

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Ariane Rolins de Santana

**TRANSFERIBILIDADE E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA**  
**MULTIPLEX DE GENOTIPAGEM DE MARCADORES**  
**MICROSSATÉLITES PARA *Pterodon emarginatus* Vogel (FABACEAE)**

Orientador (a): Dr<sup>a</sup> Thannya Nascimento Soares

GOIÂNIA - GO  
ABRIL - 2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Ariane Rolins de Santana

**TRANSFERIBILIDADE E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA**  
**MULTIPLEX DE GENOTIPAGEM DE MARCADORES**  
**MICROSSATÉLITES PARA *Pterodon emarginatus* Vogel (FABACEAE)**

Orientador (a): Dr<sup>a</sup> Thannya Nascimento Soares

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Rosana Pereira Vianello

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Goiás, como exigência parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

GOIÂNIA - GO

ABRIL - 2014

ARIANE ROLINS DE SANTANA

**TRANSFERIBILIDADE E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA  
MULTIPLEX DE GENOTIPAGEM DE MARCADORES  
MICROSSATÉLITES PARA *Pterodon emarginatus* Vogel (FABACEAE)**

Orientadora: Dra. Thannya Nascimento Soares

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Goiás, como exigência parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 10 de Abril de 2014

Dr<sup>a</sup> Flávia Melo Rodrigues

Dr<sup>a</sup> Daniela de Melo e Silva

Dr<sup>a</sup> Thannya Nascimento Soares  
(Orientadora)

*“Não há monotonia no coração daquele que se dispôs a viver a vida aprendendo... Ó Deus todo poderoso, derrame sobre o nosso coração o dom de aprender...”*

Padre Fábio de Melo

*A Deus, a minha família e a todos.*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus, pois sem Ele eu nada seria. Infinitos agradecimentos aos meus pais Ana Benedita de Santana Rolins e Arias Rolins da Silva, pelo amor incondicional, educação, juntamente com os meus irmãos Douglas Rolins de Santana e Leandro Rolins de Santana, pela confiança, incentivo, apoio e amor. Agradeço ao Frederico Veiga Vale, melhor amigo e amor da minha vida, que sempre esteve ao meu lado, sempre paciente, carinhoso, divertido e me apoiando. Amo-os sem medidas.

Agradeço à minha orientadora professora Thannya Nascimento Soares, pela disposição em me orientar, dedicação, pelo enorme aprendizado, conselhos, compreensão e correções. À professora Mariana Pires de Campos Telles por contribuir na orientação desse trabalho, e também pelo enorme aprendizado. À professora Rosana Pereira Vianello por ter cedido os *primers* para que este trabalho pudesse ser realizado e pelos conhecimentos e correções. Agradeço ao professor Lázaro José Chaves e à Fernanda Fraga Rosa pela imensa ajuda na coleta das folhas de sucupira pelo cerrado e pela maravilhosa companhia.

Agradeço a todos os alunos do Laboratório de Genética e Biodiversidade. A todas as técnicas, Ramila Braga, Thaís Castro, Ludymila Guedes, Daniela Anjos, Fernanda Fraga e em especial à Sara Giselly Gondim pelos conhecimentos, amizade, pela enorme ajuda para comigo e para com todos os alunos. Aos laços de amizade Kássia Marques, Rejane Araújo, Mariana Siqueira, Vanessa Bernardes, Tatianne Pizza, Warita Alves e em especial a Elen Miranda por todos os momentos que passamos juntas, pelos estudos, compartilhamento de ideias, ajuda e pelos momentos divertidos e de descontrações. Obrigada de todo o meu coração.

Agradeço conjuntamente às três professoras Thannya Nascimento Soares, Mariana Pires de Campos Telles e Rosane Garcia Collevatti por me permitirem conduzir este trabalho no Laboratório de Genética e Biodiversidade, a todos os professores do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular e a Universidade Federal de Goiás pela minha formação de mestre. Com o mestrado aprendi a trabalhar em equipe, a ter postura profissional, e foi muito importante para o meu amadurecimento tanto profissional quanto pessoal, além de expandir os meus conhecimentos. Agradeço a Capes pela concessão da bolsa de mestrado e ao projeto maior no qual este estudo faz parte, GENPAC 02 (CNPq/FAPEG CNPq/FAPEG/PRO-CENTRO-OESTE nº31/201 - 563839/2010-4 e 201110267000125). Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
2.1 Microssatélites.....	12
2.1.1 Desenvolvimento e transferibilidade de marcadores microssatélites.....	17
2.1.2 Desenvolvimento de sistemas multiplex de genotipagem de microssatélites.....	20
2.2 A espécie <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (sucupira).....	21
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
4.1 Coleta do material biológico e obtenção do DNA.....	26
4.2 Amplificação cruzada e seleção de locos microssatélites polimórficos.....	28
4.2.1 Desenvolvimento do sistema multiplex de genotipagem de microssatélites.....	29
4.3 Caracterização dos locos microssatélites transferidos para <i>Pterodon emarginatus</i> .....	30
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
5.1 Amplificação cruzada e avaliação do polimorfismo dos locos.....	33
5.1.1 Sistema multiplex de genotipagem para <i>Pterodon emarginatus</i> .....	36
5.2 Caracterização dos locos microssatélites transferidos para <i>Pterodon emarginatus</i> .....	39
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>APÊNDICES</b> .....	57
<b>Apêndice 1:</b> Padronização do mix de PCR para os 9 locos microssatélites transferidos para <i>Pterodon emarginatus</i> .....	57
<b>Apêndice 2:</b> Genótipos obtidos pelos 9 locos microssatélites transferidos para <i>Pterodon emarginatus</i> .....	58

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Deslizamento da DNA Polimerase (*slippage*) durante a replicação do DNA. *Slippage* no fragmento síntese ocasionam o aumento deste. *Slippage* na fita molde ocasionam a diminuição do fragmento sintetizado..... 14
- Figura 2.** (A) Esquema do ciclo de vida do microsatélite; (B - D) Variações ao longo do tempo; (B) Comprimento médio do alelo; (C) Ocorrência relativa de expansão da repetição e eventos de contração; (D) Pureza de repetição (proporção de repetições perfeitas); (E) Dados sobrepostos em uma filogenia que permitem a observação direta de um ciclo de vida local., (CSS: Sequências simples crípticas)..... 15
- Figura 3.** *Pterodon emarginatus* Vogel com frutos na população de Pirenópolis (GO) .... 23
- Figura 4.** *Pterodon emarginatus* Vogel com flores na população de Pirenópolis (GO)..... 23
- Figura 5.** Mapa do Brasil mostrando as áreas de Cerrado em cinza e mapa de Goiás e Distrito Federal indicando os pontos de coleta das três populações de *Pterodon emarginatus*. ..... 27
- Figura 6.** Resumo dos resultados parciais e final da transferibilidade de marcadores microsatélites de *Phaseolus vulgaris*, provenientes de bibliotecas de EST e genômica, e número de locos polimórficos em *Pterodon emarginatus*. ..... 33
- Figura 7.** Perfis de amplificação dos locos ESTs polimórficos em *Pterodon emarginatus* obtidos pelos iniciades PVESTBR90, PVESTBR67, PVESTBR247, PVEST268 e PVESTBR199, e perfis de amplificação dos locos genômicos obtidos pelos iniciadores PVCOMP17 e PVHEXA4, visualizados em gel de poliacrilamida 6%..... 34
- Figura 8.** Perfis dos eletroferogramas apresentados pelos 9 locos polimórficos transferidos para *Pterodon emarginatus* organizados em multiplex. Eixo vertical indica o nível de absorbância da fluorescência e o eixo horizontal os nomes dos alelos. .... 37
- Figura 9.** Frequências alélicas para nove locos microsatélites avaliados em três populações de *Pterodon emarginatus*..... 44

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Número de indivíduos da espécie *Pterodon emarginatus* amostrados por localidade e coordenadas geográficas (latitude e longitude) referentes aos locais de coleta e data da coleta ..... 26
- Tabela 2:** Sistemas multiplex de genotipagem de marcadores microssatélites para *Pterodon emarginatus*. Estão descritos o nome do par de *primers*, a sequência dos *primers*, com o respectivo tipo de marcação fluorescente no *primer forward* (F), o motivo da repetição (detectado em *Phaselus vulgaris*), (VAA) variação da amplitude alélica; (Ta) temperatura de anelamento ajustada e quantidade do produto da reação de amplificação de cada *primer* colocada no sistema multiplex ..... 38
- Tabela 3:** Caracterização dos locos para três populações naturais de *Pterodon emarginatus* avaliadas com nove locos microssatélites. Em que, *n*: número de indivíduos amostrados;  $N_A$ : número de alelos por loco;  $H_{máx}$ : heterozigosidade máxima;  $H_e$ : heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg;  $H_o$ : heterozigosidade observada; *f*: índice de fixação intrapopulacional; *Q*: probabilidade de exclusão de paternidade; *PI*: probabilidade de identidade..... 39
- Tabela 4:** Caracterização genética dos 9 locos microssatélites em 3 populações de *Pterodon emarginatus*, sendo *n*: número de indivíduos amostrados;  $N_A$ : número de alelos por loco;  $A_p$ : número de alelos privados;  $H_e$ : heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg;  $H_{máx}$ : heterozigosidade máxima;  $H_o$ : heterozigosidade observada; *f* : índice de fixação intrapopulacional; PEMAGEDF: Estação Ecológica de Águas Emendadas, Planaltina-DF; PEMPOTGO: Portelândia-GO; PEMPIRGO: Pirenópolis-GO..... 43

## RESUMO

SANTANA A. R. **TRANSFERIBILIDADE E DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MULTIPLEX DE GENOTIPAGEM DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *Pterodon emarginatus* Vogel (FABACEAE)**. 2014. 61 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Os marcadores microssatélites são amplamente utilizados para acessar a variabilidade genética em populações naturais. Estes marcadores podem ser desenvolvidos a partir de bibliotecas derivadas de Sequências Expressas Transcritas (ESTs) ou genômicas. Uma alternativa possível e econômica para a obtenção destes marcadores para espécies que ainda não os possuem, é a transferibilidade a partir de *primers* desenhados para espécies evolutivamente próximas. A espécie *Pterodon emarginatus* Vogel (sucupira) pertence à família Fabaceae e apresenta grande potencial de uso medicinal e madeireiro, o que faz dela alvo da exploração extrativista. Assim, estudos que contribuam com o seu melhor uso e conservação são necessários, dentre eles os genético-populacionais. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de amplificação cruzada de *primers* desenvolvidos para a espécie *Phaseolus vulgaris* para *P. emarginatus* e analisar o polimorfismo dos locos transferidos a partir de sistema multiplex de genotipagem em três populações desta espécie. Para tanto, foram avaliados 539 *primers* desenvolvidos para *Phaseolus vulgaris*, sendo 345 derivados de bibliotecas de ESTs e 194 genômicos. Os testes de amplificação foram realizados utilizando três indivíduos, enquanto a avaliação inicial do polimorfismo com oito. Por fim, os parâmetros genéticos de diversidade foram estimados utilizando 88 plantas, provenientes de três populações naturais de *P. emarginatus*. Os *primers* que apresentaram produtos de amplificação visualizados em gel de agarose foram, posteriormente, avaliados em gel de acrilamida 6% corado com nitrato de prata. Os locos polimórficos foram sintetizados com fluorescência para a avaliação e genotipagem via eletroforese capilar, no analisador automático de DNA ABI3500. Os locos transferidos para *P. emarginatus* foram 23 (4%) sendo 7 polimórficos. Dos polimórficos, 6 apresentaram bons perfis de eletroferogramas. Estes 6 locos foram avaliados nas populações juntamente com três locos genômicos polimórficos previamente padronizados para sucupira, totalizando nove locos adequados para genotipagem. Foi possível o desenvolvimento de dois sistemas multiplex, um composto de 5 *primers* e outro por 4. O número de alelos por loco variou de dois a 13, com uma média de cinco alelos por loco. Os valores médios de  $H_e$  e  $H_o$  para o conjunto das populações foram de 0,563 e 0,463 respectivamente. O valor de  $f$  não foi significativo para o total das populações e igual a 0,144. Os valores de  $F_{ST}$  e  $F_{IT}$  foram significativos e iguais a 0,06 e 0,195 respectivamente. Os marcadores microssatélites transferidos e polimórficos para *P. emarginatus* apresentaram bom polimorfismo e podem ser utilizados em estudos genético-populacionais mais aprofundados com a espécie.

**Palavras-chave:** amplificação cruzada, Cerrado, sucupira, diversidade genética, SSRs.

## ABSTRACT

SANTANA A. R. **TRANSFERABILITY AND DEVELOPMENT OF MULTIPLEX SYSTEM OF GENOTYPING MICROSATELLITE MARKERS FOR *Pterodon emarginatus* VOGEL (FABACEAE)**. 2014. 61 f. Dissertation (Master in Genetics and Molecular Biology), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.

Microsatellite markers are widely used to assess the genetic variability in natural populations. These markers can be developed from derived Expressed sequence tag (ESTs) or genomic libraries. A feasible and economical alternative for obtaining of these markers for species that do not already have them is the transferability from *primers* designed for species evolutionarily close. The species *Pterodon emarginatus* Vogel (sucupira) belongs to the Fabaceae family and shows great potential for use timber and medicinal, which makes them a target of exploitation. Thus, studies that contribute to their use and conservation are needed, including the genetic population. Therefore, the aim of this study was to evaluate the potential for cross-amplification *primers* developed for the species *Phaseolus vulgaris* to *P. emarginatus* and to analyze the polymorphism of the loci transferred from multiplex genotyping in three populations of this species. For this, were evaluated 539 *primers* developed for *Phaseolus vulgaris*, with 345 derived from ESTs libraries and 194 genomics. Amplification tests were performed using three individuals, while the assessment initial of the polymorphism with eight. Finally, genetic diversity parameters were estimated using 88 plants from three natural populations of *P. emarginatus*. *Primers* that showed amplification products visualized on agarose gel were then evaluated in 6% acrylamide gel stained with silver nitrate. Polymorphic loci were synthesized with fluorescence for evaluation and genotyping by capillary electrophoresis in ABI3500 automatic DNA analyzer. The loci were transferred to *P. emarginatus* 23 (4 %) being 7 polymorphic. Polymorphic, 6 electropherograms profiles. These 6 loci were evaluated in populations along with three polymorphic genomic loci previously standardized sucupira, totaling nine loci suitable for genotyping. It was possible to develop two multiplex systems, a compound of 5 *primers* and another for 4. The number of alleles per locus ranged from two to 13, with an average of five alleles per loci. The mean values of  $H_e$  and  $H_o$  for both populations were 0,563 and 0,463 respectively. The value of  $f$  was not significant for the total population and equal to 0,144. The values  $F_{IT}$  and  $F_{ST}$  were significant and equal to 0,06 and 0,195 respectively. Microsatellite markers transferred and polymorphic for *P. emarginatus* showed polymorphism and can be used in studies genetic population more depth to the species.

**Keywords:** cross-amplification, Cerrado, sucupira, genetic diversity, SSRs.

## 1 INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares microssatélites são uma das ferramentas mais utilizadas para o conhecimento da variabilidade genética das espécies, por serem capazes de diferenciar e caracterizar geneticamente os indivíduos, mostrando-se eficientes nos estudos de genética de populações (Ribeiro et al., 2013; Collevatti et al., 2013; Soares et al., 2012; Telles et al., 2013).

Estes marcadores exibem um alto potencial de polimorfismo, apresentam-se seletivamente neutros e possuem um padrão de herança co-dominante, assim, podem apresentar um bom conteúdo informativo. Além disso, as sequências microssatélites são distribuídas de forma abundante e uniforme no genoma, o que é muito importante para acessar a variabilidade genética intra e interpopulacional (Ferreira & Grattapaglia, 1988; Powell, et al., 1996; Brondani et al., 2007).

Atualmente existem marcadores microssatélites desenvolvidos para algumas espécies nativas, como as do Cerrado, por exemplo (Telles et al., 2011; Menezes et al., 2012; Soares et al., 2012; Telles et al., 2013). A disponibilização destes marcadores para as espécies nativas é importante para que se possa avaliar a distribuição da diversidade genética das populações, e dessa forma, contribuir para estudos que visam o uso racional e sustentável destas espécies.

Para a adequação de marcadores microssatélites para uma dada espécie, além de poder realizar o desenvolvimento, também existe a possibilidade de transferibilidade destes marcadores a partir de uma espécie próxima filogeneticamente (mesmo gênero ou mesma família) (Barbará et al., 2007). Há relatos na literatura de diversos estudos que obtiveram sucesso na transferibilidade de marcadores microssatélites para plantas nativas (Zucchi et al., 2002; Ciamp et al., 2008; Garcia et al., 2011; Soares et al., 2013).

A espécie *Pterodon emarginatus* Vogel, popularmente conhecida como sucupira, é uma árvore nativa do Cerrado pertencente à família Fabaceae. As sementes de *P. emarginatus* são dispersas por anemocoria (Barroso et al., 1999), as flores são polinizadas por abelhas (Almeida et al., 2003) e possui um sistema misto de reprodução (Rocha, 2008).

Os frutos de *P. emarginatus* são popularmente comercializados e utilizados por possuírem propriedades farmacêuticas (Moraes et al., 2012; Alves et al., 2013) e sua madeira é empregada principalmente para obras, como construções pesadas por apresentar extrema dureza. Além disso, a árvore pode ser usada na arborização paisagística, e também

é uma espécie muito útil em reflorestamentos de áreas degradadas pela sua tolerância à luz solar e tolerância à baixa fertilidade do solo (Lorenzi, 2002).

