



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Faculdade de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em
Ciências Florestais e Ambientais - PPGCIFA



ANA RITA QUEMEL MÉLO

Desenvolvimento de locos de microssatélites para *Trema micrantha*



Manaus
2015

ANA RITA QUEMEL MÉLO

Desenvolvimento de locos de microssatélites para *Trema micrantha*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais (PPG-CIFA), da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do Título de Mestre. Área de concentração: Ciências Florestais e Ambientais (CIFA).

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Teresa Gomes Lopes

Co-orientadora: Dra. Jacqueline da Silva Batista

Manaus
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

M528d Melo, Ana Rita Quemel
Desenvolvimento de locos de microssatélites para Trema
micrantha / Ana Rita Quemel Melo. 2015
40 f.: 31 cm.

Orientadora: Prfª Dra. Maria Teresa Gomes Lopes
Coorientadora: Dra. Jacqueline da Silva Batista
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Cannabaceae. 2. Marcador molecular. 3. Diversidade gené
4. Crindiúva. I. Lopes, Prfª Dra. Maria Teresa Gomes I
Universidade Federal do Amazonas III. Título

PARECER

DEDICO,

À DEUS, pelas bênçãos diárias. Aos “anjos” que me fortalecem a cada sorriso, meus pais, Michel e Benedita, minha irmã Ada Marta, meu esposo Simão Tannus e meus filhos Tiago e Simão Pedro. Por todas as orações, e palavras de apoio que me impulsionaram diante dos momentos difíceis. Todo o sucesso que vier, será nosso, família de amor.

Agradecimentos

À Deus, por ter me oferecido a vida, e me agraciado com a família que tenho e pelas oportunidades que me trouxeram até aqui, pois sem ele nada seria possível.

À Nossa Senhora de Nazaré, por tantas vezes que recorri a sua intercessão e fui atendida.

À meus pais, Michel e Benedita, que me concederam e me mostraram exemplos de amor, honestidade e justiça. Por nunca terem medido esforços para meu crescimento profissional.

À minha irmã, Ada Marta, pelos conselhos, orações e palavras de apoio, em todos os momentos em que me vi atribulada, sua presença foi fundamental para que eu tivesse a certeza da conquista.

Ao meu esposo, Simão Tannus, por ter me oferecido condições para concretizar esse sonho. Agradeço pelo seu companherismo, atenção e paciência nos momentos em que o cansaço me vencia, e acima de tudo pelo amor dedicado à realização desse nosso sonho.

Aos meus filhos, Tiago e Simão Pedro, que com suas existências me motivaram a recomeçar e buscar o crescimento acadêmico. Foi por vocês e para vocês!

À Prof.^a Dra Maria Teresa Gomes Lopes, que com seu conhecimento, me orientou e se doou em tantos momentos difíceis nessa caminhada, como uma mãe. Obrigada pela confiança!

À Dra Jacqueline Da Silva Batista, por ter me aberto as portas do Laboratório Temático de Biologia Molecular-LTBM/INPA, cooperando com meus primeiros passos na pesquisa. Obrigada pela paciência!

À Pesquisadora Kyara Martins Formiga, pela contribuição com a pesquisa.

À MsC Giselle Marques, pela amizade e incansável apoio, durante os momentos mais difíceis na bancada do laboratório. Sua dedicação e paciência me conduziram até aqui. Obrigada pela sua amizade!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais/Universidade Federal do Amazonas-UFAM, pela oportunidade de retorno à vida acadêmica.

À CAPES-Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior, pelos recursos de financiamento da bolsa de estudos ao longo do curso.

Ao Instituto de Pesquisas Amazônicas-INPA, pela utilização do Laboratório Temático de Biologia Molecular, onde desenvolvi a maioria das etapas do presente trabalho.

À Prf^a Dra Liane Demósthene/UFAM, por sua grandiosa contribuição na elaboração da dissertação.

Às colegas do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal/UFAM, Lúcia Helena e Fabíola, pelo auxílio durante as extrações de DNA. Vocês são muito queridas!

Ao Dr Santiago Ramos, pela ajuda nas análises.

Aos colegas do LTBM, Paula, Jane, Carol, Kátia, Iumi, Érick, Érico, Glauco, Matheus, Aline, Larissa, Shizuka, Camila, Érica, Roberta, Denise, Saulo, Adriel e Amanda, obrigada pela ajuda e amizade.

A todos que de qualquer forma contribuíram para concretização desse trabalho.

*"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."
(Madre Teresa de Calcuta)*

RESUMO

Trema micrantha (L.) Blume é uma espécie florestal nativa do Brasil, pioneira e de crescimento rápido. A espécie apresenta ampla gama de benefícios, desde uso como matéria prima até a conservação do solo e da recuperação de condições normais da floresta. A madeira é usada para edificações leves e como lenha. Tem-se verificado fragmentação de populações das espécies arbóreas na Amazônia devido ao desmatamento para agricultura ou pelo extrativismo. Este trabalho teve como objetivo desenvolver iniciadores microssatélites específicos para a espécie *Trema micrantha* e caracterizar a diversidade genética de uma população natural dessa espécie. Para tanto, foram desenvolvidos locos de microssatélites isolados a partir de uma biblioteca genômica enriquecida com esses marcadores, os quais foram usados para caracterizar uma população com indivíduos de *T. micrantha*, oriundos de Manaus, Amazonas. Foram identificados aleatoriamente na área de estudo, 30 árvores para representar a população. O estudo gerou informações sobre a diversidade genética da população com base nas estimativas das frequências alélicas e genotípicas, foi estimando a magnitude e a distribuição da variabilidade genética dentro da área de amostragem. A partir da biblioteca genômica desenvolvida foram obtidas e sequenciadas um total de 120 colônias. A partir das colônias foram identificados, desenhados e selecionados 41 microssatélites, o que representa 34,17% de enriquecimento. Dentre estes, 11 microssatélites apresentaram produtos de amplificação à 60 °C, sendo 6 (54,5%) monomórficos para o grupo de indivíduos estudados. Os valores de heterozigosidade esperada (H_e) variaram de 0,171 a 0,717, com média de 0,438. A heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,133 a 0,308, com média de 0,196. Os marcadores Tmi04, Tmi28 e Tmi36 demonstraram ser moderadamente informativos. Os marcadores microssatélites sintetizados nesse trabalho poderão ser utilizados para a análise de polimorfismo de indivíduos de *T. micrantha* em outros estudos genéticos. Os genótipos analisados apresentaram um excesso de homozigose na maioria dos locos estudados, sugerindo forte endogamia na população analisada.

Palavras – chave: Cannabaceae, marcador molecular, diversidade genética, crindiúva.

ABSTRACT

Trema micrantha (L.) Blume is a native forest species of Brazil, a pioneer and rapid growth. The species has a wide range of benefits, from use as raw material to soil conservation and recovery of normal forest conditions. The wood is used for light buildings and as firewood. There has been fragmentation of populations of tree species in the Amazon due to deforestation for agriculture or by extraction. This study aimed to develop specific microsatellite primers for *Trema micrantha* species and characterize the genetic diversity of a natural population of this species. Thus, we developed microsatellite loci isolated from a genomic library enriched with these markers, which were used to characterize a population with *T. micrantha* of individuals, coming from Manaus, Amazonas. Were randomly identified in the study area, 30 trees to represent the population. The study provided information on the genetic diversity of the population based on estimates of allelic and genotypic frequencies, was estimating the magnitude and distribution of genetic variability within the sampling area. From the developed genomic library was obtained and sequenced a total of 120 colonies. From the colonies were identified 41 designed and selected microsatellite, which is 34.17% enrichment. Among these, 11 microsatellites showed amplification products to 60° C, 6 (54.5%) monomorphic for the group of subjects studied. The expected heterozygosity values (H_e) ranged from 0.171 to 0.717, with an average of 0.438. The observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.133 to 0.308, with an average of 0.196. The Tmi04, Tmi28 and Tmi36 markers shown to be moderately informative. Microsatellite markers synthesized in this work can be used for polymorphism analysis of individuals of *T. micrantha* other genetic studies. The genotypes analyzed showed an excess of homozygosity in most loci, suggesting strong inbreeding in the population studied.

