

Vanessa Samara Petry

**VALIDAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E  
ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES  
DE *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari

Coorientador: Dr. Gustavo Henrique Ferrero Klabunde

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Petry, Vanessa Samara  
Validação de marcadores microssatélites e análise da diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg / Vanessa Samara Petry ; orientador, Rubens Onofre Nodari, coorientador, Gustavo Henrique Ferrero Klabunde, 2018.  
120 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Marcadores SSR. 3. Genética de populações. 4. Guabiroba. I. Nodari, Rubens Onofre. II. Klabunde, Gustavo Henrique Ferrero. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

**Validação de marcadores microssatélites e análise da diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg**

por

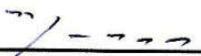
**Vanessa Samara Petry**

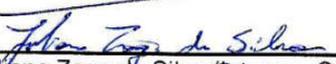
Dissertação julgada e aprovada em 19/04/2018, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Presidente - CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Adelar Mantovani (Externo - UDESC/SC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis (Interno - CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Juliano Zago da Silva (Interno - CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis, abril de 2018



Este trabalho é dedicado aos meus pais  
Bento José Petry e Rosani Prochnow  
Petry, por todo incentivo, amor e  
compreensão!



## AGRADECIMENTOS

Foi um longo caminho de trabalho árduo, com renúncias e prioridades. Caminho este que pensei em desistir por várias vezes, mas com fé e determinação consegui chegar até o fim!

Primeiro quero agradecer a Deus pela minha vida, por ter me guiado nessa jornada e ter me abençoado com tantas Graças! Agradeço meu Deus pela sabedoria e força diante de tantos momentos, sejam eles obstáculos ou conquistas!

Aos meus pais, Bento e Rosani, por todo incentivo, amor, dedicação e investimento! Obrigada por compreenderem (ou aceitarem da melhor maneira possível) a minha ausência em tantos momentos durante a minha jornada acadêmica! Obrigada por dividirem comigo as conquistas, os sorrisos e secarem as minhas lágrimas! Amo vocês!

Ao meu namorado e amigo Cassio, por todo amor, incentivo e companheirismo ao longo dessa jornada. Agradeço pelos dias alegres e tristes, sempre compartilhados lado a lado! Agradeço por ter me auxiliado a compreender tantos momentos, a evoluir, a amadurecer... Te amo!

Ao meu orientador Rubens Onofre Nodari, pela orientação desde os tempos de Graduação (*since* 2010). Agradeço pelos ensinamentos, contribuições, diálogos e pelo professor me encorajar diante de muitas situações complicadas! Foram grandiosos anos de crescimento pessoal e profissional! Agradeço também pelos churrascos dos Nodarianos, foram momentos alegres e descontraídos importantíssimos para a união do grupo de pesquisa!

Ao meu coorientador Gustavo Klabunde, por todos os ensinamentos, pela paciência, dedicação e puxões de orelha ao longo do Mestrado! Obrigada pelas preciosas contribuições repassadas para que essa pesquisa fosse desenvolvida!

À minha grande amiga Lilian, companheira de todas as horas e que foi uma ajuda preciosa no final das análises no laboratório! Gratidão minha amiga linda por todo incentivo, apoio moral e risadas! Obrigada por cada abraço e por ser esse ser de luz angelical em minha vida!

À amiga Gabriela, pelos hambúrguers e chopps no Sambaqui, regada de muita conversa, planos e sonhos! Agradeço por me ajudar e ser uma pessoa melhor e me ajudar a enxergar a vida de maneira mais serena e leve!

À tia Alzira, que além de amiga e conselheira, foi um grande porto-seguro para mim durante toda a minha jornada aqui em Florianópolis.

Ao Zelito Maraffon pela disponibilidade da área para estudo e pela parceria nos trabalhos de campo. E a Dona Ide por todas as orações!

Ao amigo Luciano, pelas inúmeras conversas, desabafos, consolos, risos e desesperos compartilhados! Agradeço a parceria nos trabalhos e no laboratório meu amigo! Obrigada por me aturar!

Aos amigos e colegas do LFDGV e do RGV: Anyela, Bianca (Lapad), Carol, Daniel, Dani, Edson, Fernandinho, Giulia, Gregorio, Ihangika, Joana, Lido, Marcia R., Marcia F., Miguel, Morgana, Newton, Tiago T., Tiago M., Thiago, Yohan, Rodrigo, Wagner. Agradeço pelos momentos compartilhados, troca de experiência, compreensão, incentivo e por todo o auxílio ao longo do Mestrado!

Aos queridos colegas do Mestrado, pelas risadas em momentos de desespero acadêmico: Catarina, Estevão, Linda, Luciano e Luiza.

Ao Newton, por ter sido um elemento chave para encontrar duas populações de Guabiroba, bem como pelas conversas, ensinamentos e críticas ao longo dessa jornada. Agradeço também pelo auxílio nas coletas em São Joaquim e São José do Cerrito.

Ao Juliano P. Gomes, pela paciência em indicar a localização da população de São José do Cerrito. E à empresa ELETROSUL pelos contatos fornecidos para que o proprietário da área fosse encontrado.

Aos queridos amigos Fernandinho e Ihangika pelo auxílio na coleta em Iomerê! Ao Alex R. Mendes pelo auxílio na coleta em São Joaquim! E ao Murilo Dalla Costa (EPAGRI) e Newton pelas coletas das Myrtaceae em Lages.

À Cristiane Wesp que não mediu esforços desde o início para identificar uma população em Iomerê, bem como auxiliar na coleta das amostras foliares e da exsicata.

Aos amigos “Les français”, pela amizade, apoio e compreensão mesmo estando tão distante. Vocês são especiais em minha vida!

Ao Rafael e à Barbara por todo o conhecimento compartilhado e pela paciência em me explicar tão bem o protocolo de poliacrilamida!

À amiga Denise Olkoski, por todos os ensinamentos teóricos e práticos na área da biologia molecular! Agradeço pelas contribuições na defesa do projeto! Obrigada pelo incentivo, amizade e apoio durante tantos anos!

Ao Luciano, Miguel e Newton pelas orientações nas análises dos eletroferogramas!

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela oportunidade em crescer profissionalmente. E aos

professores do PPGRGV, pelos ensinamentos repassados ao longo desses dois anos.

Ao Professor Mauricio, professor ético e humano, que nos compreende diante de nossas limitações humanas. Estar próxima de pessoas como você faz com que tenhamos mais força para alcançar nossos objetivos e sonhos! Agradeço pela oportunidade do convívio e do diálogo durante toda a minha permanência na UFSC.

A querida Berna, secretária maravilhosa do PPGRGV, que sempre esteve disposta a tirar as minhas dúvidas com as questões burocráticas. E também ao Newton, secretário da Fitotecnia, que sempre me atendeu com muita alegria e disposição!

Aos professores membros da banca: Adelar Mantovani, Juliano Zago da Silva e Mauricio Sedrez dos Reis pela colaboração, sugestões e correções desta Dissertação!

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao CNPQ, FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento dos trabalhos.

A todos que direta ou indiretamente também colaboraram para a realização desta pesquisa e que por um lapso de memória não constam nomeados aqui...Muito obrigada!!!

Por fim, gostaria de agradecer e também dedicar este trabalho a duas grandes guerreiras que partiram no meio da minha jornada do Mestrado: minha querida oma Edith Prochnow que entre tantas coisas me ensinou sobre a seriedade da vida e a importância e o valor da família; e a minha amada vó Tereza Maria Junckes Petry, que de maneira sempre alegre me incentivou nos estudos, a buscar pelo conhecimento, a crescer profissionalmente... Duas mulheres sábias que aceitaram a minha ausência em tantos momentos no decorrer da minha graduação e do mestrado. E que agora são anjos, as estrelas mais lindas do céu, que guiarão meu caminho e estarão sempre ao meu lado! Amor eterno...

“Há os que se queixam do vento. Os que esperam que ele mude. E os que procuram ajustar as velas”.

**William G. Ward**

## RESUMO

*Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg, popularmente conhecida como guabirobeira, é uma Myrtaceae amplamente distribuída no Brasil, ocorrendo desde Bahia, Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, bem como na Argentina, Paraguai e Uruguai. Espécie frutífera que apresenta potencial comercial, pois os frutos são suculentos, doces e aromáticos e podem ser consumidos frescos ou também podem ser utilizados para beneficiamento. Os frutos apresentam propriedades nutricionais importantes e as folhas apresentam propriedades medicinais. No entanto a utilização majoritária da espécie se dá por meio do consumo doméstico e comercialização em pequena escala por produtores rurais, notadamente em sua região de origem e disseminação natural. Pelo fato da guabirobeira também estar no bioma da Mata Atlântica, estudos genéticos são necessários para conhecer a diversidade genética existente nas populações de guabiroba devido ao alto grau de fragmentação florestal deste bioma. O conhecimento a respeito da diversidade genética desta espécie ainda é incipiente, sendo assim, o objetivo deste estudo foi validar os marcadores microssatélites nucleares e plastidiais desenvolvidos em *C. xanthocarpa* visando posterior utilização na caracterização e análise da diversidade genética intra e interpopulacional da espécie. Foram testados 77 marcadores microssatélites nucleares (SSR) e 12 plastidiais (cpSSR) obtidos a partir de sequenciamento de nova geração. Após os testes de amplificação, otimização e *screening* inicial de polimorfismos em gel de poliacrilamida, foram obtidos dez marcadores microssatélites polimórficos, sendo oito marcadores nucleares e dois plastidiais. Os dez marcadores polimórficos foram sintetizados com fluorescência para eletroforese capilar visando a caracterização da diversidade genética de quatro populações de *C. xanthocarpa* (n=200) localizadas no Estado de Santa Catarina: Coronel Freitas, Iomerê, São Joaquim e São José do Cerrito. Com relação aos SSR nucleares, o número de alelos por loco variou de dois a oito. Utilizando oito locos microssatélites, os valores de heterozigosidade observada variaram de 0,313 a 0,436 e esperada de 0,376 a 0,508 entre as populações. As populações de Coronel Freitas, Iomerê e São Joaquim apresentaram índices de fixação significativos, indicando a presença de endogamia e deriva genética. Foram identificados quatro alelos exclusivos, dois alelos na população de Coronel Freitas e outros dois na população de São José do Cerrito. Os resultados demonstraram que não há ligação entre os locos analisados ( $p < 0,05$ ). O Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) variou de 0,269 a 0,637 dentre os

oito marcadores SSR nucleares. Desvios significativos de HWE foram detectados para três locos nas populações de Coronel Freitas, São Joaquim e São José do Cerrito e em um loco na população de Iomerê. Em média, a divergência genética entre as populações foi de  $\hat{F}_{ST}=0,188$ . Com relação aos dois SSR plastidiais, o número de alelos por loco variou de dois a quatro. Os valores de diversidade de haplótipos variaram de 0,090 a 0,505 entre as populações. O Índice de Shannon variou de zero a 0,924 por loco. Foram identificados dois alelos raros na população de São Joaquim para o loco Guabi05. Além disso, foi testada a transferibilidade dos marcadores desenvolvidos para *C. xanthocarpa* em sete espécies de Myrtaceae (*Acca sellowiana*, *Campomanesia aurea*, *Eugenia pungens*, *Eugenia uniflora*, *Psidium australe*, *Psidium cattleianum* e *Psidium grandiflorum*), onde quatro marcadores apresentaram produto de amplificação nas sete espécies. Este é o primeiro estudo de desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites nucleares e plastidiais espécie-específico para *C. xanthocarpa* com potencial aplicabilidade para outras espécies. Com estes marcadores, foi possível validar e gerar informações a respeito da diversidade genética de quatro populações em Santa Catarina. Os marcadores microssatélites recém-desenvolvidos para *C. xanthocarpa* são úteis em estudos de genética de populações.

**Palavras-chave:** Guabioba. Marcadores SSR. Genética de Populações.

## ABSTRACT

*Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg, popularly known as guabirobeira, is a Myrtaceae species, widely distributed in Brazil, occurring from Minas Gerais to Rio Grande do Sul, as well as in Argentina, Paraguay and Uruguay. It is a fruit species with commercial potential because its fruit is succulent, sweet and aromatic that can be consumed fresh or processed. While the fruit has important nutritional properties, the leaves have medicinal properties. However, the major use of the species occurs through domestic consumption and small-scale commercialization by rural producers, especially in south of Brazil. Because guabirobeira occurs also in the Atlantic Forest biome, genetic studies are necessary to know the genetic diversity in the populations of guabirobeira due to the high degree of forest fragmentation of that biome. The knowledge about the genetic diversity of this species is still incipient; therefore, the objective of this study was to validate the nuclear and plastid microsatellite markers developed in *C. xanthocarpa* for later use in characterizing and analyzing the intra and interpopulational genetic diversity of this species. Previously nuclear microsatellite markers (SSR) and plastid (cpSSR) markers were obtained by Next Generation Sequencing. After amplification, optimization and initial polymorphism screening in polyacrylamide gel, out of 77 SSR and 12 cpSSR, ten polymorphic microsatellite markers were obtained, being eight nuclear and two plastid markers. The ten polymorphic markers were synthesized with fluorescent dyes in order to be genotyped in a capillary electrophoresis platform aiming the characterization of the genetic diversity of four populations of *C. xanthocarpa* (n = 200) located in the State of Santa Catarina: Coronel Freitas, Iomerê, São Joaquim and São José do Cerrito. Regarding nuclear SSR, the number of alleles per locus ranged from two to eight. Using eight microsatellite loci, the observed heterozygosity ranged from 0.313 to 0.436 and expected from 0.366 to 0.508 between populations. The populations of Coronel Freitas, Iomerê and São Joaquim presented significant indexes of fixation, indicating the existence of inbreeding. Four exclusive alleles were identified, two alleles in the population of Coronel Freitas and another two ones in the population of São José do Cerrito. The results showed that there are not linkage between analyzed loci ( $p < 0.05$ ). Polymorphic Informative Content (PIC) ranged from 0.296 to 0.637 among the eight nuclear SSR markers. Significant deviations of HWE were detected for three loci in the populations of Coronel Freitas, São Joaquim and São José do Cerrito and at one

location in the population of Iomerê. On average, the genetic divergence among the populations was  $\hat{F}_{ST} = 0.188$ . For the two plastid SSR, the number of alleles per locus ranged from two to four. The values of haplotype diversity ranged from 0.090 to 0.505 between populations. The Shannon Index ranged from zero to 0.924 per loco. Two rare alleles were identified in the São Joaquim population for the Guabi05 locus. In addition, the transferability of the markers developed for *C. xanthocarpa* in seven species of Myrtaceae (*Acca sellowiana*, *Campomanesia aurea*, *Eugenia pungens*, *Eugenia uniflora*, *Psidium australis*, *Psidium cattleianum* and *Psidium grandiflorum*) were tested and where four markers showed amplification product in the seven species. This is the first study of development and characterization of nuclear microsatellite markers and species-specific plastid for *C. xanthocarpa* with potential applicability to other species. With the use of them, it was possible to validate and generate information about the genetic diversity of four guabiropa populations from Santa Catarina. The newly developed microsatellite markers for *C. xanthocarpa* are useful in population genetic studies.

**Keywords:** Guabiropa. SSR markers. Population genetics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Mapa de ocorrência de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> .....	22
<b>Figura 3.2. A.</b> Árvore adulta de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> apresentando copa arredondada e <b>B.</b> Detalhe do tronco de <i>C. xanthocarpa</i> .....	23
<b>Figura 3.3.</b> Detalhe das folhas e frutos de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> . .....	24
<b>Figura 3.4.</b> Etapas do fluxo de desenvolvimento de marcadores microssatélites. ....	34
<b>Figura 5.1.</b> Mapa de Santa Catarina indicando a localização das quatro populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> coletadas. ....	66
<b>Figura 5.2.</b> Representação gráfica do Teste de Mantel entre as distâncias genéticas ( $F_{ST}$ ) e as distâncias geográficas para as quatro populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> de Santa Catarina .....	84
<b>Figura 5.3.</b> Dendrograma com base no método de agrupamento UPGMA com base das distâncias genéticas de Nei (1978) das quatro populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> em Santa Catarina a partir dos oito locos microssatélites. ....	84



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 5.1.</b> Localização geográfica, altitude e descrição das áreas onde foram coletadas amostras de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> em Santa Catarina. ....	66
<b>Tabela 5.2.</b> Informações das exsicatas das quatro populações amostradas de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> depositadas no Herbário FLOR e no Herbário LUSC. ....	67
<b>Tabela 5.3.</b> Características dos 10 locos microssatélites de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> utilizados neste trabalho. ....	69
<b>Tabela 5.4.</b> Concentração dos componentes da reação de amplificação dos distintos iniciadores microssatélites para as reações em Multiplex utilizando o MasterMix QIAGEN. ....	71
<b>Tabela 5.5.</b> Concentração dos componentes da reação de amplificação dos distintos iniciadores microssatélites. ....	72
<b>Tabela 5.6.</b> Frequências alélicas para os oito locos microssatélites nucleares e para os dois locos microssatélites plastidiais em quatro populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> de Santa Catarina. ....	76
<b>Tabela 5.7.</b> Identificação dos alelos exclusivos encontrados nos locos microssatélites nucleares das quatro populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> de Santa Catarina. ....	77
<b>Tabela 5.8.</b> Identificação dos alelos raros encontrados nos locos microssatélites nucleares e plastidiais em quatro populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> de Santa Catarina. ....	78
<b>Tabela 5.9.</b> Numero de alelos por loco ( $A$ ), heterozigosidade média observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ), significância estatística do teste do equilíbrio Hardy-Weinberg e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) para os oito locos microssatélites nucleares em quatro populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> de Santa Catarina. ....	80
<b>Tabela 5.10.</b> Índices de diversidade genética para as quatro populações de <i>Campomanesia xanthocarpa</i> de Santa Catarina a partir da utilização de oito locos microssatélites nucleares. $n$ = tamanho amostral; $k$ = número total de alelos; $P_{(99\%)}$ = porcentagem de locos polimórficos; $A$ = número médio de alelos por loco; $A_p$ = número médio de alelos por loco polimórfico; $H_E$ = heterozigosidade esperada; $H_O$ = heterozigosidade	

observada;  $f$  = índice de fixação; A.R. = alelos raros; A.E. = alelos exclusivos. (<sup>ns</sup>= não significativo; \* =  $p < 0,05$ ) ..... 82

**Tabela 5.11.** Estimativa das estatísticas F de Wright para o conjunto de quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* em Santa Catarina a partir da utilização de oito locos microssatélites nucleares.  $F_{IS}$  = índice de fixação médio dentro da população;  $F_{IT}$  = índice de fixação total;  $F_{ST}$  = índice de fixação devido à subdivisão; IC = intervalo de confiança; \*= $p < 0,05$  ..... 83

**Tabela 5.12.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* de Santa Catarina a partir da utilização de oito locos microssatélites nucleares. .... 83

**Tabela 5.13.** Índices de diversidade para os dois locos microssatélites plastidiais em quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* de Santa Catarina.  $n$  = tamanho amostral;  $A$  = número de alelos;  $h$  = diversidade de haplótipos;  $I$  = Índice de Shannon. .... 86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**BAG** – Banco Ativo de Germoplasma

**bp** – *Base pairs* – Pares de base

**cpSSR** - Marcador molecular SSR localizado no genoma plastidial

**CTAB** – *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*

**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico

**GPS** - *Global Positioning System*

**LFDGV** - Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal

**mg** – Miligrama

**min** - Minuto

**mL** – Mililitro

**mM** – Milimolar

**NGS** - *Next Generation Sequencing* – Sequenciamento de Nova Geração

**PAGE** - *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

**pb** – Pares de base

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase

**PIC** – *Polymorphism Information Content* - Conteúdo de Informação de Polimorfismo

**RNAse** – Nucleases que catalisam a degradação do ácido ribonucleico  
s – Segundo

**SSR** – *Simple Sequence Repeats* - Sequências Repetidas Simples

**TD** – *Touchdown*

**UDESC** – Universidade do Estado de Santa Catarina

**UFSC** – Universidade Federal de Santa Catarina

**µg** – Micrograma

**µL** – Microlitro

**µM** - Micromolar



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo geral .....	19
2.1.1 Objetivos específicos .....	19
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>21</b>
3.1 A espécie <i>Campomanesia xanthocarpa</i> .....	21
3.2 Diversidade genética dos recursos vegetais .....	27
3.3 Marcadores moleculares microssatélites .....	31
3.3.1 Características gerais dos microssatélites .....	31
3.3.2 Desenvolvimento de microssatélites .....	33
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>
<b>4 CAPÍTULO I .....</b>	<b>47</b>
Abstract .....	48
4.1 Introduction .....	49
4.2 Methods and Results .....	50
4.3 Conclusions .....	53
4.4 Literature cited .....	53
4.5 Tables .....	57
4.6 Figure .....	61
4.7 Appendix .....	61
<b>5 CAPÍTULO II .....</b>	<b>62</b>
5.1 Introdução .....	63
5.2 Material e Métodos .....	65
5.2.1 Amplificação e Genotipagem .....	67
5.2.2 Análise dos dados .....	73
5.3 Resultados .....	76
5.4 Discussão .....	87
5.5 Conclusões .....	95
5.6 Referências Bibliográficas .....	96
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>103</b>
<b>APÊNDICE A – Distribuição das plantas dentro das populações amostradas .....</b>	<b>104</b>
<b>APÊNDICE B – Detalhamento do procedimento de extração de DNA proposto por Doyle e Doyle (1990), com modificações .....</b>	<b>106</b>
<b>APÊNDICE C – Relação dos marcadores SSR testados .....</b>	<b>107</b>
<b>APÊNDICE D – Configuração do programa TD (<i>touchdown</i>) .....</b>	<b>117</b>
<b>APÊNDICE E – Protocolo de eletroforese de gel desnaturante de poliacrilamida proposto por Albright e Slatko (2000), modificado .....</b>	<b>118</b>



## 1 INTRODUÇÃO

*Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg (Myrtaceae) é uma árvore frutífera, popularmente conhecida como guabirobeira, guabiroba e gabiroba. Esta espécie é amplamente distribuída no Brasil, ocorrendo desde Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, bem como na Argentina, Paraguai e Uruguai.

A utilização majoritária dos frutos da espécie se dá por meio do consumo doméstico e comercialização em pequena escala por produtores rurais, notadamente em sua área de ocorrência. Contudo, é um recurso genético com potencial para exploração sustentável em maior escala, como uma nova opção de cultivo e alternativa de renda aos agricultores que ainda não a utilizam.

Os frutos desta espécie são suculentos, doces e aromáticos e podem ser consumidos *in natura* ou também podem ser usados na fabricação de sucos, geleias, sorvetes, licores, dentre outros produtos que podem ser uma alternativa para o escoamento da produção frutícola. De particular importância, os frutos possuem importantes propriedades medicinais e são indicados como alimentos funcionais. Algumas espécies de aves e mamíferos também consomem os frutos e, assim, disseminam as sementes, sendo, portanto um importante mecanismo de dispersão de alelos. Além disso, *C. xanthocarpa* pode ser indicada como ornamental e para plantio em áreas degradadas, além de ser uma opção para inclusão em sistemas agroflorestais (SAFs), aliado a um contexto de valorização da diversificação com espécies nativas.

Estudos genéticos são necessários para conhecer o cenário atual das populações de guabiroba devido ao alto grau de fragmentação das florestas, de maneira especial a Mata Atlântica, bioma na qual a espécie é encontrada. Especificadamente, estudos genéticos utilizando marcadores microssatélites poderão ser realizados com o objetivo de gerar informações sobre a dinâmica populacional e diversidade genética para, assim, auxiliar futuramente na elaboração de estratégias de conservação e uso sustentável da espécie.

Os marcadores microssatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*), são marcadores moleculares eficientes para gerar informações que auxiliam em diversos estudos genéticos, como: análise e caracterização da diversidade genética, mapeamento genético, estudos de genética de população, estudos evolutivos, filogeografia e filogenética. As regiões microssatélites estão amplamente distribuídas no genoma nuclear dos eucariotos, além de também serem encontrados no genoma plastidial. Os marcadores SSRs genômicos são

codominantes, altamente polimórficos, informativos e multialélicos, além de serem potencialmente transferíveis entre espécies. O genoma plastidial apresenta herança uniparental, ausência de recombinação e é conservado, sendo os microssatélites plastidiais indicados para utilização em estudos evolutivos, filogeográficos, filogenéticos e de fluxo gênico.

Até o momento, não há registro na literatura de marcadores microssatélites desenvolvidos em *C. xanthocarpa*, sendo assim, com a caracterização e validação dos marcadores SSRs espécie-específicos, estudos genéticos poderão ser realizados utilizando essas marcas e assim avançar na caracterização genética da espécie que se apresenta como um recurso nativo promissor e de relevância ecológica. Além disso, os marcadores desenvolvidos para *C. xanthocarpa* se apresentam como uma ferramenta promissora à transferibilidade e utilização em outras espécies do gênero *Campomanesia* e da família Myrtaceae.