Até o presente momento ainda não estão disponíveis marcadores microssatélites para *P. emarginatus*. Considerando que a espécie *Phaseolus vulgaris* pertence à mesma família de *P. emarginatus* e que possui um grande número de marcadores microssatélites disponíveis, testar o potencial de transferibilidade destes marcadores se torna uma boa opção para a adequação de marcadores microssatélites em *P. emarginatus* com o intuito de realizar estudos genéticos-populacionais com esta espécie.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Microssatélites

O DNA satélite foi descoberto em 1960, quando ao submeter o DNA a um gradiente de ultracentrifugação utilizando cloreto de cério, foram observadas a formação de uma banda principal e bandas com densidades de flutuação distintas compostas por DNAs com sequências altamente repetitivas, que foram denominados de DNAs satélites (100pb a 500pb) (Ellegren, 2004). Em 1985, Alec. J. Jeffreys e seus colaboradores encontraram regiões menores contendo sequências de DNA repetitivo, a qual chamou de minissatélites (VNTRs - Variable Number Tandem Repeat), que consistem de repetições de 10 a 100 pares de bases. Determinaram também que o número de repetições de um dado minissatélite diferia entre indivíduos, e isso o levou ao desenvolvimento posterior da técnica de DNA-fingerprinting. No fim dos anos 80 foram isoladas regiões compostas de repetições de 1 a 6 pares de bases e chamaram essas repetições de microssatélites (Microssatélites - *Simple Sequence Repeats*) (Ellegren, 2004).

Os microssatélites estão presentes no DNA de procariotos e, de forma bem mais abundante, em eucariotos (Marcotte et al., 1999). São conhecidos por diversos nomes como SSRs (*Simple Sequence Repeats*), STRs (*Short Tandem Repeats*), STMSs (*Sequence Tagged Microsatellite Site*) e SSLPs (*Simple Sequence Length Polymorphism*) (Caixeta et al., 2009).

Foram descritos por Litt & Luty (1989) e Tautz (1989), definidos como repetições de motivos em tandem, sendo que cada motivo é composto por uma variação de 1 a 6 nucleotídeos. Os motivos podem ser repetidos de 5 a 50 vezes, podendo repetir centenas de vezes em alguns casos (Chin et al., 1996; Ellegren, 2004). Os motivos compostos por um nucleotídeo são chamados de mononucleotídeos, como (G)<sub>n</sub>, onde n é o número de repetições. Os motivos compostos por dois nucleotídeos são denominados de dinucleotídeos, como (GA)<sub>n</sub>, seguido pelos trinucleotídeos (GAT)<sub>n</sub>, tetranucleotídeos (GATA)<sub>n</sub>, pentanucleotídeos (GATAC)<sub>n</sub> e hexanucleotídeos (GATACA)<sub>n</sub> (Tautz, 1989).

Os microssatélites também podem ser classificados como perfeitos, em que não há a presença de outras bases nas repetições (GAGAGAGAGAGA); imperfeitos, nos quais há outras bases que não sejam as dos motivos dentro das repetições (GAGATGAGAGA) e

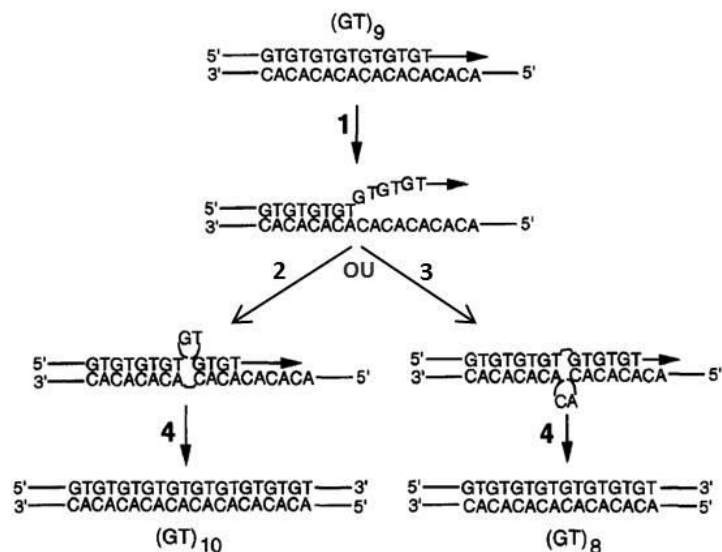
compostos, quando o microssatélite é composto por 2 tipos de motivos distintos (GAGAGATGTGTG) (Oliveira et al., 2006).

Os microssatélites estão presentes em regiões ESTs (Expressed Sequence Targed) e genômicas, porém com ocorrências em níveis diferentes. Em eucariotos, são mais abundantes em regiões genômicas, exceto para os trinucleotídeos e os hexanucleotídeos (Ellegren, 2004). Em plantas as repetições dinucleotídicas mais frequentes são (AT)<sub>n</sub>, seguidas de (GA)<sub>n</sub> e (AC)<sub>n</sub>. Entre as repetições trinucleotídicas, (AAT)<sub>n</sub> e (AAC)<sub>n</sub> são mais frequentes e entre as tetranucleotídicas são (AATT)<sub>n</sub> e (AAAT)<sub>n</sub> (Ciampi, 2007).

O que antes era considerado como DNA evolutivamente neutro, ou DNA “lixo” hoje se sabe que em humanos, os microssatélites apresentam diversas funções no organismo. As regiões microssatélites são importantes para a organização da cromatina; para a regulação de processos metabólicos como replicação, ciclo celular e recombinação e regulação da atividade gênica (tradução e transcrição) (Sawaya et al., 2013).

Dados revisados por Buschiazzo & Gemmell (2006) sugerem duas hipóteses para explicar o surgimento dos microssatélites. A primeira demonstra que os microssatélites originaram espontaneamente através da duplicação de poucas bases por substituições ou inserções formando inicialmente um proto-microssatélite (Messier et al., 1996). A outra hipótese sugere que sequências microssatélites são levadas por elementos transponíveis (Wilder et al., 2001).

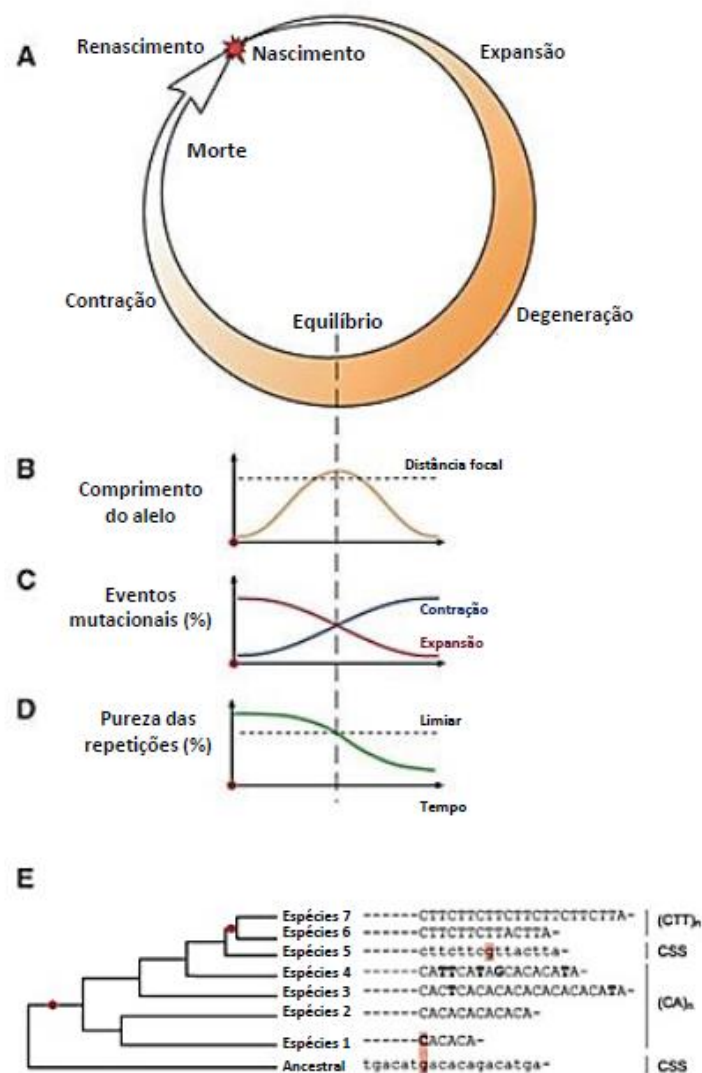
Uma vez que as duplicações em tandem são geradas, estas sequências curtas estão propensas ao deslizamento pela DNA polimerase (*slippage*) por erros do sistema de reparo durante a replicação (*Slipped Strand Mismatching e Mismatch repair – SSM*), causando a adição de bases duplicadas e a expansão do comprimento do seguimento repetitivo (Figura 1) (Wierdl et al., 1997). A partir daí, o microssatélite segue um ciclo de vida, no qual, após seu nascimento, ele cresce e expande. Conforme o surgimento das interrupções de bases nas repetições, devido a mutações, o microssatélites degenera e morre, com possibilidade de renascer (Figura 2) (Buschiazzo & Gemmell, 2006).



**Figura 1:** Deslizamento da DNA Polimerase (*slippage*) durante a replicação do DNA. *Slippage* no fragmento síntese ocasionam o aumento deste. *Slippage* na fita molde ocasionam a diminuição do fragmento sintetizado (Fonte: Wilder, et al., 1997).

O *slippage* é apontado como o principal mecanismo que leva à variabilidade e à alteração do comprimento nos microssatélites, através da diferença no número dos motivos de repetição, gerando o polimorfismo. Entende-se como polimorfismo, a observação de diferentes formas alélicas para um mesmo loco, sendo que os alelos devem ter frequência igual ou superior a 1%(REF). As taxas de mutações podem variar entre os locos e entre alelos de mesmo loco. O tamanho do alelo e o tipo do motivo possuem influência nas taxas de adição e exclusão de bases, onde alelos mais longos estão mais propensos a contração e exibem maiores níveis de polimorfismo, como também as repetições de mononucleotídeos e dinucleotídeos possuem maiores taxas de mutação, seguida de tri e tetra (Weber, 1990; Buschiazzo & Gemmell, 2006).

O tipo de reprodução, a taxa metabólica, o tempo de geração, tamanho do organismo e adaptação seletiva são alguns dos fatores mais evidentes que podem influenciar a dinâmica de mutação de microssatélites em nível de espécie (Buschiazzo & Gemmell, 2006). Estudos indicam que as sequências das regiões flangeadoras e a localização no cromossomo também influenciam na taxa de mutação dos microssatélites (Harr et al., 1998; Santibanez-Koref et al., 2001).



**Figura 2.** (A) Esquema do ciclo de vida do microssatélite; (B - D) Variações ao longo do tempo (B) Comprimento médio do alelo; (C) Ocorrência relativa de expansão da repetição e eventos de contração; (D) pureza de repetição (proporção de repetições perfeitas); (E) Dados sobrepostos em uma filogenia que permitem a observação direta de um ciclo de vida local (CSS: Sequências simples crípticas) (Fonte: adaptado de Buschiazzi & Gemell, 2006).

Além do *slippage*, outros dois mecanismos foram relatados para explicar as altas taxas de mutações nas regiões microssatélites. O primeiro está relacionado a elementos de transposição, onde sequências repetitivas dispersas no genoma, se autorreplicam e se reinserem em posições aleatórias no genoma (Nadir et al., 1996). O Segundo mecanismo está relacionado com a ocorrência de crossing-over desigual, neste mecanismo, através de erros no emparelhamento entre cromossomos homólogos causados pela grande quantidade

de repetições, fazem com que as cromátides sejam erradamente emparelhadas, o que causa alterações no número de repetições de microssatélites em cada cromossomo (Ellegren, 2004; Oliveira et al., 2006).

Para melhor compreender o comportamento mutacional dos microssatélites, três modelos foram inicialmente adotados. De acordo com o *Infinite Allele Model* (IAM), proposto por Kimura & Crow (1964), cada mutação gera um novo alelo a uma taxa de mutação  $\mu$ . O *K-Allele Model* (KAM), proposto por Crow & Kimura (1970), assume que existe um determinado número (K) de alelos possíveis na população e a mutação em cada um dos K-1 alelos ocorre com a probabilidade  $\mu/(K-1)$ . O modelo de mutação *Stepwise Mutation Model* (SMM) proposto por Kimura & Ohta (1978), considera que a mutação é responsável pelo aumento ou diminuição de uma única unidade de repetição ao alelo original, com igual e constante probabilidade  $\mu$ , assim os alelos de tamanho mais próximo seriam mais relacionados do que alelos distantes entre si (Hartl & Clark, 2010).

Posteriormente, foi proposto o modelo *Two Phase Model* (TPM) (Di Rienzo et al., 1994), o qual assume que uma porcentagem das mutações dos microssatélites ocorrem seguindo o SMM e outra menor o IAM. Estes modelos sugerem que a mutação nos microssatélites são devido a um único motivo no número de repetições, porém outras mutações podem ocorrer através da inserção ou deleção de mais de um motivo, o que é explicado pelo modelo *Generalized Stepwise Model* (GSM). Apesar dos vários modelos mutacionais para os microssatélites pressupostos, estudos apontam que o TPM e o GSM são os mais realistas (Ellegren, 2000; Schlotterer, 2000).

Os marcadores microssatélites são excelentes em discriminar os indivíduos e possuem uma ampla aplicação em diversas áreas, como no melhoramento genético para o mapeamento de características genéticas desejadas, estudos de associação e seleção assistida (Salazar et al., 2013; Du et al., 2013; Guo et al., 2013), na medicina e genética forense, sendo a ferramenta de ponta utilizada pelo FBI (Federal Bureau of Investigation) e como padrão internacional em genética e investigação forense (Butler, 2006; Hares, 2012); utilizada em estudos de diversidade genética, fluxo gênico e estrutura genética e permite também examinar os organismos em diferentes escalas espaciais e temporais (Collevatti et al., 2013; Last et al., 2013; Diniz-Filho et al., 2013).

A confiabilidade em usar os marcadores microssatélites é devida a diversas características. São codominantes, permitindo a distinção entre homozigotos e heterozigotos; são multialélicos com potencial alto de polimorfismo, exibindo várias

formas alélicas para um mesmo loco, o que possibilita a discriminação de indivíduos; são amplamente distribuídos pelo genoma; são amplificados via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), o que permite a amplificação com reduzidas quantidades de DNA; são altamente reprodutíveis, dessa forma, podem ser compartilhados entre laboratórios para a realização de diversos estudos. Além dessas características os marcadores microssatélites possuem potencial de transferibilidade, o que possibilita a amplificação em espécies relacionadas (Ferreira & Grattapaglia, 1988; Powell et al., 1996; Barbará et al., 2007).

### 2.1.1 Desenvolvimento e transferibilidade de marcadores microssatélites

As sequências de DNA que flanqueiam as regiões microssatélites são altamente conservadas, o que permite o desenvolvimento de *primers* específicos para a amplificação dos locos. A obtenção destes *primers*, ou marcadores microssatélites, para a espécie que se deseja estudar consiste primeiramente na identificação das sequências repetitivas, que pode ser por meio de bibliotecas genômicas clássicas, bibliotecas de cDNA (*DNA Complementar*), bibliotecas enriquecidas para sequências microssatélites e a partir de sequências depositadas em bancos de dados como o GenBank (Zane et al., 2002; Gao et al., 2003).

Entende-se por biblioteca genômica, uma coleção de clones que representam a totalidade do genoma de um organismo. E bibliotecas de cDNA, o conjunto de clones das sequências codificadoras que estão sendo expressas pela célula naquele momento, obtido através da clonagem de moléculas cópias de mRNA, este tipo de biblioteca é usado quando o intuito é gerar ESTs (*Expressed Sequence Tags*) (Zane et al., 2002).

O método de bibliotecas genômicas enriquecidas para microssatélites consiste na fragmentação do DNA com enzimas de restrição e cada fragmentado é ligado com adaptadores específicos. Os fragmentos são amplificados e purificados. O enriquecimento das regiões contendo os microssatélites é realizado através da hibridização dos fragmentos com uma sonda marcada com biotina. Esta proteína, por afinidade, se liga a estreptavidina contida em esferas paramagnéticas, assim os fragmentos são selecionados e submetidos à lavagem para a remoção do DNA ligado. O DNA é suspenso em um tampão e amplificado. Em seguida, é clonado em vetores como BACs, PACs, e YACs, extraído e sequenciado. A partir das sequências são identificadas as regiões microssatélites de interesse, com a utilização de programas de busca de regiões microssatélites como IMEx-Web.

Posteriormente é feito o desenvolvimento dos *primers* que flanqueiam essas regiões, por programas como o *Primer3* (Paetkau, 1999).

A biblioteca genômica clássica se diferencia da enriquecida por não haver a seleção prévia das regiões microssatélites com biotina e estreptavidina ou por hibridização em membrana de nylon, resultando no sequenciamento de regiões repetitivas e não repetitivas o que torna mais complexa a busca dos microssatélites. Esse método usa a técnica de “*shotgun*”, na qual o DNA é fragmentado em pequenos pedaços, pela quebra mecânica (por sonicação ou nebulização), estes fragmentos são selecionados pelo tamanho em gel de agarose, inseridos em vetores de clonagem. As bibliotecas de cDNA se diferenciam por usar o mRNA extraído, e posteriormente é convertido em DNA complementar com o uso da transcriptase reversa (Zane et al., 2002).

Quando já se tem as sequências do organismo de interesse depositadas em bancos de dados (GenBank), o desenvolvimento dos marcadores microssatélites tem menor custo, uma vez que as sequências já estão prontas. Contudo, para espécies nativas existem poucas ou nenhuma sequências disponíveis e apropriadas (Varshney et al., 2005).

Outra forma de disponibilizar estes marcadores para espécies que ainda não possuem, é utilizar marcadores que já estão disponíveis para espécies relacionadas filogeneticamente. Esse procedimento é chamado de transferibilidade. Em outras palavras pode-se definir como a amplificação de locos microssatélites desenvolvidos para uma espécie em outra espécie, seguida da avaliação do polimorfismo. Para espécies que já possuem uma grande quantidade de *primers* microssatélites disponíveis e já desenhados, a transferibilidade desses *primers* em espécies relacionadas, se torna uma alternativa ao desenvolvimento. Esse procedimento se baseia em vários testes de amplificação do DNA por PCR, alterando as temperaturas de anelamento dos *primers* e se preciso a concentração dos reagentes usados na amplificação, até a obtenção de amplificações satisfatórias.

Além de disponibilizar ferramentas moleculares para estudos genéticos-populacionais, a transferibilidade também pode ser usada para estudar padrões de evolução das regiões microssatélites em determinados gêneros ou famílias, por exemplo (Karaca et al., 2012).