Key - words: Cannabaceae, molecular marker, genetic diversity, crindiúva.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ramo de <i>Trema micrantha</i> . Disponível: www.plantsystematics.org Acesso: 04 de junho de 2014.....	16
Figura 2. Faces de folha de <i>Trema micrantha</i> . Disponível: www.discoverlife.org . Acesso: 04 de junho de 2014.....	17
Figura 3. Detalhes da flor de <i>Trema micrantha</i> . Disponível: www.discoverlife.org . Acesso: 04 de junho de 2014.....	17
Figura 4. Frutos de <i>Trema micrantha</i> em diferentes estágios de maturação. Disponível: www.discoverlife.org Acesso: 04 de junho de 2014.....	18
Figura 5. Frequência da classificação dos iniciadores.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos iniciadores incluindo nome, motivo, porcentagem de GC, temperaturas de anelamento, tamanhos esperados dos produtos em pares de bases (pb), e classificação de cada iniciador desenvolvido para <i>Trema micrantha</i>	29
Tabela 2. Parâmetros de diversidade genética avaliados na população de <i>TREMA MICRANTHA</i> , incluindo número de amostras (N), número de alelos (A), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e índice de fixação de Wright (f).....	32
Tabela 3. Teste exato de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco.....	34

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Classificação taxonômica.....	16
3.2 Descrição da espécie.....	16
3.3 Distribuição geográfica.....	18
3.4 Uso e importância da espécie.....	18
3.5 Diversidade genética.....	19
3.6 Marcadores moleculares.....	20
3.6.1 Marcadores microsatélites	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Coleta de material vegetal em árvores de <i>Trema micranta</i>	22
4.2 Extração e quantificação do DNA genômico para o desenvolvimento dos microsatélites.....	22
4.3 Construção de biblioteca genômica enriquecida com microsatélites de <i>Trema micrantha</i>	23
4.4 Caracterização e amplificação dos microsatélites de <i>Trema micrantha</i>	25
4.5 Análise da diversidade genética inter e intrapopulacional de populações naturais de <i>Trema micranta</i>	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Desenho dos iniciadores.....	28
5.2 Condições de amplificação dos locos microsatélites.....	31
5.3 Índices de diversidade genética na população de <i>Trema micrantha</i>	32
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

Trema micrantha (L.) Blume é uma espécie florestal nativa do Brasil, pioneira e de crescimento rápido. É encontrada principalmente em solos fortemente alterados, podendo colonizar áreas desmatadas, tornando-se dominante durante os primeiros anos de sucessão (BROKAW, 1987; DENSLOW, 1987).

A espécie apresenta ampla gama de benefícios, desde uso como matéria prima até a conservação do solo e das condições da floresta. A madeira é usada para construções leves e como lenha. Apresenta uso medicinal, sendo os compostos extraídos de suas folhas, usados no tratamento de erupções oriundas de sarampo, e ainda, amenizando sintomas de diabetes e artrite (BARBERA et al., 1992; NEE, 1993; SCHOENFELDER et al., 2006; MÁRQUEZ-CRUZ et al., 2011). É recomendada para programas de plantios florestais, recuperação de áreas degradadas por mineração e restauração de matas ciliares (FERREIRA et al., 1977; CARVALHO, 1994; LORENZI, 2008; NÓBREGA et al., 2010).

O desmatamento na Amazônia seja pelo extrativismo, ou para fim agropecuário vem reduzindo a variabilidade genética das espécies arbóreas (KOSKELA e AMARAL 2002). Acredita-se que essa perda de variabilidade genética seja causada pelos efeitos de deriva genética, de endogamia relacionada à redução do tamanho de suas populações e pela diminuição ou perda de fluxo gênico entre populações anteriormente conectadas (ELLSTRAND e ELAM 1993; KOSKELA e AMARAL 2002). O grau de influência desses eventos sobre a diversidade e estrutura genética das populações está diretamente relacionado ao tamanho e ao grau de isolamento dos fragmentos e ao nível de perturbação a que foram submetidos (BOSHIER e LAMB 1997). *Trema micrantha* é uma espécie amplamente distribuída na Amazônia, que vem sofrendo alterações em suas populações devido ao descontrole no desmatamento.

O conhecimento da diversidade genética de uma espécie é importante para o manejo ou para efetuar novos plantios, para realizar adequadamente o extrativismo e também para a conservação e o melhoramento genético (ESFAHANI et al., 2009; SETOTAW et al., 2010). Informações sobre a diversidade genética entre e dentro de populações naturais em espécies vegetais permite entender como a seleção está atuando em função da adaptabilidade (ESTOPA et al., 2006). O conhecimento da diversidade genética de populações de *T. micrantha* na Amazônia é útil na

valorização dos recursos genéticos desta espécie, pois, gera informações para sua conservação e uso.

Os marcadores moleculares permitem medir o grau de polimorfismos em uma ou mais populações de indivíduos, respondendo à importantes questões em estudos de genética populacional e também abordagens ecológicas e evolutivas (DAVEY et al., 2011). Entre os marcadores, ressalta-se os microssatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR, *Sequence Simple Repeats*) que apresentam natureza co-dominante (OUBORG et al., 2010). Os SSR têm sido muito utilizados em estudos de estrutura e diversidade genética de espécies arbóreas nativas, tais como *Carapa guianensis* (RAPOSO et al., 2007), *Solanum spp.* (MOURA et al., 2009), *Dipteryx alata* (TARAZI et al., 2010).

O desenvolvimento de iniciadores microssatélites específicos para *T. micrantha* permitiu estudar a diversidade intrapopulacional de uma população na Amazônia visando à conservação e uso dos recursos genéticos em reflorestamento. As informações sobre a distribuição da variabilidade genética, gerada pelo presente trabalho, em populações naturais poderá orientar a identificação de populações para coleta de sementes para uso em reflorestamento, na recuperação de áreas degradadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver locos de microssatélites para a espécie *Trema micrantha*.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os locos microssatélites desenvolvidos;
- Caracterizar a diversidade genética de uma população natural de *Trema micrantha* utilizando marcadores microssatélites.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Classificação taxonômica

A *Trema micrantha* (L.) Blum. é uma espécie arbórea pertencente a divisão *Magnoliophyta* (Angiospermae), classe *Magnoliopsidae* (Dicotyledonae), ordem Rosales e família das Cannabaceae. Vulgarmente é conhecida como pau-pólvora, trema, crindiúva, motamba, periquiteiro, seriúva e tamanqueira (OLIVEIRA-FILHO et al., 1995; VENTURIN et al., 2000; LORENZZI, 2008).

3.2. Descrição da espécie

É uma árvore neotropical, encontrada em regiões de climas tropical e temperado, de crescimento rápido, podendo chegar a 29 metros de altura. Em regeneração natural e artificial pode chegar a 6 m de altura em 14 meses. É perene, ereta, bastante ramificada, de caule estriado na cor marrom escura e que se propaga por sementes (FERREIRA et al., 1977; CARVALHO, 1994; TORRES, 1996; LORENZI, 2008; MATOS et al., 2011).

Seus galhos são compostos por folhas simples (Figura 1), de consistência fina, com tamanho de 10 a 12 cm, alternadas, pubescentes na face dorsal e ásperas na face ventral, com margem foliar finamente serrada em toda sua extensão e nervuras marcadas (Figura 2) (CARVALHO, 1994).



Figura 1. Ramo de *T. micrantha*. Disponível: <www.plantsystematics.org> Acesso: 04 de junho de 2014

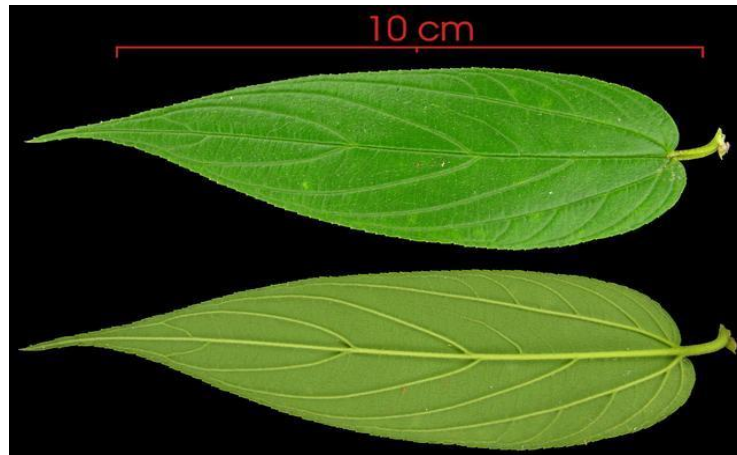


Figura 2. Faces de folha de *T. micrantha*. Disponível: <www.discoverlife.org.> Acesso: 04 de junho de 2014.

A espécie é classificada como hermafrodita críptica por possuir representantes variando de monóicas à dioicas, alógama, com flores pequenas (Figura 3) unissexuais ou bissexuais andrógenas, possui polinização através do vento, podendo ser visitada por pequenos insetos (BAWA et al., 1985; TORRES, 1996).