O presente estudo está organizado em dois capítulos, precedidos pela revisão bibliográfica. O primeiro aborda o desenvolvimento e a validação dos primeiros marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie. O segundo capítulo descreve a aplicação destes marcadores SSR na caracterização e análise da diversidade genética de quatro populações de *C. xanthocarpa* amostradas no Estado de Santa Catarina.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Validar os marcadores microssatélites e analisar a diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa*.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- a) Validar os marcadores microssatélites nucleares e plastidiais desenvolvidos em *C. xanthocarpa*;
- b) Testar a transferibilidade dos marcadores polimórficos validados para outras espécies da família Myrtaceae;
- c) Caracterizar e analisar a diversidade genética intra e interpopulacional de *C. xanthocarpa* em quatro populações de Santa Catarina, utilizando os marcadores microssatélites nucleares e plastidiais desenvolvidos para a espécie.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A espécie *Campomanesia xanthocarpa*

O Brasil é um país megadiverso e, por isso, abriga relevante quantidade de recursos fitogenéticos; entretanto, a maioria destes ainda é pouco conhecida ou pesquisada. A região sul do Brasil apresenta uma grande diversidade de espécies vegetais de ocorrência natural que podem ser enquadradas em distintos grupos funcionais, visto que dentre o grupo das espécies alimentícias, as frutíferas se destacam por apresentarem elevado potencial econômico devido à diversidade de produtos que podem ser feitos a partir do beneficiamento dos frutos na indústria (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

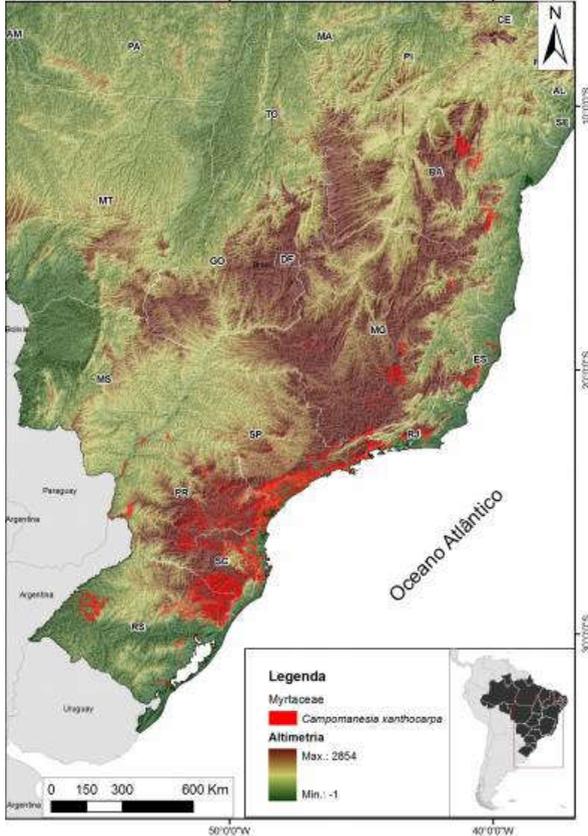
Dentre as espécies frutíferas de ocorrência natural no sul do Brasil, encontra-se a *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg, espécie alimentícia que apresenta potencial para ser utilizada como uma opção de cultivo em escala comercial na agricultura familiar, assim como uma oportunidade de investimento para o setor da agroindústria (LISBÔA; KINUPP; BARROS, 2011). Esta espécie da família Myrtaceae é conhecida popularmente como guabirobeira, guabiroba, gabirobeira, gabiroba, guavirobeira, guaviroba, guavirova, e apresenta as seguintes sinonímias botânicas: *Eugenia xanthocarpa* Mart., *Campomanesia crenata* O. Berg, *Campomanesia dusenii* Kausel, *Campomanesia malifolia* O. Berg, *Campomanesia rhombea* O. Berg, *Eugenia variabilis* Mart. e *Psidium malifolium* (O.Berg) F. Muell. (REFLORA, 2017).

Segundo Legrand; Klein (1977), o significado de *xanthocarpa* vem do grego, onde *xantho*=amarelo, e *carpo*=fruta, portanto, fruta amarela. De acordo com Donadio et al. (2002), o nome indígena para guabiroba é *wa'bi rob*, que significa fruto amargo. Para os Xokleng, a *C. xanthocarpa* era denominada de *pãnvó* (HEINEBERG, 2014).

A espécie apresenta ampla distribuição geográfica (Figura 3.1), pois ocorre desde o Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) até o Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) (CNCFlora, 2017; REFLORA, 2017), assim como ocorre também na Argentina, Paraguai e Uruguai (LEGRAND; KLEIN, 1977) e Bolívia (LISBÔA; KINUPP; BARROS, 2011). Ainda de acordo com Reflora (2017), há possibilidade de ocorrência da espécie no Nordeste (Bahia) e no Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso do Sul). As guabirobeiras são encontradas no domínio fitogeográfico da Mata Atlântica (REFLORA, 2017) e do Cerrado (SOBRAL et al.,

2015), sendo bastante frequente na Floresta Ombrófila Mista (REITZ; KLEIN; REIS, 1988).

**Figura 3.1.** Mapa de ocorrência de *Campomanesia xanthocarpa*.

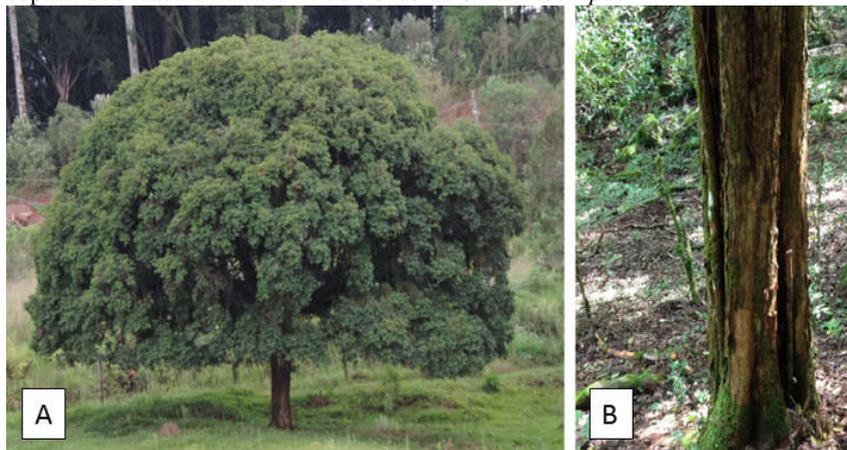


Fonte: CNCFlora (2017).

*C. xanthocarpa* é uma espécie considerada de boa adaptabilidade (SANCHOTENE, 1989), pois é seletiva higrófito e mesófito até heliófito, com abundância em locais com solos úmidos e compactos das matas de altitude (semidecídua e de pinhais), comum na floresta latifoliada semidecídua da bacia do Paraná e rara na mata pluvial da encosta atlântica (LEGRAND; KLEIN, 1977; REITZ; KLEIN; REIS, 1988). De acordo com Klauberg et al. (2010), pertence ao grupo ecológico de secundárias e climácicas.

A guabirobeira é uma árvore semidecidual que pode alcançar de 10 a 25 m de altura e diâmetro do caule de 0,3 a 0,7 m. A copa é arredondada (Figura 3.2.A) com densa folhagem de coloração verde-escura na parte superior das folhas e verde-clara na parte inferior. O tronco apresenta caneluras (Figura 3.2.B) com deiscência em tiras finas, casca pardo-acinzentada e ramos glabros amarelo-claros ou acinzentados (LEGRAND; KLEIN, 1977; REITZ; KLEIN; REIS, 1988; MARCHIORI; SOBRAL, 1997). As folhas são classificadas como simples, opostas, limbo ovalado-oblongo, ápice agudo ou acuminado e base aguda, por vezes assimétrica. Possuem tamanho que varia de 3,5 a 10 cm de comprimento por 2,5 a 5 cm de largura. A consistência das folhas se apresenta como membranácea e as nervuras estão impressas na face adaxial das folhas e muito salientes na face abaxial (Figura 3.3). A flor pode se apresentar solitária ou agrupada sobre os ramos laterais, flores hermafroditas e de coloração branca com cinco pétalas obovadas. A floração ocorre de setembro a novembro (LEGRAND; KLEIN, 1977; REITZ; KLEIN; REIS, 1988; MARCHIORI; SOBRAL, 1997). A espécie apresenta fecundação cruzada com barreira à autofecundação, sendo a incompatibilidade homomórfica gametofítica o mecanismo que melhor explica este comportamento (SANTOS, 2013).

**Figura 3.2.** A. Árvore adulta de *Campomanesia xanthocarpa* apresentando copa arredondada e B. Detalhe do tronco de *C. xanthocarpa*.



Fonte: Vanessa Samara Petry (2017).

Os frutos comestíveis são bagas globosas, coroados por sépalas, medem cerca de 2 a 3 cm de diâmetro, com epicarpo liso e fino (Figura 3.3). A maturação dos frutos ocorre de novembro a dezembro, onde a coloração do epicarpo passa do verde para amarelo ou alaranjado. O endocarpo é succulento, doce e levemente aromático, contendo muitas sementes ovaladas e achatadas (LEGRAND; KLEIN, 1977; REITZ; KLEIN; REIS, 1988; SANCHOTENE, 1985; MARCHIORI; SOBRAL, 1997). As sementes de guabiroba possuem diâmetro médio longitudinal e transversal de 0,77 cm e 0,62 cm, respectivamente (WESP, 2014).

**Figura 3.3.** Detalhe das folhas e frutos de *Campomanesia xanthocarpa*.



Fonte: APREMAVI (2017).

Os frutos da guabiroba são saborosos e contém grande quantidade de vitaminas e propriedades nutricionais importantes (VALLILO et al., 2008; SANTOS et al., 2009), podendo ser consumidos *in natura* ou na fabricação de produtos beneficiados como, por exemplo, sucos, geleias, licores e sorvetes (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; LISBÔA; KINUPP; BARROS, 2011; SANTOS, 2011), promovendo assim uma alternativa de uso para o setor frutícola. Além de apresentar potencial para a indústria alimentícia devido à presença de diferentes tipos de pectinas nos frutos (SANTOS et al., 2009), a planta também apresenta potencial no âmbito nutracêutico, visto que os frutos apresentam grandes quantidades de compostos bioativos com propriedades antioxidantes

importantes (KLAFKE et al., 2010; PEREIRA, 2011). Segundo Santos et al. (2009), os frutos de guabiroba podem ser considerados como alimento funcional, devido às quantidades significativas de compostos fenólicos (1616 ppm/100g), vitamina C (233,56 mg/100g) e sais minerais encontrados (VALLILO et al., 2008). Os compostos voláteis dos frutos foram estudados por Ferreira et al. (2015), que revelaram notas verdes e doces como os principais odores descritos no aroma da guabiroba.

As folhas e casca do caule são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de problemas digestivos, gástricos e inflamatórios (CORREA, 1984; ALICE et al., 1995). Além disso, Sens (2002) relata a utilização das folhas de guabiroba pelos índios Xokleng (da Terra Indígena Ibirama/SC), com o objetivo de facilitar o parto e estimular a produção de leite.

Estudos científicos realizados com folhas de guabirobeira comprovaram as propriedades farmacológicas da espécie. Foi verificada a presença de flavonóides, saponinas, taninos e terpenos em folhas de *C. xanthocarpa* (KLAFKE et al., 2010; SANT'ANNA et al., 2017), compostos estes que estão relacionados aos efeitos gastroprotetivos verificados por Markman et al. (2004). Os estudos científicos também relataram o potencial efeito redutor dos níveis de colesterol no sangue (KLAFKE et al., 2010), e comprovaram a redução de estresse oxidativo e processos inflamatórios (KLAFKE et al., 2010; VIECILI et al., 2014). Além disso, também foi verificada atividade antimicrobiana dos extratos foliares de guabiroba (DESOTI et al., 2011).

A guabirobeira apresenta importância ecológica pelo fato de suas flores serem consideradas melíferas, onde Knoll et al. (1993) *apud* Gressler et al. (2006) apresentaram as abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponinae) como visitantes florais da guabirobeira. Além disso, os frutos de *C. xanthocarpa* servem de alimento para pequenos animais mamíferos e aves, contribuindo assim para a dispersão das sementes (REITZ; KLEIN; REIS, 1988).

Gressler et al. (2006), a partir de um artigo de revisão, citam como dispersores de sementes de guabiroba, as aves, mamíferos carnívoros, macacos (BRISOLA, 1993; CUNHA, 1994; FIALHO; SETZ, 2000; GALETTI et al., 1997; GASPARELLO, 1997), e ungulados (MIKICH, 2000; MIRANDA; PASSOS, 2004). Com relação às aves, normalmente são aves de grande porte que são dispersoras, como por exemplo, o jacu (*Penelope supercilialis* Temminck, 1815) (GRESSLER et al., 2006).

Segundo Schmitz et al. (2013), povos indígenas usufruíam da presença da guabiroba e de outras espécies frutíferas da família Myrtaceae (como por exemplo, guabiju - *Myrciantes pungens* e Araçá - *Psidium cattleianum*), pois estas atraíam mamíferos e aves para perto do acampamento.

Apesar da quiropterocoria não ser relatada em guabiroba, Sekiama et al. (2011) verificaram o consumo dos frutos por morcegos da espécie *Artibeus lituratus*, onde também auxiliaram na dispersão das sementes.

A espécie pode ser indicada para ornamentação paisagística, plantio em áreas degradadas e reflorestamento, além de ser uma opção para inclusão em sistemas agroflorestais, em um contexto de valorização da diversificação com espécies nativas (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; VALLILO et al., 2008; WESP, 2014; CETAP, 2015). A madeira é considerada dura (com 860 a 930 kg/m<sup>3</sup> de densidade) e pode ser utilizada para tabuados em geral, fabricação de instrumentos musicais e de cabos para ferramentas. É indicada para lenha e carvão, sendo que ao passar por combustão, a madeira exala um aroma agradável (MARCHIORI; SOBRAL, 1997).

A maioria das espécies frutíferas apresenta potencial comercial, como é o caso da guabiroba que produz frutos de valor econômico potencial devido ao sabor diferenciado e à diversidade e apelo medicinal de seus produtos. Entretanto, de maneira geral, a utilização da espécie ainda é restrita, sendo assim oportuna a tomada de medidas para promover e expandir o uso e a comercialização dos frutos, dentre elas, o fortalecimento da cadeia produtiva, concomitantemente com o desenvolvimento de pesquisas para este recurso genético.

De acordo com Lisbôa et al. (2011) não há indicação de que existem plantios comerciais de guabirobeira. Há, contudo, exploração extrativista e manejo sustentável da espécie, como por exemplo, para produção e comercialização de suco concentrado em Antônio Prado, no Rio Grande do Sul, o que se constitui, aos agricultores locais, uma alternativa de renda. Ainda no Rio Grande do Sul, o Centro de Tecnologias Alternativas Populares (CETAP) vem promovendo a inserção de espécies frutíferas nativas nos sistemas agrícolas das famílias de agricultores na região dos Campos de Cima da Serra (região localizada no extremo nordeste do Rio Grande do Sul), com o objetivo conciliar produção, conservação e cuidado ambiental aliada à construção de cadeias produtivas solidárias e agroecológicas. Com isso, as famílias geram renda a partir dos subprodutos como picolés e sucos feitos a

partir da polpa das frutas nativas da região, como por exemplo, a guabiroba (CETAP, 2015).

Sendo assim, apesar deste recurso genético nativo apresentar potencial agrícola, ainda são necessários estudos para o avanço no conhecimento da espécie, tanto no âmbito agrônomo, como genético, de fisiologia e de conservação.

### **3.2 Diversidade genética dos recursos vegetais**

O território brasileiro é subdividido em seis biomas continentais: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (IBGE, 2004), dos quais o Cerrado e Mata Atlântica são considerados *hotspots* da biodiversidade, devido à grande quantidade de espécies endêmicas encontradas em fragmentos florestais reduzidos devido a degradação ambiental, portanto, ameaçadas, sendo assim áreas prioritárias para ações de conservação (MYERS et al., 2000). A Mata Atlântica está distribuída em 17 Estados brasileiros (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí), visto que originalmente ocupava cerca de 1.300.000 Km<sup>2</sup> e, atualmente, restam apenas cerca de 11 a 16% da cobertura da Mata Atlântica (MITTERMEIER et al., 2005; RIBEIRO et al., 2009). De acordo com o SOS Mata Atlântica/INPE (2016), é possível contabilizar 12,5% de remanescente florestal, considerando os fragmentos de floresta acima de três hectares.

O aumento do número de fragmentos florestais, bem como diminuição destas áreas e um maior isolamento destes fragmentos resultam em mudanças consideráveis na estrutura da paisagem (FAHRIG, 2003), podendo ocasionar a redução de populações, alteração do fluxo gênico, aumento da endogamia e deriva genética das espécies, alterando assim a diversidade genética das espécies (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996; KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998).

A temática sobre o avanço da agricultura e da urbanização nas áreas remanescentes de Mata Atlântica já é conhecido e amplamente discutido. Vibrans et al. (2008) destaca a exploração madeireira, a agricultura, a pecuária, os reflorestamentos com espécies exóticas e a própria expansão das cidades como os grandes causadores da redução florestal. No período de 2015 a 2016 os Estados que mais devastaram o bioma foram: Bahia, Minas Gerais, Paraná, Piauí e Santa Catarina (SOS Mata Atlântica/INPE, 2016). Esta degradação ambiental e consequente

fragmentação florestal trazem consequências negativas sérias e crescentes para a biodiversidade, como por exemplo, o risco de extinção de espécies endêmicas devido à perda de diversidade genética (MITTERMEIER et al., 2005; FRANKHAM, 2005).

Segundo Ribeiro et al. (2009), ações de conservação da biodiversidade e de restauração devem ser realizadas imediatamente na Mata Atlântica, devido ao alto grau de fragmentação observado. Outras ações que podem afetar negativamente a biodiversidade são as mudanças do clima, a poluição, a exploração não sustentável dos recursos naturais e a inclusão de espécies exóticas em substituição das espécies nativas (BRASIL, 2003; GUERRA; NODARI, 2014).

Para Hughes et al. (2008), a diversidade genética é considerada um componente-chave da biodiversidade, não somente importante em processos evolutivos, como também interfere em processos ecológicos. As variações morfológicas, fisiológicas e comportamentais entre plantas e populações são consideradas relevantes diante das pressões de seleção do ambiente, sendo essas variações resultantes da variabilidade de alelos presentes na população (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996). Assim, em termos de definição, a diversidade genética quantifica essa variabilidade genética existente (HUGHES et al., 2008).

Atualmente, com o desenvolvimento de ferramentas moleculares, é possível quantificar e caracterizar a diversidade genética das populações a partir de índices genéticos comumente utilizados em estudos de genética de populações, tais como: as frequências de genótipos e alelos, a proporção de loci polimórficos, a heterozigosidade observada e esperada ou ainda por meio do parâmetro de diversidade alélica (TORO; CABALLERO, 2005). A riqueza alélica é um componente extremamente afetado pelas mudanças no tamanho populacional, e é caracterizado pelo número de alelos existentes na amostra (NAMKOONG et al., 2005), sendo este parâmetro considerado relevante para estudos em programas de conservação (PETIT; EL MOUSADIK; PONS, 1998). Entretanto, o índice mais conhecido e utilizado é a heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), denominada também como diversidade genética de Nei (1973). De maneira geral, estudar a genética de populações auxilia na análise de quais forças micro evolutivas e de que maneira estão afetando as populações estudadas.

O princípio de Hardy-Weinberg considera que quando a população é grande e há acasalamento ao acaso, as frequências alélicas e genotípicas permanecem constantes de geração após geração, na ausência de mutação, seleção e migração (HARTL; CLARK, 2010). Entretanto, se não houver equilíbrio, as forças micro evolutivas podem

estar afetando a população. Para verificar se há um desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, pode-se utilizar a fórmula do índice de fixação ( $f$ ) ( $f = (H_E - H_O) / H_E$ ), em que  $H_O$  é a frequência observada e  $H_E$  é a frequência esperada de heterozigotos na população (HARTL; CLARK, 2010). E assim, quando houver excesso de homozigotos na população, há indicativo de que há endogamia e deriva genética ocorrendo.

A endogamia é um termo que se refere ao acasalamento entre indivíduos aparentados (que apresentam ascendência em comum), sendo assim, um dos principais efeitos da endogamia na população é a diminuição na frequência de genótipos heterozigotos nas próximas gerações (HARTL; CLARK, 2010).

A outra força micro evolutiva denominada de deriva genética, refere-se às flutuações casuais que ocorrem devido à amostragem aleatória de gametas em cada geração, decorrente de restrições nos tamanhos populacionais. A longo prazo, a tendência é que ocorra a redução de heterozigotos e aumento dos homozigotos, onde os alelos podem ser fixados e perdidos na população (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998).

Outros parâmetros são utilizados quando se estuda a estrutura genética de populações, visando compreender a divergência existente entre e dentro das populações e a quantidade de fixação que está ocorrendo. Um dos métodos é por meio das estatísticas  $F$  de Wright (WRIGHT, 1950), onde há caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as subpopulações ( $F_{ST}$ ), assim como o índice de fixação médio ( $F_{IS}$ ) e no conjunto total das subpopulações ( $F_{IT}$ ), com base em medidas de probabilidade de identidade por descendência. Nei (1973) propôs uma adaptação da metodologia que acomodasse locos multialélicos para a análise da diversidade em populações subdivididas, onde  $H_T$  representa a diversidade genética total da população (heterozigosidade total),  $H_S$  corresponde à heterozigosidade média das subpopulações e o  $G_{ST}$  é um estimador de divergência interpopulacional que deriva de  $H_T$  e  $H_S$ .

Estudar e compreender a variabilidade genética existente nas populações é fundamental para avaliar de que maneira essa variabilidade pode ser mantida ou aumentada. O potencial evolutivo de cada espécie está diretamente relacionado com a diversidade genética existente, sendo esta imprescindível para a capacidade adaptativa das espécies frente às mudanças ambientais (FRANKHAM, 2005).

Além da caracterização fenotípica (WESP, 2014), a caracterização genética das guabirobeiras encontradas na área de distribuição da espécie é extremamente relevante e fornecerá subsídios

para as ações de conservação que se complementem, seja *in situ/on farm* e *ex situ*. Porém, avançar na caracterização genética contribui não somente para a conservação da variabilidade genética da espécie, como também possibilitará que essas informações possam ser utilizadas futuramente em programas de melhoramento genético e no desenvolvimento de sistemas de produção (CARVALHO et al., 2002).

De acordo com Barbieri et al. (2005), há dez acessos de *C. xanthocarpa* conservados a campo no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Frutas Nativas do Sul do Brasil, mantido pela Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS). O principal objetivo deste BAG é estudar o potencial das espécies para promover a inserção das espécies nativas em pequenas propriedades agrícolas. Em Santa Catarina, a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) também possui uma pequena coleção contendo seis acessos de *C. xanthocarpa* conservados a campo no município de Lages (Marlise Nara Ciotta, comunicação pessoal). Entretanto, verifica-se a necessidade de um BAG de *C. xanthocarpa* que represente a variabilidade genética existente para fins de conservação deste recurso genético vegetal nativo distribuído nas áreas com biodiversidade ameaçada.

A literatura é escassa em termos de estudos genéticos para algumas espécies nativas, como é o caso de *C. xanthocarpa*, o que reforça a necessidade de gerar informações sobre a variabilidade genética existente nas populações encontradas nos remanescente da Mata Atlântica. Silva (2012) analisou a diversidade genética de três populações de *C. xanthocarpa* no Paraná, na região de Guarapuava, utilizando marcadores moleculares do tipo ISSR (*inter simple sequence repeat*) e marcadores SSR desenvolvidos em *Eucalyptus* spp., *Eugenia uniflora* e *Melaleuca alternifolia*. O autor constatou perda de variabilidade genética em uma das populações, possivelmente explicado pelo isolamento e redução das populações devido à fragmentação florestal.

Nas demais áreas de ocorrência da espécie, não há registro de caracterização e análise genética da diversidade de populações de *C. xanthocarpa*. Apenas há o registro de estudos de genética de populações de outras espécies do mesmo gênero na região do Cerrado (MIRANDA, 2014; VASCONCELOS, 2016). Miranda et al. (2016), a partir de um estudo de transferibilidade de microssatélites provenientes de regiões gênicas (EST-SSR), validaram 12 EST-SSR transferidos de *Eucalyptus* para *C. adamantium* e *C. pubescens* e analisaram a diversidade genética em duas populações (n=20) de cada espécie. Nesse estudo, Miranda et al. (2016) concluíram que as populações estudadas apresentaram

estrutura genética populacional significativa, onde ambas espécies apresentaram valores altos de heterozigosidade observada e não foi detectado endogamia. E Vasconcelos (2016) investigou a variabilidade genética de cinco populações de *C. adamantium* utilizando sete marcadores EST-SSR transferidos de *Eucalyptus*. A autora verificou que todas as cinco populações apresentaram altos níveis de riqueza alélica e diversidade genética, além de um baixo nível de endogamia e baixo nível de diferenciação interpopulacional, demonstrando assim a importância da conservação destas populações.

Além disso, há estudos de variabilidade genética de *Campomanesia* spp em Goiás, onde Assis (2011) analisou a diversidade genética de 140 matrizes provenientes de populações nativas de guabirobeiras (*Campomanesia* spp) em Goiás, utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD. Assis (2011) verificou grande variabilidade entre os genótipos estudados, demonstrando a importância da implantação desta coleção base de guabirobeiras na Universidade Federal de Goiás. E Estevão (2016), utilizando marcadores do tipo ISSR, caracterizou a variabilidade genética de 93 genótipos desta coleção de germoplasma de *Campomanesia* spp da Universidade Federal de Goiás.

Portanto, é premente a necessidade de estudos genéticos detalhados para conhecer o cenário atual das populações de *C. xanthocarpa* em toda sua área de ocorrência, devido ao alto grau de fragmentação da Mata Atlântica.