Existem vários exemplos de transferibilidade de marcadores microssatélites para estudos de genética de populações de plantas nativas. Foi avaliada a transferibilidade de marcadores desenvolvidos para *Eucalyptus spp* (Eucalipto) em *Eugenia dysenterica* (cagaita) no trabalho de Zucchi et al., (2002), marcadores desenvolvidos para *Hymenaea*

*courbaril* (jatobá) amplificados em *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá-do-Cerrado) no trabalho de Ciamp et al., (2008). Marcadores microssatélites desenvolvidos para *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) foram testados em várias leguminosas (*Medicago sativa*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus coccineus*, *Phaseolus acutifolius*, *Vigna mungo*, *Vigna angularis*, *Vigna unguiculata*, *Glycine max*, *Arachis hypogaea*, *Dipteryx alata*) no estudo de Garcia et al., (2011). Foram transferidos marcadores de *Anacardium occidentale* (caju) em *A. humile* (cajuzinho-do-Cerrado) no trabalho de Cota et al., (2012) e Soares et al., (2013). Para a espécie *Pterodon emarginatus* (sucupira) foi testado a amplificação cruzada de *primers* microssatélites desenvolvidos para *Dipteryx alata* (baru) nos trabalhos de Batista et al. (2009) e de Soares et al. (2012).

O potencial de transferibilidade está relacionado com o grupo taxonômico e depende de vários fatores. O sucesso é maior em espécies que possuem longo tempo de geração, em espécies que são alógamas ou com sistema de reprodução misto, e quando o genoma da espécie alvo é menor que o da fonte. Quanto maior o grau de parentesco entre as duas espécies relacionadas, maior o percentual de marcadores transferidos (Barbará et al., 2007).

Maior sucesso de transferibilidade é verificado em aves, mamíferos e répteis. Em plantas é maior em dicotiledôneas do que em monocotiledôneas (Barbará et al., 2007). Em espécies de mesmo gênero em monocotiledôneas, o porcentual de transferibilidade é em média 40%, e em dicotiledôneas, 60%. Entre espécies de gêneros diferentes e mesma família, o porcentual de transferibilidade em monocotiledôneas é quase nulo e em dicotiledôneas é em média 10% (Barbará et al., 2007).

O potencial de transferibilidade também é maior quando são testados marcadores de regiões gênicas ou ESTs, pois são localizadas em regiões expressas (éxons) e por sua vez, possuem um alto grau de conservação evolutiva, portanto estas regiões apresentem menos polimorfismos que em regiões genômicas (Barbará, et al., 2007).

A transferibilidade de marcadores microssatélites entre espécies próximas evolutivamente favorece a obtenção rápida dessa ferramenta e permite o acesso à diversidade da espécie que se deseja estudar o que pode auxiliar no estabelecimento de estratégias eficientes para a sua conservação. Contudo, para isso é preciso que marcadores microssatélites pertencentes à espécie próxima filogeneticamente estejam disponíveis e se possível desenhados, pois assim se torna uma alternativa econômica e rápida para disponibilizar marcadores para a espécie desejada.

### 2.1.2 Desenvolvimento de sistemas multiplex de genotipagem de microssatélites

Tradicionalmente a genotipagem de marcadores microssatélites é realizada pela análise da eletroforese em géis de agarose e poliacrilamida. Com os avanços da automação e dos reagentes para análise molecular, a genotipagem evoluiu para a eletroforese capilar de forma semi-automatizada. Este tipo de genotipagem nos últimos anos tem sido acessível pela diminuição dos custos dos equipamentos analisadores automáticos de DNA (Brondani et al., 2007; Guichoux et al., 2011).

Visando a rapidez e a redução no número de análises, têm sido desenvolvidos sistemas de genotipagem multiloco ou multiplex (Guichoux et al., 2011). Este sistema se baseia na detecção simultânea de vários locos em uma mesma corrida de eletroforese. Os locos podem ser amplificados em uma única reação de PCR, ou podem ser amplificados separadamente para serem carregados em um mesmo gel. Tradicionalmente, a genotipagem via sistema multiplex é realizada em gel de acrilamida por colorimetria com nitrato de prata e têm evoluído para a forma semi-automatizada por eletroforese capilar (Brondani et al., 2007).

Na genotipagem automatizada, um dos pares de *primers* que amplificam o microssatélite é marcado com fluoróforo no terminal 5' e a detecção é feita por meio da excitação dos fluoróforos por um feixe de raios de laser e imediata captura de sinais gerados em um aparelho analisador automático de DNA. O grande interesse dessa tecnologia se deve a inúmeras vantagens: reduz o tempo para genotipar um grande número de indivíduos; produz dados mais precisos por meio da adição de um marcador interno junto a cada amostra a ser genotipada, como também permite a separação de amplicons similares com alto grau de resolução; aquisição e armazenamento de dados computadorizados reduzindo a manipulação manual da informação; possibilidade de exportação direta dos dados para programas de análise genética e compartilhamento do sistema para outros laboratórios, permitindo a padronização dos locos do genoma amostrado e a comparação dos resultados (Brondani et al., 2007).

Os locos combinados em um mesmo sistema multiplex de genotipagem semi-automatizada devem obedecer aos seguintes critérios, quando amplificados separadamente e carregados em um mesmo gel: não devem apresentar amplificações inespecíficas; os locos que amplifiquem fragmentos com a mesma faixa de tamanho devem ser marcados com diferentes fluoróforos e os locos marcados com o mesmo fluoróforo devem amplificar

produtos de PCR com faixas de tamanhos que diferem de no mínimo 20 pares de bases. Estas estratégias minimizam a possibilidade de ocorrer sobreposição dos alelos, como também aumenta o potencial de multiplexação minimizando os gastos com reagentes e o tempo necessário para o preparo das reações (Guichoux et al., 2011).

## 2.2 A espécie *Pterodon emarginatus* Vogel (sucupira)

A família Fabaceae ou Leguminosae é a terceira maior família das angiospermas com 727 gêneros e 19.325 espécies, dividida em 3 subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (Papilionoideae). A variação no nome é devido à coexistência atual de mais de um sistema de classificação (Souza, 2008). Compreende espécies de grande importância ou potencial econômico, como exemplo, na produção de alimentos como a soja (*Glycine max*) e o feijão (*Phaseolus vulgaris*); madeireiro como o jatobá (*Hymenaea spp*) e angelim (*Hymenolobium spp*); ornamental como o flamboyant (*Delonix regia*) e *Calliandra tweedii* (caliandra) e potencial farmacêutico como *Styphnodendron adstringens* Mart. (barbatimão), *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. (angico-do-Cerrado) e a sucupira (*Pterodon emarginatus*) (Lorenzi, 2008). É a terceira maior família das angiospermas, em riqueza de espécies, superada pelas famílias Orchidaceae (orquídeas) e Asteraceae (margaridas, girassóis) e considerada a segunda maior família botânica em importância econômica, ficando atrás da Poaceae (Bruneau et al., 2000; Wojciechowski et al., 2004).

O gênero *Pterodon* Vog. (família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Dipteryxae) compreende seis espécies: *Pterodon apparicioi* Pedersoli, *P. macrophyllus* Klotzsch, *P. abruptus* (Moric.) Benth., *P. pubescens* (Benth.) Benth., *P. polygalaeiflorus* (Benth.) Benth. e *P. emarginatus* Vog. (International Plant Names Index, 2005).

A espécie *P. emarginatus*, conhecida popularmente como sucupira, foi descrita por Vogel em 1837. Sua descrição foi baseada em um material coletado próximo ao Rio das Velhas em Minas Gerais e sugeriu que a espécie seja arbórea; folhas com sete folíolos, glabros, ovato-oblongos, com ápice emarginado, não mencionando a cor da flor (Rocha, 2006).

No livro “Legumes da Bahia” publicado por Lewis em 1987, apresentou *P. pubescens* e *P. polygalaeiflorus* como sinônimos de *P. emarginatus*. Após esta publicação, apesar de não se tratar de uma revisão do gênero, houve uma confusão em relação a como

os autores vêm se referindo a esses nomes em suas publicações. Ora se referem como três táxons distintos, ora como dois, ora como somente um (Rocha, 2006).

Lewis (1987) descreveu a espécie *P. emarginatus* como dimórfica com dois tipos de populações. Uma com indivíduos de flores que variam do rosa claro (quase branco) ao rosa escuro, folhas pubescentes e ápice dos folíolos levemente retos, e, outras populações com indivíduos de flores roxas/violetas, folhas glabras e ápice dos folíolos fortemente emarginado.

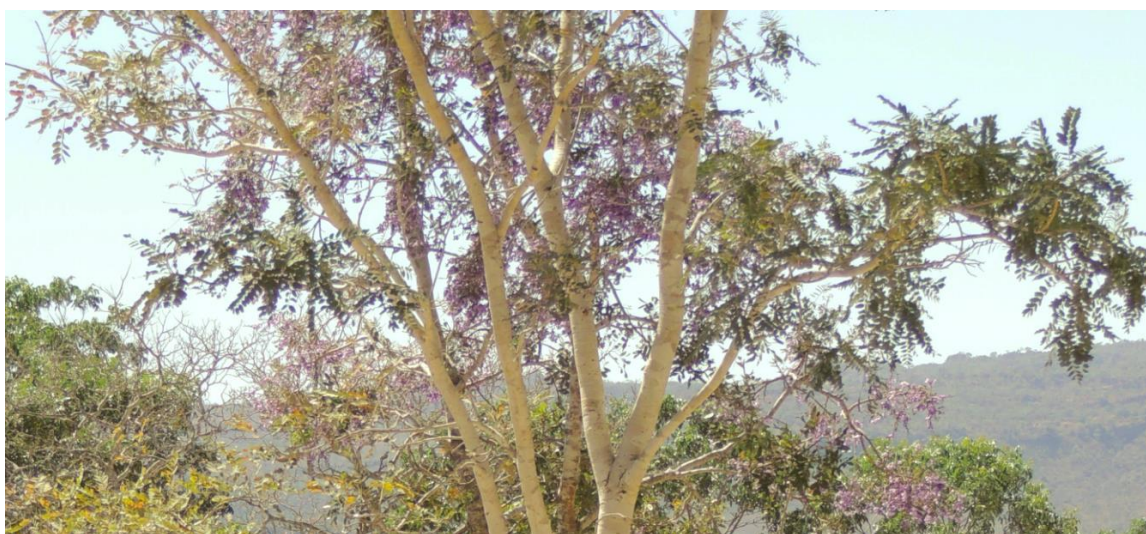
De acordo com Lorenzi & Matos (2002) e Carvalho (2004), *P. emarginatus* seria sinônimo de *P. pubescens*. No entanto, de acordo com a Lista de Espécies da Flora do Brasil, *P. emarginatus* é considerada sinônimo de *P. polygalaeiflorus* (Benth).

Assim, Rocha (2006) realizou um de dados morfológicos e moleculares utilizando marcadores RAPD com o intuito de procurar a real sinonímia de *P. emarginatus*. Concluiu que *P. polygalaeiflorus* (Benth) Benth. é sinônimo de *P. emarginatus* Vog. e corresponde a morfo roxa. Diante disso, *P. pubescens* deve ser mantida como espécie distinta correspondendo à morfo rósea, o que contrasta com a classificação de Lorenzi (2002), onde a classificação morfológica descrita correspondente a *P. polygalaeiflorus* (Benth.) deveria ser a mesma de *P. emarginatus*, e a classificação correspondente a *P. emarginatus* deveria ser de *P. pubescens*.

Assim, considerando Rocha (2006), *P. emarginatus* pode ser classificada como uma árvore que atinge de 8 a 18 m de altura com 40 a 60 cm de diâmetro, tronco revestido por casca lisa branco-amarelada, folhas compostas pinadas de 12-18 cm com folíolos alternos e opostos, flores de cor violeta que florescem durante os meses de agosto a outubro; fruto tipo legume drupáceo e lenhoso de 6,5 a 7,5 cm de comprimento, o qual amadurece a partir de julho (Figuras 3 e 4). A área de ocorrência é no Cerrado e na transição para floresta semidecídua, heliófita, seletiva xerófita com distribuição nos estados de Goiás, Distrito Federal, Tocantins, Piauí, Bahia e região noroeste de Minas Gerais.



**Figura 3:** *Pterodon emarginatus* Vogel com frutos na população de Pirenópolis (GO)  
(Foto: Ariane Rolins de Santana, Julho de 2013).



**Figura 4:** *Pterodon emarginatus* Vogel com flores na população de Pirenópolis (GO)  
(Foto: Ariane Rolins de Santana, Julho de 2013).

As sementes de *P. emarginatus* são dispersas por anemocoria (Barroso et al., 1999) e suas flores são polinizadas por abelhas (Almeida et al., 2003). As flores são morfologicamente hermafroditas, porém nem todas são funcionalmente hermafroditas, pois de acordo com o observado por Rocha (2006) as flores com estames curtos e estigma muito acima ou abaixo das anteras quase não produzem pólen fértil e seriam mais femininas do que masculinas, e as flores que apresentam estames longos e curvos seriam as

responsáveis pela formação de pólen fértil e portanto, ou hermafroditas ou masculinas. Dessa forma foi sugerido que *P. emarginatus* é uma planta com sistema misto de reprodução. A análise citogenética realizada por Dutra et al. (2012) confirmou com o número de cromossomos de *P. emarginatus*,  $2n = 16$ .

A planta possui um grande potencial econômico no ramo farmacêutico e madeireiro. Os seus frutos são popularmente comercializados e utilizados por possuírem propriedades antirreumáticas, analgésicas, anti-inflamatórias e antimicrobianas, sendo que diversos estudos químicos e farmacológicos vem sendo realizados, corroborando seus vários efeitos farmacológicos (Coelho et al., 2005; Santos et al., 2010; Galceran et al. 2011; Moraes et al., 2012; Alves et al., 2013). Um estudo realizado por Hansen et al., (2012) revelou também atividade antitumoral de extratos isolados de *P. emarginatus*.

Devido à madeira apresentar extrema dureza ela é empregada principalmente para obras, como construções pesadas, pontes, vigas, carroçarias, postes etc. A árvore também possui características ornamentais para ser usada na arborização paisagística, e também é uma espécie muito útil em reflorestamentos de áreas degradadas pela sua tolerância à luz solar e tolerância a baixa fertilidade do solo (Lorenzi, 2002).

Como *P. emarginatus* é uma planta com um bom potencial de utilização, isso faz dela alvo da exploração extrativista. Assim, estudos que contribuam com o seu melhor uso e conservação são necessários, dentre eles os genético-populacionais. Para isso é preciso que ferramentas moleculares estejam disponíveis para esta espécie. Devido a espécie *Phaseolus vulgaris* pertencer a mesma família de *P. emarginatus*, e por possuir um grande número de marcadores microssatélites disponíveis e desenhados (Garcia et al., 2011), a transferibilidade destes marcadores se torna uma boa opção para disponibilizar marcadores microssatélites para *P. emarginatus*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Transferir marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie *Phaseolus vulgaris* para *Pterodon emarginatus* com o intuito de disponibilizar um painel de marcadores polimórficos para esta espécie.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial de amplificação cruzada dos *primers* desenvolvidos para *Phaseolus vulgaris* em *P. emarginatus*;
- Avaliar o polimorfismo dos locos transferidos;
- Desenvolver sistemas multiplex para genotipagem dos marcadores microssatélites transferidos em analisador automático de DNA;
- Avaliar a variabilidade genética de três populações de *P. emarginatus* naturais do Cerrado, utilizando os locos polimórficos transferidos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta do material biológico e obtenção do DNA

Para realizar os testes iniciais de amplificação cruzada dos marcadores microssatélites foram coletadas folhas de três árvores de *Pterodon emarginatus* localizadas próximas ao Campus II, da Universidade Federal de Goiás em Goiânia. Posteriormente, a amostragem foi ampliada para 88 indivíduos de *P. emarginatus*, divididos em três populações naturais, sendo 23 indivíduos de uma população da Estação Ecológica de Águas Emendadas na cidade de Planaltina (DF), 29 localizados próximos à cidade de Portelândia (GO) e 36 próximos a cidade de Pirenópolis (GO), conforme apresentado na tabela 1. Os pontos de coleta estão representados no mapa na figura 5.

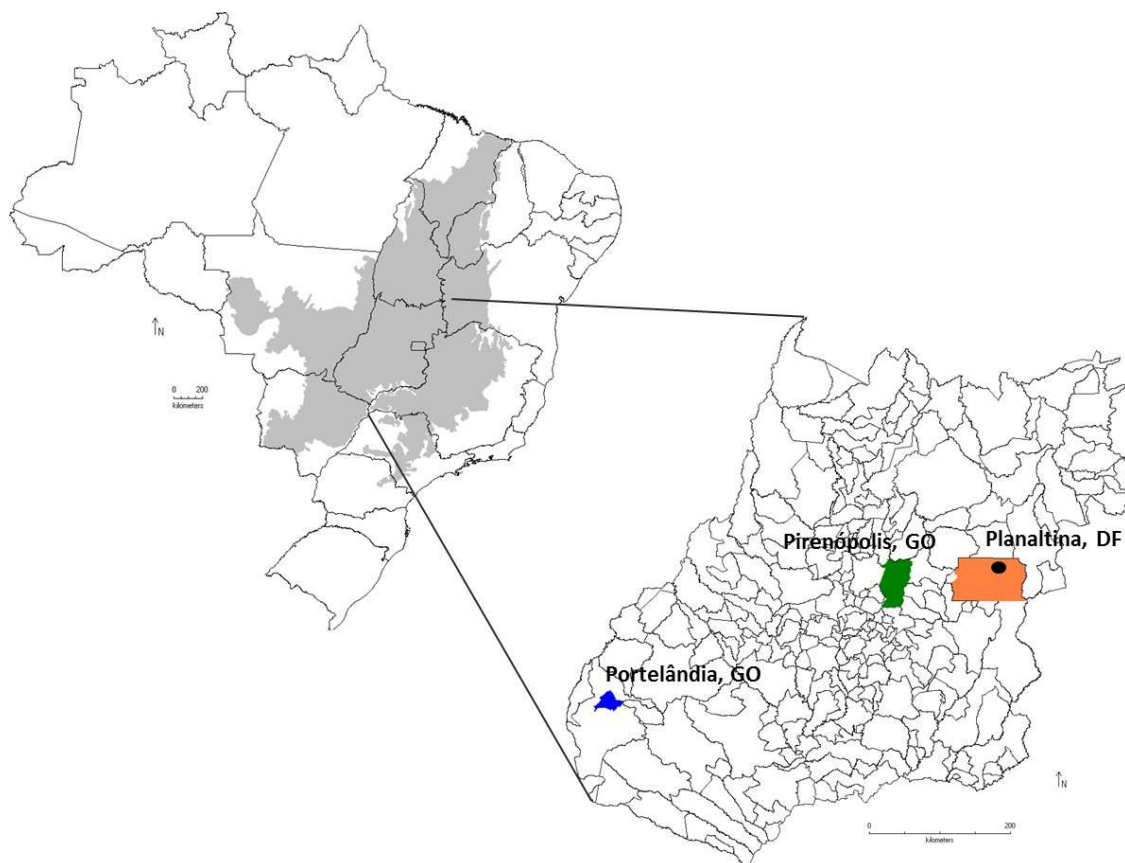
**Tabela 1:** Número de indivíduos da espécie *Pterodon emarginatus* amostrados por localidade, coordenadas geográficas (latitude e longitude) referentes aos locais de coleta e data da coleta.