Figura 3. Detalhes da flor de *T. micrantha*. Disponível:< www.discoverlife.org.> Acesso: 04 de junho de 2014.

Florescem entre setembro e janeiro, podendo se estender ao longo de todo o ano. Suas flores são melíferas, e seu néctar é aproveitado por abelhas nativas na produção do mel (LORENZI, 2008).

Possui frutos pequenos (0,3 mm) em cachos agarrados aos galhos (Figura 4), carnosos e indeiscentes, tipo drupa, contendo somente uma semente no seu interior, protegida por um endocarpo lenhoso e faveolado, constituindo o pirênio. O fruto é

verde-escuro e, quando maduro, apresenta coloração vermelha. Devido à grande quantidade de frutos produzidos, a espécie destaca-se na alimentação da fauna, sendo suas sementes dispersas, por aves, primatas e outros animais (CORNER, 1976; BARROSO, 1978; CARVALHO, 1994).



Figura 4. Frutos de *T. micrantha* em diferentes estágios de maturação.

Disponível: <www.discoverlife.org.> Acesso: 04 de junho de 2014.

3.3. Distribuição geográfica

Trema Micrantha é uma espécie nativa do Brasil, com ocorrência no sul dos Estados Unidos, México, América Central e América do Sul (BACKES e IRGANG, 2004). Em território brasileiro está distribuída em vários tipos de formações vegetais por Minas Gerais, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (LORENZI, 2008). Sua presença é marcante em floresta ombrófila densa (Floresta Amazônica e Floresta Atlântica) e nos Campos Rupestres ou de Altitude (CARVALHO, 1994).

3.4. Uso e importância da espécie

A espécie é uma das primeiras a se estabelecer em clareiras e áreas abandonadas (LORENZI, 2008; DURIGAN et al., 2002). Surge de maneira explosiva na floresta, respondendo à simples penetração de luz, permitida a partir de qualquer derrubada, queimada ou outras alterações (BACKES e IRGANG, 2004).

Árvore pioneira com elevado valor ecológico, com seus frutos sendo bastante consumidos por uma grande diversidade de aves, principalmente por maritacas e Psitacídeos (OLIVEIRA-FILHO et al., 1995).

A espécie é indicada para programas de plantios florestais, reconstituição de mata ciliar em locais sem inundação, recuperação de área erodidas e degradadas por mineração (FERREIRA et al., 1977; CARVALHO, 1994; LORENZI, 2008;

NÓBREGA et al., 2010). Podendo, então, ser vista como uma espécie bastante resistente à acidez do solo (FURTINI NETO et al., 1999) e responsiva ao fósforo no substrato (PARON et al., 1997; SOARES et al., 2006). Sua importância silvicultural vem crescendo à medida que espécies pioneiras tem desempenhado relevante função na sucessão secundária e na ecologia da área estudada, criando condições necessárias ao desenvolvimento de espécies secundárias e clímax.

Seus troncos grossos são usados para armação de paredes, já os troncos mais finos, são utilizados como viga de teto. A madeira é leve e macia ao corte, fraca, de baixa resistência ao apodrecimento. Em outros lugares, é usada como lenha (MÁRQUEZ-CRUZ et al., 2011).

Na medicina popular, uma infusão feita com suas folhas é utilizada para banhar as erupções cutâneas ocasionadas pelo sarampo, pois, seu poder analgésico é quase imediato. Evitando, assim, o aparecimento de novos focos da doença (NEE, 1993; MÁRQUES-CRUZ et al., 2011). Também estudada como um agente importante no combate ao diabetes, um grupo de pesquisadores brasileiros descobriram em suas folhas, um extrato bruto de etanol, com efeitos comparados a glibenclamida, que pode reduzir os níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos (SCHOENFELDER et al., 2006).

3.5. Diversidade genética

Informações sobre a diversidade genética de uma espécie auxilia nos estudos de conservação e melhoramento genético (ESFAHANI et al., 2009; SETOTAW et al., 2010), o que proporciona um melhor entendimento de como a seleção está atuando em função da adaptabilidade (ESTOPA et al. 2006).

Estudos de variabilidade genética em populações naturais de plantas em regiões tropicais mostram que estas conservam alta variabilidade dentro das populações, em comparação a outras populações presentes em outros tipos de ambientes que apresentam uma variabilidade menor. Os fatores que influenciam diretamente na distribuição dessa variabilidade genética são: o sistema de cruzamento, o tipo de reprodução das espécies, o tamanho real da população, sua distribuição geográfica e fluxo gênico (PAIVA, 1998).

Estudos de melhoramento e conservação genética de espécies arbóreas vêm mostrando uma perda de genes adaptados a determinados ambientes, devido à redução dessas populações naturais, ocasionando altas perdas de variabilidade

genética, por deriva genética (SEBBENN e ETTORI, 2001). Logo, a deriva genética origina a depressão por endogamia, reduzindo a capacidade adaptativa, fertilidade, produtividade, vigor, entre outras características (RITLAND, 1996).

A biodiversidade tem como base a variabilidade genética, que pode ser estudada por meio de marcadores genéticos, que vem se tornando uma importante ferramenta em estudos populacionais de espécies arbóreas (FREITAS et al., 2005).

3.6. Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são características bioquímicas ou fragmentos da molécula de DNA usados para diferenciar indivíduos geneticamente diferentes e podem ser usados para caracterização da variabilidade genética de populações, estudos de evolução e dispersão de espécies e análises filogenéticas (BORÉM e MIRANDA, 2009; CAIXETA et al., 2009). Esses dados moleculares sobre semelhanças e diferenças entre indivíduos de uma mesma população ou entre indivíduos de populações diferentes produzem um grande acervo de informações sobre a diversidade genética e a relação filogenética entre eles (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Somente a partir da década de 80 é que a utilização dos marcadores moleculares ganhou relevância em estudos acerca da variabilidade genética de populações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Dos quatro tipos de marcadores usados em plantas (morfológicos, citológicos, bioquímicos e moleculares), os marcadores moleculares representam a tecnologia mais precisa empregada no mapeamento genético não somente de plantas, assim como em seres humanos e animais domésticos (BRONDANI et al., 2007; BORÉM e MIRANDA, 2009).

3.6.1. Marcadores moleculares microssatélites

São marcadores denominados de sequências curtas repetidas em *tandem* (STR – *Short Tandem Repeats*) ou mais comumente conhecidos como sequências simples repetidas (SSR – *Simple Sequence Repeats*) (BRONDANI et al., 2007).

São compostos por fragmentos de duas a seis bases nitrogenadas repetidas em *tandem* como, TATATATATATA, frequentemente encontradas no genoma de eucariotos, sendo então utilizados para diferenciá-los. Podem ser classificados segundo os motivos de repetições em mononucleotídeo, dinucleotídeo,

tetranucleotídeo, pentanucleotídeo e hexanucleotídico. Os dinucleotídeos são as repetições mais frequentes, seguido por mono e tetra e os trinucleotídeos e demais repetições aparecem com menor frequência (ELLEGREN, 2004). Tais repetições podem ser classificadas em: repetições perfeitas, sem interrupção (CTCTCTCTCTCT), repetições imperfeitas, com interrupção por base não repetida (CTCTCTCATCTCT), repetições compostas, quando duas ou mais repetições se encontram (GTGTGTGTGTATATATAT) (BORÉM e MIRANDA, 2009) e ainda, repetições interrompidas, quando uma sequência qualquer entra na repetição (TATATATAGGGGTATA) (GOLDSTEIN e SCHLÖTTERER, 1999).

Os microssatélites são altamente polimórficos, apresentando um padrão grande de variação no tamanho das repetições, o que pode ter sido ocasionado por um *crossing-over* desigual ou um erro da DNA polimerase no momento da replicação acrescentando conjuntos extras de sequências repetidas (BORÉM e MIRANDA, 2009). Como elemento de caracterização e comparação genéticas, os microssatélites constituem um loco genético (fragmento de DNA), bastante variável, multialélico, como uma gama de conteúdo acerca da espécie estudada (CAIXETA et al., 2009).

Em estudos populacionais de espécies florestais, o uso desse marcador molecular vem representando uma ferramenta de alto potencial, sendo utilizado para estudos de diversidade genética, sistema de reprodução, estrutura genética e fluxo gênico de plantas, devido a pequena quantidade de DNA necessária por amostra, à facilidade de detecção por PCR, a facilidade de análise, a herança codominante, o multialelismo, assim como a alta informatividade e abundância no genoma (POWER et al., 1996; GUPTA; VARSHNEY, 2000).