### **3.3 Marcadores moleculares microssatélites**

#### **3.3.1 Características gerais dos microssatélites**

Em análises genéticas, diversas são as opções de marcadores moleculares que podem ser utilizados para identificação de polimorfismos no nível de DNA. No entanto, é possível verificar que grande parte dos estudos baseados em genética molecular como, por exemplo, os estudos de genética de populações e fluxo gênico, utilizam amplamente os marcadores moleculares do tipo microssatélite, também conhecidos como *Simple Sequence Repeats* – SSR (ou ainda *Short Tandem Repeats* - STR e *Variable Number Tandem Repeats* - VNTR) (SELKOE; TOONEN, 2006). Os SSRs apresentam sequências motivo (*sequence motif*) curtas, variando de um a seis nucleotídeos que se repetem em *tandem* (FIELD; WILLS, 1996).

De acordo com o tipo da *sequence motif*, podem ser classificados como perfeito, imperfeito, interrompido ou composto, assim sendo: i) perfeito, quando a sequência da repetição é composta de um único motivo sem ser interrompida por qualquer outro nucleotídeo (exemplo:  $[GA]_7 = GAGAGAGAGAGAGA$ ); ii) imperfeito, quando há um par de bases entre as repetições (exemplo:  $GAGAGACTGAGAGAGA$ ); iii) interrompido quando há uma sequência de alguns pares de bases inserida na *sequence motif* (exemplo:  $GAGAGACGCTGGAGAGAGA$ ); ou iv) composto, quando há múltiplas sequências repetidas adjacentes e distintas (exemplo:  $GAGAGAGAGAGTGTGTGTGT$  (OLIVEIRA et al., 2006)).

Os microssatélites estão amplamente distribuídos no genoma nuclear dos eucariotos, além de também serem encontrados no genoma plastidial (POWELL et al., 1995; WANG; BARKLEY; JENKINS, 2009). Podem estar em regiões codantes e não-codantes, onde os SSRs provenientes das regiões codantes são denominados de SSRs gênicos, ou EST-SSR (*Expressed Sequence Tag*), e os SSRs provenientes das regiões não codantes são denominados de SSRs genômicos (VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005). No entanto, verifica-se menor ocorrência de SSRs nas regiões codantes (VIEIRA, 2016).

Os SSRs genômicos são codominantes, altamente polimórficos, informativos e multialélicos, onde as regiões contendo as marcas SSRs são amplificadas via reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) (POWELL; MACHRAY; PROVAN, 1996). Os SSRs apresentam potencial de transferência entre espécies (VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005).

Os marcadores SSRs são ferramentas extremamente úteis para diversos estudos genéticos, tais como: análise e caracterização da diversidade genética, mapeamento genético, seleção assistida por marcadores, identificação de QTLs (*quantitative trait loci*), estudos de genética de população, estudos evolutivos, testes de paternidade, fluxo gênico, filogeografia e filogenética (POWELL; MACHRAY; PROVAN, 1996; VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005; WANG; BARKLEY; JENKINS, 2009; VIEIRA et al., 2016).

Uma das discussões que se tem observado na literatura é referente à alta taxa de mutação observada nos microssatélites, que por sua vez, resulta na alta diversidade alélica destes marcadores moleculares (SELKOE; TOONEN, 2006). Segundo Schlötterer (2000), as taxas de mutação dos SSRs variam entre  $10^{-2}$  e  $10^{-6}$  por geração, que é explicado principalmente pelo mecanismo do deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação do DNA. Sendo assim, o polimorfismo

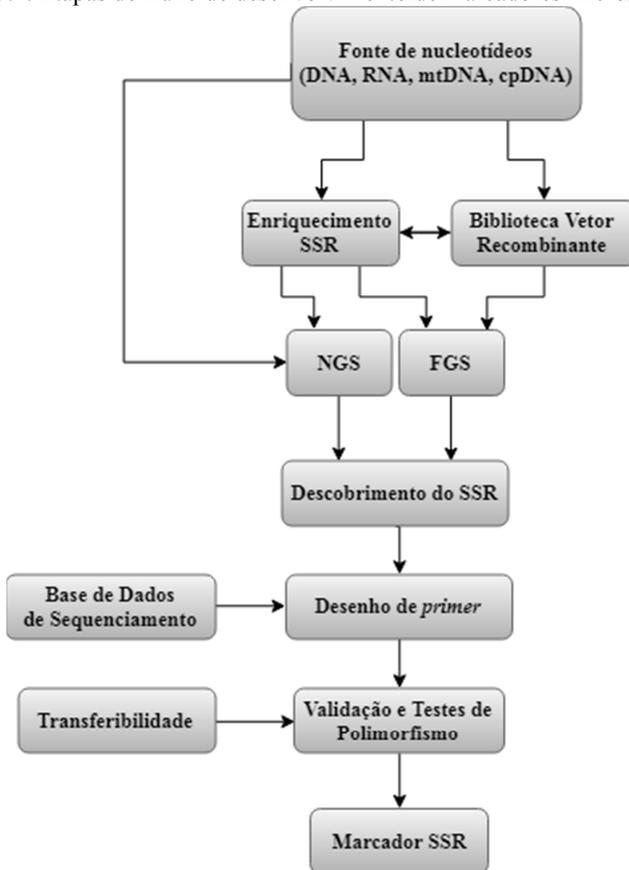
é gerado por meio da adição ou deleção das unidades repetidas devido ao mecanismo de mutação (GEMAYEL, 2012; MASON, 2015). A taxa de mutação dos microssatélites é variável entre locos, sendo que alguns fatores podem influenciar na taxa de mutação destes marcadores, como por exemplo, o número de repetições, a sequência motivo, o comprimento da unidade de repetição, entre outros (SCHLÖTTERER, 2000). Apesar dos marcadores microssatélites serem amplamente utilizados, a alta taxa de mutação deve ser levada em consideração nos estudos genéticos (ELLEGREN, 2004; LI et al., 2002). Isto se deve ao fato de que algumas estimativas dependem de um modelo teórico, como no caso o  $F_{ST}$  e o  $R_{ST}$  (SELKOE; TOONEN, 2006).

Além dos marcadores microssatélites nucleares que são amplamente conhecidos e utilizados, é possível encontrar marcadores SSR no genoma plastidial (POWELL et al., 1995). O genoma plastidial apresenta herança uniparental, ausência de recombinação e é conservado (BIRKY, 1995). Os microssatélites encontrados no genoma plastidial, denominados de cpSSR, são indicados para utilização em estudos evolutivos, filogeográficos, filogenéticos e de fluxo gênico (PROVAN; POWELL; HOLLINGSWORTH, 2001). Geralmente, o modo de herança em angiospermas é maternal, tornando os cpSSR relevantes para os estudos de fluxo de sementes e pólen da estrutura genética de populações. Eventos de deriva genética, efeito fundador e gargalos genéticos (*bottlenecks*) são analisados de maneira mais detalhada utilizando cpSSR e são considerados marcadores complementares ao SSRs nucleares (POWELL et al., 1995; PROVAN; POWELL; HOLLINGSWORTH, 2001).

### 3.3.2 Desenvolvimento de microssatélites

O desenvolvimento de marcadores microssatélites inicia com a prospecção das regiões SSRs, posteriormente com o desenho dos marcadores (também chamados de oligonucleotídeos, iniciadores ou *primers*) complementares às regiões que flanqueiam a região SSR e é finalizada com a validação dos marcadores por meio da técnica de amplificação via PCR e visualização do polimorfismo entre indivíduos (Figura 3.4) (MASON, 2015; VIEIRA et al., 2016).

**Figura 3.4.** Etapas do fluxo de desenvolvimento de marcadores microsatélites.



Fonte: Adaptado de Vieira et al. (2016).

Com relação à prospecção dos SSRs, há alguns métodos que podem ser utilizados. O primeiro deles é por meio da pesquisa em banco de dados, como por exemplo, no *GenBank*, para verificar se há dados de sequência genômica disponíveis da espécie de interesse para prosseguir com a identificação de regiões SSRs na sequência disponível (MASON, 2015).

O outro método é a própria construção de bibliotecas genômicas clássicas enriquecidas para regiões microsatélites, onde basicamente é preciso primeiramente fragmentar o DNA e ligá-lo a adaptadores que serão inseridos em vetores para a transformação em *Escherichia coli* e

posteriormente o DNA amplificado é sequenciado (VIEIRA et al., 2016).

E por fim, o outro método de prospecção dos SSRs é via sequenciamento de DNA de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*), sendo que as plataformas 454 e Illumina são as mais utilizadas para a detecção de SSRs (VIEIRA et al., 2016). Este último método tem a vantagem de identificar grande quantidade de sequências contendo as regiões SSRs para o desenvolvimento dos futuros marcadores SSRs, sendo que atualmente muitos estudos utilizaram NGS que geraram um grande número de sequências de genoma ou transcriptoma para a descoberta de locos SSR em plantas (ZALAPA et al., 2012). O genoma plastidial de *C. xanthocarpa* foi sequenciado e anotado por Machado (2017) por meio da técnica NGS utilizando a plataforma Illumina MiSeq. A partir do estudo realizado por Machado (2017), foi possível identificar as regiões SSRs nucleares e plastidiais da espécie, onde os *primers* desenhados foram validados na presente Dissertação.

Os *primers* são um conjunto de oligonucleotídeos específicos que flanqueiam a sequência-alvo de SSR, sendo um iniciador direto (*forward*) para a direção 5' – 3' e outro iniciador reverso (*reverse*) para a direção 3' – 5' da fita complementar (MASON, 2015). Assim, após desenhar e sintetizar os oligonucleotídeos, é necessário realizar a otimização das reações de amplificação via técnica de PCR, onde nesta etapa são realizados os ajustes de concentração dos reagentes, dos marcadores e de temperatura ideal para cada par de *primer*. A visualização do produto da PCR pode ser feita por meio de eletroforese em gel de agarose para verificar o tamanho dos fragmentos amplificados, porém para a visualização de polimorfismos outras duas técnicas podem ser utilizadas pelo fato de apresentarem maior sensibilidade: eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE - *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) e eletroforese em gel capilar (MASON, 2015).

Outra estratégia relevante é a possibilidade de transferibilidade dos marcadores microssatélites entre espécies relacionadas (VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005; WANG; BARKLEY; JENKINS, 2009), viabilizando os estudos com espécies em que ainda não validaram marcadores espécie-específicos. Fagundes et al (2016) enfatiza a dificuldade no desenvolvimento de marcadores SSR e a importância de testar a transferibilidade entre as espécies nativas.

Não há registro na literatura de marcadores microssatélites desenvolvidos para *C. xanthocarpa*. Entretanto, Silva (2012) testou a

transferibilidade de marcadores microssatélites desenvolvidos em *Eucalyptus spp.*, *Eugenia uniflora* e *Melaleuca alternifolia* para *C. xanthocarpa*. Dentre os 21 pares de marcadores testados por Silva (2012), houve sucesso de amplificação em 14 marcadores SSR. Além disso, Silva (2012) estudou a diversidade genética de três populações de *C. xanthocarpa* localizadas em fragmentos da Floresta Ombrófila Mista, no Paraná, utilizando estes marcadores SSR transferidos, bem como marcadores moleculares do tipo ISSR (*inter simple sequence repeat*).

Para as demais espécies do gênero *Campomanesia*, há registro na literatura de testes de transferibilidade, onde Nogueira et al. (2016), avaliaram a transferibilidade de marcadores SSR desenvolvidos para *Psidium guajava* em 18 espécies frutíferas dos gêneros *Eugenia*, *Campomanesia*, *Myrciaria* e *Syzygium*. Neste estudo de Nogueira et al. (2016), dos 158 SSR testados, 40 SSR foram transferidos com boa qualidade de amplificação para *C. guaviroba*, 60 para *C. hirsute* e 64 para *C. phaea*. Miranda et al. (2016) utilizaram microssatélites provenientes de regiões gênicas (EST-SSR) transferidos de *Eucalyptus* para outras espécies de guabiroba existentes no Cerrado, a *C. adamantium* e *C. pubescens*. Miranda et al. (2016) verificaram que dentre os 120 marcadores testados, somente 12 foram transferidos com sucesso para as duas espécies e os marcadores foram validados para estudos de genética de populações. E utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD, Assis (2011) analisou a diversidade genética de guabirobeiras (*Campomanesia* spp) em Goiás, onde foi possível verificar grande variabilidade genética entre os 140 genótipos analisados. Estevão (2016), utilizando marcadores do tipo ISSR, caracterizou a variabilidade genética de 93 genótipos desta coleção de germoplasma de *Campomanesia* spp da Universidade Federal de Goiás.

Com a caracterização e validação dos marcadores SSRs espécie-específicos, estudos genéticos poderão ser realizados utilizando essas marcas e assim avançar na caracterização genética da espécie que se apresenta como um recurso nativo promissor e de relevância ecológica. Além disso, os marcadores desenvolvidos para *C. xanthocarpa* se apresentam como uma ferramenta promissora à transferibilidade e utilização em outras espécies do gênero *Campomanesia*, bem como de outras espécies de Myrtaceae.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, L.A.; BRASIL E SILVA, G.A.A.; JOSÉ, K.F.D. **Plantas Medicinais de uso Popular**: Atlas Farmacognóstico. Canoas: ULBRA, 1995.

APREMAVI. **Guabiroba, um gostinho inconfundível**. Disponível em: <<http://www.apremavi.org.br/guabiroba-um-gostinho-inconfundivel/>>. Acesso em: 10 dezembro 2017.

ASSIS, E.S. **Diversidade genética de gabirobeiras (*Campomanesia spp*) por meio de caracteres morfológicos e marcadores moleculares RAPD**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2011.

BARBIERI, R.L. **Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais na Embrapa Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, Documentos 143, 27 p., 2005.

BIRKY, C.W. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 25, p. 11331-11338, 1995.

BRASIL - Ministério do Meio Ambiente. **Fragmentação de ecossistemas: Causas, Efeitos sobre a Biodiversidade e recomendações de Políticas Públicas**. Brasília: MMA/SBF, 510 p., 2003.

BRISOLA, L.M.L. **Estudo do hábito alimentar de *Tapirus terrestris* (ordem Perissodactyla) e sua atuação como dispersor de sementes no Parque Estadual do Morro do Diabo**. Monografia de bacharelado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1993.

CARVALHO, P.C.L DE; SOARES FILHO, W.S; RITZINGER, R.; CARVALHO, J.A.B.S. Conservação de germoplasma de fruteiras tropicais com a participação do agricultor. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 1, p. 277-281, 2002.

CETAP. **Frutas Nativas: alimentos locais, sabores e ingredientes especiais**. 2015. Disponível em: <[http://www.centroecologico.org.br/cartilhas/Frutas\\_Nativas-2015.pdf](http://www.centroecologico.org.br/cartilhas/Frutas_Nativas-2015.pdf)>. Acesso em: 05 abril 2018.

CNCFlora. ***Campomanesia xanthocarpa* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2** Centro Nacional de Conservação da Flora.

Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Campomanesia\\_xanthocarpa](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Campomanesia_xanthocarpa)>. Acesso em: 10 dezembro 2017.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial**: plantas para o futuro: Região Sul. Brasília, DF: MMA, 2011, 934p.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. v. 6, 1984.

CUNHA, A.S. **Aspectos sócio-ecológicos de um grupo de bugios (*Alouatta fusca clamitans*) do Parque Estadual de Itapuã, RS**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1994.

DESOTI, V.C.; MALDANER, C.L.; CARLETTO, M.S.; HEINZ, A.A.; COELHO, M.S.; PIATI, D.; TIUMAN, T.S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 15, n. 1, 2011.

DONADIO, L.C.; MÔRO, F.V.; SERVIDONE, A.A. **Frutas Brasileiras**. Jaboticabal: Novos Talentos, 288 p., 2002.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature reviews genetics**, v. 5, n. 6, p. 435, 2004.

ESTEVAO, C.I.M. **Marcadores genéticos associados a caracteres agrônômicos de genótipos da coleção goiana de germoplasma de *Campomanesia* spp.** 115 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Produção Vegetal), Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Goiás, 2016.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual review of ecology, evolution, and systematics**, v. 34, n. 1, p. 487-515, 2003.

FERREIRA, D.D.F.; GARRUTI, D.D.S.; BARIN, J.S.; CICHOSKI, A.J.; WAGNER, R. Characterization of Odor-Active Compounds in Gabiroba Fruits (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg). **Journal of Food Quality**, v. 39, n. 2, p. 90-97, 2016.

FIALHO, M.S.; SETZ, E.Z.F. Brown howler seasonal frugivory in extreme southern Brazil. In: **III International Symposium - Workshop**

**on Frugivores and Seed Dispersal Biodiversity and Conservational Perspectives.** São Pedro, v.1., p.171, 2000.

FIELD, D.; WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences**, v. 263, n. 1367, p. 209-215, 1996.

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological conservation**, v. 126, n. 2, p. 131-140, 2005.

GALETTI, M.; MARTUSCELLI, P.; OLMOS, F.; ALEIXO, A. Ecology and conservation of Jacutinga *Pipile jacutinga* in the Atlantic forest of Brazil. **Biological Conservation**, v. 82, n. 1, p. 31-39, 1997.

GASPAR, D.A. **Ecologia e comportamento do bugio ruivo, *Alouatta fusca* (Geoffroy, 1812, Primates: Cebidae), em um fragmento de mata de Campinas, SP.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997.

GEMAYEL, R.; CHO, J.; BOEYNAEMS, S.; VERSTREPEN, K.J. Beyond junk-variable tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. **Genes**, v. 3, n. 3, p. 461-480, 2012.

GOUDET, J. 2002. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 07 setembro 2016.

GRESSLER, E. ; PIZO, M. A.; MORELLATO, L. P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Brazilian Journal of Botany**, p. 509-530, 2006.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. A biodiversidade na era do Antropoceno e suas relações com a agricultura e o meio ambiente em um cenário de escassez e mudanças. In: LEITE, J. R. M.; PERALTA, C. E. **Perspectivas e desafios para a proteção da biodiversidade no Brasil e na Costa Rica.** São Paulo: Instituto o Direito por um Planeta Verde, p. 259-312. 2014.

HARTL, D.L.; CLARCK, A.G. **Princípios de genética de populações.** 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HEINEBERG, M.R. **Conhecimento e Uso das Plantas pelos Xokleng na TI Ibirama-Laklãnõ, Santa Catarina.** 260 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências

Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, Florianópolis, 2014.

HEYWOOD, V.H.; IRIONDO, J.M. Plant conservation: old problems, new perspectives. **Biological conservation**, v. 113, n. 3, p. 321-335, 2003.

HUGHES, A.R.; INOUE, B.D.; JOHNSON, M.T.; UNDERWOOD, N.; VELLEND, M. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecological Letters**, v. 11, p. 609-623, 2008.

IBGE. 2004. **Mapa de Biomas do Brasil**. 2004. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 12 dezembro 2017.

KAGEYAMA, P.Y; GANDARA, F.B.; SOUZA, L.M.I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**. v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

KLAFKE, J.Z.; DA SILVA, M.A.; PANIGAS, T.F.; BELLI, K.C.; DE OLIVEIRA, M.F.; BARICHELLO, M.M.; et al. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 299-305, 2010.

KLAUBERG, C.; PALUDO, G.F.; BORTOLUZZI, R.L.C.; MANTOVANI, A. Florística e estrutura de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista no Planalto Catarinense. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 35-47, 2010.

KNOLL, F.R.N., REGO, L.R.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. As abelhas em áreas urbanas - um estudo no Campus da Universidade de São Paulo. In: PIRANI, J.R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. Edusp/Fapesp, São Paulo, p.31-42. 1993.

LEGRAND, C.D.; KLEIN, R.M. Mirtáceas. In: REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 596-602. 1977.

LEWIS, P.O; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis (GDA)**: Computer program for the analysis of allelic data. Versão 1.0., 2002.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. **Molecular ecology**, v. 11, n. 12, p. 2453-2465, 2002.

LISBÔA, G.N.; KINUPP, V.F.; DE BARROS, I.B.I. *Campomanesia xanthocarpa* (Guabiroba). In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Sul**. Brasília, DF: MMA, 2011, v.1, p. 111-129.

MACHADO, L.O. **Análise comparativa do genoma plastidial de Myrtaceae: *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret, *Eugenia uniflora* L., *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg, *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel, *Plinia aureana* (Mattos) Mattos e *Plinia* sp.** 198 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2017.

MARCHIORI, J.N.C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas: myrtales**. Santa Maria: Editora da UFSM, 1997. 304 p.

MARKMAN, B.E.O.; BACCHI, E.M.; KATO, E.T.M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 55-57, 2004.

MASON, A.S. SSR Genotyping. In: BATLEY, J. **Plant Genotyping**. Springer, New York, NY, p. 77-89, 2015.

MIKICH, S.B. **Frugivoria e dispersão de sementes em uma pequena reserva isolada no estado do Paraná, Brasil**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2000.

MIRANDA, E.A.G.C.; BOAVENTURA-NOVAES, C.R.D.; BRAGA, R.S.; REIS, E.F.; PINTO, J.F.N.; TELLES, M.P.C. Validation of EST-derived microsatellite markers for two Cerrado-endemic *Campomanesia* (Myrtaceae) species. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 1, 2016.

MIRANDA, J.M.D.; PASSOS, F.C. 2004. Hábito alimentar de *Alouatta guariba* (Humboldt) (Primates, Atelidae) em floresta de Araucária, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 4, p. 821-826, 2004.

MITTERMEIER, R.A.; HOFFMANN, F.M.; PILGRIM, J.; BROOKS, T.; GIL, P.R.; MITTERMEIER, C.; LAMOREUX, J. Hotspots Revisitados - As Regiões Biologicamente Mais Ricas e Ameaçadas do Planeta. **Mata Atlântica e Cerrado. Internacional Conservation**, 2005.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; DA FONSECA, G.A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NAMKOONG, G. et al. Criteria and indicators for sustainable forest management: assessment and monitoring of genetic variation. **Forest genetic resources working paper FGR E**, v. 37, 2002.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NOGUEIRA, A.M.; FERREIRA, A.; DA SILVA FERREIRA, M.F. Transferability of microsatellites from *Psidium guajava* to *Eugenia*, *Myrciaria*, *Campomanesia*, and *Syzygium* species (Myrtaceae). **Plant molecular biology reporter**, v. 34, n. 1, p. 249-256, 2016.

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

PEREIRA, M. C. **Avaliação de compostos bioativos em frutos nativos do Rio Grande do Sul**. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

PETIT, R.J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Conservation biology**, v. 12, n. 4, p. 844-855, 1998.

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

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; MCNICOL, J.W.; MACHRAY, G.C.; DOYLE, J.J.; TINGEYT, S.V.; RAFALSKI, J.A. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. **Current Biology**, v. 5, n. 9, p. 1023-1029, 1995.

PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P.M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in ecology & evolution**, v. 16, n. 3, p. 142-147, 2001.

REFLORA. *Campomanesia*. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10335>>. Acesso em: 01 dezembro 2017.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Corag, 1988. 528 p.

RIBEIRO, M.C., METZGER, J.P., MARTENSEN, A.C., PONZONI, F. J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Bioinformatics methods and protocols**, p. 365-386, 1999.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre: Feplan, 311 p. 1985.

SANT'ANNA, L.S. et al. Chemical Composition and Hypotensive Effect of *Campomanesia xanthocarpa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

SANTOS, C.M.R. **Desenvolvimento estrutural associado à biologia reprodutiva de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae)**. 206 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2013.

SANTOS, M.S. **Impacto do Processamento sobre as Características Físico-Químicas, Reológicas e Funcionais de Frutos da Gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg)**. Tese (Doutorado - Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SANTOS, M.S.; CARNEIRO, P.I.B; WOSIACKI, G.; PETKOWICZ, C.L.O.; CARNEIRO, E.B.B. Caracterização físico-química, extração e análise de pectinas de frutos de *Campomanesia xanthocarpa* B. (*Gabiroba*). **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 101-106, 2009.

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

SCHMITZ, P.I.; ROGGE, J.H.; NOVASCO, R.V.; MERGEN, N.M.; FERRASSO, S. Rincão dos Albinos: um grande sítio Jê meridional. **Pesquisas: Antropologia**, v. 70, p. 65-131, 2013.

SEKIAMA, M.L.; REIS, N.R. dos; ROCHA, V.J. Dieta e dispersão de sementes por morcegos no Parque Nacional do Iguaçu, sul do Brasil. **Chiroptera Neotropical**, v. 17, n. 1A, p. 49-52, 2011.

SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology letters**, v. 9, n. 5, p. 615-629, 2006.

SILVA, L.F. **Diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa* Berg. oriundas de fragmentos da Mata Atlântica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual do Centro-Oeste, em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva, Guarapuava, 2012.

SENS, S.L. **Alternativas para a auto-sustentabilidade dos Xokleng da Terra Indígena Ibirama**. 386 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção), Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção, Florianópolis, 2002.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10335>>. Acesso em: 12 agosto 2016.

SOS Mata Atlântica, INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica: período 2015-2016**. Relatório Final. 2016.

THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R.; GRANER, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, n. 3, p. 411-422, 2003.

TORO, M. A.; CABALLERO, A. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1459, p. 1367-1378, 2005.

VALLILO, M.I.; MORENO, P.R.H.; OLIVEIRA, E.D.; LAMARDO, L.C.A.; GARBELOTTI, M.L. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 231-237, 2008.

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, p. 535-553, 2004.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005.

VASCONCELOS, A.A. **Análise de diversidade genética em populações de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae) por meio de marcadores microssatélites transferíveis**. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia), Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2016.

VIBRANS, A.C. et al. Ordenação dos dados de estrutura da floresta ombrófila mista partindo de informações do inventário florístico-florestal de Santa Catarina: Resultados de estudo-piloto. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 4, 2008.

VIECILI, P.R.N.; BORGES, D.O.; KIRSTEN, K.; MALHEIROS, J.; VIECILI, E.; MELO, R.D.; TREVISAN, G.; SILVA, M.A.; BOCHI, G.V.; MORESCO, R.N.; KLAFKE, J. Z. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. **Atherosclerosis**, v. 234, n. 1, p. 85-92, 2014.