Localidade	Código	Número de Indivíduos	Latitude	Longitude	Data da coleta
Estação Ecológica de Águas Emendadas (DF)	PEMAGEDF	23	S 15° 35' 04,7"	W 47° 39' 59,7"	12/09/2009
Portelândia (GO)	PEMPOTGO	29	S 17° 21' 8,4"	W 52° 36' 34,5"	16/10/2012
Pirenópolis (GO)	PEMPIRGO	36	S 15° 44' 53,4"	W 48° 57' 19,02"	31/07/2013
Total	-	88	-	-	-

As áreas de coleta das três populações foram em bioma de Cerrado, sendo que a Estação Ecológica de Águas Emendadas é uma unidade de conservação que vem sendo objeto de várias pesquisas científicas resultando num rico acervo de conhecimento sobre o Cerrado brasileiro na região do Distrito Federal.

As folhas foram encaminhadas ao Laboratório de Genética & Biodiversidade da Universidade Federal de Goiás (LGBio/UFG) para armazenamento, extração do DNA genômico e realização das análises. Para a extração do DNA genômico a partir do tecido foliar foi utilizado o protocolo CTAB 2% (Cátion de Brometo de Hexadecil Trimetil Amônia) descrito em Ferreira & Grattapaglia (1998). Nesse protocolo a extração passa por cinco etapas principais. Primeiro, o tecido é submetido à maceração mecânica para romper as paredes e membranas celulares. Segundo, o tecido macerado é ressuspensionado na solução de CTAB 2%, um tampão detergente e antioxidante que visa a solubilização de membranas

lipoprotéicas, desnaturação de proteínas e proteção do DNA da ação de enzimas de degradação. Terceiro, a suspensão é submetida à extração com clorofórmio-álcool-isoamílico, resultando numa fase orgânica inferior, e numa fase aquosa superior, onde são retidos o DNA, RNA e alguns polissacarídeos. Na quarta etapa, o DNA é precipitado com isopropanol. Na quinta, utiliza-se um tampão Tris-EDTA contendo RNase para degradar o RNA, restando apenas o DNA genômico.



**Figura 5:** Mapa do Brasil mostrando as áreas de Cerrado em cinza e mapa de Goiás e Distrito Federal indicando os pontos de coleta das três populações de *Pterodon emarginatus* (Fonte: Software DIVA-GIS, 2014).

Visando avaliar a integridade e a concentração do DNA, foi realizada a eletroforese horizontal de 5  $\mu\text{L}$  da solução de DNA de cada amostra com 4  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento em gel de agarose 1% corado com Brometo de Etídeo e imerso em tampão TBE 1X (0,89M Tris, 0,89M ácido bórico; 0,02M EDTA, pH8,0). Os padrões de massa molecular da eletroforese foram  $\lambda$  10ng/  $\mu\text{L}$ , 50ng/  $\mu\text{L}$  e 100ng/  $\mu\text{L}$ . Foi utilizado o fotodocumentador LPIX da Loccus Biotecnologia® para capturar a imagem do gel. Para a

quantificação foi realizada a comparação visual do DNA com os padrões de massa molecular. O DNA foi diluído a uma concentração de 2,5ng/  $\mu$ L que é considerada adequada para a amplificação de regiões microssatélites.

#### 4.2 Amplificação cruzada e seleção de locos microssatélites polimórficos

Foram utilizados 539 *primers* microssatélites desenvolvidos para *Phaseolus vulgaris*, sendo 345 gênicos (derivados de bibliotecas de ESTs) e 194 genômicas para testar a amplificação no DNA de *Pterodon emarginatus*. Estes *primers* foram cedidos por pesquisadores da Embrapa Arroz e Feijão (GO) para a realização do trabalho. Os *primers* gênicos (provenientes de regiões ESTs – *Expressed Sequence Tags*) foram desenvolvidos e publicados por Garcia et al., (2011) e os *primers* genômicos foram desenvolvidos por Muller et al., (2013).

As reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas no termociclador da Applied Biosystems® (Califórnia, EUA). Para tanto foi montado um coquetel, com volume final de 15  $\mu$ L por reação, contendo 12,5 ng de DNA, 0,9  $\mu$ M de cada *primer*, 5 U de Taq DNA Polymerase (Phoneutria, Belo Horizonte, BR), 2,5  $\mu$ M de cada dNTP, 25mg/ml de BSA, tampão 10X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3) e o volume final foi completado utilizando água ultra pura. Os ciclos de amplificação ocorreram em 3 etapas: (1<sup>a</sup>) desnaturação inicial da dupla fita de DNA a 94°C/5min; (2<sup>a</sup>) realização de 30 ciclos, sendo que cada ciclo compreendeu respectivamente, a desnaturação do DNA a 95°C/5seg, o anelamento dos *primers* à fita molde a 48°-60°C/1min e a extensão da fita a 72°/30seg; (3<sup>a</sup>) extensão final a 72°/45min.

As reações de PCR foram inicialmente conduzidas, com uma amostra de DNA de três indivíduos, utilizando as temperaturas de anelamento dos *primers* previamente padronizadas para *P. vulgaris*. A partir do produto amplificado obtido as temperaturas foram sendo ajustadas, aumentando-as ou diminuindo-as, a fim de obter um produto de amplificação com resolução adequada. Para verificar a amplificação, o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3% corado com Brometo de Etídeo e imerso em tampão TBE 1X (0,89M Tris, 0,89M ácido bórico; 0,02M EDTA, pH 8,0). Foi utilizado como padrão molecular o marcador de 100pb.

Os *primers* que apresentaram um bom padrão de amplificação visualizado no gel de agarose foram avaliados em eletroforese vertical em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, para visualizar com melhor resolução os fragmentos amplificados. A coloração do gel

foi realizada com nitrato de prata conforme o protocolo descrito por Creste et al., (2001). Neste gel foram utilizados os marcadores de padrões moleculares de 10pb e 50pb (Invitrogen®) para estimar o tamanho dos alelos. Após a secagem das placas contendo os géis corados, elas foram colocadas sobre luz branca para a verificação dos tamanhos aproximados dos alelos de cada loco. Os primers com bom perfil de bandas em gel de poliacrilamida 6% foram avaliados quanto ao polimorfismo em 8 indivíduos de *P. emarginatus*, retirados da população de Portelândia-GO (PEMPOTGO).

Os locos polimórficos foram selecionados para serem avaliados nas populações de *P. emarginatus*. Foi avaliado também, o polimorfismo de 9 locos microssatélites desenvolvidos para *Dipteryx alata* (Fabaceae) por Soares et al., (2012) e um loco de *Phaseolus vulgaris* desenvolvido por Blair et al., (2003) e transferido para *D. alata* (Garcia et al., 2007) que tiveram bom padrão de amplificação em *P. emarginatus* no trabalho monográfico de Batista (2010).

#### 4.2.1 Desenvolvimento do sistema multiplex de genotipagem de microssatélites

Os locos que apresentaram polimorfismo com uma amostra de oito indivíduos de *P. emarginatus* tiveram os *primers Forward* resintetizados incorporando os fluoróforos 6-FAM (azul), HEX (verde) ou NED (amarelo) na extremidade 5', para a realização da genotipagem em analisador automático de DNA (modelo ABI3500 - *Applied Biosystems*).

A amplitude alélica dos locos foi considerada para definir a cor fluorescente de cada *primer*, de forma que, locos com amplitudes alélicas sobrepostas foram marcados com cores diferentes e locos com amplitudes alélicas não sobrepostas foram marcados com cores iguais, a fim de ampliar o número de locos em cada sistema multiplex.

As reações de PCR para cada *primer* foram realizadas separadamente, e após a verificação da amplificação em gel de agarose 3%, foi realizada a mistura dos produtos de PCR de acordo com o sistema multiplex. Como os *primers* amplificam produtos com diferentes intensidades de bandas, a partir da análise do gel de agarose, foi ajustado o volume de cada produto para a montagem do sistema multiplex de genotipagem.

Para a genotipagem em analisador automático de DNA, foi preparado para cada indivíduo uma solução contendo 1 µL da mistura dos produtos de PCR; 8,75 µL de formamida e 0,25 µL de marcador interno fluorescente de tamanho conhecido (size

standard) ROX500™. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 3min e submetidas à eletroforese capilar.

Os tamanhos dos alelos em pares de bases foram estimados por meio da fluorescência emitida, no programa Genescan. Os valores definidos pelo Genescan foram importados para o programa GeneMapper, onde o genótipo de cada indivíduo foi definido. Feitos os ajustes, o sistema multiplex foi utilizado para a genotipagem dos 88 indivíduos, provenientes de três populações de *P. emarginatus* coletadas.

Para a confirmação dos alelos e genótipos, foi realizada uma “escada alélica”, a partir da realização de uma nova eletroforese capilar, com o número mínimo de indivíduos (em duplicata) que contivesse todos os alelos de um dado loco.

#### 4.3 Caracterização dos locos microssatélites transferidos para *Pterodon emarginatus*

O programa Micro-checker (Van Oosterhout et al., 2004) foi utilizado para detectar a evidência de possíveis “erros de genotipagem”. Este programa consiste numa aplicação desenvolvida para procurar alelos nulos, bandas *stutter*, e alelos *drop-out*, que ocorrem durante a PCR e que podem afetar a definição dos genótipos.

Com o auxílio do programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2002) foram estimados o número de alelos por loco, as frequências alélicas, a heterozigosidade esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ), a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e o índice de fixação intrapopulacional ( $f$ ). A Heterozigosidade esperada se refere ao número de heterozigotos esperados considerando que os locos estejam em Equilíbrio de Hardy Weinberg. Pelo programa, é obtida utilizando-se o seguinte estimador conforme Nei (1973):

$$H_e = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r \left[ 2n \frac{\left( 1 - \sum_{j=1}^k p_{ij}^2 \right)}{(2n-1)} \right]$$

no qual  $n$  é o número de indivíduos,  $r$  é o número de locos,  $k$  é o número de alelos no loco  $i$  e  $p_{ij}$  é a frequência do  $j$ -ésimo alelo do  $i$ -ésimo loco. Quanto maior a equidistribuição das frequências alélicas, maior será o valor de  $H_e$ , sendo que para um loco com dois alelos este valor máximo é de 0,5 (Vencovsky, et al., 2007). A Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) foi obtida pela fórmula proposta por Weir (1966):

$$f = \frac{(H_e - H_o)}{H_e} \text{ sendo assim, } H_o = (-H_e \times f) + H_e$$

O índice de endogamia ( $f$ ) se refere à medida de excesso ou deficiência de homozigotos ou heterozigotos em cada loco e generalizando na população. Assim, para verificar se existe diferença entre os valores de heterozigosidade esperada e observada nos locos foi avaliada a significância do índice de endogamia ( $f$ ). O FSTAT utiliza a correção de Bonferroni para ajustar o nível de significância 5% em função do número de testes a serem realizados. Assim cada valor de ( $p$ ) gerado é comparado com o nível de significância corrigido. O valor de ( $p$ ) corresponde à probabilidade associada à observação de valores tão ou mais extremos do que os que foram observados. Dessa forma, se o valor de ( $p$ ) for menor ou igual ao nível de significância corrigido, o índice de endogamia ( $f$ ) será significativo, sendo, índices positivos, indica excesso de homozigotos e índices negativos, excesso de heterozigotos. Se o valor de ( $p$ ) for maior que o nível de significância corrigido o índice de endogamia não será significativo, indicando que não existem diferenças entre as frequências de  $H_e$  e  $H_o$  e por sua vez corrobora que o loco está em Equilíbrio de Hardy Weinberg.

A diversidade genética máxima ( $H_{m\acute{a}x}$ ) refere ao valor máximo teoricamente esperado para a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), considerando o número de alelos observados na análise. A  $H_{m\acute{a}x}$  para cada loco foi estimada segundo a fórmula:  $H_{m\acute{a}x} = (\hat{A}-1) / \hat{A}$ , onde,  $\hat{A}$  corresponde ao número de alelos verificados no loco (Hartl & Clark, 2010).

Pelo FSTAT também foi avaliado se os locos estão em desequilíbrio de ligação. O desequilíbrio de ligação indica a associação não aleatória ou preferencial entre alelos de diferentes locos em uma mesma população, resultando em desvios das frequências gaméticas em relação às esperadas pela condição de equilíbrio de ligação. Pode ocorrer entre alelos de dois ou mais locos que estão fisicamente ligados, ou seja, próximos em um mesmo cromossomo, e pode ocorrer também entre alelos de dois ou mais locos não fisicamente ligados, ou seja, distantes no mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes. Os locos apenas estarão associados de forma não-aleatória se o valor calculado para o desequilíbrio de ligação for estatisticamente significativo (Weir, 1996; Hedrick, 2010).

Foram estimados também no programa FSTAT, os valores das estatísticas  $F$  desenvolvidos por Wright (1965), método baseado na análise de variância das frequências

gênicas. Este método mede a correlação entre frequências alélicas em diferentes níveis hierárquicos populacionais através de três índices:  $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$ . O  $F_{IT}$  se refere ao índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto de populações (devido ao sistema reprodutivo e subdivisão). O  $F_{IS}$  ( $F_{IS} = f$ ) equivale ao índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional (devido ao sistema reprodutivo) e o  $F_{ST}$  se refere ao índice de fixação ou coeficiente de endogamia entre populações (devido à subdivisão). O programa calcula estas estatísticas a partir dos estimadores “ $f$ ”, “ $F$ ” e “ $\theta$ ”, propostos por Weir & Cockerham (1984), aos quais são análogos aos índices de Wright (1965).

Com o auxílio do programa GDA (*Genetic Data Analysis*) (Lewis & Zaykin, 2002) foi verificado a presença de alelos privados em cada população.

O programa Identity (1.0) (Wagner e Sefc, 1999) foi utilizado para se estimar a Probabilidade de Exclusão de Paternidade ( $Q$ ) e a Probabilidade de Identidade ( $PI$ ). A Probabilidade de Exclusão de Paternidade ( $Q$ ), se refere a probabilidade de se excluir uma falsa paternidade. De acordo com Mommens et al. (1998), um bom microssatélite para análise de vínculo genético é aquele que apresenta altos valores de probabilidade de exclusão de paternidade, sendo que  $Q$  maiores que 50% são considerados satisfatórios, e que uma ótima probabilidade de exclusão de paternidade é de 0,99. Esta probabilidade foi calculada conforme sugerido por Evett & Weir (1998) que pode ser estimada por:

$$Q_L = \sum_u p_u (1 - p_u)^2 - \frac{1}{2} \sum_u \sum_{v \neq u} p_u^2 p_v^2 (4 - 3p_u - 3p_v), \text{ generalizando para todos os locos,}$$

tem-se:  $Q = 1 - \prod_L (1 - Q_L)$ .

Onde  $p_u$  se refere às frequências alélicas do loco  $u$  na população e  $Q$  à probabilidade de que pelo menos um loco do sistema permita a exclusão de um dos prováveis pais.

A Probabilidade de Identidade é a probabilidade de dois indivíduos escolhidos aleatoriamente em uma população terem genótipos idênticos. Sendo assim, bons marcadores devem apresentar valores de  $PI$  quase nula, para demonstrar que são ótimos para discriminar os indivíduos. A  $PI$  foi calculada segundo Paetkau et al. (1998) em que:

$$PI = \frac{n^3(2a_2^2 - a_4) - 2n^2(a_3 + 2a_2) + n(9a_2 + 2) - 6}{(n-1)(n-2)(n-3)}$$

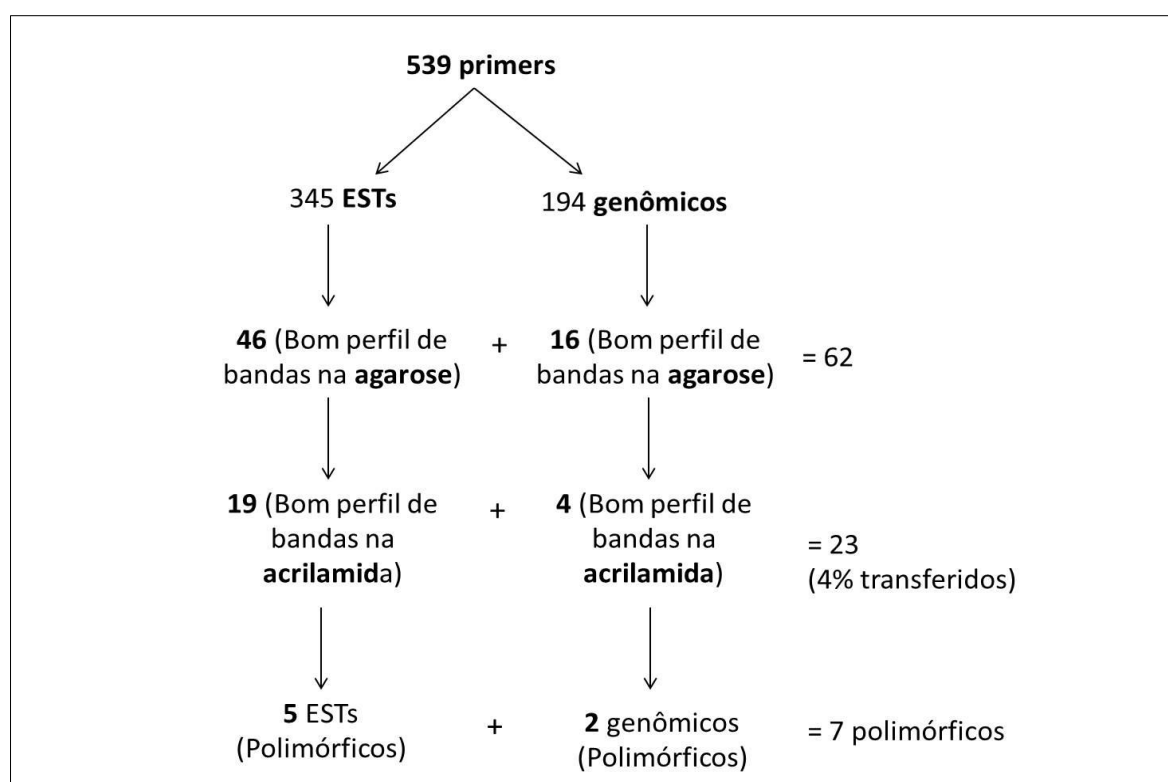
Onde  $n$  é o número de amostras,  $a_i$  é dado por:  $\sum_j p_j^i$ , em que  $p_j$  é a frequência do  $j$ -ésimo

alelo calculado por loco e multiplicada para todos os locos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Amplificação cruzada e avaliação do polimorfismo dos locos

Dos 539 locos de *Phaseolus vulgaris* avaliados quanto ao potencial de amplificação utilizando três indivíduos de *Pterodon emarginatus*, 62 apresentaram um bom padrão de amplificação e 477 não amplificaram ou foram inespecíficos em gel de agarose 3%. Dos 62 que apresentaram amplificação satisfatória 16 são genômicos e 46 provenientes de bibliotecas ESTs (Figura 6).