Para o desenvolvimento do microssatélites é necessário construir bibliotecas enriquecidas com regiões do genoma que contenham as sequencias simples repetidas, a partir de um *pool* de DNA de uma determinada espécie (BILLOTTE et al., 1999). Quando obtida a biblioteca, as sequências de DNA podem ser obtidas diretamente desta, podendo ser identificadas, isoladas, sequenciadas e desenhados os pares de *primers* das regiões que flanqueiam os locos com sequências microssatélites (BRONDANI et al., 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de material vegetal em árvores de *Trema micrantha*

Foi utilizada uma população de *T. micrantha*, oriunda do município de Manaus. Foram identificadas aleatoriamente 30 árvores para representar a população e no momento da coleta os indivíduos georeferenciados.

A partir de cada árvore foi coletada uma amostra de pelo menos três folhas para a extração de DNA e armazenadas em um saco plástico tipo ziplock, previamente identificado, contendo sílica gel e acondicionadas em isopor com gelo. Após a coleta, as amostras de tecido vegetal foram direcionadas ao Laboratório de Melhoramento Vegetal da UFAM e colocadas em freezer a -4°C .

4.2. Extração e quantificação do DNA genômico para o desenvolvimento dos microssatélites

Foi utilizado o protocolo que utiliza o detergente catiônico CTAB (*Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide*) descrito por Doyle e Doyle (1990) e adaptado para esta espécie por Ramos et al. (2011). Para a extração do DNA genômico de cada uma destas amostras foram retirados 100 mg de tecido foliar, fragmentadas em pedaços bem pequenos, colocadas em um gral de porcelana, onde foi adicionado 800 μL de detergente de extração de CTAB, e macerada com auxílio de um bastão de porcelana. O produto resultante da maceração de cada uma das amostras foi depositado em tubo *Eppendorf* de 1,5 ml de capacidade, previamente identificado. Em seguida, em cada amostra, foi acrescentado 2 μl de 2- β -mercaptoetanol 1% e estas colocadas em banho-maria a uma temperatura de 60°C , durante 30 minutos, sendo homogeneizado a cada 10 minutos. Em seguida, foram colocados para esfriar e, logo após, foi adicionado 600 μL de Clorofórmio e Álcool Isoamílico – CIA, na proporção 24:1. Depois, os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 14.000 rpm por 12 minutos. Posteriormente, foi pipetada toda a fase aquosa de cada uma das amostras, e transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. A esse tubo foram adicionados 400 μL de isopropanol gelado (-20°C) para permitir a precipitação do DNA. O material foi incubado por 12 horas (*overnight*) a -20°C . Em seguida, os tubos foram centrifugados a 7.500 rpm por 10 minutos. Posteriormente, com a identificação do *pellet*, foi feito o descarte do isopropanol. Na sequência, foi acrescentado por duas vezes 1000 μL de etanol absoluto a 70% no

pellet de cada amostra por 10 minutos. Logo, se acrescentou uma única vez 1000 μ L de etanol absoluto a 100% por três minutos, retirando-se em seguida o máximo possível deste etanol. Em seguida, os tubos *Eppendorf* com o *pellet* foram colocados a secar na bancada a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 75 μ l de solução tampão TE (Tris-HCl e EDTA) acrescido de RNase. As amostras foram incubadas por duas horas a 37°C e vortexadas de 30 em 30 minutos para a digestão do RNase. O material final foi armazenado a -20 °C.

A quantificação do DNA genômico foi realizada em gel de agarose 0,8 % em tampão TBE 1X, com comparações visuais com padrões de massa molecular de 50, 100 e 200 ng/ μ l de DNA do fago lambda. Os géis foram corados com o corante Blue Green (1mg/mL) para a visualização das bandas de DNA. A corrida eletroforética foi realizada a uma voltagem de 110 V durante o período de 60 minutos. E o gel foi fotografado e avaliado com auxílio de um fotodocumentador. Após a quantificação do DNA concentrado, foram necessários para o desenvolvimento dos SSR entre cinco e seis μ g de DNA total, e para a realização das genotipagens. A quantidade de DNA obtida foi diluída a uma concentração de 10 ng/ μ l com água milli-Q.

4.3. Construção de biblioteca genômica enriquecida com microssatélites de *Trema micrantha*

A construção da biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites seguiu a metodologia descrita por Billote et al. (1999) com adaptações.

A digestão do DNA genômico e a separação de fragmentos foi realizada com a enzima de restrição *RSA I* (GT↓AC) procurando obter os fragmentos de DNA situados entre 200 e 800 pares de bases (pb), que, posteriormente, foram visualizados em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 1X com 0,2 μ g/mL de Blue Green, utilizando um marcador de fragmentos de tamanho conhecido (100 a 1500 pb = 1 Kb plus de DNA). Posteriormente, foi realizado o enriquecimento dos fragmentos para microssatélites, iniciando com o preparo e ligação dos adaptadores compatíveis com a enzima *RSA I*, sendo estas o *RSA 21* (5´CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3´) e *RSA 25* (5´TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACAA3´), juntamente com a enzima T4 DNA ligase. Em seguida foi realizada a amplificação via PCR dos fragmentos digeridos, procurando amplificar a maior quantidade de fragmentos e garantir que a ligação tenha ocorrido com os adaptadores compatíveis com a enzima *RSA I*. Posteriormente, o produto obtido da PCR foi purificado com Kit comercial (Qiagen

cat. n° 28106). Na sequência, foi realizado o enriquecimento da biblioteca genômica, por intermédio da hibridização do DNA ligado aos adaptadores aos quais foram adicionados dois oligonucleotídeos biotinizados simultaneamente, conhecidos como sondas de Biotina (CT)₈ e (GT)₈. Este procedimento envolve a ligação de sondas marcadas com biotina a esferas magnéticas recobertas por estreptavidina. Como biotina e estreptavidina possuem uma alta afinidade, forma-se uma ligação estável, que permite a utilização das sondas ligadas a esferas magnéticas para selecionar fragmentos de interesse através da utilização de um ímã. Após o passo de hibridização e várias lavagens para remover os fragmentos não específicos, o DNA foi eluído e recuperado. Posteriormente, os fragmentos hibridizados foram amplificados por PCR a fim de permitir o enriquecimento dos fragmentos contendo microssatélites.

Este DNA amplificado foi ligado a vetor de clonagem plasmidial pGEM-T easy, para isso, as bactérias eletrocompetentes foram utilizadas na etapa de transformação com o auxílio de eletroporador programado para 1900 volts., procurando que os fragmentos contendo microssatélites ligados ao vetor de clonagem (inserto) fossem inseridos em bactérias competentes a fim de gerar clones recombinantes. Posteriormente, o produto transformado foi plaqueado em meio LB com Agar na presença de IPTG e X-gal.

Após o passo anterior, foi realizada a triagem da biblioteca e seleção de clones com microssatélites, iniciando pela identificação dos clones recombinantes. Os clones contendo inserto formadas por colônias brancas foram selecionadas com auxílio de palitos estéreis e transferidas para placas de lise (com fundo em U) contendo meio LB líquido, no qual cresceram isoladamente por 16 horas. Posteriormente, foram amplificados os clones da biblioteca genômica utilizando os *primers* universais T7F e SP6R, a fim de verificar e selecionar os clones transformados contendo os insertos. Logo, foi realizada a extração do DNA plasmidial das colônias recombinantes, inoculando os clones em placas tipo *deep well* e colocadas para crescimento á 37° C, 300 rpm, por 22h em meio de cultura Circle grow, depois, sendo centrifugada para sedimentar as células. A extração do DNA plasmidial propriamente dita, foi realizada com o auxílio das soluções GET (Glicose + EDTA +Tris), RNase (10mg/ml), NaOH (0,2 M), SDS 1% e KOAc (3M) e o produto obtido foi precipitado com isopropanol 100%, seguido de etanol 70% e

centrifugado. Ao final do procedimento, o DNA plasmidial foi ressuspenso em água ultrapura.

Para o seqüenciamento nucleotídico dos clones recombinantes foram realizadas duas reações para cada clone, sendo uma reação com o *primer* T7 (forward) e outra com o *primer* SP6 (reverso), entre 40 a 100 ng do produto de PCR purificado juntamente com o reagente Big Dye Terminator Ver 3.1 (Applied Biosystems), tampão 2X e água ultrapura. O preparo da reação seguiu as recomendações do fabricante. Após a precipitação com isopropanol 95% e etanol 65% a reação de seqüenciamento foi eletroinjetada em ABI 3130xl.

