plantas dessa família botânica não estão entre as de ocorrência mais comum a apomixia (Nygren, 1954; Caetano & Cortez, 2014; Hojsgaard et al. 2014; Guollo et al. 2023), ainda assim, estudos já relataram sua ocorrência para alguns de seus gêneros (Souza-pérez & Speroni, 2017; Binks & Byrne, 2022). Dentro do gênero *Eugenia*, essa forma de reprodução assexuada já foi sugerida para *Eugenia apiculata* DC. (Johnson, 1936), *Eugenia cauliflora* DC. (Traub, 1939; Gurgel e Soubihe-Sobrinho, 1951) e *Eugenia edulis* Vell. (Gurgel e Soubihe-Sobrinho, 1951).

Figura 3. Distribuição espacial dos clones de *E. klotzschiana*, seguindo o mesmo padrão colorimétrico da figura 2, onde os pontos de mesma cor indicam uma única linhagem clonal, ainda que não estejam agrupados espacialmente próximos um do outro.



A apomixia se trata da formação assexuada de sementes geneticamente semelhantes à planta-mãe e estudos indicam que esse tipo de reprodução promove a expansão de alcance explorando as vantagens da clonalidade, poliploidia, diversificação e expansão de alcance

(Hojsgaard & Hörandl, 2019). Esse método de reprodução é complexo, não apresentando um padrão evolutivo claro em angiospermas, podendo ter diversas origens. Algumas das hipóteses são: Desenvolvimento assíncrono decorrente de alteração no desenvolvimento sexual, condicionado a fatores genéticos de predisposição e fatores ambientais através da regulação epigenética (Niccolò; Anderson & Emidio, 2023; Hörandl et al. 2024). A apomixia possui diversas vantagens que podem ser exploradas tanto no cenário agrícola, na criação de variedades de alto rendimento, quanto na preservação ambiental, trazendo benefícios de persistência em ambientes ou regiões com clima desfavorável. Ela possibilita a reprodução independente de polinizadores, a facilidade da reprodução clonal com as vantagens da semente (proteção, dispersão e dormência do embrião), a redução de custos e energia gasta na meiose e na produção de grãos de pólen, além disso, a fixação de genótipos altamente adaptados a um ambiente específico (Caetano & Cortez, 2014).

Apesar disso, quando esse crescimento clonal ocorre em excesso é possível que ocorra a deleção de polimorfismos sexuais, levando a disfunções reprodutivas ou permitindo a fixação de alelos deletérios e perda da capacidade adaptativa a desafios ambientais (Barrett, 2015). Portanto a apomixia facultativa, que mantêm a capacidade de se reproduzir sexuadamente, com a combinação dos dois processos, é a mais vantajosa para uma população a longo prazo. Essa dinâmica pode ser fonte de diversidade genética por permitir a criação de novos genótipos apomíticos, mantendo a variabilidade genética dentro da descendência, resultando em novas linhagens assexuadas, com maior diversidade clonal. (Koltunow & Grossniklaus 2003; Tinschert et al., 2020; Hörandl, 2024). A capacidade de apomixia em *E. klotzschiana* pode explicar sua capacidade de se estabelecerem em ambientes variados e de manter populações estáveis mesmo em condições adversas, entretanto, apesar dos resultados obtidos fornecerem uma base esclarecedora, mais estudos são necessários para avaliar as preferências reprodutiva de *Eugenia klotzschiana* O. Berg.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os 22 locos SSR-Seq analisados apresentaram polimorfismos decorrentes da variação nas sequências dos alelos, tanto por variação do número de motivos de repetições e/ou por composição de bases dos fragmentos. Apesar da presença de mutações pontuais (SNPs) normalmente acompanhar a variação dos tamanhos dos alelos, houve ocorrência de alelos de mesmo tamanho que variaram em composição de bases. Diante disso, podemos concluir que a análise quanto as sequências obtidas possibilita maiores informações em comparação com a análise com critério de tamanho.

A diversidade genética (H_e) da população é mediana e apresenta alta heterozigosidade observada e índice de fixação intrapopulacional negativo, sugerindo excesso de heterozigotos. Entretanto, foi confirmado que a população estudada apresenta oito linhagens clonais, o que explica que a alta quantidade de indivíduos heterozigotos é decorrente da reprodução assexuada e não por exogamia. Os resultados obtidos mostram que *Eugenia klotzschiana* possui hábito reprodutivo clonal e que das oito linhagens multiloci identificadas foi evidente dois grupos com alta diferenciação dos alelos entre si. Se tratando de reprodução assexuada, a apomixia não é tão comum como o brotamento, entretanto o alcance da formação de clones é muito alta (300 metros) para que o brotamento seja provável. Portanto, a hipótese mais provável é que *E. klotzschiana* seja uma espécie com reprodução assexuada apomítica. Se faz então necessários mais estudos a fim de explorar as conclusões chegadas no presente estudo e verificar as preferências reprodutivas desta espécie.