VIEIRA, M.L.C.; SANTINI, L.; DINIZ, A.L.; MUNHOZ, C.D.F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 3, p. 312-328, 2016.

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

WESP, C.L. **Caracterização morfológica e físico-química de guabirobeiras (*Campomanesia* spp.) acessadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. 232 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1950.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

ZALAPA, J. E.; CUEVAS, H.; ZHU, H.; STEFFAN, S.; SENALIK, D.; ZELDIN, E.; MCCOWN, B.; HARBUT, R.; SIMON, P. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. **American journal of botany**, v. 99, n. 2, p. 193-208, 2012.

#### 4 CAPÍTULO I

Manuscrito formatado de acordo com as normas do periódico  
*Applications in Plant Sciences – Primer Note* (Qualis Capes: B1)

**The first set of nuclear and plastidial microsatellites in  
*Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae), a promising  
native fruit tree from South America**

### Abstract

- *Premise of the study:* Microsatellite markers were identified and characterized in *Campomanesia xanthocarpa* with the aim of developing species-specific primers that will be valuable molecular tools for the genetic characterization of this native species.
- *Methods and Results:* A total of 10 polymorphic (being eight nuclear and two plastidial markers) and five monomorphic microsatellite markers were obtained by Next Generation Sequencing among 77 nuclear SSRs and 12 cpSSRs, and characterized in 100 samples from four *C. xanthocarpa* populations. The nuclear SSRs revealed two to seven alleles per locus among di-, tri- and tetranucleotides repeats, and values from 0.000 to 0.875 and from 0.000 to 0.679, for observed and expected heterozygosities, respectively. On the other hand, the haploid diversity detected by cpSSR ranged from 0.000 to 0.602 and the Shannon's index ranged from 0.000 to 0.994. Four loci successfully amplified products in *Acca sellowiana*, *Campomanesia aurea*, *Eugenia pungens*, *Eugenia uniflora*, *Psidium australe*, *Psidium cattleianum* and *Psidium grandiflorum*.
- *Conclusions:* The newly developed polymorphic microsatellites markers are useful in population genetic studies of *Campomanesia xanthocarpa*. In addition, they can be successfully used in other Myrtaceae species.

Key words: Guabiroba; plastid simple sequence repeats (cpSSR); nuclear simple sequence repeats (SSR); transferability.

## 4.1 Introduction

*Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg (Myrtaceae) is a native fruit tree from Brazil, popularly known as “Guabirobeira”. This species is widely distributed in Brazil, it occurs from Minas Gerais (19°54'S; 43°56'W) to Rio Grande do Sul (28°47'S; 55°38'W), as well as in Argentina, Paraguay and Uruguay (Legrand and Klein, 1977). The fruits of this species are juicy, sweet, slightly aromatic and can be eaten fresh or be used to make juices, jellies, ice creams, liqueurs, among other products (Reitz et al., 1988). Of particular importance, the fruit has important medicinal properties and is indicated as functional food (Vallilo et al., 2008; Viecili et al., 2014). Several species of birds and mammals also consume the fruit and disseminate the seeds, being therefore an important mechanism of dispersion of alleles (Reitz et al., 1988). In addition, *C. xanthocarpa* can be indicated for ornamental species and planting in degraded areas, besides being an option for inclusion in agroforestry systems, in the context of valorization of the diversification with native species (Reitz et al., 1988). The major fruit use is through domestic consumption and small-scale marketing by small farmers, notably in their region of natural occurrence. However, it is a genetic resource with potential for sustainable exploitation on a larger scale, as a new fruit crop option and income alternative for small farmers who do not yet use it.

Microsatellite molecular markers (or simple sequence repeats – SSR) are efficient tools that generate useful information to advance the genetic knowledge of the species and thus, they can help future studies of population genetics, conservation, phylogeographic, gene flow, breeding and management of the species (Powel et al., 1996). The plastid genome has uniparental inheritance, is conserved and nonrecombinant, being therefore ideal to develop plastid microsatellite markers to perform studies on the genetic diversity of and thus to contribute in future phylogeographic and population genetics studies for this species (Provan et al., 2001). These molecular markers can be used in studies of species genetic characterization, which is even incipiently known and studied.

However, no species-specific microsatellites markers have been developed for *C. xanthocarpa*. In addition, just one study tested the transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* sp., *Eugenia uniflora* L., and *Melaleuca alternifolia* Cheel to seven native species from the Atlantic Forest, including *C. xanthocarpa* (Fagundes et al., 2016). Here, we report 15 new species-specific markers for *C.*

*xanthocarpa*, being eight polymorphic nuclear, two polymorphic plastid and five monomorphic nuclear microsatellite markers. In addition, we investigated the transferability of these loci to other native fruit species from the Atlantic Forest.

## 4.2 Methods and Results

***Samples origin and DNA extraction*** - Fresh leaf samples were collected from 25 plants of *C. xanthocarpa* from four populations (Fig. 4.1), located in Santa Catarina State, Southern Brazil. The voucher specimens were deposited at the FLOR Herbarium, Department of Botany/UFSC and at the LUSC Herbarium, of the State University of Santa Catarina (Appendix 1). Total DNA was extracted mainly from leaves dried on silica-gel, using the CTAB method (Doyle and Doyle, 1990).

***Development of microsatellites*** - The complete plastidial genome sequence of *C. xanthocarpa* was recently assembled and annotated by our research group (GeneBank Accession Number KY392760) and plastid microsatellites were identified using MISA tool (Thiel et al., 2003). Nuclear microsatellites were identified from a Next Generation Sequencing run at the Illumina MiSeq platform (Machado, 2017). The detection of microsatellites markers was performed by using MISA tool, where a minimum number of replicates of 10, 5, 4, 3, 3 were considered for mono-, di-, tri-, tetra-, and pentanucleotides, respectively. Microsatellite markers were designed with the software PRIMER3 (Rozen and Skaletsky, 2000) by setting product size ranges from 100 to 500 base pairs (bp). The possible formation of secondary structures such as hairpin loops, dimers, bulge loops and internal loops were verified with Gene Runner ([www.generunner.com](http://www.generunner.com); Hastings Software Inc.). A total of 12 cpSSR and 77 nuclear SSR loci were identified and tested.

***Microsatellite screening*** - For the temperature optimization tests, PCR reactions were performed in a volume of 20  $\mu$ L containing 20 ng of DNA template, 0.2 mM from each dNTP (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 1 unit of *Taq* DNA Polymerase (QuatroG, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil), 1X buffer (QuatroG), 1.5 mM of  $MgCl_2$  – free reaction buffer (QuatroG), and 0.2  $\mu$ M of each primer. Amplifications were performed in a Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the following sequence: 94°C for 3 min; followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, annealing temperature for 30 s, 72°C for 1 min; and a final extension step at 72°C for 30 min. Amplifications were confirmed in 1.5% agarose gels stained

with Gel Red (Biotium, Hayward, California, USA). For the initial polymorphism screening, PCR products were denatured and separated with 8% denaturing polyacrylamide gels stained with silver nitrate. Allele sizes were estimated by comparison with a 10 bp DNA ladder standard (Sinapse Inc, Hollywood, Florida, USA). The forward primers were labeled with fluorescent dyes for electrophoresis. The 10 markers were arranged in multiplex sets for genotyping (Table 4.1).

Multiplex PCR reactions for genotyping were performed in a final volume of 6.2  $\mu\text{L}$ , containing in each sample 2.1  $\mu\text{L}$  of QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen Inc., Valencia, CA), 0.10-0.4  $\mu\text{M}$  of each primer, 1.2  $\mu\text{L}$  (12 ng) of DNA template and RNase-free water to make up the final volume of 6.2  $\mu\text{L}$ . Amplifications were performed in a Veriti™ Thermal Cycler, with the following sequence: 95°C for 15 min; followed by 25 cycles of 94°C for 30 s, annealing temperature (Table 4.1) for 30 s, 72°C for 1 min; and a final extension step at 60°C for 30 min. Amplifications were confirmed in 1.5% agarose gels stained with Gel Red (Biotium, Hayward, California, USA).

The Cxant50, Cxant66, Cxant69, Cxant76 and Cxant35 markers were individually amplified for genotyping, where PCR amplification reactions were performed in a final volume of 10  $\mu\text{L}$ , containing 1.2  $\mu\text{L}$  of DNA (12 ng), 0.2 to 0.3 mM dNTP (Sinapse Inc, Hollywood, Florida, USA), 1 unit of Taq Polymerase DNA (Sinapse), 1X buffer 10X (Sinapse), 1.0 to 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  - free reaction buffer (Sinapse), and 0.1 to 0.3  $\mu\text{M}$  of each primer labeled with fluorescence. The cycling program used in the Veriti® Thermal Cycler was: 94°C for 3 min; followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, annealing temperature for 90 s, 72°C for 1 min; and the final extension step at 72°C for 60 min.

Genotyping was performed by capillary electrophoresis using the ABI 3500 XL DNA automatic sequencer (Applied Biosystems), with the POP-7™ polymer (Applied Biosystems, Framingham, MA), where the reactions were adjusted to a final volume of 11  $\mu\text{L}$ , being: 1  $\mu\text{L}$  of the PCR product, 0.3  $\mu\text{L}$  of GeneScan 600 Liz genotyping standard (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 9.7  $\mu\text{L}$  Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems, Woolston, Warrington, WA). Sizing was carried out using software GeneMapper® version 4.1 (Applied Biosystems).

**Data analysis** - We estimated the presence of null alleles and genotyping errors in the program Micro-Checker version 2.2.4 (van Oosterhout et al., 2004). The linkage disequilibrium between microsatellite loci pairs was verified (significance level of 5%) using the Fstat version 2.9.3.2 (Goudet, 2002). The results of genotyping were

analyzed and were estimated for the nuclear markers the number of alleles ( $A$ ), expected heterozygosity ( $He$ ), observed heterozygosity ( $Ho$ ) and the polymorphic information content (PIC) (Botstein et al., 1980) were obtained in Cervus version 3.0.3 (Kalinowski et al., 2007). The significance of deviation from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) at each locus for each population was tested ( $p < 0,05$ ) using Fstat version 2.9.3.2 (Goudet, 2002).

For the plastid markers, it was estimated the number of alleles per locus, haploid diversity and Shannon's index using GenAEx version 6.5 software (Peakall and Smouse, 2012).

**Results** - From 77 tested nuclear SSR, six showed no amplification and eight loci SSR were polymorphic. Among the 63 monomorphic microsatellites marker, for the present article the five monomorphic nuclear SSR were chosen based on the good amplification pattern, visually scored on polyacrylamide gel. Among 12 cpSSR, only two were polymorphic. All these SSR sequences have been deposited in GenBank (Table 4.1).

The number of alleles ranged from two to seven for SSR nuclear and from two to four for SSR plastid markers (Table 4.2). A total of 30 alleles were identified with de SSR nuclear markers and six alleles were identified with two loci plastid SSR markers. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) ranged from de 0.000-0.522; 0.000-0.739; 0.000-0.840 and 0.000-0.875 for the Coronel Freitas, Iomerê, São Joaquim and São José do Cerrito populations, respectively. The expected heterozygosity ( $H_e$ ) ranged from 0.257-0.679; 0.000-0.571; 0.000-0.669 and 0.078-0.600 for the Coronel Freitas, Iomerê, São Joaquim and São José do Cerrito populations, respectively. PIC values also showed large variation, from 0.281 to 0.640. Significant deviations from HWE were detected for some primers within each population. Micro-Checker identified the significant evidence for the presence of a null alleles in some loci: Cxant22, Cxant36, Cxant50 and Cxant76. The results showed no linkage between loci.

For the chloroplast markers, the haploid diversity ranged from 0.497-0.602; 0.000-0.077; 0.000-0.554 and 0.269-0.282 for the Coronel Freitas, Iomerê, São Joaquim and São José do Cerrito populations, respectively. The Shannon's index ranged from 0.690-0.998; 0.000-0.168; 0.000-0.994 and 0.440-0.551 for the Coronel Freitas, Iomerê, São Joaquim and São José do Cerrito populations, respectively.

**Cross-amplification in other Myrtaceae species** - Additionally, this study performed cross-amplification of these 10 polymorphic microsatellite markers using the same amplification conditions

described above, in five plants from seven other Myrtaceae species: *Acca sellowiana*, *Campomanesia aurea*, *Eugenia pungens*, *Eugenia uniflora*, *Psidium australe*, *Psidium cattleianum* and *Psidium grandiflorum* (Table 4.3). The percentage of transferability was 70% in *A. sellowiana* (7/10), 80% in *C. aurea* (8/10), 40% in *E. pungens* (4/10), 70% in *E. uniflora* (7/10), 90% in *P. australe* (9/10), 80% in *P. cattleianum* (8/10) and 90% in *Psidium grandiflorum* (9/10). Four loci (Cxant59, Cxant22, Guabi05 and Guabi11) successfully amplified products in the seven species analyzed. The marker Cxant76 did not amplify in any of the tested species. For future studies, we indicate the need for optimization tests of the amplification conditions and polymorphism tests for the species analyzed in this study using these markers SSR.

### 4.3 Conclusions

This is the first study of the development and characterization of species-specific nuclear and plastidial microsatellites markers for *C. xanthocarpa*, and they transferability to other seven Myrtaceae species.

Comparatively to the library method to develop SSRs, lower percentage of polymorphism are obtained by the Next Generation Sequencing method. In this study, we developed a total of eight polymorphic out of 77 nuclear microsatellite tested markers, and two plastidial polymorphic from 12 tested markers.

Since this species is largely distributed in the Atlantic Biome, which is highly fragmented, genetic characterization studies in populations of *C. xanthocarpa* should be performed as soon as possible using this set of new species-specific markers. The genetic knowledge will help to better design the conservation and sustainable use strategies, which is utmost importance for the future of this promising fruit tree to the Brazilian Atlantic Forest, nevertheless incipiently known.

### 4.4 Literature cited

- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. 1980. *American journal of human genetics*, 32 (3), 314.
- DOYLE, J. J., AND J. L. DOYLE. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

- FAGUNDES, B. S., L. F. DA SILVA, R. M. GIACOMIN, D. SECCO, J. A. DÍAZ-CRUZ, AND P. R. DA-SILVA. 2016. Transferability of microsatellite markers among Myrtaceae species and their use to obtain population genetics data to help the conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Tropical Conservation Science* 9(1): 408-422.
- GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002.
- KALINOWSKI, S. T., M. L. TAPER, AND T. C. MARSHALL. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099 – 1106
- LEGRAND, C. D., AND R. M. KLEIN. 1977. Mirtáceas. In R. Reitz [ed], Flora Ilustrada Catarinense, 596-602. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, Santa Catarina, Brasil.
- LISBÔA, G. N., V. F. KINUPP, AND I. B. I. DE BARROS. 2011. *Campomanesia xanthocarpa* (Guabiroba). In: L. Coradin and A. Siminski, A. Reis, Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Sul, 159-162. MMA, Brasília, DF, Brasil.
- PEAKALL, R., AND P. E. SMOUSE. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics (Oxford, England)* 28: 2537 – 2539.
- POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 7: 215-222.
- PROVAN, J., W. POWELL, AND M. HOLLINGSWORTH. 2001 . Chloroplast microsatellites: New tool for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 16: 142 – 147.
- REITZ, R., R. M. KLEIN, AND A. REIS. 1988. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Corag, 528 p.
- ROZEN, S., AND H. J. SKALETSKY. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In Krawetz, S

- and S. Misener [eds.], *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, 365-386. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
- THIEL, T., W. MICHALEK, R. VARSHNEY, A. GRANER. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 106: 411-422.
- VALLILO, M. I., P. R. H. MORENO, E. D. OLIVEIRA, L. C. A. LAMARDO, AND M. L. GARBELOTTI. 2008. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28: 231-237.
- VAN OOSTERHOUT, C., W. F. HUTCHINSON, D. P. M. WILLS, P. SHIPLEY. 2004. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data, version 2.2.4. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-553.
- VIECILI, P. R. N., D. O. BORGES, K. KIRSTEN, J. MALHEIROS, E. VIECILI, R. D. MELO, G. TREVISAN, M. A. SILVA, G.V. BOCHI, R. N. MORESCO, J. Z. KLAFKE. 2014. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals. *Atherosclerosis*, 234: 85-92.



## 4.5 Tables

**Table 4.1.** Characteristics of 15 microsatellite loci developed in *Campomanesia xanthocarpa*

Locus	Primer sequences (5'-3')	Repeat motif	Allele size (bp)	T <sub>a</sub> (°C)	5' Dye	GenBank accession no.
<b>Cxant36</b>	F: TTCCCGCCTAACCCCTAATG R: GTCAAATCTCGCTCCTCCAA	(AAG) <sub>4</sub>	323	57	PET	MG557631
<b>Cxant50</b>	F: CGCACAACCAGCACAAAAC R: CTATCACCGAGGGAGGCAAG	(CTTT) <sub>3</sub>	477	66	6FAM	MG557634
<b>Cxant66</b>	F: GCGAGACCATAAGCCACTAC R: TGAGAAGGAGACACACAAAAT	(AGA) <sub>4</sub>	211	57	NED	MG557636
<b>Cxant69</b>	F: CCCAACACTCTCCACAATCC R: TCCTTCCCTCTTCTCTCCATC	(GA) <sub>7</sub>	294	60	6FAM	MG557637
<b>Cxant76</b>	F: ATGTTTTTGTGCGTTCTGG R: TTGACCTTTGTTCTCTTCCT	(AAG) <sub>6</sub>	336	60	VIC	MG557638
<b><i>Multiplex Panel 1</i></b>						
<b>Cxant59</b>	F: GAGGGACTTTCAGTTTGTGTGTC R: GACCGTTTCCAACATTTCCA	(GA) <sub>10</sub>	230	55	NED	MG557635
<b>Guabi05</b>	F: TTCTCGTGATTTGTATCCAAGG R: TGCTTCAATCTTTCCTATCGAA	(T) <sub>10</sub>	201	55	PET	MG973216

<i>Multiplex Panel 2</i>						
<b>Cxant22</b>	F: GCTTGGTGGTGCCTCTCTC R: GCTCTTCCCTTTGCCTCTCT	(TCCA) <sub>3</sub>	209	57	VIC	MG557627
<b>Cxant26</b>	F: ATGCAAAATCCCTACGTGCT R: ATGACACATTTCCGGCTGTGA	(ATCG) <sub>3</sub>	162	57	NED	MG557629
<b>Guabi11</b>	F: TTGATTCAGGGAACAAATTCAA R: TGGCTAGTGTGGTTCATTCAG	(ATTA) <sub>4</sub>	225	57	6FAM	MG973217
<i>Monomorphic SSR Primers</i>						
<b>Cxant02*</b>	F: TTAGTTTCCCCGCTCACC R: CATCTTCCTTCCCGTTTGT	(TCTT) <sub>3</sub>	474	55		MG557626
<b>Cxant23*</b>	F: ATCCCCGACCCTAATGAATG R: GAAAGCCAGCGACCAAG	(GTCA) <sub>3</sub>	215	55		MG557628
<b>Cxant35*</b>	F: GACCGCAAACGAAGGATG R: CGAAACTGGAAGGAGAAACAA	(CGGC) <sub>3</sub>	273	57		MG557630
<b>Cxant39*</b>	F: TCGTTTATTCGCTTGGTTAGA R: GGGTTGGAGGTTCAAGTT	(TGAA) <sub>3</sub>	249	57		MG557632
<b>Cxant45*</b>	F: GCCTTTCGCCTTTTCATC R: CCCAGTTTCCTTTCTTTTG	(CTT) <sub>4</sub>	236	57		MG557633

*Note:* Ta = annealing temperature; FD = fluorescent dye; Cxant = name of SSR; Guabi = name of cpSSR;  
\*monomorphic in *C. xanthocarpa*.

Region Guabi05 = trnS-GCU-trnR-UCU; Region Guabi11 = trnE-UUC-trnT-GGU

**Table 4.2.** Genetic characterization of the ten newly developed polymorphic microsatellites of *Campomanesia xanthocarpa*.

Locus SSR	Coronel Freitas (n = 25)			Iomerê (n = 25)			São Joaquim (n = 25)			São José do Cerrito (n = 25)			PIC
	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> <sup>A</sup>	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> <sup>A</sup>	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> <sup>A</sup>	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub> <sup>A</sup>	
Cxant22 <sup>+</sup>	2	0.000	0.507 <sup>*</sup>	1	0.000	0.000 <sup>m</sup>	1	0.000	0.000 <sup>m</sup>	1	0.000	0.000 <sup>m</sup>	0.356
Cxant26	3	0.375	0.377 <sup>ns</sup>	2	0.500	0.383 <sup>ns</sup>	2	0.280	0.246 <sup>ns</sup>	2	0.400	0.327 <sup>ns</sup>	0.281
Cxant36 <sup>+</sup>	3	0.480	0.664 <sup>ns</sup>	3	0.360	0.556 <sup>ns</sup>	4	0.240	0.607 <sup>*</sup>	3	0.625	0.600 <sup>ns</sup>	0.640
Cxant50 <sup>+</sup>	4	0.040	0.257 <sup>*</sup>	2	0.286	0.418 <sup>ns</sup>	4	0.333	0.669 <sup>*</sup>	4	0.524	0.502 <sup>ns</sup>	0.458
Cxant59	2	0.520	0.510 <sup>ns</sup>	2	0.400	0.444 <sup>ns</sup>	2	0.200	0.184 <sup>ns</sup>	3	0.520	0.554 <sup>ns</sup>	0.395
Cxant66	2	0.417	0.337 <sup>ns</sup>	2	0.240	0.372 <sup>ns</sup>	3	0.560	0.598 <sup>ns</sup>	2	0.440	0.458 <sup>ns</sup>	0.399
Cxant69	3	0.522	0.679 <sup>ns</sup>	3	0.739	0.571 <sup>ns</sup>	2	0.840	0.497 <sup>ns</sup>	3	0.875	0.520 <sup>ns</sup>	0.504
Cxant76 <sup>+</sup>	7	0.261	0.744 <sup>*</sup>	5	0.240	0.612 <sup>*</sup>	2	0.150	0.296 <sup>ns</sup>	3	0.391	0.505 <sup>*</sup>	0.569
Locus cpSSR	A	h	I	A	h	I	A	h	I	A	h	I	
Guabi05	3	0.602	0.998	2	0.077	0.168	4	0.554	0.994	3	0.282	0.551	
Guabi11	2	0.497	0.690	1	0.000	0.000	1	0.000	0.000	2	0.269	0.440	

Note: n = number of sampled plants; A = number of alleles; H<sub>e</sub> = expected heterozygosity; H<sub>o</sub> = observed heterozygosity; PIC = polymorphism information content; h = haploid diversity; I = Shannon's index.

<sup>A</sup> Significance of deviation from Hardy–Weinberg equilibrium: \* P<0.05; <sup>ns</sup> = not statistically significant; <sup>m</sup> = monomorphic  
<sup>+</sup> significant evidence of null alleles detected at P<0.05.

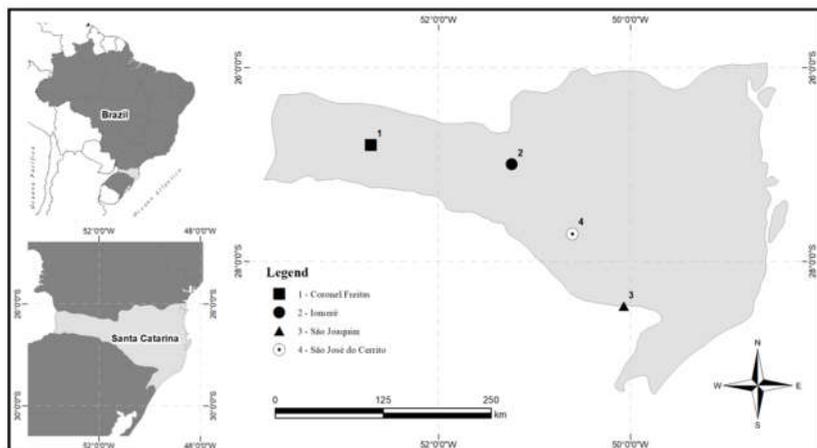
**Table 4.3.** Results of cross-amplification (allele size ranges) of ten microsatellite loci developed in *Campomanesia xanthocarpa* and tested in five plantas of seven species of the family Myrtaceae.

Locus	<i>Acca sellowiana</i> (n = 5)	<i>Campomanesia aurea</i> (n = 5)	<i>Eugenia pungens</i> (n = 5)	<i>Eugenia uniflora</i> (n = 5)	<i>Psidium australe</i> (n = 5)	<i>Psidium cattleianum</i> (n = 5)	<i>Psidium grandiflorum</i> (n = 5)
<b>Cxant36</b>	—	288-290	—	288	289	—	289
<b>Cxant50</b>	496	477	—	470-471	461-489	459-474	461
<b>Cxant66</b>	202	204	—	202	205-209	205-209	205
<b>Cxant69</b>	282	294-302	—	—	294	298	292-294
<b>Cxant76</b>	—	—	—	—	—	—	—
<b><i>Panel Multiplex 1</i></b>							
<b>Cxant59</b>	198	199	197	198-199	199	199	199
<b>Guabi05</b>	199-200	199-200	198	199-200	200	199-200	200
<b><i>Panel Multiplex 2</i></b>							
<b>Cxant22</b>	213	209	209	209	213	213	213
<b>Cxant26</b>	—	—	—	—	325	325	325
<b>Guabi11</b>	245	219	228	245	231	231	231

*Note:* — = unsuccessful amplification; n = number of plants sampled.