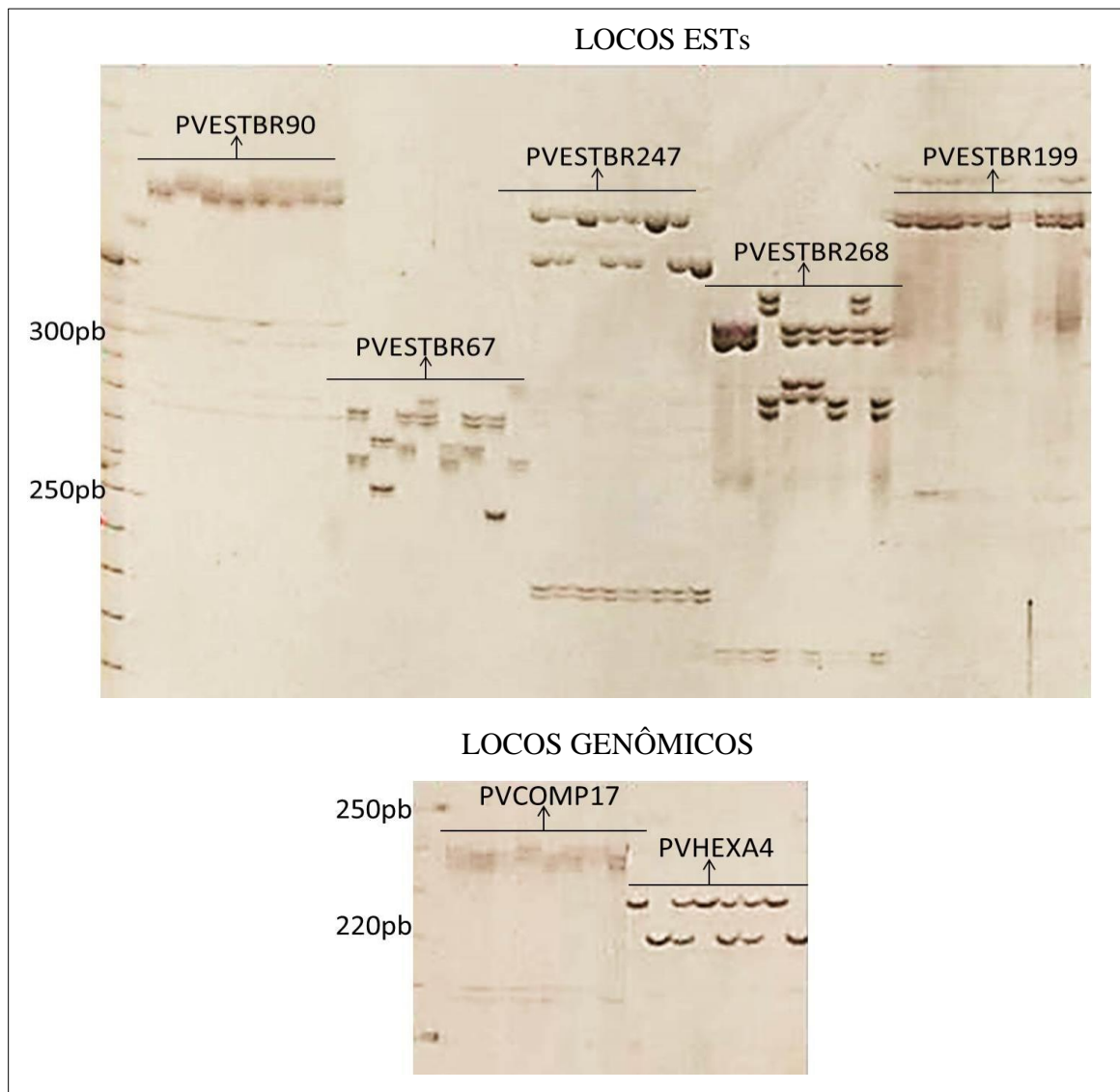


**Figura 6:** Resumo dos resultados parciais e final da transferibilidade de marcadores microsatélites de *Phaseolus vulgaris*, provenientes de bibliotecas de EST e genômica, e número de locos polimórficos em *Pterodon emarginatus*.

Os locos com bom padrão de amplificação neste primeiro teste, quando avaliados no gel de poli-acrilamida 6%, 23 deles apresentaram um bom padrão de bandas, sendo 4 genômicos e 19 ESTs. Dessa forma, tem-se como resultado final que, dos 539 locos testados, 23 foram transferidos, o que equivale a 4% de transferibilidade. Este é um resultado inferior ao esperado para a transferibilidade entre gêneros diferentes e mesma

família em dicotiledôneas, 10% (Barbará et al., 2007). Estes 23 locos foram utilizados para a avaliação do polimorfismo em oito indivíduos de *P. emarginatus*.

Desse total, sete locos apresentaram polimorfismo e 16 foram monomórficos. Dos sete locos polimórficos, cinco foram ESTs (PVESTBR67; PVESTBR090; PVESTBR199; PVESTBR247 E PVESTBR268) e dois foram genômicos (PVCOMP17 e PVHEXA4) (Figura 7).



**Figura 7:** Perfis de amplificação dos locos ESTs polimórficos em *Pterodon emarginatus* obtidos pelos iniciades PVESTBR90, PVESTBR67, PVESTBR247, PVEST268 e PVESTBR199, e perfis de amplificação dos locos genômicos obtidos pelos iniciadores PVCOMP17 e PVHEXA4, visualizados em gel de poliacrilamida 6%.

Alguns estudos têm demonstrado sucesso na transferibilidade de marcadores microssatélites para árvores nativas do Cerrado entre espécies pertencentes a gêneros diferentes e à mesma família. Zucchi et al. (2002) testaram a amplificação de 356 pares de *primers* genômicos desenvolvidos para *Eucalyptus spp.* em *Eugenia dysenterica* (cagaita) e obtiveram 10 (2,8%) destes marcadores transferidos. Garcia et al. (2011) avaliaram a amplificação cruzada entre espécies da família Fabaceae, a partir de 167 *primers*, sendo (65 *primers* gênicos e 102 *primers* genômicos), desenvolvidos para *Phaseolus vulgaris* (feijão-comum), 10 (6%) foram transferidos para *Dipteryx alata* (baru), sendo 6 gênicos e 4 genômicos. Os valores de porcentagem de transferibilidade obtidos nestes estudos se aproximam à porcentagem obtida pelo presente trabalho (4%).

Garcia et al. (2011), também avaliaram estes marcadores de *P. vulgaris* em plantas cultivadas da família Fabaceae (*Glycine max*, *Arachis hypogaea*, *Medicago sativa* e 3 espécies do gênero *Vigna*). O maior índice de transferibilidade foi para *Vigna unguiculata* (feijão frade) com 30% (35 gênicos e 15 genômicos), e o menor para *Arachis hypogaea* (amendoim) com 1,8% (4 gênicos e 1 genômico).

De forma semelhante ao resultado do presente estudo, o trabalho de Garcia et al. (2011) mostra que o número de marcadores gênicos transferidos é maior que o número de marcadores genômicos. Este é um resultado esperado, pois as regiões gênicas possuem um maior sucesso de transferibilidade do que regiões genômicas, devido à maior conservação evolutiva destas regiões (Varshney et al., 2005).

De acordo com a maioria dos trabalhos revisados, foram demonstrados grandes sucessos de transferibilidade entre espécies com maior relação filogenética (mesma família, por exemplo). Entre as plantas cultivadas da família Myrtaceae, de 23 marcadores microssatélites desenvolvidos para *Psidium guajava L.* (goiaba), 78,2% foram transferidos para *Eucalyptus citriodora* (eucalipto cidró); 60,80% foram transferidos para *Eucalyptus camaldulensis* (eucalipto); 73,9% para *Callistemon lanceolatus* (escova de garrafa) e 73,9% para *Syzygium aromaticum* (cravo da índia) (Rai, et al. 2013).

Grandes sucessos de transferibilidade são observados também entre plantas cultivadas da família Moraceae, para as quais de 188 marcadores microssatélites desenvolvidos para *Morus spp* (amora), 45,2% foram transferidos para *Ficus benghalensis* (figueira); 45,7% foram transferidos para *Ficus carica* (figueira-comum) e 71,8% para *Artocarpus heterophyllus* (jaca) (Mathithumilan et al. 2013). Altas porcentagens de

transferibilidade também são observadas entre plantas cultivadas da família Laminaceae (69,9%) (Karaca, et al. 2012) e Rosaceae (61,2% em média) (Fan, et al. 2013).

Para que a transferibilidade de marcadores microssatélites seja bem-sucedida, as sequências das regiões de anelamento dos *primers* devem ser conservadas entre os táxons, ou seja, devem ser homólogas. Assim os maiores e menores sucessos de transferibilidade de marcadores microssatélites estão relacionados com a homologia do DNA entre as espécies estudadas, dessa forma, quanto maior a homologia, maior a conservação dos microssatélites e das regiões flangeadoras e maior é a possibilidade de transferibilidade dos marcadores (Varshney et al., 2005).

Espera-se que quanto menor a distância evolutiva entre as espécies maior seja o número de marcadores microssatélites transferidos, devido à maior homologia do genoma. Assim, a transferibilidade de marcadores microssatélites entre espécies que pertencem ao mesmo gênero geralmente é maior do que a transferibilidade entre espécies de gêneros diferentes (Barbará et al., 2007).

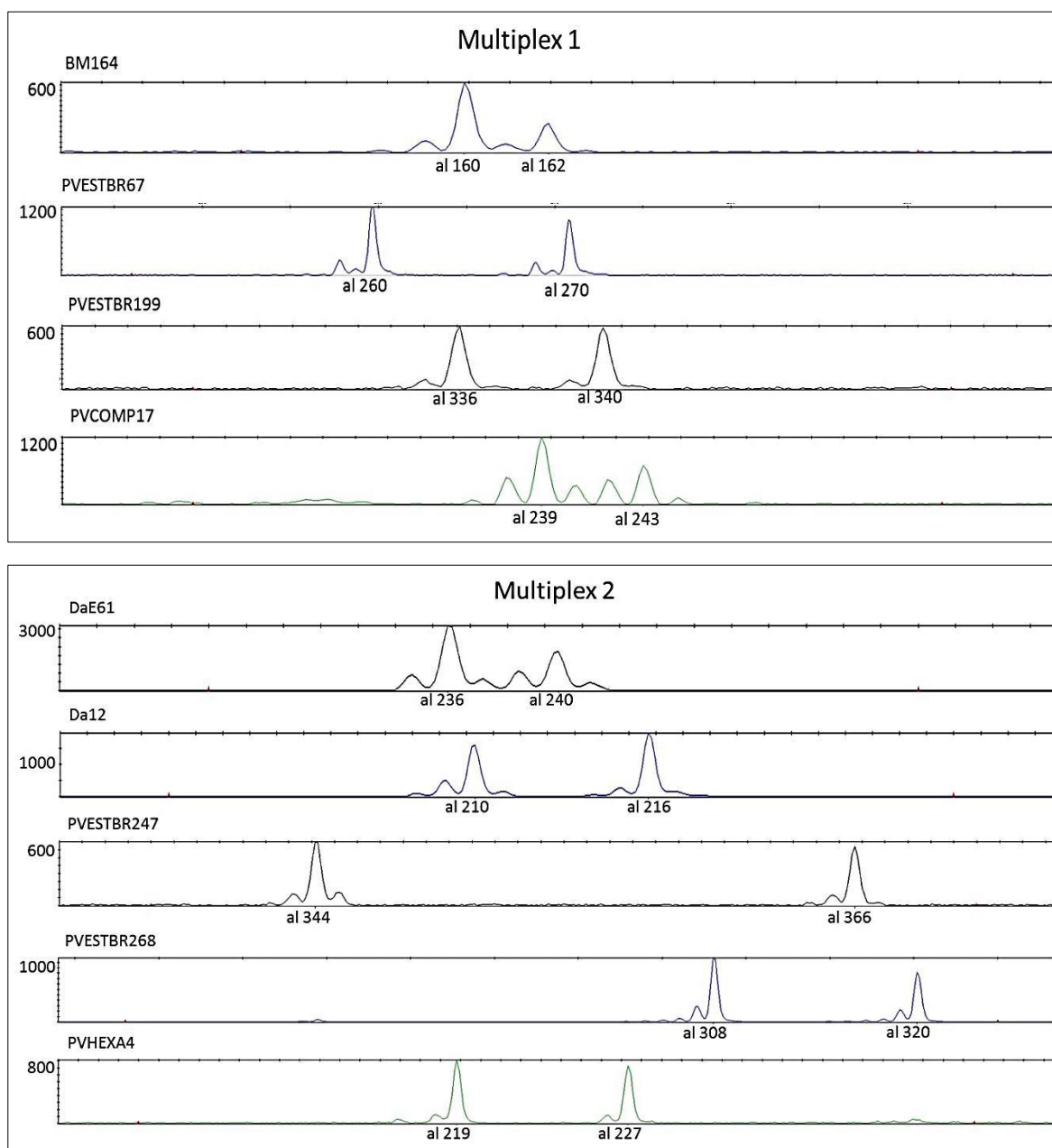
Estudos têm demonstrado grande sucesso na transferibilidade de marcadores microssatélites para árvores nativas do Cerrado entre espécies pertencentes ao mesmo gênero. No estudo de Ciamp et al. (2008), a partir de 9 marcadores microssatélites desenvolvidos para *Hymenaea courbaril* (jatobá), 77,7% destes marcadores foram transferidos para *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá do Cerrado). No estudo de Soares et al. (2012), a partir de 14 marcadores desenvolvidos para *Anacardium occidentale* (caju), 85,7% destes marcadores foram transferidos para *Anacardium humile* (cajuzinho do Cerrado).

No presente estudo foi avaliado também o polimorfismo de 10 locos que apresentaram sucesso na amplificação cruzada em *P. emarginatus* conforme descrito por Batista (2009). Destes, três apresentaram polimorfismo em *P. emarginatus* (BM164, Da\_E12 e Da\_E61). Assim, o número total de *primers* microssatélites marcados com fluorescência para a genotipagem em analisador automático de DNA foram 10.

#### 5.1.1 Sistema multiplex de genotipagem para *Pterodon emarginatus*

Foi possível desenvolver dois sistemas multiplex de genotipagem, cada um com cinco *primers* (Tabela 2). Ao testar a amplificação com os *primers* resintetizados fluorescentes em 4 indivíduos de sucupira, foi necessário fazer um novo ajuste das

temperaturas de anelamento e ajustes na quantidade de reagentes no mix de PCR (Anexo 1). O loco PVESTBR090 apresentou um perfil de eletroferograma insatisfatório, com excesso de *stutters* e picos de absorbância baixos, sendo descartado das análises com as populações, restando assim, um sistema multiplex com 4 *primers* e outro com cinco *primers*, totalizando nove locos com bons perfis de eletroferograma (Figura 8).



**Figura 8:** Perfis dos eletroferogramas apresentados pelos 9 locos polimórficos transferidos para *Pterodon emarginatus* organizados em multiplex. Eixo vertical indica o nível de absorbância da fluorescência e o eixo horizontal os nomes dos alelos.

**Tabela 2:** Sistemas multiplex de genotipagem de marcadores microssatélites para *Pterodon emarginatus*. Estão descritos o nome do par de *primers*, a sequência dos *primers*, com o respectivo tipo de marcação fluorescente no *primer forward* (F), o motivo da repetição (detectado em *Phaseolus vulgaris*), (VAA) variação da amplitude alélica; (Ta) temperatura de anelamento ajustada e quantidade do produto da reação de amplificação de cada *primer* colocada no sistema multiplex.