5. REFERÊNCIAS

- BARRETT, S. C. H. Influences of clonality on plant sexual reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 29, p. 8859–8866, 20 jul. 2015.
- BINKS, R. M.; BYRNE, M. Species delimitation, hybridization and possible apomixis in a rapid radiation of Western Australian *Leptospermum* (Myrtaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 200, n. 3, p. 378–394, 25 fev. 2022.
- BRZYSKI, J. R.; STIEHA, C. R.; D NICHOLAS MCLETCHIE. The impact of asexual and sexual reproduction in spatial genetic structure within and between populations of the dioecious plant *Marchantia inflexa* (Marchantiaceae). **Annals of Botany**, v. 122, n. 6, p. 993–1003, 2018.
- CAETANO, A. P. S. & CORTEZ, P. A. Reprodução assexuada. In: RECH, A. R. *et al.* **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Projeto cultural, 2014. cap. 4, p. 93–111. ISBN: 9788568126011.
- CARNEIRO, N. S. *et al.* Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Essential Oils from Leaves and Flowers of *Eugenia Klotzschiana* O. Berg (Myrtaceae). **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 89, no. 3, 29 July 2017, pp. 1907–1915, <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160652>.
- CARNEIRO, N. S. *et al.* ***Eugenia klotzschiana* O. Berg fruits as new sources of nutrients: determination of their bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition.** Brazilian Archives of Biology and Technology 62 (2019): DOI: 10.1590/1678-4324-2019170562.
- CORRÊA, S. R. **Validação de Marcadores SSR-Seq para *Eugenia klotzschiana* O. BERG. (MYRTACEAE).** Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. [s. l.] Universidade Federal de Goiás - UFG, 2024.
- CORVALÁN, L. C. J. *et al.* Data of SSRs primers for high-throughput genotyping-by-sequencing (SSR-Seq) based on the partial genome assembly of *Eugenia klotzschiana* (Myrtaceae). **Data in Brief**, v. 47, p. 108917–108917, 19 jan. 2023.
- DOUHOVNIKOFF, V.; CHENG, A. M.; DODD, R. S. Incidence, size and spatial structure of clones in second-growth stands of coast redwood, *Sequoia sempervirens* (Cupressaceae). **American Journal of Botany**, v. 91, n. 7, p. 1140–1146, jul. 2004.
- DUBOVÁ, J.; HEJÁTKO, J.; FRIML, J. **Reproduction of Plants.** Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine (2006), 249–295. <https://doi.org/10.1002/3527600906.MCB.200500033>.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2007. 102 p. ISBN 978-85-7075-035-8
- GUOLLO, K. *et al.* Floral, reproductive, and pollination biology of *Eugenia myrcianthes* Nied. **Comunicata Scientiae**, v. 15, p. e3504–e3504, 31 out. 2023.

- GURGEL, J. T. A.; SOUBIHE-SOBRINHO, J. 1951. Poliembrionia em Mirtáceas frutíferas. **Bragantia**, v. 11, p. 141-163, 1951.
- HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HARDY, G. H. Mendelian proportions in a mixed population. **Science**, v. 28, n. 706, p. 49-50, 1908.
- HOJSGAARD, D. *et al.* **Taxonomy and Biogeography of Apomixis in Angiosperms and Associated Biodiversity Characteristics**. *Critical Reviews in Plant Sciences* (2014), 33(5), 414–427. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898488>
- HOJSGAARD, D.; HÖRANDL, E. The Rise of Apomixis in Natural Plant Populations. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, 2 abr. 2019.
- HÖRANDL, E. Apomixis and the paradox of sex in plants. **Annals of Botany**, v. 134, n. 1, p. 1–18, 18 mar. 2024.
- HÖRANDL, E. *et al.* **Apomixis in Systematics, Evolution and Phylogenetics of Angiosperms: Current Developments and Prospects**. *Critical Reviews in Plant Sciences* (2024), 1–43. <https://doi.org/10.1080/07352689.2024.2396259>
- HÖRANDL, E.; COSENDAL, A. C.; & TEMSCH, E. M. **Understanding the geographic distributions of apomictic plants: a case for a pluralistic approach**. *Plant Ecology & Diversity* (2008), 1(2), 309–320. <https://doi.org/10.1080/17550870802351175>
- JOHNSON, A. M. Polyembryony in *Eugenia hookeri*. **American Journal of Botany**, p. 83-88, 1936.
- KAMVAR Z. N.; TABIMA J. F.; GRÜNWARD N. J. **Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction**. *PeerJ* 2:e281, 2014. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- KOLTUNOW, A. M.; GROSSNIKLAUS, U. Apomixis: a developmental perspective. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, p. 547-574, 2003.
- LOZADA-GOBILARD, S. *et al.* Genetic Diversity and Connectivity in Plant Species Differing in Clonality and Dispersal Mechanisms in Wetland Island Habitats. **Journal of Heredity**, v. 112, n. 1, p. 108–121, 1 jan. 2021.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.
- NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 5, p. 1143–1155, 6 abr. 2004.