O desenho dos *primers* ou iniciadores, foi iniciado verificando, editando e compilando as seqüências nucleotídicas com o auxílio dos programas BIOEDIT 7.0.9.0 (HALL, 1999) e CHROMAS 2.23. As seqüências de DNA com insertos de melhor qualidade foram selecionadas e analisadas com o auxílio do programa WEBSAT (MARTINS et al., 2009) para a identificação das seqüências nucleotídicas com regiões de microssatélites e caracterização da biblioteca genômica. Foram considerados microssatélites do tipo dinucleotídeos aqueles com mais de cinco repetições; trinucleotídeos, com quatro ou mais repetições; tetra e penta nucleotídeos com três ou mais repetições. Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa PRIMER3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000) implementado no programa WEBSAT (MARTINS et al., 2009). Os critérios utilizados para o desenho foram: tamanho entre 17 e 23 pb; temperatura de anelamento entre 55 e 65°C, conteúdo de guanina-citosina (GC) entre 35 e 50% e fragmentos entre 100 e 400 pb de tamanho. Em cada iniciador *forward* desenhado, foi adicionada uma seqüência nucleotídica universal (calda M13) na extremidade 5', para uso de método econômico na etapa de genotipagem (SCHUELKE, 2000). Posteriormente os pares de iniciadores foram sintetizados para serem analisados.

4.4. Caracterização e amplificação dos microssatélites de *Trema micrantha*

Os pares de iniciadores sintetizados referentes aos locos microssatélites foram caracterizados e amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em um volume total de 10 µL para cada reação. Para compor a reação foi adicionado 10 ng de DNA genômico, 1X buffer, 210 µM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 0,16 µM de iniciador *forward* e calda M13 (FAM or NED) (SCHUELKE, 2000), 0,32 µM de iniciador *reverse*, 1,05 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, California,

USA) e 3,49 μ L de água ultra pura. Estas ampliações via PCR foram desenvolvidas em duas etapas, a primeira etapa é específica para os iniciadores e a segunda para realizar a ligação do M13. A primeira etapa se inicia estabilizando a temperatura a 68°C por 2 minutos e logo a 92°C por 30 segundos. Na sequência foram realizados 30 ciclos do processo de desnaturação a 92°C por 30 segundos, seguido do anelamento por 35 segundos e a extensão a 68°C ou de 72°C por 35 segundos. Na segunda etapa do M13 foram realizados 15 ciclos do processo de desnaturação a 92°C por 20 segundos, seguido do anelamento a 53°C por 30 segundos e da extensão a 72°C por 30 segundos, finalizando com uma extensão a 72°C por 15 minutos seguida de 68°C por 30 minutos (RAMOS et al., 2011). As amostras foram amplificadas usando o termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Do produto a ser obtido das PCRs, 2 μ L será utilizado para realizar a eletroforese por 90 minutos em corrente 80V. Esta permitiu visualizar o grau de intensidade das PCRs no gel de agarose a 1,5% por 90 minutos em corrente de 80V. Os iniciadores não amplificados ou com baixa qualidade de amplificação foram submetidos a gradientes de temperatura para seleção da temperatura de anelamento ideal e PCR *touchdown*, com a temperatura de anelamento diminuindo um grau por ciclo para serem novamente analisados.

Os produtos da PCR de boa qualidade foram submetidos à eletroforese capilar no Analisador automático de DNA *ABI 3130XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) para determinar os tamanhos dos alelos com o auxílio do marcador com tamanhos de fragmentos conhecidos, *ET-550 ROX size standard* (GE Healthcare, Amersham, Buckinghamshire, UK). As genotipagens foram observadas e analisadas com o auxílio do programa *GENEMAPPER v4.0 software* (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), por meio do qual poderá ser verificado o padrão dos alelos e evidenciada a presença ou não de polimorfismo nos locos.

Para caracterização dos locos microssatélites, estes foram amplificados em quatro indivíduos da população.

Estes resultados permitiram estimar e analisar os parâmetros genéticos, iniciando pelo índice de diversidade genética, tais como: o número de alelos (A), a heterozigosidade esperada (HE) e observada (HO), e o índice de fixação de Wright para cada loco. Foi também verificado se os locos se encontram em equilíbrio de

Hardy-Weinberg e em desequilíbrio de ligação. Essas estimativas foram obtidas com o auxílio do programa GDA (LEWIS e ZAYKIN, 2001).

4.5. Análise da diversidade genética intrapopulacional da população natural de *Trema micranta*

Para cada par de iniciadores de microssatélite foi verificada a presença de alelos nulos utilizando o *software* MICROCHECKER (OOSTERHOUT et al., 2004) utilizando um intervalo de confiança de 95 % e 10.000 interações. Esta análise permitiu identificar os erros de genotipagem, ou seja, verifica a presença de alelos que não são amplificados mesmo estes existindo (alelos nulos). O programa estima os alelos nulos em cada loco, baseado nos níveis de endogamia e no efeito *Wahlund* (redução da heterozigosidade em uma população causada pela subestruturação da população), bem como nos desvios ao determinar o Equilíbrio de Hardy - Weinberg (*EHW*), o que indica que este é estimado pela frequência dos alelos.

Os parâmetros de diversidade genética, número de alelos totais (*A*), alelos privados (*AP*), heterozigosidade observada (*HO*), heterozigosidade esperada (*HE*), coeficiente de endogamia ou índice de fixação de Wright (*f*), e equilíbrio de Hardy – Weinberg (*EHW*), foram estimados para cada loco e em cada população individual com o programa *Genetic Data Analysis* - GDA (LEWIS e ZAYKIN, 2001). Para cada loco foi estimada também a taxa de cruzamento aparente a partir da fórmula:

$$T_a = (1 - f)/(1 + f)$$

Onde *f* é o coeficiente de endogamia de Wright, determinado para cada loco em função das heterozigosidades esperadas e observadas.

O *EHW* foi realizado pelo teste exato de Fisher com 100000 permutações (método *shuffle*). O programa utiliza o teste exato de Fisher para avaliar a aderência às proporções de *EHW*, como descrito por Weir (1996). O nível de significância ($P \leq 0.05$) do *EHW* foi ajustado com a correção de Bonferroni (RICE, 1989).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenho dos iniciadores

A partir da biblioteca genômica desenvolvida foram obtidas e sequenciadas um total de 120 colônias. Deste total, foram encontrados microssatélites em 41 colônias, o que representa um total de 34,17% de enriquecimento. Resultados similares foram obtidos em algumas espécies, como, por exemplo, 40,3% de enriquecimento obtidos em *Mussaenda pubescens*, um arbusto da família Rubiaceae (DUAN et al., 2012), 35,9% em *Protium subserratum* uma espécie, 39,2% obtido em cacau (*Theobroma cacao*) (ARAÚJO et al., 2007) e 28% em melão (*Cucumis melo*) (RISTCHEL et al., 2004). Contudo, em mamona foi observado um valor bastante superior, de 92,9% (BAJAY et al., 2009). Portanto, este percentual de enriquecimento é muito variável entre espécies, sendo influenciado também pelos parâmetros definidos na busca por microssatélites dentro das sequências (Dequigiovanni, 2013).

Foram identificados 41 microssatélites, sendo que destes, 29 foram dinucleotídeos (70,73%), quatro trinucleotídeos (9,76%), um tetranucleotídeo (2,44%) e um hexanucleotídeo (2,44%). (Tabela 1; Figura 5).

Os marcadores SSR sintetizados a partir da biblioteca genômica desenvolvida apresentam porcentagem média de GC igual a 44,76%, variando de 30% a 50,0%, amplificando produtos com tamanho médio de 227 pb, variando de 122 pb a 333 pb, e temperatura de anelamento média de 60,0°C. Dos 41 SSR sintetizados, 35 (85,37%) foram classificados como perfeitos, 4 (9,76%) como interrompido e 2 (4,88%) composto-interrompido. Não foi identificada a classificação de primers classificados como compostos.

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores incluindo nome, motivo, porcentagem de GC, temperaturas de anelamento, tamanhos esperados dos produtos em pares de bases (pb), e classificação de cada iniciador desenvolvido para *Trema micrantha*.