## 4.6 Figure

**Figure 4.1.** Geographic location of the sampled populations.



## 4.7 Appendix

### Appendix 1. Voucher information for *Campomanesia xanthocarpa* used in this study

Voucher specimen	Collection locality	Geographic coordinates
FLOR 63645 <sup>a</sup>	Coronel Freitas, Santa Catarina, Brazil	26°48'33"S 52°42'22"W
FLOR 63646 <sup>a</sup>	Iomerê, Santa Catarina, Brazil	27°00'26"S 51°14'28"W
LUSC 8707 <sup>b</sup>	São Joaquim, Santa Catarina, Brazil	28°28'38"S 50°04'04"W
LUSC 7870 <sup>b</sup>	São José do Cerrito, Santa Catarina, Brazil	27°43'30"S 50°36'21"W

*Note:*

<sup>a</sup> Vouchers deposited at Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Biologia, Florianópolis/SC.

<sup>b</sup> Vouchers deposited at Universidade Estadual de Santa Catarina, Lages/SC.

## **5 CAPÍTULO II**

### **ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Campomanesia xanthocarpa* NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

## 5.1 Introdução

A *Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg, pertencente à família Myrtaceae, é conhecida popularmente como guabirobeira, guabiroba, guavirobeira e guaviroba (REFLORA, 2017). A espécie apresenta ampla distribuição geográfica, pois ocorre desde a Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais até o Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina) (CNCFlora, 2017; REFLORA, 2017), assim como ocorre também na Argentina, Paraguai e Uruguai (LEGRAND; KLEIN, 1977) e Bolívia (LISBÔA; KINUPP; BARROS, 2011). A guabirobeira está presente no domínio fitogeográfico da Mata Atlântica (REFLORA, 2017) e do Cerrado (SOBRAL et al., 2015), sendo bastante frequente na Floresta Ombrófila Mista (REITZ; KLEIN; REIS, 1988).

A espécie apresenta importância ecológica pelo fato de suas flores serem consideradas melíferas e os frutos servem de alimento para pequenos animais mamíferos e avifauna, contribuindo assim para a dispersão das sementes (REITZ; KLEIN; REIS, 1988). De acordo com Santos (2013), *C. xanthocarpa* apresenta fecundação cruzada com barreira à autofecundação, sendo a incompatibilidade homomórfica gametofítica o mecanismo que melhor explica este comportamento.

Os frutos da guabiroba são comestíveis, doces e levemente aromáticos (LEGRAND; KLEIN, 1977; MARCHIORI; SOBRAL, 1997), podendo ser consumidos *in natura* ou na fabricação de produtos beneficiados como, por exemplo, sucos, geleias, licores e sorvetes (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; LISBÔA; KINUPP; BARROS, 2011; SANTOS, 2011). Os frutos contêm grande quantidade de vitaminas, e propriedades nutricionais importantes (VALLILO et al., 2008; SANTOS et al., 2009), além de apresentarem grandes quantidades de compostos bioativos com propriedades antioxidantes importantes (KLAFKE et al., 2010; PEREIRA, 2011).

Além de espécie alimentícia, também pode ser indicada para paisagismo, recuperação de áreas degradadas e reflorestamento, além de ser uma opção para inclusão em sistemas agroflorestais, em um contexto de valorização da diversificação com espécies nativas (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; VALLILO et al., 2008; WESP, 2014).

De acordo com Lisbôa et al. (2011) a obtenção de frutos de *C. xanthocarpa* é majoritariamente de forma extrativista, pois não há indicação de plantios comerciais de guabirobeira. Portanto, há demanda no avanço do conhecimento da espécie, em termos também de subsídios para práticas de manejo sustentável desta espécie em sua área de ocorrência natural.

O aumento do número de fragmentos florestais, bem como diminuição destas áreas e um maior isolamento destes fragmentos resultam em mudanças consideráveis na estrutura da paisagem (FAHRIG, 2003), podendo ocasionar a redução de populações, alteração do fluxo gênico, aumento da endogamia e deriva genética das espécies, alterando assim a diversidade genética das espécies (YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996; KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998). Para Hughes et al. (2008), a diversidade genética é considerada um componente-chave da biodiversidade, não somente importante em processos evolutivos, como também interfere em processos ecológicos.

A literatura é escassa em termos de estudos genéticos para algumas espécies nativas, como é o caso de *C. xanthocarpa* (SILVA, 2012) o que reforça a necessidade de gerar informações sobre a variabilidade genética existente nas populações encontradas em áreas com biodiversidade ameaçada, como no caso os remanescentes da Mata Atlântica em Santa Catarina. Nas demais áreas de ocorrência da espécie, não há registro de caracterização e análise genética da diversidade de populações de *C. xanthocarpa*. Apenas há registro de estudos genéticos na região do Cerrado, onde os autores avaliaram espécies do gênero *Campomanesia* spp., *C. adamantium* e *C. pubescens* (ASSIS, 2011; MIRANDA, 2014; ESTEVÃO, 2016; VASCONCELOS, 2016). Portanto, é evidente a necessidade de estudos genéticos mais detalhados para conhecer o cenário atual das populações de *C. xanthocarpa* em toda a área de ocorrência, principalmente devido ao alto grau de fragmentação da Mata Atlântica.

Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo analisar a diversidade genética existente em quatro populações de *C. xanthocarpa* no Estado de Santa Catarina, utilizando marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie.

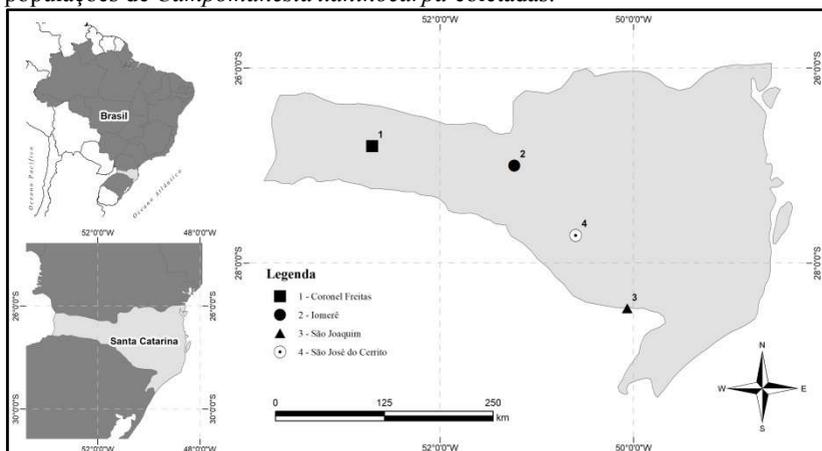
## 5.2 Material e Métodos

Foram coletadas amostras foliares de 50 plantas adultas de *C. xanthocarpa* de quatro populações localizadas nos municípios do Estado de Santa Catarina: Coronel Freitas, Iomerê, São Joaquim e São José do Cerrito (Figura 5.1). Nas populações de Coronel Freitas, Iomerê e São Joaquim, as amostras foliares foram coletadas aleatoriamente com espaçamento médio de 15 a 20m entre plantas no percurso feito em zigue-zague dentro da população. Na população de São José do Cerrito todas as plantas adultas existentes foram coletadas. Na Tabela 5.1 segue uma breve descrição referente às áreas de cada população coletada. As plantas das quais foram coletadas amostras, foram mapeadas com auxílio de um aparelho GPS (Sistema de Posicionamento Global) (Apêndice A) e exsiccatas das quatro populações foram depositadas nos herbários da Universidade Federal de Santa Catarina (Herbário FLOR) e Universidade do Estado de Santa Catarina (Herbário LUSC) (Tabela 5.2).

As amostras foliares coletadas foram acondicionadas em recipientes plásticos contendo sílica gel e, posteriormente, encaminhadas ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), para a realização dos procedimentos e análises genéticas.

As amostras foliares previamente desidratadas em sílica foram maceradas em nitrogênio líquido e, posteriormente, a extração do DNA total foi realizada por meio do método CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990), com modificações (Apêndice B). A quantidade e a qualidade de DNA extraído foram verificadas por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose (concentração de 1,0%), corados com GelRed (Biotium, Hayward, California, USA) e contendo um padrão *Ladder* 100pb (Sinapse Inc, Hollywood, Florida, USA). A quantidade e a qualidade de DNA extraído também foram verificadas em espectrofotômetro NanoDrop®1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Posteriormente, as amostras foram diluídas com água ultra pura autoclavada na concentração final de  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

**Figura 5.1.** Mapa de Santa Catarina indicando a localização das quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* coletadas.



Fonte: elaborado pelo autor (2018).

**Tabela 5.1.** Localização geográfica, altitude e descrição das áreas onde foram coletadas amostras de *Campomanesia xanthocarpa* em Santa Catarina.

Populações	Localização geográfica	Altitude (m)	Descrição
Coronel Freitas	26°48'S 52°42'W	370 a 400	Área particular com criação de bovinocultura leiteira. Plantas localizadas à campo com acesso dos bovinos e outras na Mata Ciliar sem acesso dos bovinos.
Iomerê	27°00'S 51°14'W	845 a 870	Área particular (Fazenda Faxinal Branco) com criação de bovinocultura leiteira. População de <i>C. xanthocarpa</i> com mais de 100 plantas.
São Joaquim	28°28'S 50°04'W	860 a 920	Área particular próximo ao Rio Pelotas, local de difícil acesso e sem manejo.

São José do Cerrito	27°43'S 50°36'W	780 a 830	Área particular com histórico de criação extensiva de gado de corte e área com margem à represa da Pequena Central Hidrelétrica (PCH João Borges/Eletrosul). Local de difícil acesso.
---------------------	--------------------	-----------------	---

**Tabela 5.2.** Informações das exsicatas das quatro populações amostradas de *Campomanesia xanthocarpa* depositadas no Herbário FLOR e no Herbário LUSC.

Nº Tombo	População	Coordenadas geográficas
FLOR 63645 <sup>a</sup>	Coronel Freitas/SC	26°48'33"S 52°42'22"W
FLOR 63646 <sup>a</sup>	Iomerê/SC	27°00'26"S 51°14'28"W
LUSC 8707 <sup>b</sup>	São Joaquim/SC	28°28'38"S 50°04'04"W
LUSC 7870 <sup>b</sup>	São José do Cerrito/SC	27°43'30"S 50°36'21"W

*Notas:* <sup>a</sup> Exsicata depositada no Herbário FLOR da Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Biologia, Florianópolis/SC; <sup>b</sup> Exsicata depositada no Herbário LUSC da Universidade Estadual de Santa Catarina, Lages/SC.

### 5.2.1 Amplificação e Genotipagem

Os marcadores utilizados no presente trabalho (Tabela 5.3) foram otimizados no Capítulo I. No Apêndice C estão listados todos os marcadores testados para a presente Dissertação, e no Apêndice E é possível verificar o protocolo utilizado para realização do *screening* inicial dos marcadores em gel de poliacrilamida. Os microssatélites nucleares foram identificados como Cxant e os plastidiais como Guabi.

Nas reações de amplificação via PCR para genotipagem, o protocolo de amplificação dos 10 marcadores microssatélites por meio de reações de PCR em Termociclador Veriti® seguiu as temperaturas estabelecidas para cada marcador validado no Capítulo I, sendo que nesta etapa foram realizados testes de combinação dos marcadores

microsatélites para formar conjuntos multiplex. Para as reações multiplex, foi utilizado o QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA), contendo 2,1 µL de QIAGEN multiplex PCR master mix (1X), 0,10 a 0,4 µM de cada iniciador marcado com fluorescência, 12 ng (1,2 uL) de amostra de DNA e água para completar o volume final de 6,2 µL (Tabela 5.4). A programação no Termociclador Veriti® foi realizada da seguinte maneira: 95°C por 15 min; seguido de 25 ciclos de 94°C por 30 s, temperatura de anelamento conforme cada marcador por 90 s, 72°C por 55 s; e a etapa de extensão final a 60°C por 30 min.

Os marcadores Cxant50, Cxant66, Cxant69, Cxant76 e Cxant35 foram amplificados individualmente para a genotipagem, onde as reações de amplificação via PCR foram realizadas para um volume final de 10 µL, contendo 1,2 µl de DNA (12 ng), 0,2 a 0,3 mM de dNTP (Sinapse Inc, Hollywood, Florida, USA), 1 unidade de Taq Polimerase DNA (Sinapse), 1X tampão 10X (Sinapse), 1,0 a 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> – *free reaction buffer* (Sinapse), e 0,1 a 0,3 µM de cada *primer* marcado com fluorescência (Tabela 5.5). O programa utilizado no Termociclador Veriti® foi o seguinte: 94°C por 3 min; seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 s, temperatura de anelamento conforme cada marcador por 90 s, 72°C por 1 min; e a etapa de extensão final a 72°C por 60 min.

A caracterização dos genótipos foi realizada por meio de eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3500XL (Applied Biosystems) com o polímero POP-7® (Applied Biosystems, Framingham, MA), onde as reações foram ajustadas para um volume final de 11 µL, sendo 1 µL do produto de PCR, 0,3 µL de padrão de genotipagem GeneScan 600 Liz (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e de 9,7 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Woolston, Warrington, WA).

**Tabela 5.3.** Características dos 10 locos microssatélites de *Campomanesia xanthocarpa* utilizados neste trabalho.

Loco	Sequência (5'-3')	Motivo SSR	Tamanho (pb)	T <sub>a</sub> (°C)	FC	n° do acesso no GenBank
<b>Cxant36</b>	F: TTCCCGCCTAACCTAATG R: GTCAAATCTCGCTCCTCCAA	(AAG) <sub>4</sub>	323	57	PET	MG557631
<b>Cxant50</b>	F: CGCACAACCAGCACAAAAC R: CTATCACCGAGGGAGGCAAG	(CTTT) <sub>3</sub>	477	66	6FAM	MG557634
<b>Cxant66</b>	F: GCGAGACCATAAGCCACTAC R: TGAGAAGGAGACACACAAAAT	(AGA) <sub>4</sub>	211	57	NED	MG557636
<b>Cxant69</b>	F: CCCAACACTCTCCACAATCC R: TCCTTCCCTCTTCTCTCCATC	(GA) <sub>7</sub>	294	60	6FAM	MG557637
<b>Cxant76</b>	F: ATGTTTTTGTGCGTTCTGG R: TTGACCTTTGTTCCCTCTTCCT	(AAG) <sub>6</sub>	336	60	VIC	MG557638
<b>Panel Multiplex 1</b>						
<b>Cxant59</b>	F: GAGGGACTTTCAGTTTGTGTGTC R: GACCGTTTCCAACATTCCA	(GA) <sub>10</sub>	230	55	NED	MG557635
<b>Guabi05</b>	F: TTCTCGTGATTTGTATCCAAGG R: TGCTTCAATCTTTCCTATCGAA	(T) <sub>10</sub>	201	55	PET	MG973216

**Tabela 5.3.** Continuação

<b>Painel Multiplex 2</b>						
<b>Cxant22</b>	F: GCTTGGTGGTGCCTCTCTC R: GCTCTTCCCTTTGCCTCTCT	(TCCA) <sub>3</sub>	209	57	VIC	MG557627
<b>Cxant26</b>	F: ATGCAAAATCCCTACGTGCT R: ATGACACATTTCTGGCTGTGA	(ATCG) <sub>3</sub>	162	57	NED	MG557629
<b>Guabi11</b>	F: TTGATTCAGGGAACAAATTCAA R: TGGCTAGTGTGGTTCATTCAG	(ATTA) <sub>4</sub>	225	57	6FAM	MG973217

*Notas:* F= sequência *forward*; R= sequência *reverse*; T<sub>a</sub> = temperatura de anelamento; FC = fluorescência; Cxant = nome para os SSR nucleares; Guabi = nome para os SSR plastidiais.

**Tabela 5.4.** Concentração dos componentes da reação de amplificação dos distintos iniciadores microssatélites para as reações em Multiplex utilizando o MasterMix QIAGEN.

<b>MULTIPLEX 1</b>			
<b>Reagentes</b>	<b>Concentração estoque</b>	<b>Concentração final</b>	<b>Reação Multiplex (n=1)</b>
<b>QIAGEN Master Mix</b>	2 X	1 X	2,10 µL
<b>Cxant59 (F e R)</b>	10 µM	0,15 µM	0,15 µL
<b>Guabi05 (F e R)</b>	10 µM	0,10 µM	0,10 µL
<b>Água</b>			2,40 µL
<b>Total MasterMix</b>			5,00 µL
<b>Amostra DNA</b>	10 ng.µl <sup>-1</sup>	12 ng	1,20 µL
<b>VOLUME FINAL</b>			6,20 µL
<b>MULTIPLEX 2</b>			
<b>Reagentes</b>	<b>Concentração Estoque</b>	<b>Concentração Final</b>	<b>Reação Multiplex (n=1)</b>
<b>QIAGEN Master Mix</b>	2X	1 X	2,10 µL
<b>Cxant22 (F e R)</b>	10 µM	0,05 µM	0,05 µL
<b>Cxant26 (F e R)</b>	10 µM	0,05 µM	0,05 µL
<b>Guabi11 (F e R)</b>	10 µM	0,40 µM	0,40 µL
<b>Água</b>			1,90 µL
<b>Total MasterMix</b>			5,00 µL
<b>Amostra DNA</b>	10 ng.µl <sup>-1</sup>	12 ng	1,20 µL
<b>VOLUME FINAL</b>			6,20 µL

*Notas:* F= forward; R= reverse.

**Tabela 5.5.** Concentração dos componentes da reação de amplificação dos distintos iniciadores microsatélites.

Reagentes	Concentração o Estoque	Concentração Final			Reação Mastermix (n=1)		
		Cxant69	Cxant76 e Cxant66	Cxant36 e Cxant50	Cxant69	Cxant76 e Cxant 66	Cxant36 e Cxant50
<b>Buffer</b>	10 X	1 X	1 X	1 X	1,00 µL	1,00 µL	1,00 µL
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1,00 mM	1,00 mM	1,50 mM	0,40 µL	0,40 µL	0,60 µL
<b>dNTPs</b>	10 mM	0,20 mM	0,20 mM	0,30 mM	0,20 µL	0,20 µL	0,30 µL
<b>Forward</b>	10 µM	0,10 µM	0,12 µM	0,30 µM	0,10 µL	0,12 µL	0,30 µL
<b>Reverse</b>	10 µM	0,10 µM	0,12 µM	0,30 µM	0,10 µL	0,12 µL	0,30 µL
<b>Taq DNA Polimerase</b>	5 U.µl <sup>-1</sup>	1 U	1 U	1 U	0,20 µL	0,20 µL	0,20 µL
<b>Água</b>					6,80 µL	6,76 µL	6,10 µL
<b>TOTAL MASTERMIX</b>					8,80 µL	8,80 µL	8,80 µL
<b>Amostra DNA</b>	10 ng.µl <sup>-1</sup>	12 ng	12 ng	12 ng	1,20 µL	1,20 µL	1,20 µL
<b>VOLUME FINAL</b>					10 µL	10 µL	10 µL

### 5.2.2 Análise dos dados

A análise dos eletroferogramas foi realizada no software GeneMapper® versão 4.1 (Applied Biosystems), que identifica os alelos em função do padrão de genotipagem GeneScan 600 Liz.

O desequilíbrio de ligação entre os pares de locos microsstatélites foi verificado com auxílio do programa Fstat versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002), aplicando a correção de Bonferroni para comparações múltiplas e nível de significância de 5%.

A partir da análise dos eletroferogramas, foram estimadas frequências alélicas e os índices de diversidade genética (número total de alelos ( $k$ ); número médio de alelos por locos ( $\hat{A}$ ); porcentagem de locos polimórficos ( $\hat{P}_{(99\%)}$ ) número médio de alelos por loco polimórfico ( $\hat{A}_p$ ), heterozigosidade esperada ( $\hat{H}_E$ ) e observada ( $\hat{H}_O$ ) e índice de fixação ( $\hat{f}$ ). Além disso, foram estimadas as estatísticas  $F$  de Wright (WRIGHT, 1950), número de alelos raros (A.R.) e número de alelos exclusivos (A.E.) e o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC - *Polymorphism Information Content*) (BOTSTEIN et al., 1980).

As frequências alélicas foram obtidas pelo programa Fstat versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). Os índices de diversidade genética  $k$ ,  $\hat{A}$ ,  $\hat{P}_{(99\%)}$ ,  $\hat{A}_p$ ,  $\hat{H}_O$ ,  $\hat{H}_E$  e  $\hat{f}$  foram estimados no programa GDA versão 1.1. (LEWIS; ZAYKIN, 2002).

A heterozigosidade observada ( $\hat{H}_O$ ) é a proporção do número de heterozigotos observados em cada população, onde:

$$\hat{H}_O = 1 - \sum p_i$$

Sendo:

$p_i$  = frequência observada de genótipos homozigotos alelo  $i$ .

A heterozigosidade esperada ( $\hat{H}_E$ ) é estimada no programa utilizando um estimador não-viesado de Nei (1987), para cada loco e população (*by default*):

$$\hat{H}_E = \frac{n_k}{n_k - 1} \left( 1 - \sum p_{ik}^2 - H_{Ok} / 2n_k \right)$$

Em que:

$n_k$  = tamanho da amostra  $k$ ;

$p_{ik}$  = frequência do alelo  $A_i$  na amostra  $k$ ;

$H_{O_k}$  = proporção de heterozigotos na amostra  $k$ .

O índice de fixação ( $\hat{f}$ ) foi estimado pelos desvios da heterozigosidade, sendo:

$$\hat{f} = (\hat{H}_E - \hat{H}_O) / \hat{H}_E$$

A significância dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) em cada loco e para cada população foi testado com auxílio do programa Fstat versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002), baseado em randomizações múltiplas, à um nível de significância de 5%.

As estatísticas  $F$  ( $\hat{F}_{IS}$ ,  $\hat{F}_{IT}$  e  $\hat{F}_{ST}$ ) de Wright (WRIGHT, 1950) foram estimadas utilizando o programa Fstat versão 2.9.3.2, que se baseia no método descrito por Weir e Cockerham (1984). A significância das estatísticas  $F$  foi obtida por meio do mesmo programa, que utiliza o método de reamostragem *bootstrap*, com 1000 reamostragens e significância de 95%, empregando o intervalo de confiança. Como medida de comparação, também foi estimado o  $\hat{R}_{ST}$  (SLATKIN, 1995) a partir do método descrito por Goodman (1997), desenvolvido para análises com microssatélites por levar em consideração o processo mutacional dos microssatélites.

Os alelos exclusivos foram identificados utilizando o programa GenAlEx versão 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012) e o número de alelos raros foi calculado com auxílio do Excel, onde foram considerados alelos raros aqueles cuja frequência alélica foi menor que 0,05 em cada população.

Os valores de PIC foram obtidos por meio do programa CERVUS versão 3.0.3 (KALINOWSKI et al., 2007). Sendo:

$$PIC = 1 - \sum_{i=j}^m p_{ij}^2$$

Onde,  $p_{ij}$  é a frequência do alelo “ $j$ ” no marcador “ $i$ ”.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi obtida por meio do programa GenAlEx versão 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

Para verificar a possível associação entre divergência genética ( $\hat{F}_{ST}$ ) e distância geográfica (em Km), foi realizado o Teste de Mantel (MANTEL, 1970) a partir da correlação entre as matrizes das variáveis para os pares de populações. A matriz de divergência genética foi obtida com auxílio do programa Fstat versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002) e a matriz das distâncias geográficas foi gerada por meio do programa *Geographic Distance Matrix Generator* (ERSTS, 2018), utilizando as coordenadas geográficas X e Y de cada população. O coeficiente de correlação e o gráfico foram gerados com auxílio do Excel.

Um dendrograma foi gerado a partir de uma matriz de distância genética de Nei (1978) obtida no GDA com agrupamento do algoritmo de médias aritméticas por meio do método (UPGMA) utilizando o programa PAST (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

Para os marcadores SSR plastidiais, foram estimadas as frequências alélicas, o número de alelos ( $A$ ), o Índice de Shannon ( $I$ ) e a diversidade de haplótipos ( $h$ ) por meio do programa GenAlEx versão 6.5, considerando as análises para dado haploide (PEAKALL; SMOUSE, 2012). A diversidade de haplótipos é obtida pela equação abaixo, onde  $p_i$  é a frequência alélica estimada para o  $i$ -ésimo alelo.

$$h = 1 - \sum p_i^2$$

O Índice de Shannon foi estimado com base equação abaixo, sendo  $\ln$  é logaritmo natural e  $p_i$  é a frequência alélica estimada para o  $i$ -ésimo alelo:

$$I = - \sum p_i \ln p_i$$

### 5.3 Resultados

As frequências alélicas obtidas com a utilização dos oito locos microssatélites nucleares e dos dois locos plastidiais estão apresentadas na Tabela 5.6. O loco Cxant76, com oito alelos, foi o loco que apresentou o maior número de alelos dentre os microssatélites nucleares desenvolvidos para *C. xanthocarpa*. O loco Cxant22 foi o loco com menor número, apresentando apenas dois alelos. Considerando o total de oito locos microssatélites em 200 plantas, foram observados 31 alelos.

**Tabela 5.6.** Frequências alélicas para os oito locos microssatélites nucleares e para os dois locos microssatélites plastidiais em quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* de Santa Catarina.