- NYGREN A. **Apomixia nas angiospermas**. II. The Botanical Review. 1954 Dez;20(10):577-649.
- OLIVEIRA, G. C. *et al.* Caracterização de plantas de *Eugenia klotzschiana* Berg (Pêra-do-Cerrado) e do ambiente de sua ocorrência na região fisiográfica dos campos das vertentes em Minas Gerais. **R Un Alfenas**, v. 5, p. 9-13, 1999.
- PEAKALL, R. E. & SMOUSE P. E. **GenAlEx 6.5: análise genética no Excel. Software de genética populacional para ensino e pesquisa - uma atualização**. *Bioinformática* (2012) 28, 2537-2539. Disponível em: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>
- PEAKALL, R. E. & SMOUSE P. E. **GENALEX 6: análise genética em Excel. Software de genética populacional para ensino e pesquisa**. *Molecular Ecology Notes* (2006), 6, 288-295.
- PETTAY, D. T. *et al.* Genotypic diversity and spatial-temporal distribution of *Symbiodinium* clones in an abundant reef coral. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 24, p. 5197–5212, 14 nov. 2011.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2023. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acesso em: 2024.
- RICONO, A. *et al.* Fine-scale spatial structuring of genotypes and phenotypes in natural populations of *Asclepias syriaca*. **Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics**, v. 45, p. 125546–125546, 2 jun. 2020.
- SILVERTOWN, J. The Evolutionary Maintenance of Sexual Reproduction: Evidence from the Ecological Distribution of Asexual Reproduction in Clonal Plants. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 1, p. 157–168, 1 jan. 2008.
- SIQUEIRA, M. N. **Transferibilidade e variabilidade genética de marcadores microssatélitesgênicos em *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae)**. Universidade Federal De Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular. [s.l.] Universidade Federal De Goiás - UFG, 2014.
- SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **University of Kansas Science Bulletin**, v. 38, p. 1409-1438, 1958.
- SOUZA-PÉREZ, M.; SPERONI, G. New apomictic pathway in Myrtaceae inferred from *Psidium cattleianum* female gametophyte ontogeny. **Flora**, v. 234, p. 34–40, 24 jun. 2017.
- NICCOLÒ T.; ANDERSON, A. W.; EMIDIO A. Apomixis: oh, what a tangled web we have! **Planta**, v. 257, n. 5, 31 mar. 2023.
- TIBIHIKA, P. D. *et al.* Application of microsatellite genotyping by sequencing (SSR-GBS) to measure genetic diversity of the East African *Oreochromis niloticus*. **Conservation Genetics**, v. 20, n. 2, p. 357–372, 2019.
- TINSCHERT, E. *et al.* Alternate reproductive strategies of *Populus nigra* influence diversity, structure and successional processes within riparian woodlands along the Allier River, France. **Journal of Hydro-environment Research**, v. 30, p. 100–108, 26 mar. 2020.

TRAUB, H. Polyembryony in *Myrciaria cauliflora*. **Botanical Gazette**, v. 101, n. 1, p. 233-234, 1939.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. *et al.* **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. cap. 6, p. 94-113. ISBN 978-85-89265-26-3

VIEIRA, R. F. *et al.* **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o futuro - Região centro-oeste**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade, 2018. cap. 5, p. 101-227. ISBN 9788577383092.

WEINBERG, W. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. **Jahreshefte des Vereins für Vaterländische Naturkunde in Württemberg**, v. 64, p. 368-382, 1908.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations**. Volume 2: Theory of Gene Frequencies. University of Chicago Press, 1969.