	<i>Primer</i>	Sequência com a marcação (5' – 3')	Motivo	VAA	Ta (°C)	Quant. de reação
<b>Multiplex 1</b>	BM164	F: 6-FAM-CCACCACAAGGAGAAGCAAC R: ACCATTCAGGCCGATACTCC	(GT)9 (GA)21	160-168	58°	1ul
	PVESTBR067	F: 6-FAM-CACTGAGGTTTTCTCTGCTTT R: TGTTGAAGGCAAAACATGAAAC	(CT)8	254-290	54°	2ul
	PVESTBR199	F: NED-AAAGACGATGCAGTTGGAAAGT R: GTTATTGTGTTCTCATCCGCAA	(GCG)7	336-340	50°	3ul
	PVCOMP 17	F: HEX-ACAAGGGTCTGCAGTTTCTT R: GATTCCTCCACGTTAGAGTTGG	(TAA)4 (TAA)4 (TAA)4 (TAA)4 (TAA)4 (TAA)4 (TAA)4 (ATA)4 (TAA)4	235-247	52°	3ul
	PVESTBR090*	F: HEX-CTAACGACACTGCTGGAACAG R: CATATCAGCACTTTTGGCAGAC	AGA(7) A(13)	301-310	52°	descartado
<b>Multiplex 2</b>	Da_E61	F: NED-TACCACCTACCCCAATCCAA R: TGCATGCCCAATCATTCTA	ATAA(26)	236-244	60°	1ul
	Da_E12	F: 6-FAM-CCTTCTATGCGCTCTCTGCT R: TACTTCAACGCCAGCTTCCT	(ATTTTT)18	200-224	60°	1ul
	PVESTBR268	F: 6-FAM-AGATGCAGAACAGATGCTTCAA R: TGAAAGGGTCTTCTTGTTCCAT	(CCA)6	282-320	58°	1ul
	PVESTBR 247	F: NED-GGAGTCTTTTCTTTGGATGTGG R: AGGTTGAAGCTCCCTCTCTCTT	(A)7 (A)7 (A)6 (A)7	344-366	58°	2ul
	PVHEXA 4	F: HEX-TGCTTCCCATAAAGAAAGGAAA R: TTCGTCTTGTTGAATGACCTTG	(AAAGAA)5	219-227	50°	4ul

\*Excluído das análises por apresentar perfil de eletroferograma insatisfatório durante os testes de eletroforese capilar.

## 5.2 Caracterização dos locos microssatélites transferidos para *Pterodon emarginatus*

Os genótipos dados para cada indivíduo, em cada loco, estão representados no Apêndice 2. Os nove locos microssatélites analisados nas populações apresentaram entre dois (PVESTBR199 e PVHEXA4) a 13 alelos (PVESTBR67) cada, com uma média de cinco alelos por loco (Tabela 3).

Como os microssatélites são potencialmente multialélicos, são verificados um grande número de alelos em outros estudos com plantas nativas (Zucchi et al., 2002; Pereira et al., 2008) como também verifica-se uma média de número de alelos similar ao presente estudo (Cota et al., 201; Soares et al., 2012; Soares et al., 2013)

**Tabela 3:** Caracterização dos locos para três populações naturais de *Pterodon emarginatus* avaliadas com nove locos microssatélites. Em que,  $n$ : número de indivíduos amostrados;  $N_A$ : número de alelos por loco;  $H_{máx}$ : heterozigosidade máxima;  $H_e$ : heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg;  $H_o$ : heterozigosidade observada;  $f$ : índice de fixação intrapopulacional;  $Q$ : probabilidade de exclusão de paternidade;  $PI$ : probabilidade de identidade.

Loco	$n$	$N_A$	$H_{máx}$	$H_e$	$H_o$	$f$	$Q$	$PI$
BM164	88	4	0,750	0,350	0,262	0,252*	0,183	0,452
PVCOMP17	88	7	0,857	0,697	0,454	0,348*	0,474	0,131
PVESTBR199	85	2	0,500	0,478	0,400	0,164	0,181	0,388
PVESTBBR67	88	13	0,923	0,882	0,818	0,073	0,753	0,027
Da_E12	76	5	0,800	0,607	0,526	0,133	0,323	0,238
Da_E61	88	4	0,750	0,520	0,114	0,781*	0,233	0,329
PVESTBR247	88	3	0,666	0,513	0,580	-0,13	0,227	0,336
PVESTBR268	88	4	0,750	0,584	0,602	-0,031	0,350	0,219
PVHEXA4	86	2	0,500	0,438	0,407	0,07	0,170	0,414
Média	86	5	0,800	0,563	0,463	0,179*	0,9811122	$1,497759 \times 10^{-6}$

\*Valor de  $f$  significativo,  $p \leq 0,00556$

Os níveis de polimorfismo dos marcadores microssatélites estão relacionados com a natureza gênica ou genômica, os tipos de motivos de repetição destas regiões (mono, di, tri, tetra, penta ou hexa), o número de repetições dos motivos e interrupções nas repetições (Ellegren, 2004). No presente estudo o loco PVESTBR67 foi o que apresentou o maior número de alelos (13). Por ser um loco EST, grande polimorfismo, não era esperado, contudo é um marcador microssatélite com motivo dinucleotídico sem interrupções na

repetição. Para os locos mono e dinucleotídeos, espera-se maior polimorfismo, pois estes tipos de motivos, por serem menores, estão mais sujeitos ao *slippage* e com isso a mutações mais frequentes (Ellegren, 2004), o que pode explicar o grande número de alelos encontrado para este loco.

O segundo loco com maior número de alelos foi o PVCOMP17, um trinucleotídeo com 7 alelos, assim, maior polimorfismo era esperado por ser um loco genômico. Como é composto por regiões de trinucleotídeos, parece estar livre das restrições de ocorrência de mutações, como ocorre nas regiões gênicas, o que pode explicar o grande número de alelos encontrado (Ellegren, 2004).

Para locos mononucleotídeos espera-se que apresentem o maior polimorfismo, contudo, o único loco mononucleotídeo desse estudo (PVESTBR247) apresentou somente 3 alelos. Este loco é mononucleotídeo com muitas interrupções, o que pode explicar o baixo número de alelos apresentado, pois, interrupções na região repetitiva podem tornar o *slippage* menos frequente e diminuir as mutações (Jin et al., 1996).

Os locos PVESTBR199, um trinucleotídeo, e PVHEXA 4, um hexanucleotídeo, apresentaram o menor número de alelos (ambos 2 alelos). No caso do loco PVESTBR199, por ser um loco gênico e trinucleotídeo era esperado que apresentasse pouco polimorfismo. Pouco polimorfismo espera-se também para locos hexanucleotídeos, que além de poderem estar dentro de genes, possuem um grande tamanho de motivo, o que faz com que eles estejam menos sujeitos ao *slippage* do que regiões com motivos menores. No caso do loco PVHEXA4, por ser um loco genômico, o pouco polimorfismo deve estar relacionado ao tamanho do motivo. Além disto, é um loco que possui baixo número de repetições de motivos (5 repetições) em relação a todos os outros locos. Microsatélites com um menor número de repetições independentemente do motivo são menos mutáveis devido à menor probabilidade de *slippage* (Wierdl et al., 1997).

Vale ressaltar que, não necessariamente, os motivos destes locos desenvolvidos para o feijão, sejam as mesmas em sucupira, assim, seria necessário sequenciar os locos de sucupira para comprovar os motivos de repetição e o efeito no polimorfismo apresentado em sucupira.

A análise da qualidade da genotipagem pelo programa Micro-checker apontou possíveis “erros de genotipagem” para os locos BM164, PVCOMP17 e Da\_E61. Nestes três locos foi detectado excesso de homozigotos, sendo sugerida a presença de alelos nulos, ou seja, alelos que não são amplificados na PCR pela mutação na região onde o *primer*

anela, assim o genótipo que era para ser heterozigoto, mostra-se como homozigoto (Chakraborty et al., 1997).

Não foi verificado desequilíbrio de ligação entre os pares dos locos avaliados. Dessa forma é possível inferir que todos os pares de locos estão em equilíbrio de ligação, indicando que não há redundância nas informações geradas por cada loco, o que é de grande importância para os estudos de genética de populações (Hartl & Clark, 2010).

O valor da diversidade genética média de todos os locos, avaliada pela estimativa da heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e = 0,563$ ), representa 70% da heterozigosidade máxima esperada para este conjunto de locos ( $H_{máx} = 0,800$ ) (tabela 3). Esta representação de diversidade genética média dos locos com relação à diversidade máxima comparando com outras Fabaceas nativas, é maior que a de *Dipteryx alata* (60%) Rodrigues et al., (2013), e menor que a de *Dimorphandra mollis* (79%) (Souza et al., 2012) e *Dalbergia nigra* (81%) (Barreto et al., 2010).

A maior diversidade foi apresentada pelo loco PVESTBR67, sendo observado o valor de  $H_e$  igual a 0,882 e maior número de alelos (13) representando 95% da sua heterozigosidade máxima ( $H_{máx} = 0,923$ ) (Tabela 3). A menor diversidade foi apresentada pelo loco BM164, sendo verificado o valor de  $H_e$  igual a 0,350, representando 47% de sua heterozigosidade máxima ( $H_{máx} = 0,750$ ), o que pode ser devido à presença de alelos nulos que foi encontrada para este loco, indicando excesso de homozigotos. Um loco com muitos alelos não necessariamente é um loco com maior diversidade, pois os valores de diversidade genética são influenciados pela relação entre o número de alelos e a distribuição de suas frequências relativas (Vencovsky et al., 2007).

A heterozigosidade observada apresentou média de 0,463 variando entre 0,262(BM164) e 0,818 (PVESTBR67). Foi observada diferença significativa entre os valores de heterozigosidade esperada e observada para os locos BM164, COMP17 e DaE61 ( $p \leq 0,00556$  ou aproximado), o que resultou em um valor de  $f$  significativo para o total de populações, indicando desvios ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido à presença de endogamia, que pode ter sido causada pelos alelos nulos que foram detectados para estes três locos.

Ao avaliar qualidade dos marcadores em análises de vínculos genéticos e de discriminação individual, a probabilidade de exclusão combinada foi igual a 0,9811122. Este valor pode ser considerado moderado a alto, significando que a bateria dos locos microsatélites transferidos possuem uma boa probabilidade para excluir uma falsa

paternidade (Evet & Weir, 1998). A probabilidade de identidade combinada foi igual a  $1,497759 \times 10^{-6}$ , ou seja, praticamente nula, isso indica que o conjunto dos locos microssatélites polimórficos transferidos são adequados para discriminar os indivíduos (Paetkau et al., 1995).

Os nove locos polimórficos permitiram observar 36 alelos em 23 indivíduos da população PEMAGEDF, 33 alelos em 29 indivíduos da população PEMPOTGO e 37 alelos em 36 indivíduos da população PEMPIRGO (Tabela 4). Estes valores sugerem que a amostragem de cerca de 30 indivíduos por população é razoável, considerando o número de alelos detectados com esta bateria de locos. Ou seja, esta amostragem oferece um bom balanço entre as amostragens genéticas e de indivíduos por população.

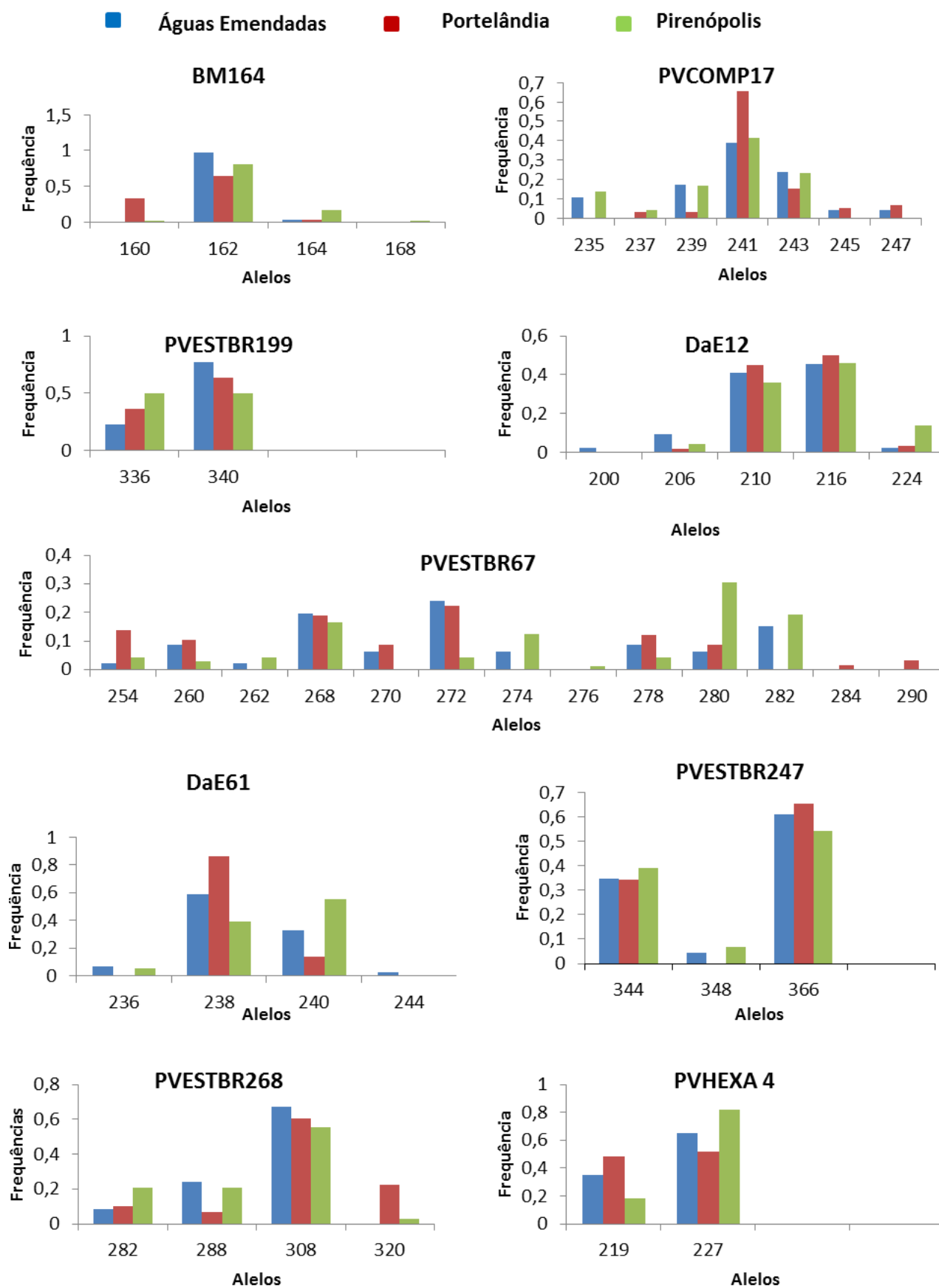
As frequências alélicas dos locos nas populações estão representadas graficamente na figura 9, onde é possível observar uma diferença aparente na abundância dos alelos nas diferentes populações.

Foram verificados alelos raros nas três populações, considerando o critério de alelo raro como aquele cuja frequência na população deve ser inferior a 5% (Raposos et al., 2007). Na população PEMAGEDF foram verificados 5 alelos raros; na população PEMPOTGO, 6, e na população PEMPIRGO, 11.

**Tabela 4:** Caracterização genética dos 9 locos microssatélites em 3 populações de *Pterodon emarginatus*, sendo *n*: número de indivíduos amostrados; *N<sub>A</sub>*: número de alelos por loco; *A<sub>p</sub>*: número de alelos privados; *H<sub>máx</sub>*: heterozigosidade máxima; *H<sub>e</sub>*: heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg; *H<sub>o</sub>*: heterozigosidade observada; *f*: índice de fixação intrapopulacional; PEMAGEDF: Estação Ecológica de Águas Emendadas, Planaltina-DF; PEMPOTGO: Portelândia-GO; PEMPIRGO: Pirenópolis-GO.

Loco	PEMAGEDF							PEMPOTGO							PEMPIRGO						
	<i>n</i>	<i>N<sub>A</sub></i>	<i>A<sub>p</sub></i>	<i>H<sub>máx</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>f</i>	<i>n</i>	<i>N<sub>A</sub></i>	<i>A<sub>p</sub></i>	<i>H<sub>máx</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>f</i>	<i>n</i>	<i>N<sub>A</sub></i>	<i>A<sub>p</sub></i>	<i>H<sub>máx</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>f</i>
BM164	23	2	0	0,500	0,043	0,043	0,000	29	3	0	0,666	0,494	0,449	0,092	36	4	1	0,750	0,329	0,250	0,239
PVCOMP17	23	6	0	0,833	0,766	0,522	0,319	29	6	0	0,833	0,549	0,414	0,246	36	5	0	0,800	0,736	0,445	0,396*
PVESTBR199	20	2	0	0,500	0,361	0,250	0,307	29	2	0	0,500	0,473	0,310	0,344	36	2	0	0,500	0,506	0,555	-0,097
PVESTBBR67	23	10	0	0,900	0,874	0,783	0,104	29	9	2	0,888	0,868	0,897	-0,033	36	10	1	0,900	0,830	0,778	0,063
Da_E12	22	5	1	0,800	0,628	0,773	-0,231	29	4	0	0,750	0,561	0,345	0,385	25	4	0	0,750	0,653	0,520	0,204
Da_E61	23	4	1	0,750	0,567	0,087	0,847*	29	2	0	0,500	0,244	0,138	0,434	36	3	0	0,666	0,551	0,111	0,798*
PVESTBR247	23	3	0	0,666	0,520	0,435	0,163	29	2	0	0,500	0,458	0,551	-0,204	36	3	0	0,666	0,556	0,694	-0,248
PVESTBR268	23	3	0	0,666	0,491	0,521	-0,062	29	4	0	0,750	0,579	0,620	-0,071	36	4	0	0,750	0,612	0,639	-0,044
PVHEXA4	23	2	0	0,500	0,462	0,521	-0,128	27	2	0	0,500	0,509	0,519	-0,020	36	2	0	0,500	0,301	0,250	0,169
Média	22	4	-	0,750	0,524	0,437	0,165	29	4	-	0,750	0,526	0,471	0,104	35	4	-	0,750	0,564	0,471	0,164

\*Valor de *f* significativo considerando a correção de Bonferroni,  $p \leq 0,00185$ .



**Figura 9:** Frequências alélicas para nove locos microssatélites avaliados em três populações de *Pterodon emarginatus*.

Quanto maior a amostragem da população maior a possibilidade de se encontrar alelos raros. A presença de alelos raros nas populações pode indicar que estes alelos estão sendo perdidos com o decorrer das gerações devido à deriva, ou seja, alelos que antes eram frequentes passam a ser raros devido a fatores antropogênicos, ou até mesmo à contribuição genética dos indivíduos que participam efetivamente da reprodução, pois mesmo em grandes populações, nem todos os indivíduos contribuem para a variabilidade genética pelo fato de alguns ainda serem jovens e outros já terem ultrapassado a idade reprodutiva (Tarnowski, 2010).