(continua)

Nome	Motivo	Sequência	%GC	Temp (°C)	Produto (pb)	Classificação
Tmi01	(TG)12	F: GAGTGCTTGTGTTTGCCTGT R: GTCATTCGTTCAAAGCCAGC	50	59 60	207	Dinucleotídeo
Tmi02	(TC)20	F: GCAAAGGAGAAACGGTGGTA R: GGGAAAGGGGTAAGTTCACAG	50	60 59	229	Dinucleotídeo
Tmi03	(AG)22	F: TTCCTCTAGTATGTTCCACAG R: ATCACATCTGTTTGTATGC	35	52 50	203	Dinucleotídeo
Tmi04	(TC)24	F: CCGTCTAATTTCTCCTAAAATG R: AGAGCCACAGAGTTAAAACG	35	54 54	122	Dinucleotídeo
Tmi05	(GA)13	F: CACCAGTTCATGTCTTGACC R: ACTCCTGTCGTATGTGATGGG	50	60 59	222	Dinucleotídeo
Tmi06	(AG)10AA(AG)9AA(AG)7	F: ACGTCTTCCTCGGCCATTTT R: TGGCCTTACTCTTCCCTCAC	50	60 60	269	Dinucleotídeo interrompido
Tmi07	(AG)22	F: TGAGAATGAGAAGTGAACACCG R: TGCCTAGTCGATTTGGAGAGT	45	60 59	316	Dinucleotídeo
Tmi08	(TC)18	F: ATGAGGCTACTTGGGAACTCG R: CAGTGCTCTTCGGTCTTCTTC	50	60 59	306	Dinucleotídeo
Tmi09	(TG)7	F: AGAAACGAGAGCGTGACAAA R: CCATTCACATACCTTCACACAC	45	58 60	298	Dinucleotídeo
Tmi10	(CA)7	F: CTCCTAACTCGCACATACGAC R: TGCTTCCTTGCCGAAAAC	50	57 59	321	Dinucleotídeo
Tmi11	(TC)26	F: ACGTATGTATTAGTCTGAGGGG R: GTGATTAGTGGCGTTACAAGA	50	55 55	194	Dinucleotídeo
Tmi12	(GA)6GCCGACTGAGCTGAA AGGGG(GA)26	F: CTAACCACTATGAGCTGCGGA R: CACAGCGAACTCTCTCACGAT	45	60 60	278	Dinucleotídeo interrompido
Tmi13	(GA)18	F: AAGAAAAGGCAAAAGAGCCC R: GAGCAATTCAAAACCTAACCC	50	59 61	321	Dinucleotídeo
Tmi14	(AT)7(AG)17GGAATATAAAT ATACATATATAT(AG)8	F: AAGCCCCACCTATCCAAGTC R: CCATTCCAACCAAAACCC	50	60 59	170	Dinucleotídeo
Tmi15	(AG)16	F: AATGAGATGGGTGGAGGA R: CTCCTTGTGTGTCTGCTCT	50	56 55	209	Dinucleotídeo
Tmi16	(TG)7	F: CCTTCCACTCAACAACCTACTC R: CACACGCACACACATACG	40	57 60	128	Dinucleotídeo
Tmi17	(GA)6C(AG)6AC(AG)6CAACT AAGTAA(GA)7	F: GAAGAACCTCAAAACGCTAGAA R: CTCTCATTTTCTCTTCCCTCA	40	57 57	190	Dinucleotídeo interrompido composto
Tmi18	(AC)13	F: CGTGCAAGTTAGAAGAGTCCAC R: AATCTCAAGCTGCTCTCAC	50	59 57	317	Dinucleotídeo
Tmi19	(AC)14	F: GCTGCACTTCAACGAGAGATA R: TCTTCCAGCTAAAACGAATAGG	40	58 57	136	Dinucleotídeo
Tmi20	(TAT)4	F: GATGGCGAACACATAATCAC R: GAGCTGCCTAATCTCCTCTTG	50	56 58	244	Trinucleotídeo
Tmi21	(CT)24T(TC)15TT(TC)6	F: AAAGGATCACTCCACCCATTC R: TGGAAGCAACATGCTAGG	45	60 58	224	Dinucleotídeo interrompido composto
Tmi22	(AC)26	F: GTGAGATTTAACTAATGACCAC R: GGAAATTAACAACTGGAGC	35	50 52	192	Dinucleotídeo

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores incluindo nome, motivo, porcentagem de GC, temperaturas de anelamento, tamanhos esperados dos produtos em pares de bases (pb), e classificação de cada iniciador desenvolvido para *Trema micrantha*.

(conclusão)						
Nome	Motivo	Sequência	%GC	Temp (°C)	Produto (pb)	Classificação
Tmi23	(TTTTTA)3	F: GCACTTTTGTGAGTGATTGC R: GAGATGCCCGTCAAAGATACA	40	58 60	284	Hexanucleotídeo
Tmi24	(TG)12	F: ATTGAGTATGTAACGCACG R: CTCACGCTAACACAAACAT	40	52 52	163	Dinucleotídeo
Tmi25	(GA)26	F: GGTCTCCCAATCGAAATC R: CTCCTCAGCAATGGAGTTGT	50	55 57	265	Dinucleotídeo
Tmi26	(CA)8	F: ATGAGGAGAGAAACTGGCGA R: GAGATTCCAACCTTATTGTTTGAGC	35	59 58	123	Dinucleotídeo
Tmi27	(CT)6	F: TCCTTTAACTCTGCTGGAGCC R: GCAAGGGGTAGTATTTTCAGCC	50	60 59	333	Dinucleotídeo
Tmi28	(TTC)5	F: CCGTCTCTTGCTGCTGATTAC R: CTAATTCCTCCAGATGGTGC	50	60 60	282	Trinucleotídeo
Tmi29	(GAA)4	F: GGATCACAAGGTTTCAGATTGC R: GTGTCATTTCAACCTTCCCTTC	45	60 60	149	Trinucleotídeo
Tmi30	(TG)11	F: CCACAGATGAAAGGAAGTGAGC R: TACACACGCACACGTACACAC	50	61 59	188	Dinucleotídeo
Tmi31	(AG)6G(AG)18	F: TACTCTCCACGCTCAAATGG R: GTGATGTTCTGAAAGCGAGC	50	59 62	193	Dinucleotídeo interrompido
Tmi32	(GT)7	F: GTCAGGGGTTCAAATCTTGGT R: CACATACACAGAACTCACACACG	45	60 59	158	Dinucleotídeo
Tmi33	(TG)6	F: CCCTGTTCTCACTCAACAACC R: GCCCATAACGTCCCAATTAC	50	59 59	234	Dinucleotídeo
Tmi34	(TG)6	F: TAGAGGGAGAAAAGAGTGGGG R: TCAGAAGGTGAGGTATCTGCC	50	59 59	279	Dinucleotídeo
Tmi35	(ATC)8	F: GCTAAACACCCTTCTGATT R: TAGTTTGCATTGTCACCTTC	40	51 53	143	Trinucleotídeo
Tmi36	(AG)17	F: GTAGGATCTGGGGCATCTCAT R: GCTATGGCGCTTACGATAGGT	50	60 60	176	Dinucleotídeo
Tmi37	(TC)13	F: TTTTCATCACACCCGACCTC R: CACTTTCTGCCCATGTCTCTC	50	60 59	238	Dinucleotídeo
Tmi38	(TC)9TG(TC)9	F: CGTGGACTAACTCTCCAAGA R: GATGGAGGAAAATGTGGCAG	50	59 60	183	Dinucleotídeo interrompido
Tmi39	(TC)7	F: AGTAAAAGCGAGAACCTTAAT R: CCGACAAAGATAACAAAAGTG	35	54 55	179	Dinucleotídeo
Tmi40	(AT)6	F: GGACTACCCGATCACCAAACCT R: GGAGGAGAGAGAACTGCCAC	50	60 60	293	Dinucleotídeo
Tmi41	(GTGA)4G(AG)23	F: TGCAGTGAGTGAGACTGAGA R: GTCATTGGAGCAGAGTCATCG	55	59 60	155	Tetranucleotídeo