Loco	Motivo SSR	Alelos	Frequências alélicas			
			Coronel Freitas	Iomerê	São Joaquim	São José do Cerrito
Cxant59	(GA) <sub>10</sub>	<i>n</i>	50	50	50	50
		197	0,560	0,650	0,910	0,620
		217	0,000	0,000	0,000	0,160
		225	0,440	0,350	0,090	0,220
Cxant50	(CTTT) <sub>3</sub>	<i>n</i>	49	40	48	45
		475	0,082	0,013	0,281	0,000
		483	0,031	0,213	0,073	0,289
		487	0,061	0,000	0,177	0,089
		491	0,827	0,775	0,469	0,611
		495	0,000	0,000	0,000	0,011
Cxant66	(AGA) <sub>4</sub>	<i>n</i>	49	50	50	50
		204	0,714	0,740	0,400	0,570
		207	0,286	0,240	0,500	0,420
		208	0,000	0,020	0,100	0,010
Cxant69	(GA) <sub>7</sub>	<i>n</i>	48	48	50	48
		289	0,292	0,240	0,570	0,552
		303	0,260	0,104	0,010	0,031
		309	0,448	0,656	0,420	0,417
Cxant76	(AAG) <sub>6</sub>	<i>n</i>	48	46	41	47
		342	0,073	0,043	0,000	0,043
		344	0,115	0,196	0,000	0,074
		345	0,531	0,609	0,829	0,564
		348	0,063	0,022	0,134	0,000
		351	0,021	0,000	0,000	0,287
		353	0,156	0,109	0,037	0,032

		<b>354</b>	0,021	0,022	0,000	0,000
		<b>355</b>	0,021	0,000	0,000	0,000
<b>Cxant36</b>	<b>(AAG)<sub>4</sub></b>	<b>n</b>	48	48	49	48
		<b>269</b>	0,365	0,438	0,061	0,313
		<b>272</b>	0,188	0,094	0,633	0,188
		<b>273</b>	0,000	0,000	0,224	0,010
		<b>287</b>	0,448	0,469	0,082	0,490
<b>Cxant22</b>	<b>(TCCA)<sub>3</sub></b>	<b>n</b>	49	50	50	50
		<b>209</b>	0,449	0,000	1,000	0,960
		<b>213</b>	0,551	1,000	0,000	0,040
<b>Cxant26</b>	<b>(ATCG)<sub>3</sub></b>	<b>n</b>	49	49	50	50
		<b>325</b>	0,143	0,173	0,140	0,190
		<b>333</b>	0,082	0,000	0,000	0,000
		<b>345</b>	0,776	0,827	0,860	0,810
<b>Guabi05</b>	<b>(T)<sub>10</sub></b>	<b>n</b>	50	50	50	50
		<b>199</b>	0,100	0,000	0,280	0,700
		<b>200</b>	0,620	0,900	0,040	0,060
		<b>201</b>	0,280	0,100	0,040	0,140
		<b>205</b>	0,000	0,000	0,640	0,100
<b>Guabi11</b>	<b>(ATTA)<sub>4</sub></b>	<b>n</b>	49	50	50	50
		<b>222</b>	0,408	0,000	1,000	0,800
		<b>250</b>	0,592	1,000	0,000	0,200

Notas: *n* = tamanho amostral; Cxant = marcador SSR nuclear; Guabi = marcador SSR plastidial.

No total, foram identificados quatro alelos exclusivos, sendo dois em Coronel Freitas e dois em São José do Cerrito (Tabela 5.7). No total foram identificados 18 alelos raros (com frequência alélica menor que 0,05) utilizando os SSR nucleares, sendo dois em São Joaquim, quatro em Coronel Freitas, cinco em Iomerê e sete em São José do Cerrito. Com o uso dos marcadores plastidiais, foi possível identificar dois alelos raros em São Joaquim (Tabela 5.8).

**Tabela 5.7.** Identificação dos alelos exclusivos encontrados nos locos microssatélites nucleares das quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* de Santa Catarina.

<b>População</b>	<b>Loco</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frequência alélica</b>
<b>Coronel Freitas</b>	Cxant76	355	0,021
<b>Coronel Freitas</b>	Cxant26	333	0,082
<b>São José do Cerrito</b>	Cxant59	217	0,160
<b>São José do Cerrito</b>	Cxant50	495	0,011

**Tabela 5.8.** Identificação dos alelos raros encontrados nos locos microssatélites nucleares e plastidiais em quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* de Santa Catarina.

<b>População</b>	<b>Loco</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frequência alélica</b>
<b>Coronel Freitas</b>	Cxant50	483	0,031
<b>Coronel Freitas</b>	Cxant76	351	0,021
<b>Coronel Freitas</b>	Cxant76	354	0,021
<b>Coronel Freitas</b>	Cxant76	355	0,021
<b>Iomerê</b>	Cxant50	475	0,013
<b>Iomerê</b>	Cxant66	208	0,020
<b>Iomerê</b>	Cxant76	342	0,043
<b>Iomerê</b>	Cxant76	348	0,022
<b>Iomerê</b>	Cxant76	354	0,022
<b>São Joaquim</b>	Cxant69	303	0,010
<b>São Joaquim</b>	Cxant76	353	0,037
<b>São José do Cerrito</b>	Cxant50	495	0,011
<b>São José do Cerrito</b>	Cxant66	208	0,010
<b>São José do Cerrito</b>	Cxant69	303	0,031
<b>São José do Cerrito</b>	Cxant76	342	0,043
<b>São José do Cerrito</b>	Cxant76	353	0,032
<b>São José do Cerrito</b>	Cxant36	273	0,010
<b>São José do Cerrito</b>	Cxant22	213	0,040
<b>São Joaquim</b>	Guabi05	200	0,040
<b>São Joaquim</b>	Guabi05	201	0,040

*Notas:* Cxant = marcador SSR nuclear; Guabi = marcador SSR plastidial.

Os resultados para o desequilíbrio genotípico não evidenciaram ligação entre os locos, portanto os oito locos SSR nucleares desenvolvidos para a espécie foram utilizados para estimar o número de alelos, a heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) para cada um dos locos em cada uma das quatro populações de guabirola analisadas no Estado de Santa Catarina, além do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e do resultado do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5.9).

Foram identificados desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para os locos Cxant22, Cxant50 e Cxant76 na população amostrada em Coronel Freitas e na população amostrada em São José do Cerrito. Na população de Iomerê, o loco Cxant76

apresentou desvio do HWE. Na população amostrada em São Joaquim, os locos Cxant36, Cxant50 e Cxant76 apresentaram desvios de HWE. O loco Cxant22 se apresentou monomórfico nas populações de Iomerê e São Joaquim em  $H_O$  e  $H_E$  (na Tabela 5.9, a significância dos desvios do HWE está demonstrada em sobrescrito ao  $H_E$ ).

Ao analisar a  $H_O$  por marcador SSR, os valores apresentaram grande variação entre as populações, sendo que o maior valor observado foi obtido com o marcador Cxant69 na população de São Joaquim ( $H_O=0,860$ ). A  $H_E$  também apresentou grande variação, onde o maior valor esperado foi observado com o marcador Cxant76 na população de Coronel Freitas ( $H_E=0,681$ ).

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,269 (Cxant26) a 0,637 (Cxant36). Além disso, na Tabela 5.9 são apresentados os índices levando em consideração o  $n$  obtido em cada loco.

**Tabela 5.9.** Numero de alelos por loco ( $A$ ), heterozigosidade média observada ( $\widehat{H}_O$ ) e esperada ( $\widehat{H}_E$ ), significância estatística do teste do equilíbrio Hardy-Weinberg e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) para os oito locos microsatélites nucleares em quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* de Santa Catarina.

Locos	Coronel Freitas				Iomerê				São Joaquim				São José do Cerrito				PIC
	$n$	$A$	$\widehat{H}_O$	$\widehat{H}_E^A$	$n$	$A$	$\widehat{H}_O$	$\widehat{H}_E^A$	$n$	$A$	$\widehat{H}_O$	$\widehat{H}_E^A$	$n$	$A$	$\widehat{H}_O$	$\widehat{H}_E^A$	
Cxant22	49	2	0,000	0,505*	50	1	0,000	0,000 <sup>m</sup>	50	1	0,000	0,000 <sup>m</sup>	50	2	0,000	0,078*	0,364
Cxant26	49	3	0,327	0,376 <sup>ns</sup>	49	2	0,347	0,289 <sup>ns</sup>	50	2	0,240	0,243 <sup>ns</sup>	50	2	0,380	0,310 <sup>ns</sup>	0,269
Cxant36	48	3	0,500	0,639 <sup>ns</sup>	48	3	0,396	0,588 <sup>ns</sup>	49	4	0,265	0,547*	48	4	0,583	0,635 <sup>ns</sup>	0,637
Cxant50	49	4	0,143	0,310*	40	3	0,250	0,360 <sup>ns</sup>	48	4	0,333	0,675*	45	4	0,311	0,544*	0,481
Cxant59	50	2	0,480	0,498 <sup>ns</sup>	50	2	0,460	0,460 <sup>ns</sup>	50	2	0,180	0,165 <sup>ns</sup>	50	3	0,520	0,547 <sup>ns</sup>	0,381
Cxant66	49	2	0,449	0,412 <sup>ns</sup>	50	3	0,300	0,399 <sup>ns</sup>	50	3	0,480	0,587 <sup>ns</sup>	50	3	0,500	0,504 <sup>ns</sup>	0,404
Cxant69	48	3	0,646	0,653 <sup>ns</sup>	48	3	0,625	0,505 <sup>ns</sup>	50	3	0,860	0,500 <sup>ns</sup>	48	3	0,833	0,523 <sup>ns</sup>	0,494
Cxant76	48	8	0,313	0,681*	46	6	0,196	0,587*	41	3	0,146	0,298*	47	5	0,362	0,600*	0,557

Notas:  $n$  = tamanho amostral; <sup>A</sup> Significância estatística para os desvios do equilíbrio Hardy-Weinberg (\*  $p < 0,05$ ; <sup>ns</sup> = não significativo; <sup>m</sup> = monomórfico).

O maior número de alelos foi observado em Coronel Freitas ( $k=27$ ), seguido por São José do Cerrito ( $k=26$ ), Iomerê ( $k=23$ ) e o menor número de alelos foi observado em São Joaquim ( $k=22$ ), fornecendo assim uma média de 24,5 alelos observados (Tabela 5.10). Coronel Freitas e São José do Cerrito apresentaram 100% dos locos em polimorfismo, Iomerê e São Joaquim 87,5%. Além disso, a população de Coronel Freitas foi a que apresentou maior número médio de alelos por loco e por loco polimórfico ( $\hat{A}$  e  $\hat{A}_p = 3,4$ ), seguido por São José do Cerrito ( $\hat{A}$  e  $\hat{A}_p = 3,2$ ), Iomerê ( $\hat{A} = 2,9$  e  $\hat{A}_p = 3,1$ ) e São Joaquim ( $\hat{A}=2,8$  e  $\hat{A}_p = 3,0$ ).

Considerando o conjunto dos oito locos SSR nucleares, ao analisar as heterozigosidades por população,  $H_O$  foi maior em São José do Cerrito ( $H_O=0,436$ ), seguido por Coronel Freitas ( $H_O=0,357$ ), Iomerê ( $H_O=0,322$ ) e São Joaquim ( $H_O=0,313$ ), com média geral de 0,357 ( $\pm 0,056$  de desvio padrão). Com relação às  $H_E$ , o maior valor esperado foi de Coronel Freitas ( $H_E=0,508$ ), seguido por São José do Cerrito ( $H_E=0,467$ ), Iomerê ( $H_E=0,398$ ) e São Joaquim ( $H_E=0,376$ ), sendo a média geral 0,437 ( $\pm 0,061$  de desvio padrão).

Assim, ao estimar os índices de fixação por população, foi possível verificar índices significativos ( $p < 0,05$ ) para Coronel Freitas ( $\hat{f}=0,299$ ), Iomerê ( $\hat{f}=0,193$ ) e São Joaquim ( $\hat{f}=0,170$ ). No entanto, o índice de fixação não foi significativo para a população amostrada em São José do Cerrito ( $\hat{f}=0,067$ ). Como média ( $\pm$ desvio padrão) para todas as populações, o valor foi de  $\hat{f}=0,182$  ( $\pm 0,095$ ).

**Tabela 5.10.** Índices de diversidade genética para as quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* de Santa Catarina a partir da utilização de oito locos microssatélites nucleares.  $n$  = tamanho amostral;  $k$  = número total de alelos;  $\hat{P}_{(99\%)}$  = porcentagem de locos polimórficos;  $\hat{A}$  = número médio de alelos por loco;  $\hat{A}_p$  = número médio de alelos por loco polimórfico;  $\hat{H}_E$  = heterozigosidade esperada;  $\hat{H}_O$  = heterozigosidade observada;  $\hat{f}$  = índice de fixação; A.R. = alelos raros; A.E. = alelos exclusivos. (<sup>ns</sup>= não significativo; \* =  $p < 0,05$ )

Populações	$n$	$k$	$\hat{P}_{(99\%)}$	$\hat{A}$	$\hat{A}_p$	$\hat{H}_E$	$\hat{H}_O$	$\hat{f}$	A.R.	A.E.
<b>Coronel Freitas</b>	50	27	100	3,4	3,4	0,508	0,357	0,299*	4	2
<b>Iomerê</b>	50	23	87,5	2,9	3,1	0,398	0,322	0,193*	5	0
<b>São Joaquim</b>	50	22	87,5	2,7	3,0	0,376	0,313	0,170*	2	0
<b>São José do Cerrito</b>	50	26	100	3,2	3,2	0,467	0,436	0,067 <sup>ns</sup>	7	2
<b>MÉDIA</b>	50	24,5	93,8	3,1	3,2	0,437	0,357	0,182	4,5	1
<b>Desvio padrão</b>	0	2,38	7,22	0,3	0,2	0,061	0,056	0,095	2,08	1,16

Ao analisar a estrutura genética a partir das estatísticas F (Tabela 5.11), é possível constatar que o índice de fixação médio dentro de cada população ( $\hat{F}_{IS} = 0,186$ ) não foi significativamente diferente de zero. O índice de fixação total ( $\hat{F}_{IT} = 0,339$ ) e o índice de fixação devido à subdivisão ( $\hat{F}_{ST} = 0,188$ ) foram significativamente diferentes de zero ( $p < 0,05$ ). O índice  $\hat{R}_{ST}$ , que leva em consideração os processos mutacionais dos marcadores microssatélites foi estimado apenas para comparação com o  $\hat{F}_{ST}$ , pois as populações apresentaram tamanho populacional representativo, sendo  $\hat{R}_{ST} = 0,172$ , um valor consideravelmente similar ao  $\hat{F}_{ST} = 0,188$ .

**Tabela 5.11.** Estimativa das estatísticas F de Wright para o conjunto de quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* em Santa Catarina a partir da utilização de oito locos microssatélites nucleares.  $\hat{F}_{IS}$  = índice de fixação médio dentro da população;  $\hat{F}_{IT}$  = índice de fixação total;  $\hat{F}_{ST}$  = índice de fixação devido à subdivisão; IC = intervalo de confiança; \*= $p < 0,05$ .

	$\hat{F}_{IS}$	$\hat{F}_{IT}$	$\hat{F}_{ST}$
<b>Estimativa</b>	0,186	0,339*	0,188*
<b>Limite Superior (IC 95%)</b>	0,410	0,594	0,368
<b>Limite Inferior (IC 95%)</b>	-0,050	0,071	0,072

O resultado da AMOVA (Tabela 5.12) revelou que 61% da variação encontrada corresponde a variação dentro de plantas, enquanto que 22% da variação é entre plantas e 17% entre populações.

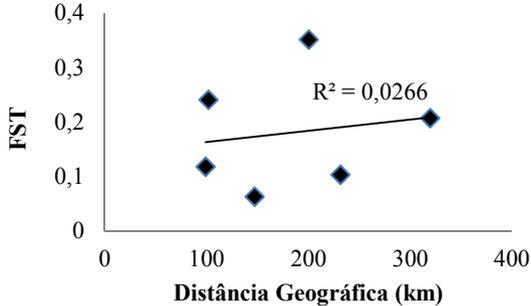
**Tabela 5.12.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* de Santa Catarina a partir da utilização de oito locos microssatélites nucleares.

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	VE	Varição Total
<b>Entre Populações</b>	3	124,21	41,40	0,39	17%
<b>Entre Plantas</b>	196	462,72	2,36	0,49	22%
<b>Dentro de Plantas</b>	200	277,00	1,39	1,39	61%
<b>TOTAL</b>	399	863,93		2,26	100%

Notas: GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM = quadrado médio; VE = variância estimada; ( $p=0,001$ ; 999 permutações).

Com base nos valores de correlação, estimado pelo Teste de Mantel, foi verificado que a distância geográfica entre populações pouco explica a diferenciação encontrada entre os pares de populações, pois o coeficiente de correlação calculado foi de 0,163 (Figura 5.2).

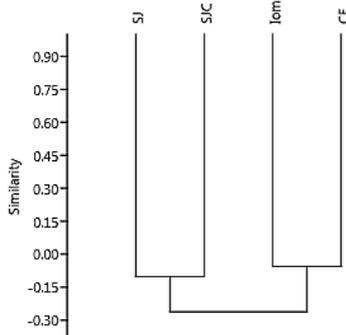
**Figura 5.2.** Representação gráfica do Teste de Mantel entre as distâncias genéticas ( $F_{ST}$ ) e as distâncias geográficas para as quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* de Santa Catarina



Notas:  $R^2$  = coeficiente de correlação de Pearson.

O dendrograma (Figura 5.3), formado a partir da matriz de distância genética de Nei (1978) com agrupamento UPGMA, revelou a formação de dois grupos, um formado pelas populações de Coronel Freitas e Iomerê e outro formado por pelas populações de São Joaquim e São José do Cerrito (coeficiente de correlação cofenética = 0,69).

**Figura 5.3.** Dendrograma com base no método de agrupamento UPGMA com base das distâncias genéticas de Nei (1978) das quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* em Santa Catarina a partir dos oito locos microssatélites.



*Notas:* SJ=São Joaquim; SJC=São José do Cerrito; Iom=Iomerê; CF = Coronel Freitas. Coeficiente de correlação cofenética = 0,69.

Com relação aos cpSSR (Tabela 5.13), o número de alelos por loco variou de dois a quatro. Utilizando apenas dois locos plastidiais, os valores de diversidade de haplótipos variaram de 0,483 a 0,527; zero a 0,180; zero a 0,509 e 0,320 a 0,477 nas populações de Coronel Freitas, Iomerê, São Joaquim e São José do Cerrito, respectivamente. Em relação à média ( $\pm$ desvio padrão), a população de Coronel Freitas apresentou a maior diversidade de haplótipos,  $h=0,505 (\pm 0,031)$ , seguido por São José do Cerrito ( $h=0,398\pm 0,111$ ), São Joaquim ( $h=0,254\pm 0,360$ ) e Iomerê ( $h=0,090\pm 0,127$ ). Os desvios observados em Iomerê e São Joaquim são altos, pelo fato do loco Guabi11 ter apresentado apenas um alelo em Iomerê (alelo 250) e um alelo em São Joaquim (alelo 222).

O Índice de Shannon variou para os dois locos, onde foram observados valores entre 0,676 a 0,883; zero a 0,325; zero a 0,900 e 0,500 a 0,924 para as populações de Coronel Freitas, Iomerê, São Joaquim e São José do Cerrito, respectivamente, onde os maiores valores são relacionados ao loco Guabi05.

**Tabela 5.13.** Índices de diversidade para os dois locos microssatélites plastidiais em quatro populações de *Campomanesia xanthocarpa* de Santa Catarina.  $n$ = tamanho amostral;  $A$ = número de alelos;  $h$  = diversidade de haplótipos;  $I$  = Índice de Shannon.

Loco	Coronel Freitas			Iomerê			São Joaquim			São José do Cerrito		
	(n=50)			(n=50)			(n=50)			(n=50)		
	<i>A</i>	<i>h</i>	<i>I</i>	<i>A</i>	<i>h</i>	<i>I</i>	<i>A</i>	<i>h</i>	<i>I</i>	<i>A</i>	<i>h</i>	<i>I</i>
<b>Guabi05</b>	3	0,527	0,883	2	0,180	0,325	4	0,509	0,900	4	0,477	0,924
<b>Guabi11</b>	2	0,483	0,676	1	0,000	0,000	1	0,000	0,000	2	0,320	0,500
<b>MÉDIA</b>	2,5	0,505	0,780	1,5	0,090	0,163	2,5	0,254	0,450	3	0,398	0,712
<b>Desvio padrão</b>	0,7	0,031	0,146	0,7	0,127	0,230	2,1	0,360	0,363	1,4	0,111	0,300

## 5.4 Discussão

Os marcadores microssatélites nucleares desenvolvidos em *Campomanesia xanthocarpa*, apresentaram um número reduzido de alelos por loco (de dois a oito) (Tabela 5.9). Silva (2012) utilizando SSR desenvolvidos em *Eucalyptus* spp. (denominados de Embra), *Eugenia uniflora* (denominados de Eun) e *Melaleuca alternifolia* (denominados de Scu) e transferidos para análise da diversidade genética em populações de *C. xanthocarpa* no Paraná, também verificou um número reduzido de alelos por loco (de dois a sete).

Entretanto, Zucchi et al. (2003) utilizou três locos iguais aos do estudo de Silva (2012) para analisar a variação genética de *Eugenia dysenterica* e verificou número de alelos consideravelmente superior em dois locos: Embra 14 = 22 alelos e Embra 210 = 14 alelos, contra Embra 14 = 7 alelos e Embra 210 = 3 alelos verificado por Silva (2012) em *C. xanthocarpa*. Demonstram os resultados, portanto, que mesmo utilizando SSR transferidos, o número de alelos em *C. xanthocarpa* é menor quando comparado com as demais espécies de Myrtaceae. Levando em consideração que no estudo de Zucchi et al. (2003), haviam em média de 12 plantas por população amostrada, totalizando 116 plantas e Silva (2012) foram analisadas 20 plantas por população, totalizando 60 plantas.

Ferreira-Ramos et al. (2014) utilizou oito locos SSR iguais aos utilizados por Silva (2012) ao analisar a variação genética em quatro espécies: *Eugenia uniflora*, *E. piriformis*, *E. brasiliensis* e *E. francavilleana*, onde para o loco Embra 14 foram verificados 2, 0, 5 e 22 alelos, respectivamente para cada espécie. Para o loco Embra 63, Ferreira-Ramos et al. (2014) verificaram 11, 4, 2 e 0 alelos em cada espécie, respectivamente. E para o loco Embra 210, os autores verificaram 9, 15, 4 e 2 alelos em cada espécie, respectivamente. Estes resultados demonstram como o número de alelos é variável por espécie, considerando que o número de plantas amostradas no estudo de Ferreira-Ramos et al. (2014) foi de 32 plantas de *Eugenia uniflora*, 26 de *E. piriformis*, 16 de *E. brasiliensis* e 32 plantas amostradas de *E. francavilleana*.

Utilizando o loco Scu052tt, Silva (2012) verificou apenas 4 alelos em *C. xanthocarpa*, e Ferreira-Ramos et al. (2014) verificou 10, 7, 3 e 3 alelos para *Eugenia uniflora*, *E. piriformis*, *E. brasiliensis* e *E. francavilleana*, respectivamente. Ferreira-Ramos et al. (2008) verificaram número de alelos consideravelmente superiores em três locos iguais aos utilizados por Silva (2012), Eun 5 = 21 alelos, Eun

11=18 alelos e Eun121= 10 alelos. É comum encontrar valores acima de 10 alelos por loco quando se utilizam marcadores microssatélites, entretanto, como visto acima, o número de alelos variou entre as espécies, mesmo quando se utilizaram os mesmos locos.

De acordo com Machado (2017), as espécies *Campomanesia xanthocarpa* e *Acca sellowiana* estão mais relacionadas geneticamente quando comparadas com *Eugenia uniflora* que faz parte da mesma tribo, Myrteae.

Santos et al. (2008), ao estudar *A. sellowiana*, utilizou SSRs espécie-específicos e encontrou de cinco a onze alelos por loco, com PIC variando de 0,499 a 0,872. Olkoski (2014), também em seu estudo com *A. sellowiana*, encontrou de dez a trinta alelos por loco utilizando SSRs espécie-específicos, com um PIC elevado, variando de 0,704 a 0,904 para os locos analisados. Para os SSR desenvolvidos neste estudo, foram verificados valores de PIC inferiores, que variaram de 0,269 (Cxant26) a 0,637 (Cxant36) (Tabela 5.9). Segundo Botstein et al. (1980), para que um marcador seja extremamente informativo, é desejável que o loco apresente muitos alelos e o valor de PIC próximo a 1,00. Sendo assim, os marcadores Cxant76 e Cxant36 são altamente informativos, pois apresentaram valores de PIC superiores à 0,500. Os demais locos são considerados moderadamente informativos, pois apresentaram PIC dentro do intervalo de 0,250 a 0,500.

Considerando o conjunto dos oito locos SSR nucleares, a heterozigosidade esperada foi maior que a heterozigosidade observada em todas as populações, o que gerou índices de fixação significativos em três, das quatro populações analisadas no Estado de Santa Catarina: Coronel Freitas ( $\hat{f}=0,299$ ), Iomerê ( $\hat{f}=0,193$ ) e São Joaquim ( $\hat{f}=0,170$ ) (Tabela 5.10). As estimativas significativas indicam que há excesso de homozigotos em cada população em relação ao que se espera pelo HWE, portanto há possibilidade de estar ocorrendo deriva genética e endogamia nessas populações. A atuação dessas forças micro evolutivas podem estar relacionadas ao processo de fragmentação florestal em Coronel Freitas e Iomerê. Porém, mesmo em área com grande cobertura florestal, observou-se desvios significativos do HWE em São Joaquim, sugerindo a atuação de outras variáveis atuando nessas populações.