Além dos alelos raros, foram detectados seis alelos privados, ou seja, alelos específicos de uma única população, sendo encontrados dois em cada população (Tabela 4). Os alelos privados podem indicar restrição ao fluxo gênico, e com isso, diferenciação entre as populações (Botrel et al., 2006). No entanto, a maior parte do conjunto de alelos verificados no presente estudo é compartilhada entre as três populações de sucupira, como também os números de alelos privados não são expressivos e são raros o que indica que podem ser facilmente perdidos com o decorrer das gerações.

Zucchi (2003) também encontrou alelos privados em *Eugenia dysenterica*, contudo em um valor expressivo. O conhecimento da existência das diferenças na distribuição dos alelos e da presença de alelos privados e raros nas populações têm implicações na tomada de decisões para a conservação genética das espécies, na coleta de germoplasma ou na conservação *in situ*, pois, sendo as populações diferentes entre si, cada um tem o seu valor em termos de conservação do conjunto da variabilidade genética da espécie (Perecin & Kageyama, 2002).

Os valores de heterozigosidade esperada para cada uma das populações, PEMAGEDF, PEMPOTGO e PEMPIRGO foi de 0,524, 0,526 e 0,564 respectivamente. A Heterozigosidade observada foi de 0,437, 0,471 e 0,471 respectivamente (Tabela 4). Observa-se que os valores de  $H_e$  se aproximaram relativamente aos valores de  $H_o$  em cada uma das três populações e que estes valores entre as três as populações também são muito semelhantes (Tabela 4).

Ao avaliar as populações separadamente, o valor de  $f$  não foi significativo para quase todos os locos, pois o valor de  $p$  para a maioria foi maior que o nível de significância corrigido por Bonferroni 0,00185, assim cada população apresentou um valor de  $f$  não significativo, o que significa que não há diferença significativa entre os valores de heterozigosidade esperada e observada, indicando que as frequências genotípicas estão

seguindo as proporções esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O valor de  $F_{IS}$  foi igual a 0,144 e não significativo (intervalo de confiança de 99%, com 10000 randomizações), corroborando a aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A estimativa do índice  $F_{ST}$  foi igual a 0,06, significando que aproximadamente 6% da variação genética encontram-se entre as populações e 94% desta variação ocorrem dentro das populações. O índice de fixação para o conjunto das populações ( $F_{IT}$ ) no presente estudo foi igual a 0,195 e significativo, corroborando com a presença endogamia para o conjunto das populações.

Este é um estudo preliminar sobre a variabilidade genética das populações de *P. emarginatus*. Dessa forma, o sistema multiplex de genotipagem de marcadores microssatélites disponibilizado se mostrou eficaz para a realização destes estudos, contudo há a necessidade de ampliar o tamanho amostral para discutir a situação da espécie na natureza e na inferência sobre a atuação de processos microevolutivos.

## 6 CONCLUSÃO

- Os marcadores microssatélites desenvolvidos para *Phaseolus vulgaris*, apresentaram boa amplificação cruzada em *Pterodon emarginatus*.
- Foi possível ajustar 9 locos microssatélites com bom padrão de amplificação e níveis de polimorfismos úteis para estudos genético-populacionais para a espécie *Pterodon emarginatus*;
- Foram estabelecidos dois sistemas multiplex de genotipagem para análise semi-automatizada em analisador automático de DNA, o que proporcionou uma maior precisão e agilidade no processo de tomada dos genótipos;
- O estudo preliminar com os locos transferidos em três populações de *P. emarginatus* mostrou alta variabilidade genética nas populações avaliadas indicando a necessidade de se expandir o estudo para um maior número de populações.

**REFERÊNCIAS**

ALMEIDA, D.; MARCHINI, L. C.; SODRÉ, G. S.; ÁVILA, M.; ARRUDA, C. M. F. **Série produtor rural: Plantas visitadas por abelhas e polinização**. Piracicaba, São Paulo. Universidade de São Paulo, USP, ESALQ, 2003, edição especial, 40p.

ALVES, S. F.; BORGES, L. L.; PAULA, J. A. M.; VIEIRA, R. F.; FERRI, P. H.; COUTO, R. O.; BARA, M. T. F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 224–229, 2013.

AQUINO, J. T. **Apicultura no semiárido paraibano: defensividade de abelhas africanizadas com e sem alimentação artificial, cajazeiras-pb**. 2013. 30 f. Dissertação (Mestrado em sistemas agroindustriais) - Centro de Ciência e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande. Pombal, PB. 2013.

BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, GECELE, M.; BERED, F., FAY, M.F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v.16, n,18, p.3759-3767, 2007.

BARRETO, M. A. **Diversidade genética de quatro populações de jacarandá-da-bahia (*Dalbergia nigra* - Fabaceae) por meio de marcadores microssatélites**. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, Ilhéus, BA. 2010.

BARROSO, G. M.; MORIM M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e sementes. Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Editora UFV, 1999, 443 p.

BATISTA, E. C. **Transferibilidade de marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie *Dipteryx alata* Vog. (baru) em *Pterodon emarginatus* Vog. (sucupira-branca)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Estadual de Goiás, 2009.

BECKMANN, J. S.; WEBER, J. L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, v.12, n.4, p. 627-631, 1992.

BLAIR, M. W.; PEDRAZA, F.; BUENDIA, H. F.; GAITÁN-SOLÍS, E.; BEEBE, S. E.; GEPTS, P.; TOHME, J. Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), **Theoretical and applied genetics**, v. 107, n. 8, p. 1362–74, 2003.

BOTREL, M. C. G.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D.; PINTO, S. I. C.; MOURA, M. C. O.; REGIANE, A. E. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* camb. em duas populações de mata ciliar, **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.5, p.821-827, 2006.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI C.; GRATTAPAGLIA, D. **Manual prático para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas**. Brasília: Embrapa Arroz e Feijão, 2007. 111p.

BRUNEAU, A.; BRETELER, F. J.; WIERINGA, J. J.; GERVAIS, G. Y. F.; FOREST, F. **Phylogenetic relationships in tribes Macrolobieae and Detarieae as inferred from chloroplast trnL intron sequences.** In: P.S. Herendeen and A. Bruneau (editors). *Advances in legume systematics*, part 9, Royal Botanic Gardens, Kew, 2000, 121–149 p.

BUTLER, J. M. Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. **J Forensic Sci** 2006, v. 51, n.2, p. 253-265, 2006.

CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BOREM, M.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores Moleculares.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 11-93 p.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.** São Paulo, Tecmedd, 2004.

CHAKRABORTY R.; KIMMEL M.; STIVERS D. N.; DAVISON L. J.; DEKA R. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotidemicrosatellite loci. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94, p. 1041–1046, 1997.

CHIN, E. C. L.; SENIOR, M. L.; SHU, H.; SMITH, J. C. S. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allelic variation. **Genome**, v. 39, n.5, p. 866-873, 1996.

CIAMPI, A. Y.; VINSON, C. C.; GAIOTTO, F. A. **Estimativa da diversidade genética em arbóreas nativas tropicais utilizando microssatélites.** In: NASS, L. L. (ed.) *Recursos genéticos vegetais.* Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, p. 421-440.

CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C.; GAIOTTO, F. A.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Mol. Ecol. Resour.** V.8, n.5, p. 1074–1077, 2008.

COELHO, L. P.; REIS, P. A.; CASTRO, F. L.; GAYER, C. R. M.; LOPES, C. S.; SILVA M. C. C.; SABINOK, C. C.; TODESCHINI A. R.; COELHO M. G. P. Anti-nociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **J. Ethnopharmacol**, v.98, n.1-2, p.109-116, 2005.

COLLEVATTI R. G.; TELLES M. P. C.; NABOUT J. C.; CHAVES L. J.; SOARES T. N. Demographic history and the low genetic diversity in *Dipteryx alata* (Fabaceae) from Brazilian Neotropical savanas. **Heredity**, v. 111, p. 97-105, 2013

COTA, L. G.; MOREIRA, P. A.; MENEZES, E. V.; GOMES, A. S.; ERICSSON, A. R. O.; OLIVEIRA, D. A.; MELO, Jr. A. F.; Transferability and characterization of simple sequence repeat markers from *Anacardium occidentale* to *A. humile* (Anacardiaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n.4, p 4609-4616, 2012.

CRESTE, C.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, v.19, n.4, p. 299-306, 2001.

CROW, J. F.; KIMURA, M. An introduction to population genetics. **Herper and Row**, New York, USA. 1970.

DINIZ-FILHO, J. A. F.; DINIZ, J. V. B. P. L.; RANGEL, T. F.; SOARES, T. N.; TELLES, M. P. C.; COLLEVATTI, R. G.; BINI, L. M. A new eigenfunction spatial analysis describing population genetic structure. **Genetica**, v. 141, n. 10-12, p. 479–89, 2013

DI RIENZO, A.; PETERSON, A. C.; GARZA, J. C.; VALDES, A. M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N. B. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, V. 91, n.8, p. 3166-3170, 1994.

DU, Q.; GONG, C.; PAN, W.; ZHANG, D. Development and application of microsatellites in candidate genes related to wood properties in the Chinese white poplar (*Populus tomentosa* Carr.). **DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes**, v. 20, n.1, p.31–44, 2013.

DUTRA R. C.; SILVA, P. S.; PITELLA, F.; VICCINI, L. F.; LEITE, M. N.; RAPOSO, N. R. B. Caracterização fitoquímica e citogenética das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Rev. Técnico Científica (IFSC)**, v. 3, n. 1, 2012.

ELLEGREN, H. Microsatellite mutations in the germline: implications for the evolutionary inference. **Trends in Genetics**, v.16, n.12, p. 551-558, 2000.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-455, 2004.

EVETT, I. W.; WEIR, B. S. **Interpreting DNA evidence: Statistical for forensic scientists**. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers, p.278, 1998.

FAN, L.; ZHANG, M.-Y.; LIU, Q.-Z.; LI, L. T.; SONG, Y.; WANG, L. F.; ZHANG, S. L., WU, J. Transferability of Newly Developed Pear SSR Markers to Other Rosaceae Species. **Plant molecular biology reporter**, v.31, n.6, p.1271–1282, 2013.

FERREIRA, M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos, 1998. 220 p.

GALCERAN, C. B.; SERTIE, J. A. A.; LIMA, C. S.; CARVALHO, J. C. T. (Anti-inflammatory and analgesic effects of 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-vouacapan-17 $\beta$ -oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits. **Inflammopharmacology**, v. 19, n.3, p. 139-43, 2011.

GAO, L. F; TANG J. F.; LI, H. W.; JIA J. Z. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches, **Molecular Breeding**, vol. 12, n. 3, p. 245–261, 2003.

GARCIA, R. A. V.; BRONDANI, C.; BRONDANI, R. P. V. Caracterização Molecular e análise de transferibilidade de marcadores microssatélites em leguminosas. In: **Anais do 53º Congresso Brasileiro de Genética**, Ribeirão Preto: SBG, 2007.

GARCIA, R. A. V.; RANGEL, P. N.; BRONDANI, C.; MARTINS, W. S.; MELO, L. C.; CARNEIRO, M. S.; BORBA, T.C. O.; BRONDANI, R.P. V. The characterization of a new set of EST- derived simple sequence repeat (SSR) markers as a resource for the genetic analysis of *Phaseolus vulgaris*. **BMC Genetics**, v.12, n.41, p.1-14, 2011.

GOUDET, J. **A program to estimate and test gene diversities and fixation indices: Version 2.9.3.2.** Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>. Acesso em: 07/02/2014, 2002.

GUO, W.; TONG, J.; YU, X.; ZHU, C.; FENG, X.; FU, B.; HE, S.; ZENG, F.; WANG X., LIU H.; LIU, L. A second generation genetic linkage map for silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using microsatellite markers. **Aquaculture**, v 412-413, p. 97–106, 2013.

GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LÉGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F.; PETIT, R. J. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, v.11, p. 591–611, 2011.

HARES, D. R. Expanding the CODIS core loci in the United States. **Forensic Sci Int Genet** v. 6, n.1, p.e52-e54, 2012.

HARR, B.; ZANGERL, B.; BREM, G.; SCHLOTTERER, C. Conservation of locus specific microsatellite variability across species: a comparison of two *Drosophila* sibling species *D. melanogaster* and *D. simulans*. **Mol. Biol. Evol**, v. 15, N.2, p. 176-184, 1998.

HARTL, D.; CLARK, A. **Princípios de genética de populações**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.

HANSEN, D. 14, 15-epoxygeranylgeraniol and extracts isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. fruits: antitumor activity on glioblastoma cells. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n.9, p. 20–24, 2012.

HEDRICK, P. W. **Genetics of Populations**. 3º Edição. Jones and Bartlett, Boston, MA, 2005, 737p, 2010.

HISANO, H.; SATO, S.; ISOBE, S.; SASAMOTO, S.; WADA, T.; MATSUNO, A.; FUJISHIRO, T.; YAMADA, M.; NAKAYAMA, S.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HARADA, K.; TABATA, S. Characterization of the soybean genome using EST-derived microsatellite markers. **DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes**, v. 14, n.6, p.271–81, 2007.

**INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX.** Disponível em: [http://www.ipni.org/ipni/advPlantNameSearch.do?find\\_family=Fabaceae&find\\_genus=Pterodon](http://www.ipni.org/ipni/advPlantNameSearch.do?find_family=Fabaceae&find_genus=Pterodon). Acesso em: 05 Fev. 2014.

JEFFREYS, A.; WILSON, V.; THEIN, S. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature** v. 314, n. 6006, p. 67–73, 1985.

JIN L.; MACAUBAS C.; HALLMAYER J.; KIMURA A.; MIGNOT E. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 15285– 15288, 1996.

KARACA, M.; INCE, A. G.; AYDIN, A.; AY, S. T. Cross-genera transferable e-microsatellite markers for 12 genera of the Lamiaceae family. **Journal of the science of food and agriculture**, v.93, n.8, p.1869–79, 2013.

KIMURA, M.; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v. 49, n.4, p. 725-738, 1964.

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allele frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n.6, p. 2868-2872, 1978.

LAST, L.; WIDMER, F.; FJELLSTAD, W.; STOYANOVA, S.; KÖLLIKER, R. Genetic diversity of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations in three regions in Europe. **BMC genetics**, v. 14, n.1, p. 102, 2013.

Lewis, P. O.; Zaykin, D. Genetic Data Analyses (GDA). Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>> Acesso em: março de 2014.

**Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 16 Jan. 2014

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in-vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Human Genet**, v.44, n.3, p. 397- 401, 1989.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Vol.1. 5a ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2008. 384p

MARCOTTE, E. M.; PELLEGRINI, M.; YEATES, T. O.; EISENBERG, D. A census of protein repeats. **Journal of Molecular Biology**, v. 293, n.1, p. 151–160, 1999.

MATHITHUMILAN, B.; KADAM, N. N.; BIRADAR, J.; REDDY, S. H.; ANKAIHAH, M.; NARAYANAN, M. J.; KHURANA P.; SHESHSHAYEE, S. M. Development and characterization of microsatellite markers for *Morus* spp. and assessment of their transferability to other closely related species. **BMC plant biology**, v.13, p.194, 2013.

MESSIER, W.; LI, S. H.; STEWART, C. B. The birth of microsatellites. **Nature**, v. 381 n. 483, 1996.

MENEZES, E.V.; SOUTO, W. F. S.; CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C. R.; VALÉRIO, H. M.; PIMENTA, M. A. S. Development and characterization of DNA microsatellite *primers* for buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.). **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.4, p. 4058-4062, 2012.

MOMMENS, G.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L.J. Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity case in American bison, *Bison bison* L. **Animal Genetics**, v.29, n.1, p.12-18, 1998.

MORAES, W. F.; GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; VANDERLINDE, F. A.; BARA, M. T. F.; COSTA, E. A.; PAULA, J. R. Triterpenes involved in the anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Pterodon emarginatus* Vogel stem bark. **Journal of natural medicines**, v. 66, n.1, p. 202-207, 2012.

MULLER, B. S. F.; SAKAMOTO, T.; MENEZES, I. P. P.; PRADO, G. S.; MARTINS, W. S.; BRONDANI, C.; BARROS, E. G.; VIANELLO, R. P. Analysis of BAC-end sequences in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) towards the development and characterization of long motifs. **Plant Molecular Biology** (submitted), 2013.

NADIR, E.; MARGALIT, H.; GALLILY, T.; BEN-SASSON, S. A. Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications, **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, n. 13, p. 6470-6475, 1996.

NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proceedings of National Academy of Science**, United States of America, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NIE, X.; LI, B.; WANG, L.; LIU, P.; BIRADAR, S. S.; LI, T. DOLEZEL, J., EDWARDS, D., LUO M., WEINING, S. Development of chromosome-arm-specific microsatellite markers in *Triticum aestivum* (Poaceae) using NGS technology. **American journal of botany**, v. 99, n.9, p. 369–71, 2012.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIERIA, M. L.C. Origin, Evolution and Genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n.2, p. 294-307, 2006.

PAETKAU, D. C. W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v. 4, n. 3, p. 347-354, 1995.

PAETKAU, D.; WAITS, L. P.; CLARKSON, P. L. Variation in genetic diversity across the range of north american brown bears. **Conservation Biology**, 1998.

PAETKAU, D. Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol. **Biotechniques**, v. 26, n. 4. 690-2, 694-7, 1999.

PERECIN, M. B.; KAGEYAMA, P. Y. Variabilidade isoenzimática em populações de espinheira-santa *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss e suas implicações para o manejo da conservação. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, n.2, p. 80-90, 2002.

PEREIRA, M. F.; BANDEIRA, L. F.; BLANCO, A. J.; V.; CIAMPI, A. Y.; COELHO A. S. G. Development of microsatellite markers in *Annona crassiflora* Mart., a Brazilian Cerrado fruit tree species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 1329–1331, 2008.

POWELL, W.; MACHRAY G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Sciences**, v.1, n.7, p. 215 –222, 1996.

RABELO S. G.; TEIXEIRA C. F.; TELLES M. P. C.; COLLEVATTI R. G. Development and characterization of microsatellite markers for *Lychnophora ericoides*, an endangered Cerrado shrub species. **Conservation Genet Resour**, v.3, p.741–743, 2011.