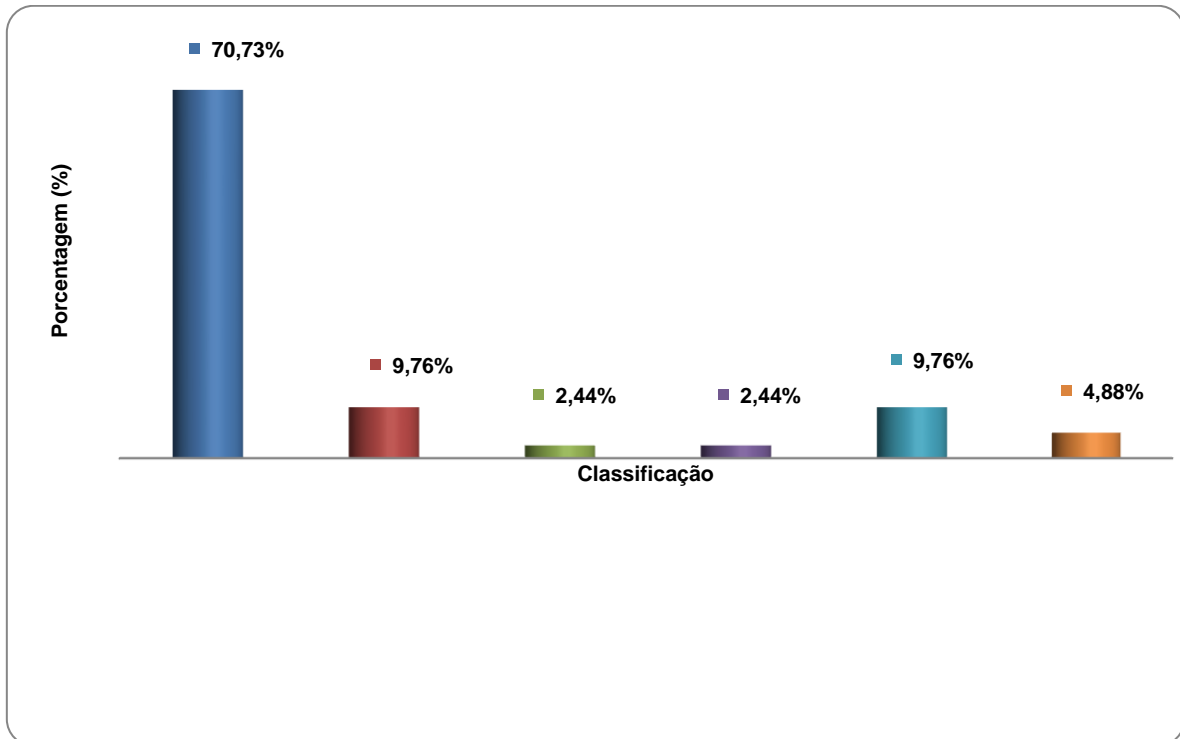


Figura 5 – Frequências da classificação dos iniciadores.

5.2 Condições de amplificação dos locos microsatélites

Dentre os 41 iniciadores sintetizados, quando realizados a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), foram identificados 11 iniciadores que amplificaram com a temperatura de anelamento de 60°C e extensão de 72°C. Iniciadores que foram utilizados nesta pesquisa.

Dentre os 11 iniciadores que apresentaram amplicons, ou seja, produtos de amplificação, 06 (54,5%) foram monomórficos para o grupo de indivíduos estudados. Contudo, isto não impede que em futuros estudos estes iniciadores passem a ser utilizados em outros grupos de indivíduos e apresentem polimorfismo. Este baixo índice de polimorfismo (45,5%) foi obtido também por outros autores trabalhando também com *Bixa orellana*. (Dequigiovanni, 2012). No desenvolvimento e caracterização dos microsatélites para *Sisyrinchium micranthum* da família Iridaceae, observou-se 11% de monomorfismo num total de nove iniciadores (TACUATIÁ et al., 2012), enquanto que a espécie *Enhalus acoroides* da família Hydrocharitaceae apresentou 89% de monomorfismo num total de 36 iniciadores de microsatélites (GAO et al., 2012).

5.3 Índices de diversidade genética na população de *Trema micrantha*

Para realizar estas análises, foram utilizados 05 iniciadores de microsatélites que apresentaram polimorfismo após a genotipagem das amostras. Foi observada a presença de alelos nulos para três iniciadores, sendo estes, o iniciador Tmi04, Tmi09 e Tmi36 na população estudada. Porém, esta estimativa dos alelos nulos em cada loco é baseado nos níveis de endogamia e heterozigidade da população, parâmetro que determina os desvios no Equilíbrio de Hardy - Weinberg (*EHW*), indicando que esta análise de alelos nulos é estimado pela frequência dos alelos presentes na população (OOSTERHOUT et al., 2004), podendo estes resultados serem influenciados pela subestruturação da população estudada.

A heterozigidade é uma medida da variabilidade genética que estima o quanto de variação existe numa população e como esta variação está distribuída em função dos alelos presentes em um determinado loco. Os valores de heterozigidade esperada (H_e) variaram de 0,171 (Tmi09) a 0,717 (Tmi36), com média de 0,438. Por outro lado, a heterozigidade observada (H_o) variou de 0,037 (Tmi09) a 0,308 (Tmi36), com média de 0,196 (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros de diversidade genética avaliados na população de *TREMA MICRANTHA*, incluindo número de amostras (N), número de alelos (A), heterozigidade esperada (H_e), heterozigidade observada (H_o) e índice de fixação de Wright (f)

Locos	N	A	H_e	H_o	f
Tmi04 ^F	30	5	0,519	0,133	0,746
Tmi09 ^F	27	2	0,171	0,037	0,787
Tmi16 ^N	30	1	---	---	---
Tmi25 ^N	28	2	0,343	0,214	0,379
Tmi26 ^N	30	1	---	---	---
Tmi27 ^H	30	1	---	---	---
Tmi28 ^H	28	3	0,441	0,286	0,356
Tmi29 ^H	30	1	---	---	---
Tmi32 ^H	30	1	---	---	---
Tmi36 ^H	26	4	0,717	0,308	0,576
Tmi37 ^H	27	1	---	---	---
Média	28,73	2	0,438	0,196	0,569

^F= Calda M13 FAM; ^N= Calda M13 NED; ^H= Calda M13 HEX

Valores altos de f observados na maioria dos locos analisados permitem a interpretação de que os genótipos estudados estão submetidos a forte endogamia. A partir destes valores foi calculada a taxa de cruzamento aparente (Ta), obtendo-se um valor de 0,275. A partir deste valor, é possível interpretar que a taxa aparente de autofecundação, neste caso, foi de 0,725.

A existência de cruzamentos entre aparentados gera autofecundação e, conseqüentemente, aumento da homozigidade (RITLAND, 2002). Estes resultados também sugerem que a *Trema micrantha* pode tolerar ambos os tipos de polinização, devido ao resultado apresentado na taxa de autofecundação (0,725). Em outras espécies também foram identificados este comportamento. Rivera-Madrid et al. (2006), realizando polinizações controladas em acessos de urucum (*Bixa orellana*) em campo experimental no México, sugerindo que urucum pode tolerar ambos tipos de polinização, tendo registrado valores de polinização cruzada de 57% e auto-fecundação de 31,4%. Muluvi et al. (2004) trabalhando com *Moringa oleifera*, uma espécie com sistema reprodutivo misto, utilizando marcadores AFLP, obtendo uma taxa de cruzamento de 0,74. Assim como *Trema micrantha*, esta espécie tolera a autofecundação. De acordo com Ritland (1983), diversos fatores podem influenciar as taxas de endogamia e cruzamentos, como seleção contra genótipos homozigotos, frequência desbalanceada de grãos de pólen na população. Assim, é importante realizar estudos referentes ao sistema reprodutivo da espécie, devido a que a biologia reprodutiva da *Trema micrantha* ainda não está bem explicada. Cabe salientar que as taxas de cruzamento e autofecundação aparente são estimativas, e não substituem análises com progênies para determinação do sistema reprodutivo, sendo assim, necessários mais estudos para confirmar estes dados (Dequigiovanni, 2013).

O teste de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3) demonstra a ocorrência de Equilíbrio de Hardy-Weinberg em nove dos onze locos estudados a partir do valor p de probabilidade. Os locos que apresentam valores de “ p ” abaixo de 0,0045, após a correção de Bonferroni (RICE, 1989) demonstram não estar em equilíbrio. Apenas os locos Tmi04 e Tmi36 não estão sob equilíbrio de Hardy-Weinberg. Tal resultado já era esperado, uma vez que as premissas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg determinam que as populações devem ser panmíticas, ou seja, com cruzamentos ao acaso. Este resultado é mais um indicativo de que deve ser realizados estudos dos sistemas reprodutivos dessa espécie.

Tabela 3 - Teste exato de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco

Locos	Valor p de probabilidade
Tmi04	0,0000*
Tmi09	0,0057
Tmi16	1,0000
Tmi25	0,0704
Tmi26	1,0000
Tmi27	1,0000
Tmi28	0,0329
Tmi29	1,0000
Tmi32	1,0000
Tmi36	0,0000*
Tmi37	1,0000

*Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg com teste exato de Fisher ($P < 0.005$, depois de ajustar a correção de Bonferroni (RICE, 1989)).