Estas forças micro evolutivas poderão ocasionar ao longo do tempo a perda de alguns alelos e fixação de outros alelos nessas populações. Com a diminuição da frequência de genótipos heterozigotos nas próximas gerações, a capacidade de adaptação dos indivíduos diante

da pressão de seleção do ambiente poderá ser menor (HARTL; CLARK, 2010).

No estudo de Silva (2012), foi verificada pouca variação entre as heterozigosidades nas três populações de *C. xanthocarpa* analisadas pelo autor no Estado do Paraná, com valores médios de  $H_O$  de 0,46 e  $H_E$  de 0,47. As três populações, denominadas de A, B e C, apresentaram valores de  $H_O$  igual a 0,41; 0,45 e 0,41, respectivamente. Os valores de  $H_E$  foram de 0,42; 0,53 e 0,45, respectivamente para as populações A, B e C. É importante ressaltar que a região de ocorrência é distinta, além do próprio marcador utilizado e o tamanho amostral. Segundo a descrição de Silva (2012), a população A é um fragmento de vegetação isolada por áreas agrícolas, já os fragmentos B e C estão conectados a outros remanescentes florestais, em uma área de preservação ambiental.

A população A estudada por Silva (2012) é semelhante à população de Iomerê analisada nesta Dissertação, pois também é considerado um fragmento pequeno e próximo ao perímetro urbano. Além disso, na área em que a população de Iomerê se encontra, há baixíssima diversidade de espécies. A população amostrada em Coronel Freitas é cercada por áreas agrícolas, e boa parte das plantas coletadas estava em área de Mata Ciliar da propriedade. A população de São José do Cerrito também é cercada por áreas agrícolas, e é próxima ao leito do Rio Caveiras. Já a população amostrada em São Joaquim pertence à um remanescente florestal de difícil acesso (área particular próxima ao Rio Pelotas).

Ao compararmos com outras espécies do gênero, Miranda et al. (2016) utilizaram EST-SSR transferidos de *Eucalyptus* para duas espécies de guabiroba existentes no Cerrado, a *C. adamantium* e *C. pubescens*, onde verificaram que não havia índice de fixação significativo, com os valores de  $H_O$  variando entre 0,498 a 0,507 entre as populações, e os valores de  $H_E$  entre 0,504 a 0,629. Em estudos com pitanga (*E. uniflora*), Ferreira-Ramos et al. (2008) a partir de marcadores SSR, verificaram os valores de  $H_O$  entre 0,381 a 0,472 e  $H_E$  entre 0,812 a 0,830, indicando déficit de heterozigotos nas populações analisadas no Estado de São Paulo. Utilizando SSR espécie-específico em *A. sellowiana*, Borsuk (2018) comparou 15 populações distribuídas em terras Indígenas, comunidades quilombolas e Unidades de Conservação no Sul do Brasil, e encontrou valores de  $H_O$  variando entre 0,54 a 0,77 e  $H_E$  entre 0,77 a 0,86, resultando em índices de fixação significativos para todas as populações analisadas, indicando evidências de endogamia e deriva genética nesses conjuntos de plantas.

Com relação às estatísticas F (Tabela 5.11), o conjunto das quatro populações de *C. xanthocarpa* apresentou índice de fixação total ( $\hat{F}_{IT}$ ) significativo de 0,339. Para o índice de fixação devido à subdivisão ( $\hat{F}_{ST}$ ), foi verificado o valor significativo de 0,188, o que indica que 18,8% da variação alélica encontrada nas populações não é compartilhada pelo conjunto das populações devido à subdivisão. O valor de  $\hat{F}_{ST}$  é próximo ao valor obtido por Silva (2012) para os locos SSR analisados nas populações de *C. xanthocarpa* do Paraná ( $\hat{F}_{ST} = 0,19$ ). Ao comparar o valor de  $\hat{F}_{IT}$ , Silva (2012) obteve um índice menor ( $\hat{F}_{IT} = 0,21$ ) utilizando os locos SSR.

Ferreira-Ramos et al. (2008), estudando a genética de três populações de *E. uniflora* a partir de locos SSR, verificaram o valor de  $\hat{F}_{ST}$  de 0,031, um valor considerado baixo, porém foi significativo no estudo, indicando uma baixa diferenciação genética entre as populações. Borsuk (2018) também verificou um valor considerado baixo e significativo para o índice de diferenciação entre as populações de *A. sellowiana* ( $\hat{F}_{ST} = 0,06$ ).

De acordo com Hartl e Clark (2010), a estruturação genética pode fazer com que ocorra fixação de alelos ou perda de alelos ao longo do tempo, reduzindo assim a diversidade genética dentro das populações. Sendo assim, em razão do  $\hat{F}_{ST}$  obtido neste estudo (0,188), destaca-se a necessidade de mais de uma área para a conservação da guabiroba, bem como de ações voltadas ao aumento do fluxo gênico entre fragmentos, como por exemplo, a criação de corredores ecológicos, a proteção e a manutenção da fauna e a proteção dos regenerantes nestas áreas. Estas ações também poderão auxiliar na redução dos efeitos negativos gerados pela deriva genética e endogamia ( $\hat{f}$ ), que foi observado na maioria das populações.

É importante salientar que a coleta excessiva de frutos para consumo ou para beneficiamento na indústria poderá influenciar negativamente o fluxo gênico da espécie. Portanto, estratégias de colheita devem ser levadas em consideração dentro de um contexto de autoecologia e manejo sustentável para a conservação genética da espécie. A adoção de práticas sustentáveis adequadas em cada realidade, como por exemplo, a introdução de migrantes de outras populações da região, poderiam trazer benefícios e até mesmo reverter estes quadros de estruturação genética e altos valores do índice de fixação.

A divergência encontrada entre as populações de Santa Catarina poderiam ser explicadas devido ao isolamento por distância. Entretanto, ao realizar o Teste de Mantel, foi possível verificar que a distância

geográfica entre as populações explica muito pouco essa diferenciação, sendo que o coeficiente de correlação foi de apenas 16% (Figura 5.2). Os fatores históricos, evolutivos e ecológicos podem estar relacionados a essa divergência observada, como por exemplo, a ação humana histórica em cada região e a própria presença e quantidade dos polinizadores e dispersores em cada população (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Sendo assim, estudos que envolvam filogeografia e ecologia da espécie em sua área de distribuição e ocorrência se tornam extremamente relevantes para compreender a interação entre esses fatores.

A partir da análise do dendrograma, foi possível verificar a formação de dois grupos, sendo um grupo formado pelas populações de Coronel Freitas e Iomerê e outro formado por pelas populações de São Joaquim e São José do Cerrito. Aparentemente, com base nas distâncias genéticas, verificou-se uma estruturação entre as populações mais conservadas *versus* as menos conservadas.

Foram verificados quatro alelos exclusivos (Tabela 5.7), sendo dois em Coronel Freitas e dois em São José do Cerrito. Importante observar que o alelo 355 do loco Cxant76 identificado na população de Coronel Freitas e o alelo 495 do loco Cxant50 identificado na população de São José do Cerrito, também são considerados alelos raros, com frequência alélica menor que 0,05. Silva (2012) também encontrou alelos exclusivos nas populações do Paraná, sendo um deles considerado raro, com frequência alélica inferior a 0,05. Estes alelos com baixa frequência são vulneráveis aos efeitos de deriva genética, onde a longo prazo estes alelos poderão ser perdidos na população (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998; HARTL; CLARK, 2007).

A maior parte dos alelos raros (Tabela 5.8) foi identificada na população de São José do Cerrito ( $AR=7$ ), entretanto esta população não apresentou índice de fixação significativo ( $\hat{f}= 0,067$ ;  $p<0,05$ ), bem como apresentou valor satisfatório de diversidade genética e, portanto, demonstra a importância desta população do ponto de vista de conservação *in situ*.

Porém, os dados chamam a atenção para a população analisada no município de Coronel Freitas, onde o índice de fixação foi alto e significativo ( $\hat{f}= 0,299$ ;  $p<0,05$ ), e foi identificada a presença de quatro alelos raros e dois alelos exclusivos para essa população, sendo que um dos alelos exclusivos é considerado raro (alelo 355, loco Cxant76, frequência alélica 0,021). Pelo fato de haver um déficit de heterozigotos em relação ao que se espera pelo HWE, o que resultou na estimativa

elevada de  $\hat{f}$ , há indicativo de que está ocorrendo deriva genética e endogamia nessa população. Pelo fato desta população apresentar um alto índice de diversidade genética e a presença de alelos exclusivos, reforça-se a importância de promover ações para aumentar o fluxo gênico entre os demais fragmentos objetivando contrapor os efeitos da deriva genética e assim auxiliar na permanência dos alelos raros na população.

Considerando o conjunto das quatro populações, foi possível verificar a partir da AMOVA (Tabela 5.12), que 61% da variação encontrada correspondem à variação dentro de plantas, enquanto que 22% da variação é entre plantas e 17% entre populações. Este valor corrobora com o valor de  $\hat{F}_{ST}$ , onde foi verificado o valor significativo de 18,8% de divergência entre as populações. Demais estudos com espécies da família Myrtaceae também reportaram o predomínio da variação genética dentro das populações. Utilizando marcadores ISSR em *C. xanthocarpa*, Silva (2012) verificou que 66,9% da variação genética é encontrada dentro das populações. Para o estudo com *A. sellowiana*, Borsuk (2018), a partir da utilização de marcadores SSR, verificou que a maior parte da variação demonstrada pela AMOVA foi dentro de plantas (75%), seguida por 24% entre plantas e 1% entre os grupos por ele estudados. Zucchi (2002), utilizando marcador RAPD em *Eugenia dysenterica* verificou que 72,97% da variabilidade genética está dentro de populações.

Com relação às análises utilizando os cpSSR, neste estudo foi verificado que o número de alelos por loco variou de dois a quatro (Tabela 5.13). E com relação à diversidade haplotípica, foi possível observar grande variação entre as populações de *C. xanthocarpa*, onde o menor valor de diversidade de haplótipos foi observado em Iomerê ( $h=0,090$ ) e o maior valor em Coronel Freitas ( $h=0,505$ ).

População de Iomerê apresentou uma diversidade de haplótipos extremamente baixa ( $h=0,090$ ), principalmente devido ao loco Guabi11 que apresentou um único alelo. Em São Joaquim, o loco Guabi 11 também apresentou um único alelo, entretanto o loco Guabi05 apresentou quatro alelos e gerou uma diversidade haplotípica superior, fazendo com que a média entre locos não fosse tão baixa quanto o valor observado em Iomerê ( $h=0,254$ ).

Na família Myrtaceae, Olkoski (2014) estudou a filogeografia de *A. sellowiana* a partir de sequenciamento de 32 populações utilizando marcadores cpSSR universais, onde obteve variação da diversidade de haplótipos de zero a 0,615. Turchetto-Zolet et al. (2011), estudando a

história evolutiva de *E. uniflora*, a partir da utilização de marcadores cpSSR universais, encontraram oito haplótipos e verificaram diversidade haplotípica variando de zero a 0,733.

Na literatura, a maioria dos estudos baseados em marcadores plastidiais utilizaram cpSSR universais, onde também encontram um número baixo de alelos por loco. Moreno et al. (2009), utilizando marcadores cpSSR universais para estudar a estrutura genética espacial em populações de *Hymenaea stigonacarpa* (Fabaceae; popularmente conhecida como jatobá-do-cerrado) verificaram um número alelos por loco variando de um a seis. No estudo de Moreno et al. (2009), os autores verificaram que uma das populações apresentou um único haplótipo, indicando que a população foi fundada por uma única linhagem materna, evidenciando o efeito fundador. Já em outra população, Moreno et al. (2009) verificaram diversidade haplotípica moderada ( $h=0,667$ ) apresentando seis haplótipos.

Em outro estudo utilizando cpSSR universais em análises genéticas em uma população de *Manilkara huberi* (Sapotaceae; popularmente conhecida como maçaranduba), Azevedo et al. (2008) verificaram de dois a quatro alelos por loco polimórfico e um alto valor de diversidade para adultos ( $h=0,898$ ) e regenerantes ( $h=0,986$ ).

Angioi et al. (2009) utilizaram cpSSR universais em *Phaseolus vulgaris* e *P. coccineus* (Leguminosae), e verificaram que o número de alelos variou de um a oito por loco para *P. vulgaris* e de um a seis para *P. coccineus*. Foram verificados valores médios de diversidade genética de 0,31 e 0,30, para *P. vulgaris* e *P. coccineus*, respectivamente. Pereira (2015) estudou a filogeografia de *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae; Mandioca) utilizando cpSSR universais e também verificou um baixo número de alelos por loco, de dois a três. Para cada loco, a diversidade haplotípica variou de 0,007 a 0,360, e ao analisar por grupo de variedade, o índice apresentou variação entre 0,034 a 0,147. Além disso, Pereira (2015) verificou que o índice de Shannon em *Manihot esculenta* variou de 0,023 a 0,567 para cada loco.

O índice de Shannon é um índice de diversidade genética (LEWONTIN, 1972), e no presente estudo, o índice de Shannon variou de 0,325 a 0,924 para o loco Guabi05 e de zero a 0,676 para o loco Guabi11, entre as quatro populações de *C. xanthocarpa* analisadas. As populações de Iomerê e São Joaquim apresentaram índice de Shannon igual a zero para o loco Guabi 11, pois foi verificado apenas um alelo.

Ao observar a média dos dois locos plastidiais, os valores do índice de Shannon seguiram a mesma tendência da média de diversidade de haplótipos observada, onde o maior valor do índice Shannon foi

observado na população de Coronel Freitas ( $I = 0,780$ ), seguido por São José do Cerrito ( $I = 0,712$ ) e São Joaquim ( $I = 0,450$ ). Iomerê apresentou o menor número de alelos plastidiais para os dois locos analisados, e, portanto, os menores índices de diversidade de haplótipos e índice de Shannon ( $I = 0,163$ ).

A partir da validação destes marcadores SSR plastidiais em *C. xanthocarpa*, estudos evolutivos, de filogeografia, filogenético e de fluxo gênico poderão ser realizados na área de ocorrência da espécie.

## 5.5 Conclusões

Os oito locos microssatélites nucleares se mostraram úteis nas análises de genética populacional, os quais demonstraram valores do Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) variando de 0,269 a 0,637. Os valores de heterozigosidade observada variaram de 0,313 a 0,436 e esperada de 0,376 a 0,508 entre as populações, sendo que três, das quatro populações apresentaram índices de fixação significativos (Coronel Freitas, Iomerê e São Joaquim), indicando a ocorrência de deriva genética e endogamia nessa população nessas populações.

Além disso, foram identificados dois alelos exclusivos na população de Coronel Freitas e outros dois alelos exclusivos na população de São José do Cerrito. Alelos raros foram identificados em todas as populações.

A divergência genética entre as populações foi de 18,8%, onde a maior parte da variância molecular se encontra dentro de plantas (61%), o que poderá ser agravado devido a coleta de frutos e consequente redução de fluxo gênico. Sendo assim, pelo fato da espécie apresentar potencial comercial devido às características de seus frutos, tornam-se necessárias estratégias de colheita dentro de um contexto de manejo sustentável para a conservação genética da espécie. Ações voltadas para aumentar o fluxo gênico entre fragmentos também são indicadas, como a formação de corredores ecológicos, proteção e manutenção da fauna, proteção dos regenerantes. Estas ações de manejo devem considerar os resultados observados, sob o risco de aumentar ainda mais o índice de fixação nas populações, a perda de alelos e a estruturação das populações.

Analizando o conjunto de resultados, há maior preocupação com a população de Coronel Freitas, visto que foram verificados alelos exclusivos, raros e um alto índice de fixação. Assim, no decorrer das gerações, poderá ocorrer perda da diversidade genética e alteração da estrutura genética desta população, o que implica em menor capacidade genética para colonizar novos ambientes.

Com a análise dos dois locos microssatélites plastidiais, foi possível encontrar diversidade de haplótipos que variou de 0,090 a 0,505 entre as populações e índice de Shannon que variou de 0,163 a 0,780 entre as populações. Além disso, a partir do loco Guabi05, foram identificados dois alelos raros na população de São Joaquim. Utilizando cpSSR, outros estudos poderão ser realizados, como por exemplo estudos evolutivos, de filogeografia, filogenético e de fluxo gênico poderão ser realizados na área de ocorrência da espécie.

## 5.6 Referências Bibliográficas

ALBRIGHT, L.M.; SLATKO, B.E. Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. **Current protocols in nucleic acid chemistry**. Appendix 3B 1-5, 2000.

ANGIOI, S.A.; DESIDERIO, F.; RAU, D.; BITOCCHI, E.; ATTENE, G.; PAPA, R. Development and use of chloroplast microsatellites in *Phaseolus* spp. and other legumes. **Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 598-612, 2009.

ASSIS, E.S. Diversidade genética de gabirobeiras (*Campomanesia* spp) por meio de caracteres morfológicos e marcadores moleculares RAPD. **Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2011.**

AZEVEDO, V.C.R., KANASHIRO, M., GRATTAPAGLIA, D.; CIAMPI, A. Y. Variabilidade no cpDNA em *Manilkara huberi*, espécie sob manejo sustentável na Amazônia brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 859-867, 2008.

BORSUK, L.J. **Avaliação da diversidade genética e morfológica da goiabeira-serrana (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret) em Terras Indígenas, Comunidades Quilombolas e em Unidades de Conservação no Sul do Brasil e acesso ao conhecimento tradicional associado ao uso e manejo da espécie.** 248 f. (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2018.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.

CNCFlora. *Campomanesia xanthocarpa* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Campomanesia\\_xanthocarpa](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Campomanesia_xanthocarpa)>. Acesso em: 10 dezembro 2017.

ERSTS, P.J. Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Disponível em:

<[http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/gdmg](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg)>. Acesso em: 22 março 2018.

ESTEVIÃO, C.I.M. **Marcadores genéticos associados a caracteres agrônômicos de genótipos da coleção goiana de germoplasma de *Campomanesia* spp.** 115 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Produção Vegetal), Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, Goiás, 2016.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual review of ecology, evolution, and systematics**, v. 34, n. 1, p. 487-515, 2003.

FERREIRA-RAMOS, R.; LABORDA, P.R.; SANTOS, M.O.; MAYOR, M.S.; MESTRINER, M.A.; SOUZA, A.P.; MARIN-ALZATE, A.L. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 5, p. 1281-1285, 2008.

FERREIRA-RAMOS, R.; ACCORONI, K.A.G.; ROSSI, A.; GUIDUGLI, M.C.; MESTRINER, M.A.; MARTINEZ, C.A.; ALZATE-MARIN, A.L. Genetic diversity assessment for *Eugenia uniflora* L., *E. pyriformis* Cambess., *E. brasiliensis* Lam. and *E. francavilleana* O. Berg neotropical tree species (Myrtaceae) with heterologous SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 61, n. 1, p. 267-272, 2014.

GOODMAN, S.J. RSTCalc: a collection of computer program for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite and determining their significance. **Molecular Ecology**, v.6, p.881-885, 1997.

GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 19 março 2018.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**. 2001.

HARTL, D.L.; CLARCK, A.G. **Princípios de genética de populações**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HUGHES, A.R.; INOUE, B.D.; JOHNSON, M.T.; UNDERWOOD, N.; VELLEND, M. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecological Letters**, v. 11, p. 609-623, 2008.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; SOUZA, L.M.I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**. v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, 2007.

KLAFKE, J.Z.; DA SILVA, M.A.; PANIGAS, T.F.; BELLI, K.C.; DE OLIVEIRA, M.F.; BARICHELLO, M.M.; et al. Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 299-305, 2010.

LEGRAND, C.D.; KLEIN, R.M. Mirtáceas. In: REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, SC: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 596-602. 1977.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **GDA-Genetic Data Analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Version 1.1. 2002.

LEWONTIN, R.C. The apportionment of human diversity. In: **Evolutionary biology**. Springer, Boston, MA, 1972. p. 381-398.

LISBÔA, G.N.; KINUPP, V.F.; DE BARROS, I.B.I. *Campomanesia xanthocarpa* (Guabirola). In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Sul**. Brasília, DF: MMA, 2011, v.1, p. 111-129.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual review of ecology and systematics**, v. 15, n. 1, p. 65-95, 1984.

MANTEL, N.; VALAND, R.S. 1970. A technique of nonparametric multivariate analysis. **Biometrics**. 26 : 547-558

MARCHIORI, J.N.C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas: myrtales**. Santa Maria: Editora da UFSM, 1997. 304 p.

MIRANDA, E.A.G.C.; BOAVENTURA-NOVAES, C.R.D.; BRAGA, R.S.; REIS, E.F.; PINTO, J.F.N.; TELLES, M.P.C. Validation of EST-derived microsatellite markers for two Cerrado-endemic *Campomanesia* (Myrtaceae) species. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 1, 2016.

MORENO, M.A.; TARAZI, R.; FERRAZ, E.M.; GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética espacial em populações de *Hymenaea stigonacarpa* Mart. ex Hayne mediante a utilização de marcadores microssatélites cloroplastidais. **Scientia Forestalis**, v. 37, p. 513-523, 2009.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

OLKOSKI, D. **Filogeografia e dinâmica da diversidade genética de *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret (Myrtaceae)**. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2014.

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. **GenAlEx 6.5**: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539, 2012.

PEREIRA, A.A. **Diversidade genética, genômica e filogeografia de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): implicações para a dispersão do cultivo ao longo dos principais eixos fluviais da bacia amazônica brasileira**. 139 f. Tese (Doutorado - Ciências) Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

PEREIRA, M.C. **Avaliação de compostos bioativos em frutos nativos do Rio Grande do Sul**. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

REFLORA. *Campomanesia*. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB10335>>. Acesso em: 01 dezembro 2017.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Corag, 1988. 528 p.

SANGUINETTI, C.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A.J.G.. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, Belo Horizonte, v. 17, n. 5, p.915-919, dez. 1994.

SANTOS, C.M.R. **Desenvolvimento estrutural associado à biologia reprodutiva de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae)**. 206 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2013.

SANTOS, K.L.; SANTOS, M.O.; LABORDA, P.R.; SOUZA, A.P.; PERONI, N.; NODARI, R.O. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Acca sellowiana* (Berg) Burret. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.1417–1419, 2008.

SANTOS, M.S. **Impacto do Processamento sobre as Características Físico-Químicas, Reológicas e Funcionais de Frutos da Gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg)**. Tese (Doutorado - Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SANTOS, M.S.; CARNEIRO, P.I.B; WOSIACKI, G.; PETKOWICZ, C.L.O.; CARNEIRO, E.B.B. Caracterização físico-química, extração e análise de pectinas de frutos de *Campomanesia xanthocarpa* B. (*Gabiroba*). **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 101-106, 2009.

SILVA, L.F. **Diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa* Berg. oriundas de fragmentos da Mata Atlântica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual do Centro-Oeste, em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva, Guarapuava, 2012.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v.139, p.457-462, 1995.

TULER, A.C.; CARRIJO, T.T.; NÓIA, L.R.; FERREIRA, A.; PEIXOTO, A.L.; DA SILVA FERREIRA, M.F. SSR markers: a tool for species identification in *Psidium* (Myrtaceae). **Molecular biology reports**, v. 42, n. 11, p. 1501-1513, 2015.

TURCHETTO-ZOLET, A.C.; SALGUEIRO, F.; CRUZ, F.; VETO, N.; MARGIS, R. Chloroplast DNA variation and phylogeography of

*Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) in the Brazilian Atlantic forest. **BMC Proceedings**, v.5 (Suppl 7), p.19, 2011.

VALLILO, M.I.; MORENO, P.R.H.; OLIVEIRA, E.D.; LAMARDO, L.C.A.; GARBELOTTI, M.L. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 231-237, 2008.

VASCONCELOS, A.A. **Análise de diversidade genética em populações de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae) por meio de marcadores microssatélites transferíveis.** 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia), Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2016.

WESP, C.L. **Caracterização morfológica e físico-química de guabirobeiras (*Campomanesia* spp.) acessadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.** 232 f. Tese (Doutorado) - Curso de Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR.** 148f. Tese (Doutorado – Agronomia), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

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



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo de desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites nucleares e plastidiais espécie-específico para *C. xanthocarpa* com potencial aplicabilidade para outras sete espécies de Myrtaceae (*Acca sellowiana*, *Campomanesia aurea*, *Eugenia pungens*, *Eugenia uniflora*, *Psidium australe*, *Psidium cattleianum* e *Psidium grandiflorum*).

Os marcadores de microssatélites recém-desenvolvidos para *C. xanthocarpa* são úteis em estudos genéticos populacionais, onde com este estudo foi possível validar estes marcadores e gerar informações a respeito da diversidade genética de quatro populações de guabiroba em Santa Catarina.

Com a caracterização e validação destes marcadores SSRs espécie-específicos, outros estudos genéticos poderão ser realizados utilizando essas marcas e assim avançar na caracterização genética da espécie que se apresenta como um recurso nativo promissor e de relevância ecológica, porém ainda que incipientemente conhecido.

Pelo fato da guabirobeira estar distribuída em um contexto de floresta altamente fragmentada, outros estudos em sua área de ocorrência são essenciais para o futuro da conservação e uso sustentável dessa frutífera nativa promissora.