RAI, M. K.; PHULWARIA, M.; SHEKHAWAT, N. S. (2013). Transferability of simple sequence repeat (SSR) markers developed in guava (*Psidium guajava* L.) to four Myrtaceae species. **Molecular biology reports**, v.40, n.8, p. 5067–71.

RAPOSO A.; MARTINS K.; CIAMPI A. Y.; WADT L. H. O.; VEASEY E. A. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.9, p.1291-1298, 2007

RIBEIRO, F. E.; BAUDOUIN, L.; LEBRUN, P.; CHAVES, L. J.; BRONDANI, C.; COSTA, E. F. N.; VENCOVSKY, R. Genetic diversity in Brazilian tall coconut populations by microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology (Impresso)**, v. 13, p. 356-362, 2013.

ROCHA, D. M. S. **Aspectos taxonômicos, genéticos e reprodutivos de *Pterodon pubescens* (Benth.)Benth. e *Pterodon emarginatus* Vog. (Leguminosae, Dipteryxaceae).** 2006. 117 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campina, SP, 2006.

RODRIGUES, N. B. **Variabilidade genética de populações de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne e *Dipteryx alata* Vogel em áreas nativas e em plantios de recuperação de áreas degradadas em Paracatu, MG.** 2013. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2013.

SANTIBANEZ-KOREF, M. F.; GANG, R.; HANCOCK, J. M. A relationship between lengths of microsatellites and nearby substitution rates in mammalian genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n.11, p. 2119-2123, 2001.

SANTOS, A. P.; ZATTA, D. T.; MORAES, W. F.; BARA, M. T. F.; FERRI, P. H.; SILVA, M. R. R.; PAULA, J. R. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides na folha de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.6, p.891-896, 2010.

SALAZAR, J. A.; RUIZ, D.; EGEA, J.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. (2013). Transmission of Fruit Quality Traits in Apricot (*Prunus armeniaca* L.) and Analysis of Linked Quantitative Trait Loci (QTLs) Using Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n.6, p.1506–1517, 2013.

SAWAYA, S.; ANDREW BAGSHAW, A.; BUSCHIAZZO, E.; KUMAR, P.; CHOWDHURY, S.; BLACK, M. A.; GEMMELL, N. Microsatellite Tandem Repeats Are Abundant in Human Promoters and Are Associated with Regulatory Elements. **Plos One**, v. 8, n. 2, 2013.

SCHLOTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v.109, n.6, p. 365-371, 2000.

SOARES, T. N.; MELO, D. B.; RESENDE, L. V.; VIANELLO, R. P.; Chaves, L. J.; COLLEVATTI, R. G.; TELLES, M. P. C. Development of microsatellite markers for the neotropical tree species *Dipteryx alata* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, p. e72-e73, 2012.

SOARES, T. N.; SANTANA, L.; OLIVEIRA, L. K.; TELLES, M. P. C.; COLLEVATTI, R. G. Transferability and characterization of microsatellite loci to in *Anacardium humile* A. St. Hil. (Anacardiaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3146-3149, 2013.

SOUZA, V. C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, 640 p.

SOUZA H. A. V.; COLLEVATTI R. G.; LEMOS-FILHO J. P.; SANTOS F. R.; LOVATO M. B. Development of microsatellite markers for *dimorphandra mollis* (leguminosae), a widespread tree from the brazilian cerrado, **American Journal of Botany**, v. 99, n.3, p.102–104, 2012.

TARNOWSKI, C. G. **Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites (ssrs) para *cedrela lilloi* c. de candolle**. 2010. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de concentração Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal Santa Catarina, Florianópolis, sc, 2010.

TAUTZ, D. S. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nuc. Acid. Res.**, New York, v. 16, n. 17, p. 6463-6471, 1989.

TELLES, M. P. C; PEIXOTO, F. P.; LIMA J. S.; RESENDE, L. V.; VIANELLO, R. P.; WALTER, M. E. M. T.; COLLEVATT, R. G. Development of microsatellite markers for the endangered Neotropical tree species *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n.1, p. 321-325, 2011.

TELLES, M. P. C.; LIMA, J. S.; 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). **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3124-3127, 2013.

VAN, OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P. M., & SHIPLEY, P. Micro-Checker: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, n. 3, p. 535–538, 2004.

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

VENCOVSKY, R.; NASS, L. L.; CORDEIRO, C. M. T.; FERREIRA, M. A. J. Amostragem em recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L. (Ed.). **Recursos genéticos vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 231-280.

WAGNER, H. W.; SEFC, K. M. **IDENTITY 4.0 - Freeware program for the analysis of microsatellite data**, Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences Vienna, 5p., 1999.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. **Genomics**, v.7, N.4, p. 524-530, 1990.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II**. Washington: Sinauer Associates, 1996, 376p.

WEIR, B.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, n.6, p. 1358-1370, 1984.

WIERDL, M.; DOMINSKA, M.; PETES, T. D.; CAROLINA, N.; HILL, C. Instability in Yeast: Dependence on the Length of the microsatellite. **Genetics Society of America Genetics**, v. 146 , n.3, 769-779, 1997.

WILDER, J.; HOLLOCHER H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Molec Biol Evol**, v 18, n.3, p.384–392, 2001.

WOJCIECHOWSKI, M.F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M.J. A Phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid Matk gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany** v. 91, n.11, p. 1846-1862, 2004.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, n.3, p. 395-420, 1965.

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

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J. B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. To *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, v. 2 , n.4, p, 502-513, 2002.

## APÊNDICES

## Apêndice 1

**Padronização do mix de PCR para os 9 locos microssatélites transferidos para *Pterodon emarginatus***

**Tabela 1:** Mix de PCR padronizado para os *primers* microssatélites transferidos em *Pterodon emarginatus* marcados com fluorescência BM164, PVESTBR199, PVCOMP17, Da\_E61, Da\_E12, PVESTBR268, PVESTBR247, demonstrando os reagentes utilizados, suas concentrações e volumes para um sistema de 10 µl.

Reagentes	Concentração inicial	Qtd/indivíduo
H <sub>2</sub> O mQ:	-	0,65µl
DNA	2,5ng/µL	3µl
<i>Primer F</i>	0,9µM	1,5µl
<i>Primer R</i>	0,9µM	1,5µl
Tp c/ MgCl <sub>2</sub>	10X	1µl
BSA	25mg/ml	1,3µl
dNTP's	2,5µM	0,9
Taq pol	5 U	0,15µl
TOTAL	-	10µl

**Tabela 2:** Mix de PCR padronizado para os *primers* microssatélites transferidos em *Pterodon emarginatus* marcados com fluorescência PVHEXA 17 e PVESTBR199, demonstrando os reagentes utilizados, suas concentrações e volumes para um sistema de 10 µl.

Reagentes	Concentração inicial	Qtd/indivíduo
H <sub>2</sub> O mQ:	-	0µl
DNA	2,5ng/µL	3µl
<i>Primer F</i>	0,9µM	2µl
<i>Primer R</i>	0,9µM	2µl
Tp c/ MgCl <sub>2</sub>	10X	0,95µl
BSA	25mg/ml	1µl
dNTP's	2,5µM	0,9
Taq pol	5 U	0,15µl
TOTAL	-	10µl

## Apêndice 2

### Genótipos obtidos pelos 9 locos microsátélites transferidos para *Pterodon emarginatus*

**Tabela 1:** Genótipos obtidos pelos 9 locos transferidos para *Pterodon emarginatus*

População	Indivíduo	BM164		PVCOMP17		PVESTBR199		PVESTBR67		Da_E12		Da_E61		PVESTBR247		PVESTBR268		PVHEXA4	
		alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2
PEMAGEDF	1	162	162	235	247	336	340	268	278	210	216	238	238	366	366	282	308	219	227
PEMAGEDF	2	162	162	235	245	?	?	260	270	206	210	238	238	344	366	288	308	227	227
PEMAGEDF	3	162	162	239	247	340	340	274	282	210	216	238	238	344	366	308	308	219	227
PEMAGEDF	4	162	162	239	241	336	340	268	268	210	216	240	240	366	366	308	308	219	219
PEMAGEDF	5	162	162	235	239	340	340	272	272	210	216	238	238	344	366	282	308	219	227
PEMAGEDF	6	162	162	239	243	340	340	260	272	210	216	240	240	344	344	288	308	219	227
PEMAGEDF	7	162	162	241	241	336	340	254	278	216	224	238	238	366	366	282	308	227	227
PEMAGEDF	8	162	162	235	245	?	?	260	270	206	210	238	238	344	366	288	308	227	227
PEMAGEDF	9	162	162	241	243	336	336	272	282	210	210	240	240	348	366	308	308	219	227
PEMAGEDF	10	162	162	241	241	340	340	268	282	210	216	238	238	344	344	288	308	227	227
PEMAGEDF	11	162	162	241	241	340	340	268	270	216	216	238	238	344	366	288	308	219	227
PEMAGEDF	12	162	162	241	241	336	340	268	272	210	216	236	236	366	366	308	308	219	227
PEMAGEDF	13	162	162	243	243	340	340	274	274	210	210	238	238	366	366	308	308	219	227
PEMAGEDF	14	162	162	241	241	340	340	278	280	?	?	240	240	366	366	282	288	227	227
PEMAGEDF	15	162	162	243	243	336	336	280	282	206	210	240	240	366	366	288	308	227	227
PEMAGEDF	16	162	162	239	243	340	340	260	282	210	216	238	238	344	344	308	308	219	227
PEMAGEDF	17	162	162	235	241	336	340	272	272	200	216	240	240	344	366	288	308	227	227
PEMAGEDF	18	162	162	243	243	340	340	268	272	210	216	238	244	366	366	308	308	227	227
PEMAGEDF	19	162	162	241	243	340	340	268	282	210	216	236	240	366	366	308	308	227	227
PEMAGEDF	20	162	162	241	241	?	?	272	278	216	216	238	238	344	366	288	288	219	219
PEMAGEDF	21	162	164	239	239	340	340	272	272	210	216	240	240	344	366	308	308	219	227

Continua...

Continuação...

População	Indivíduo	BM164		PVCOMP17		PVESTBR199		PVESTBR67		Da_E12		Da_E61		PVESTBR247		PVESTBR268		PVHEXA4	
		alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2
PEMAGEDF	22	162	162	241	241	340	340	268	280	216	216	238	238	344	344	308	308	219	227
PEMAGEDF	23	162	162	239	243	340	340	262	282	206	216	238	238	348	366	288	308	219	227
PEMPOTGO	1	160	160	241	241	336	336	254	272	216	216	240	240	366	366	308	308	219	227
PEMPOTGO	2	160	162	241	243	340	340	254	260	216	216	238	240	344	344	308	308	219	219
PEMPOTGO	3	160	164	241	241	336	340	272	280	210	210	238	240	366	366	308	308	219	227
PEMPOTGO	4	162	162	239	239	336	340	268	272	210	216	238	238	366	366	308	308	219	227
PEMPOTGO	5	160	162	237	245	340	340	260	272	216	216	238	238	366	366	288	320	219	227
PEMPOTGO	6	162	162	241	243	340	340	270	290	210	210	238	240	366	366	320	320	219	227
PEMPOTGO	7	160	162	241	241	336	340	254	260	210	210	238	238	344	366	308	320	227	227
PEMPOTGO	8	160	162	241	241	336	340	254	260	210	210	238	238	344	366	308	320	227	227
PEMPOTGO	9	160	162	241	241	340	340	254	278	216	216	238	238	344	366	308	320	219	227
PEMPOTGO	10	162	162	241	245	336	340	278	278	216	216	238	238	344	366	308	320	219	227
PEMPOTGO	11	162	162	241	243	340	340	272	280	216	216	238	238	344	366	308	308	219	227
PEMPOTGO	12	160	162	241	241	340	340	254	278	216	216	238	238	344	344	308	320	219	219
PEMPOTGO	13	160	162	241	241	340	340	268	272	210	210	238	238	344	366	308	320	?	?
PEMPOTGO	14	162	162	241	241	340	340	254	268	216	216	238	238	366	366	308	320	219	219
PEMPOTGO	15	160	162	241	243	336	340	268	280	216	216	238	238	344	366	308	308	219	227
PEMPOTGO	16	160	160	241	241	336	336	268	272	210	216	238	238	366	366	288	320	?	?
PEMPOTGO	17	162	162	241	247	340	340	260	278	210	210	238	238	344	366	308	308	219	227
PEMPOTGO	18	162	162	241	241	336	340	272	272	216	216	238	238	344	366	308	308	219	219
PEMPOTGO	19	162	162	241	241	336	340	278	284	206	216	238	238	344	366	282	308	219	227
PEMPOTGO	20	162	162	241	241	340	340	260	272	210	210	238	238	344	366	308	308	219	219
PEMPOTGO	21	160	164	241	241	336	336	272	280	210	216	238	238	366	366	282	320	219	227
PEMPOTGO	22	162	162	243	243	340	340	270	280	210	216	240	240	344	366	288	308	227	227
PEMPOTGO	23	160	160	241	241	336	336	268	272	210	216	238	238	344	366	288	308	219	227
PEMPOTGO	24	160	162	241	243	340	340	270	272	210	216	238	240	366	366	282	308	219	227

Continua ...

Continuação...

População	Indivíduo	BM164		PVCOMP17		PVESTBR199		PVESTBR67		Da_E12		Da_E61		PVESTBR247		PVESTBR268		PVHEXA4	
		alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2
PEMPOTGO	25	160	162	243	243	336	340	254	270	210	210	238	238	344	366	308	320	227	227
PEMPOTGO	26	162	162	241	247	340	340	268	278	216	224	238	238	366	366	282	308	227	227
PEMPOTGO	27	162	162	241	247	340	340	268	270	210	224	238	238	344	366	282	308	227	227
PEMPOTGO	28	160	162	241	245	336	336	268	290	210	216	238	238	366	366	282	308	219	219
PEMPOTGO	29	162	162	237	247	336	336	268	268	210	210	238	238	344	366	308	308	227	227
PEMPIRGO	1	162	162	241	241	336	340	268	282	?	?	236	240	344	366	282	308	219	219
PEMPIRGO	2	162	162	241	241	336	340	274	282	210	216	238	238	344	366	308	308	219	219
PEMPIRGO	3	162	162	241	241	340	340	262	282	216	224	240	240	344	366	288	308	227	227
PEMPIRGO	4	162	162	239	243	336	340	268	274	?	?	240	240	366	366	282	320	227	227
PEMPIRGO	5	162	162	235	239	336	340	254	268	216	224	240	240	344	348	288	308	227	227
PEMPIRGO	6	162	164	239	243	336	340	268	280	216	216	238	238	344	366	288	308	219	227
PEMPIRGO	7	162	162	241	241	336	340	274	282	?	?	238	240	366	366	308	308	227	227
PEMPIRGO	8	162	164	239	241	340	340	254	262	?	?	236	236	348	366	288	308	227	227
PEMPIRGO	9	162	162	243	243	336	336	274	282	?	?	238	238	344	366	282	308	219	227
PEMPIRGO	10	160	162	237	243	336	336	260	272	216	216	238	238	344	344	282	308	219	227
PEMPIRGO	11	162	162	243	243	336	336	280	282	210	216	240	240	344	366	308	308	227	227
PEMPIRGO	12	162	162	237	241	340	340	268	268	210	216	240	240	344	344	282	288	219	227
PEMPIRGO	13	164	164	235	239	336	340	280	280	210	216	240	240	344	366	308	308	227	227
PEMPIRGO	14	162	162	235	241	336	336	280	282	210	216	240	240	344	366	308	308	227	227
PEMPIRGO	15	162	162	239	241	336	340	278	280	?	?	240	240	344	366	288	320	227	227
PEMPIRGO	16	162	162	239	243	340	340	268	268	206	210	238	238	366	366	288	308	227	227
PEMPIRGO	17	164	168	243	243	336	340	260	278	216	216	238	238	344	366	308	308	227	227
PEMPIRGO	18	162	164	239	239	336	340	280	280	?	?	236	240	348	366	282	308	227	227
PEMPIRGO	19	162	164	235	243	336	340	280	282	210	210	240	240	366	366	308	308	227	227
PEMPIRGO	20	162	162	241	241	336	336	268	280	210	210	240	240	344	366	282	282	227	227
PEMPIRGO	21	162	162	235	237	336	340	274	274	216	224	240	240	366	366	308	308	227	227

Continua ...

Continuação...

População	Indivíduo	BM164		PVCOMP17		PVESTBR199		PVESTBR67		Da_E12		Da_E61		PVESTBR247		PVESTBR268		PVHEXA4	
		alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2	alelo 1	alelo 2
PEMPIRGO	22	162	162	241	241	340	340	268	280	210	210	238	238	344	366	282	288	219	227
PEMPIRGO	23	162	162	235	241	336	340	262	282	210	216	240	240	366	366	282	308	219	227
PEMPIRGO	24	162	162	241	241	336	340	272	280	210	210	238	238	344	366	288	308	227	227
PEMPIRGO	25	162	164	243	243	336	340	276	280	?	?	238	238	344	366	282	288	227	227
PEMPIRGO	26	164	164	239	239	336	336	254	280	224	224	240	240	344	348	288	288	227	227
PEMPIRGO	27	162	162	243	243	336	340	280	282	?	?	238	238	344	366	308	308	219	227
PEMPIRGO	28	162	162	241	241	336	340	274	280	216	224	238	238	366	366	308	308	227	227
PEMPIRGO	29	162	162	243	243	336	336	268	280	?	?	240	240	344	344	282	308	227	227
PEMPIRGO	30	162	164	235	241	340	340	280	280	210	210	238	240	348	366	282	308	219	227
PEMPIRGO	31	162	162	241	241	336	340	282	282	216	216	240	240	344	366	282	308	227	227
PEMPIRGO	32	162	162	235	241	340	340	278	280	210	216	238	238	366	366	308	308	219	227
PEMPIRGO	33	162	162	235	235	336	340	272	282	?	?	240	240	344	366	282	308	227	227
PEMPIRGO	34	162	164	241	241	336	336	280	280	216	216	240	240	344	366	288	308	227	227
PEMPIRGO	35	162	162	239	241	336	340	268	274	206	224	238	238	344	366	288	308	227	227
PEMPIRGO	36	162	162	241	241	340	340	274	282	216	216	240	240	344	366	288	308	227	227