## APÊNDICE A – Distribuição das plantas dentro das populações amostradas

**Figura A.1.** Distribuição das plantas amostradas em Coronel Freitas, Santa Catarina.



**Figura A.2.** Distribuição das plantas amostradas em Iomerê, Santa Catarina.



**Figura A.3.** Distribuição das plantas amostradas em São Joaquim, Santa Catarina.



**Figura A.4.** Distribuição das plantas amostradas em São José do Cerrito, Santa Catarina.



## **APÊNDICE B – Detalhamento do procedimento de extração de DNA proposto por Doyle e Doyle (1990), com modificações**

Para a obtenção do DNA das amostras foliares coletadas, foi realizada a extração de DNA vegetal segundo protocolo CTAB proposto por Doyle & Doyle (1990) com modificações. Em cadinho de cerâmica, foram colocados cerca de 100 mg de tecido foliar previamente desidratado em sílica gel e posteriormente foi adicionado nitrogênio líquido para a maceração do material. Cada amostra foi depositada em microtubos de polietileno de 2 mL, onde foram adicionados 1200 µL de tampão de extração (CTAB 2%; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-Cl pH 8,0; 2% polivinilpirrolidona e 2-mercaptoetanol 3,5%). A mistura foi homogeneizada e os tubos foram incubados em banho-maria à 60°C por 30 min, agitando as amostras a cada 10 min para a homogeneização da amostra. As amostras foram retiradas do banho-maria e após o resfriamento foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1), agitando as amostras por inversão durante 5 min e posteriormente centrifugação de 13500 g durante 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo onde o procedimento com CIA foi repetido por três vezes. Após esse processo, o sobrenadante foi novamente transferido para um novo microtubo e então foram adicionados 50 µL de CTAB 10% (1,4 M de NaCl) e 600 µL de CIA, agitando as amostras por inversão durante 5 min e posteriormente centrifugação de 13500 g durante 5 min. Transferido o sobrenadante para um novo microtubo, foram adicionados 2/3 do volume da solução com isopropanol previamente refrigerado. As amostras contendo isopropanol foram acondicionadas à -20°C por 12 h e posteriormente foram submetidas à centrifugação de 4650 g durante 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado duas vezes com 1000 µL da solução de etanol 76% e acetato de amônio 10 mM. As amostras foram agitadas por inversão durante 1 min e então centrifugadas por 1 min a 4650 g. Posteriormente, o pellet das amostras foi lavado com 1000 µL de etanol absoluto, agitando por inversão durante 2 min e centrifugação por 1 min a 4650 g. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram submetidas à secagem. O pellet foi ressuscitado com 50 µL da solução contendo água ultra pura autoclavada e 10 µg/mL de RNase. Por fim as amostras foram incubadas à 37°C por 60 min e posteriormente acondicionadas à -20°C.

### APÊNDICE C – Relação dos marcadores microssatélites testados

**Planilha 1.** Relação das temperaturas de anelamento utilizadas nos 77 pares de marcadores microssatélites nucleares desenvolvidos em *Campomanesia xanthocarpa*

Locus	Sequência (5'-3')	Motivo microssatélite	Tamanho (pb)	T <sub>a</sub> (°C)
Cxant01	F: CGTAAATAAAGACAGAAAGGTGGA R: TGGGATAGAAGCAAAGTAGTGATG	(GCT) <sub>4</sub>	277	55
Cxant02	F: TTAGTTTCCCCGCTCACC R: CATCTTCCTTCCCGTTTGTT	(TCTT) <sub>3</sub>	474	55
Cxant03	F: GCCTCTCCTTCTTGCTTGCT R: CCGCTTCTCCCATCTTTCTT	(TCGG) <sub>3</sub>	477	56
Cxant04	F: CGGAATCTGCTATTGGGTTAG R: CAACTGAACGGGAAGTGGT	(CTTT) <sub>3</sub>	234	56
Cxant05	F: CGACTTTTCTCTCTCCTTTTT R: ATCCGCACTACAGCCAATC	(CT) <sub>5</sub>	341	56
Cxant06	F: AGAGAAAGGCAAGGGGTAGG R: AAAAAGCAAAATAGGGTAAACGAG	(AG) <sub>5</sub>	473	50
Cxant07	F: CCCTTATTCCTCACTCCCTTA R: CTCTTTCTCTCTCCGCCTCA	(GAA) <sub>4</sub>	331	TD 60

Cxant08	F: CTGTGCCGAGATGTGAGGT R: GGGAGAAGGTTGTGAAGGTG	(GGTC) <sub>3</sub>	168	55
Cxant09	F: CGAGTTTTGGTTGATTCTATTCTTG R: ATCGGTCAGTTGCTTTTCGTT	(AGA) <sub>4</sub>	358	TD 60
Cxant10	F: CGATTCCACGGCTTCTTTT R: AGGTTTCGGTGACTCTTCCTT	(CAAG) <sub>3</sub>	420	TD 60
Cxant11	F: ACTTTGCCTGCTCTGTGGTC R: GCTCTTTCTGTGATGCTATTTTCG	(CTTT) <sub>3</sub>	497	TD 60
Cxant12	F: TGACTGGCTTTCCTTTTCG R: TACTCCCGCTCTTGCTTTT	(AAG) <sub>4</sub>	371	TD 54
Cxant13	F: CCGCAGTTGTAGGAGAGTAGG R: GGGAAAGATGGAAGAGATTGGT	(ACTC) <sub>3</sub>	181	55
Cxant15	F: GTGAAGAGAGGATAAGAAAGAAGCA R: GGGAAAGGAAGAGTTGTGTGAA	(AGAA) <sub>3</sub>	187	55
Cxant16	F: GCGAACAGAGCGAATGAAG R: CCCGAAATGAAGGAAAAGGT	(AT) <sub>5</sub>	496	TD 60
Cxant17	F: AATCAACCGAGCCAGCAG R: GACGACGGAATGGAAGAAAA	(CTT) <sub>4</sub>	355	TD 54
Cxant18	F: GCTGGTGGGTGGTCATTT	(GAAA) <sub>3</sub>	357	50

	R: GTTTCCGTCTGTCTCGTCTCT			
Cxant19	F: GGTTCCGTTCTGTTCTCTCTC R: CTCATACTCCTCCCCTCATT	(ATTC) <sub>3</sub>	338	55
Cxant20	F: CCCTTCCCTTTGTGTCTCTC R: AGTGTGTTCCCATTCCTTCC	(ATC) <sub>4</sub>	151	55
Cxant21	F: GCGAGCAGAAGCAAGGTTAT R: CGGAATGGATGAGCGAAG	(TC) <sub>5</sub>	477	55
Cxant22*	F: GCTTGGTGGTGCCTCTCTC R: GCTCTTCCCTTTGCCTCTCT	(TCCA) <sub>3</sub>	209	57
Cxant23	F: ATCCCCGACCCTAATGAATG R: GAAAGCCCAGCGACCAAG	(GTCA) <sub>3</sub>	215	55
Cxant24	F: TCCAAGAATACGACAAACCTG R: CGAACTGAACTAAAACCTACCC	(AAAG) <sub>3</sub>	314	TD 60
Cxant25	F: GCCAGATGACCCAGTTCG R: TCGCTCAGTTCACACACAAGTT	(CGAT) <sub>3</sub>	167	**
Cxant26*	F: ATGCAAAATCCCTACGTGCT R: ATGACACATTTCCGGCTGTGA	(ATCG) <sub>3</sub>	162	57
Cxant27	F: CAAAAAGAGAAAGTGGTGAGAAGA R: ATGGCCGGAAGGATAGATGTT	(TA) <sub>5</sub>	370	55

Cxant28	F: GCATCTTTCTCCCATTCTTTTC R: TATTCCTTCGGCTTTCTCTCTT	(AAAG) <sub>3</sub>	271	TD 60
Cxant29	F: GCAAGCCAAAACCTACTCCT R: TTCTATCCTCAACCTCCATCC	(TAGC) <sub>3</sub>	252	55
Cxant30	F: GCTTTCCACTAACAATAAGGACACT R: GGCAGGCGAATCAAGAGA	(CAG) <sub>4</sub>	172	55
Cxant31	F: GCTCGCTTCGCTTCTTCA R: ATCCCTGCCCTGTTTTCC	(TA) <sub>5</sub>	378	TD 60
Cxant32	F: CTGGCGTGTTAGGTGAAAAA R: CGAGTTGGGGTAGTGAGGAG	(TCCT) <sub>3</sub>	463	TD 54
Cxant33	F: AAGACGAACGGAGCAATAGAAG R: AGGAGACAGCGAGTGGAGTG	(AAGC) <sub>3</sub>	346	TD 60
Cxant34	F: CTGACACTAATCCCACACAGTTG R: TATGGCTTCTGCCCACAGTA	(AG) <sub>5</sub>	175	56
Cxant35	F: GACCGCAAACGAAGGATG R: CGAAACTGGAAGGAGAAACAA	(CGGC) <sub>3</sub>	273	TD 60
Cxant36*	F: TTCCCGCCTAACCCTAATG R: GTCAAATCTCGCTCCTCCAA	(AAG) <sub>4</sub>	323	57
Cxant37	F: TCAAGAGCACAGAACAGAGGAAA	(TTA) <sub>4</sub>	396	50

	R: TCACGCCCCAGAGGAAGGT			
Cxant38	F: CCAGAAGGGAGGAGAGGAG R: AGGAAAAGCAAGCAAAGACC	(CTT) <sub>4</sub>	416	TD 60
Cxant39	F: TCGTTTATTCGCTTGGTTAGA R: GGGTTGGAGGTTTCAGGTT	(TGAA) <sub>3</sub>	249	TD 60
Cxant40	F: AGGCGTAGCAGCATTGAGA R: CATAAGCAGCAAGCAAGGAG	(TTC) <sub>4</sub>	194	55
Cxant41	F: TATCGCAGAGGCACAAGTTC R: ATCGGGACGCAAAGAGATTA	(AAAG) <sub>3</sub>	376	TD 60
Cxant42	F: GGCAGAGATGGAGGAGAGC R: CAAAATAGAGATAGCAAAAGGCAAG	(AT) <sub>6</sub>	170	57
Cxant43	F: CTTGCTCTTTCCCCTTTCG R: TCTGTCTTTACTCCCCTTCTGC	(AGTC) <sub>3</sub>	474	TD 60
Cxant44	F: GGCTACGGCTCTCCTTCC R: CATCTCCTTCGGCTCTCTGT	(CAAG) <sub>3</sub>	330	TD 60
Cxant45	F: GCCTTTCGCCTTTTCATC R: CCCAGTTTCCTTTCTTTTG	(CTT) <sub>4</sub>	236	TD 60
Cxant46	F: GACCCCTTGACGACTTGAGA R: CGTGCCTTGTTACCTTTTGC	(TTG) <sub>5</sub>	253	57

Cxant47	F: AGCCAGTAAGCCAGCAAAC R: GTTCTTCTCGGGTGGTTGAT	(CAG) <sub>4</sub>	333	TD 60
Cxant48	F: GGGAGTTTCTGGGTTTGTTG R: GCATGAAAGAATAAATAAAAAATGCAA	(TA) <sub>5</sub>	127	**
Cxant49	F: AACAAATACAGCACAAAGCAACC R: AGCCAGAAGAGCAAAGCAAC	(TTCT) <sub>3</sub>	441	50
Cxant50*	F: CGCACAACCAGCACAAAAC R: CTATCACCCGAGGGAGGCAAG	(CTTT) <sub>3</sub>	477	66
Cxant51	F: AATGAGTAGGGCTGGTGGAA R: GAGTTGGGTCTGGAGTTGGT	(AGC) <sub>5</sub>	181	55
Cxant52	F: AGAAGACCAACCGAAGACG R: AGGCTGCAATCATATAACCTTC	(TTGA) <sub>3</sub>	244	TD 60
Cxant53	F: CTGGACTGACTTTTGCTTTTG R: TGAGATTGTAGATTGGATAGAGGA	(TCA) <sub>6</sub>	367	50
Cxant54	F: CATCTCCTTCTCCTCTTGCTG R: GCCTCTGCTGTTTGTGGTATT	(ACA) <sub>4</sub>	488	54
Cxant55	F: CACAATGATGAGCGACACAA R: TTGACACCACAAGGGAAAAA	(TGA) <sub>5</sub>	301	TD 60
Cxant56	F: ATTATGCCTTGCGGTATGCT	(TG) <sub>5</sub>	228	**

	R: CACCCTTGTCTCTCCGATTT			
Cxant57	F: TCGCTCACTTTCGGCTTC	(TCG) <sub>4</sub>	171	TD 67
	R: GTTCGTTTCTTCATTTTCCTTTGT			
Cxant58	F: TCATACCAACACACAAAACAGGA	(CTT) <sub>5</sub>	265	50
	R: TCAAGGCAAAACCGCAAG			
Cxant59*	F: GAGGGACTTTCAGTTTGTGTGTC	(GA) <sub>10</sub>	230	55
	R: GACCGTTTCCAACATTTCCA			
Cxant60	F: TCTAAGGACCACCCACGATA	(TCAA) <sub>3</sub>	107	**
	R: GTTACTGTTCACCCGAGAGC			
Cxant61	F: AAGAAGCAAGCCACCGTATCTC	(GCC) <sub>4</sub>	110	TD 60
	R: ACGCCGAGGGAGGAAAGTAG			
Cxant62	F: GCAAAAATAGGCTCGCAA	(TC) <sub>5</sub>	299	TD 60
	R: GGAGGATAAAAACGGAAGCA			
Cxant63	F: GCGAGAGAGAGGGAGAGTGG	(GA) <sub>5</sub>	240	TD 60
	R: CAAGCCCATCAAAAAGGACA			
Cxant64	F: GCAATAGAAGAAGCGAAAAACA	(AGAA) <sub>3</sub>	354	**
	R: TCAAGAAAACCCACAACAAGAG			
Cxant65	F: TTGCTTGCTCGTCTATCAGC	(AAT) <sub>5</sub>	209	TD 67
	R: CCGTTGTCGGGGA ACTATT			

Cxant66*	F: GCGAGACCATAAGCCACTAC R: TGAGAAGGAGACACACACAAAT	(AGA) <sub>4</sub>	211	57
Cxant67	F: CAGCAAAATACAAAGAAAGGAAG R: AAAAGGGAAGGAGCGTGA	(AC) <sub>6</sub>	449	50
Cxant68	F: GCTGTTGTTTTGGCTTTGTCT R: CATTGTGGTGGAGGAGGA	(TC) <sub>5</sub>	249	TD 60
Cxant69*	F: CCCAACACTCTCCACAATCC R: TCCTTCCCTCTTCTCTCCATC	(GA) <sub>7</sub>	294	60
Cxant70	F: GGAGAGAAGAGGGAAGGAGA R: CATAAGCAGAGAGAAGGAGAAGA	(GCT) <sub>6</sub>	242	TD 60
Cxant71	F: CTGCTCCATTATTTACGGTTC R: CTCAGCCAGTGTTGCGTCT	(CT) <sub>5</sub>	150	54
Cxant72	F: CAGGCAGAACAGGAGCAGA R: CGTGAAAACAAAAGAGGAAAGC	(TTAA) <sub>3</sub>	443	TD 60
Cxant73	F: CCCGTTTTTCCTATTCCTTT R: CTCTGCTCTGTCTCCTTCCTT	(AG) <sub>5</sub>	336	**
Cxant74	F: CATTGGAGAGAAAGGGAAA R: TGGGCTGAAATCTGAAAGTG	(GA) <sub>5</sub>	275	TD 60
Cxant75	F: ACCCATTTTCTTTGCCTTCC	(GA) <sub>11</sub>	195	TD 60

	R: TGACACCTCATCCAGTTACACAA			
Cxant76*	F: ATGTTTTTGTGCGTTCTGG	(AAG) <sub>6</sub>	336	60
	R: TTGACCTTTGTTCTCTTCCT			
Cxant77	F: TTATGCTCGTCGTGTCCTTT	(TCTT) <sub>3</sub>	292	TD 60
	R: AAGTTTCGTTTTATGGATGTTCC			
Cxant78	F: CATTTTCTGTGGTTCCCTGA	(CAG) <sub>4</sub>	272	TD 60
	R: GCCCTTGGATTGCTGTTG			

Notas: F= sequência forward; R= sequência reverse; Ta = temperatura de anelamento; \*=SSR polimórficos; \*\*SSR que não apresentaram produto de amplificação; Para programa TD, ver Apêndice D.

**Planilha 2.** Relação das temperaturas de anelamento utilizadas nos 12 pares de marcadores microssatélites plastidiais desenvolvidos em *Campomanesia xanthocarpa*

Locus	Sequência (5'-3')	Motivo microssatélite	Região	Tamanho (pb)	T <sub>a</sub> (°C)
Guabi01	F: GGGTATAGGAAGTCATGTTGTCG R: AGCGATTGGGTTGAAATGAA	(A) <sub>10</sub>	psbA-trnK-UUU	305	55
Guabi02	F: CACGACGCAATCAAAACATC R: TGGGTTTCGTTTCGATTTCTTG	(A) <sub>10</sub>	trnK-UUU-rps16	226	55
Guabi03	F: GAATTAACCTAAACCTCCGTGA R: TCCAATGACAATTGTTTCAGTCTATC	(A) <sub>10</sub>	rps16-trnQ-UUG	192	55
Guabi04	F: GTCCACTCAGCCATCTCTCC	(A) <sub>11</sub>	trnS-GCU-trnR-UCU	180	53

	R: TTTTCTTTATCTAAATGGGATTGC				
Guabi05*	F: TTCTCGTGATTTGTATCCAAGG R: TGCTTCAATCTTTCCTATCGAA	(T) <sub>10</sub>	trnS-GCU-trnR-UCU	201	55
Guabi06	F: AAGCAAGCCCAACAGCTAAC R: TCCCGTCGATAGGAACTAAAAA	(A) <sub>10</sub>	atpH-atpI	246	55
Guabi07	F: GCCAAGCAGGAATTTTAGGA R: TTTAGCCCAAGGTAATGTATGTG	(T) <sub>13</sub>	atpH-atpI	190	55
Guabi08	F: ATGAACTCCCGCTTCCATC R: GGGTTTTGGATCGTGTATCG	(T) <sub>10</sub>	rps2-rpoC2	184	55
Guabi09	F: ATGAACGGCGGAATAAAGAA R: TGGTACCCAATCGGATTAGAA	(A) <sub>10</sub>	rpOB-trnC-GCA	183	55
Guabi10	F: GCAAATCCTTTTTCCCCAGT R: TATGAGAGCCCTTCCACCAC	(CTTG) <sub>3</sub>	trnC-GCA-petN	249	58
Guabi11*	F: TTGATTCAGGGAACAAATTCAA R: TGGCTAGTGTGGTTCATTGAG	(ATTA) <sub>4</sub>	trnE-UUC-trnT-GGU	225	57
Guabi12	F: CGAATGGGATAGAATTCCAAT R: GCGATTCCAATTCAATTTACA	(A) <sub>10</sub>	psbZ-trnG-GCC	250	55

Notas: F= sequência *forward*; R= sequência *reverse*; Ta = temperatura de anelamento; \*=SSR polimórficos

### APÊNDICE D – Configuração do programa TD (*touchdown*)

**Planilha 3.** Configuração do programa de amplificação via PCR em Termociclador para reações TD 54 - *touchdown*

<b>Ciclos</b>	<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
	Desnaturação inicial	94°C	3 minutos
	Desnaturação	94°C	30 segundos
6	Anelamento	54°C (-1°C a cada ciclo)	30 segundos
	Extensão	72°C	60 segundos
	Desnaturação	94°C	30 segundos
30	Anelamento	49°C	30 segundos
	Extensão	72°C	60 segundos
	Extensão final	72°C	30 minutos

**Planilha 5.** Configuração do programa de amplificação via PCR em Termociclador para reações TD 60 - *touchdown*

<b>Ciclos</b>	<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
	Desnaturação inicial	94°C	3 minutos
	Desnaturação	94°C	30 segundos
6	Anelamento	60°C (-1°C a cada ciclo)	30 segundos
	Extensão	72°C	60 segundos
	Desnaturação	94°C	30 segundos
30	Anelamento	54°C	30 segundos
	Extensão	72°C	60 segundos
	Extensão final	72°C	30 minutos

**Planilha 4.** Configuração do programa de amplificação via PCR em Termociclador para reações TD 67 - *touchdown*

<b>Ciclos</b>	<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
	Desnaturação inicial	94°C	3 minutos
	Desnaturação	94°C	30 segundos
6	Anelamento	67°C (-1°C a cada ciclo)	30 segundos
	Extensão	72°C	60 segundos
	Desnaturação	94°C	30 segundos
30	Anelamento	61°C	30 segundos
	Extensão	72°C	60 segundos
	Extensão final	72°C	30 minutos

## **APÊNCIDE E – Protocolo de eletroforese de gel desnaturante de poliacrilamida proposto por Albright e Slatko (2000), com modificações**

Antes de iniciar a montagem das placas no sistema de eletroforese vertical PROTEAN II xi *Cell* (BIO-RAD), lavar cuidadosamente as placas de vidro, os espaçadores e os pentes com água destilada e álcool 70% e secar com lenço de papel. Proceder a montagem das placas seguindo a recomendação do fabricante. Neste protocolo serão descritos os procedimentos utilizados para um conjunto de placas de vidro de 18,3 cm x 20 cm (*outer glass plate*) e de 16 cm x 20 cm (*inner glass plate*), com espaçador de 1 mm.

### Gel grande (40 mL), concentração de 8%:

1. Na capela, adicionar 19,2 g de ureia, 10,66 mL de solução poliacrilamida (30% acrilamida/bisacrilamida 29:1) e 8 mL de TBE 5X e manter sob agitação em banho-maria até dissolver totalmente a ureia. Completar com água destilada para o volume final de 40 mL.
2. Em uma bisnaga, adicionar a solução de acrilamida, adicionar 30 µL de TEMED (*tetramethylethylenediamine*) e 600 µL de Persulfato de Amônio (PSA 10%). Agitar a solução por 15 s, aplicar a solução rapidamente entre as placas de vidro e inserir o pente no gel. Aguardar a polimerização do gel (cerca de 1 h).
3. Após a polimerização, retirar o conjunto da base de montagem e retirar o pente do gel. Proceder com a lavagem dos poços utilizando TBE 1X.

### Eletroforese:

1. Acoplar o conjunto de vidros no sistema de eletroforese vertical e adicionar 350 mL de TBE 1X na cuba superior até o cobrimento dos eletrodos. Adicionar TBE 1X na cuba inferior do sistema até atingir pelo menos a parte inferior do conjunto de vidros
2. Realizar uma pré-corrída de 1 h para aquecer o gel e limpar os poros com resíduos de uréia (um gel: constante 20 mA; dois géis: constante 40 mA)
3. Após finalizar a pré-corrída, iniciar a preparação das amostras para pipetar no gel. Em uma placa de PCR, adicionar 2 µL de

produto de PCR e 4  $\mu\text{L}$  de tampão de corrida. Em algumas células da placa, adicionar 0,5  $\mu\text{L}$  de *Ladder* 10 pb e 4  $\mu\text{L}$  de tampão de corrida.

4. Proceder com a desnaturação das amostras: em Termociclador, programar 94°C durante 10 min e logo em seguida manter as amostras em gelo por 5 min.
5. Aplicar as amostras e o *Ladder* no gel e iniciar a eletroforese a uma corrente elétrica constante de 20 mA para apenas um gel e 40 mA para dois géis.
6. Para ampliações com cerca de 150 pb, a corrida pode durar por cerca de 5 h. Para ampliações acima de 300 pb, o ideal é deixar a corrida por cerca de 8h30. Ao finalizar o tempo de eletroforese, desligar o aparelho e desmontar cuidadosamente o sistema de vidros.

#### Coloração do gel:

A coloração do gel segue o protocolo proposto por Sanguinetti; Dias-Neto; Simpson (1994):

1. Cuidadosamente, retirar o gel do sistema de vidros com auxílio de uma piceta contendo água destilada e coloca-lo em um recipiente sobre a mesa agitadora.
2. Adicionar 200 mL de solução fixadora e 1,5 mL de solução de nitrato de prata. Manter sob agitação no escuro por 5 min.
3. Descartar a solução fixadora e cuidadosamente realizar a lavagem do gel por três vezes com água destilada morna
4. Em um Becker, adicionar 200 mL de solução reveladora previamente aquecida e 750  $\mu\text{L}$  de formaldeído. Despejar esta solução no recipiente contendo o gel e manter sob agitação até o momento em que as bandas e marcador de peso molecular (*Ladder*) apareçam nitidamente.
5. Por fim, descartar a solução reveladora e adicionar 200 mL de solução fixadora
6. Ao finalizar a coloração, os géis podem ser digitalizados em scanner.

#### Protocolos das soluções:

- a) Persulfato de amônio (PSA 10%): Em um tubo tipo falcon, adicionar 10 mL de água destilada e 1 g de Persulfato de

Amônio. Manter sob agitação com auxílio de um vortex e posteriormente fazer alíquotas de 600 e armazenar à -20°C.

- b) Tampão de corrida: Em tubo falcon, adicionar 9,8 mL de Formamida Hi-Di, 125 µl de EDTA 0,5M (pH 8), 0,005 g de azul de bromofenol e 0,005 g de xilenocianol. Manter sob agitação com auxílio de um vortex e fazer alíquotas da solução em microtubos. Armazenar as alíquotas à -20°C.
- c) Solução fixadora: Em uma proveta, adicionar 6,67 mL de ácido acético, 160 mL de etanol e completar para 1000 mL com água destilada.
- d) Solução reveladora: Dissolver 22 g de NaOH (hidróxido de sódio) em 1000 mL de água destilada.
- e) Solução nitrato de prata: Dissolver 1 g de nitrato de prata em 5 mL de água destilada. Reagente sensível à luminosidade.

#### Referências Bibliográficas:

ALBRIGHT, L.M.; SLATKO, B.E. Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. **Current protocols in nucleic acid chemistry**. Appendix 3B 1-5, 2000.

SANGUINETTI, C.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, Belo Horizonte, v. 17, n. 5, p.915-919, dez. 1994.