6. CONCLUSÃO

Os iniciadores de microssatélites sintetizados neste estudo permitiram a detecção de polimorfismo entre todo o conjunto de amostras estudados, indicando que os mesmos são adequados para emprego em estudos de diversidade genética em *Trema micrantha*.

Os marcadores SSR sintetizados nesse trabalho poderão ser utilizados para a análise de genótipos de *T. micrantha*, em estudos de diversidade, mapeamento genético, apresentam potencial para aplicação em programas de melhoramento genético e de conservação *in situ* e *ex situ* da espécie.

Os genótipos analisados apresentaram um excesso de homozigose na maioria dos locos estudados, sugerindo forte endogamia, provavelmente resultante da ocorrência de autofecundação em *Trema micrantha* na população em estudo.

7. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, I.S.; INTORNE, A.C.; PEREIRA, M.G.; LOPES, U.V.; SOUZA-FILHO, G.A. Development and characterization of novel tetra-, tri- and di-nucleotide microsatellite markers in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Molecular Breeding**, New York, v. 20, p. 73-81, 2007.
- BACKES, P.; IRGANG, B.. **Mata Atlântica: as árvores e a paisagem**. Porto Alegre: Paisagens do Sul, 2004. 293 p.
- BAJAY, M. M.; PINHEIRO J. P.; BATISTA, C. E. A.; NÓBREGA, M. B. M.; ZUCCHI M. I. Development and characterization of microsatellite markers for castor (*Ricinus communis* L.), an important oleaginous species for biodiesel production. **Conservation Genetic Resources**, Durham, v.1, p. 237-239, 2009.
- BARBERA, R. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity in acute and chronic conditions of *Trema guineensis* (Schum. et Thonn.) Ficalho and *Trema micrantha* Blume extracts in rodents. **Phytotherapy Research**, 1992. 6: 146-148.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1978. 255p.
- BAWA, K. S. et al. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination systems. **American Journal of Botany**, New York, v.72, n. 3, p. 346-356, 1985.
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, Paris, v. 54, p. 277–288, Aug. 1999.
- BORÉM, A., MIRANDA, GLAUCO. V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: UFV, 2009. 5ed. 529p.
- BOSHIER, D.H.; LAMB, A.T. 1997. Mating System, Population Structure and Gene Flow. In: Boshier, D.H. e Lamb, A.T. (Eds.) 1997. **Cordia alliodora: genetics and tree improvement** . Tropical Forestry Papers 36. P. 29 – 38.
- BROKAW, N. V. L. Gap-phase regeneration of three pioneer tree species in a tropical forest. **Journal of Ecology**, 1987. 75:9–19.
- BRONDANI, R.P.V; BRONDANI, C; GRATTAPAGLIA D. **Manual prático para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas**. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF. 2007. 111p.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N. **Tipos de marcadores moleculares**. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (eds). **Marcadores Moleculares**. 2nd ed. Viçosa, MG, 2009. 54-66.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ/SPI, 1994. 640p.

CORNER, E. J. H. **The seeds of dicotyledons**. Cambridge: University Press, 1976. 311p.

DENSLOW, J.S. Tropical rainforest gaps and trees species diversity. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 431–451, 1987.

DEQUIGIOVANNI, G. **Desenvolvimento de locos de microssatélite para a caracterização da diversidade genética de acessos de urucum (*Bixa orellana* L.)**. 2013. 73p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13–15, Jan. 1990.

DUAN, T.; GONG, W.; ZHANG, D. Development of microsatellite markers from *Mussaenda pubescens* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 99, n.11, p. 437–439, 2012.

DURIGAN, G.; FIGLIOLIA, M.B.; KAWABATA, M.; GARRIDO, M, A, O.; BAITELLO, J.B. **Sementes e mudas de árvores tropicais**. 2. Ed. São Paulo: Instituto Florestal, CNPQ, SMA, LICA, 2002. 65p.

ELLSTRAND, N.C.; ELAM, D.R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual review of ecology and systematics**, v. 24, p. 217-242, 1993.

ESFAHANI, S.T.; SHIRAN, B.; BALALI, G. AFLP markers for the assessment of genetic diversity in european and North American potato varieties cultivated in Iran. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n.1, p. 75-86, 2009.

ESTOPA, R.A.; SOUZA, A.M.; MOURA, C.O.M.; BOTREL, M.C.G.; MENDONÇA, E.G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, n.70, p. 97-106, 2006.

FERREIRA, M. B.; GOMES, J.; LOSADA, M. Subsídios para o estudo de *Trema micrantha* (L.) Blume. In: **CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA**, 26., 1975, Rio de Janeiro. Trabalhos do... Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1977. p. 175-187.

FREITAS, M.L.M.; AUKAL, A.P. de A.; SEBBENN, A.M; MORAIS, M.L.T. de; LEMOS, E.G.M. Variabilidade genética intrapopulacional em *Mycrodruon urundeuva* Fr. All. Por marcador AFLP. **Scientia Florestalis**. n. 68, p. 21-28, 2005.

FURTINI NETO, A. E.; RESENDE, A. V.; VALE, F. R.; SILVA, I. R. Liming effects on growth of Woody species from the Brazilian Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.5, p.829-837, 1999.

GAO, H.; JIANG, K.; GENG, Y.; CHEN, X-Y. Development of microsatellite primers of the largest seagrass, *Enhalus acoroides* (Hydrocharitaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v.99, p. e99–e101. Mar. 2012.

GOLDSTEIN, D.B.; C. SCHLÖTTERER. **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford University Press, Oxford. 1999.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

KOSKELA, J.; AMARAL, W.A.N. Conservation of tropical forest genetic resources: IPGRI's efforts and experiences. **SE-Asian Moving Workshop on Conservation, Management and Utilization of Forest Genetics Resources**. Thailand. 2002.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis: computer programe for the analyse of allelic data**. Version 1.0, 2001. Disponível em:<<http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php> >. Acesso em: 20 jun. 2010.

LORENZI H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2008. 384p.

MÁRQUEZ-CRUZ, U.; LÓPEZ, C.; NEGREROS-CASTILLO, P. Una espécie multiusos del trópico mexicano *Trema micrantha* (L.) Blume. **Ciencias**, México, v. 101, 16-22, 2011.

MARTINS, W.S.; LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F. de S.; BERTIOLI, D.J. WebSat - a web software for microsatellite marker development. **Bioinformatics**, v.3, p.282-283, 2009.

MATOS, F. J. A. et al. Plantas tóxicas: estudos de fitotoxicologia química de plantas brasileiras: 1-121. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, São Paulo, 2011.

MOURA, T. M.; SEBBENN, A. M.; CHAVES, L. J.; COELHO, A.S.G.; OLIVEIRA, G.C.X.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade Genética espacial em populações altamente fragmentadas de *Solanum sp.* no Cerrado de Goiás, a partir de locos microssatélites. **Scientia florestalis**, v. 37, n. 82, p. 143-150. 2009.

MULUVI, G.M.; SPRENT, J.I.; ODEE, D.; POWELL, W. Estimates of outcrossing rates in *Moringa oleifera* using Amplified Fragment Length Polimorphism (AFLP). **African journal of biotechnology**, Nairobi, v.3, p. 146–151, 2004.

NEE, M. Ulmaceae. **Flora de Veracruz**, Veracruz, n. 40, p. 28–33. 1993.

NÓBREGA, R. S. A. et al. Substratos para o crescimento de mudas de *Trema micrantha* (L.) Blume. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 5, n. 3, p. 392-397, 2010.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; VILELA, E.A.; CARVALHO, D.A.; GAVILANES, M.L. **Estudos florísticos e fitossociológicos em remanescentes de matas ciliares do Alto e Médio Rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE, 1995. 27 p.

OOSTERHOUT, C.V; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.4, p. 535–538, June 2004.

OUBORG, N.J.; PERTOLDI, C.; LOESCHCKE, V.; BIJLSMA, R.; HEDRICK, P.W. Conservation genetics in transition to conservation genomics. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 26, p. 177–187, Apr. 2010.

PAIVA, J.R. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia: Estratégias e novas abordagens**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1998. 135p.

PARON, M. E.; SIQUEIRA, J.O.; CURI, N. Fungos micorrízicos, fósforo e nitrogênio no crescimento inicial da trema e do fedegoso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, n.4,p.567-574, 1997.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in plant science**, Oxford, v.1, p. 215–222, 1996.

RAMOS, S.L.F.; MACEDO, J.L.V.; LOPES, M.T.G.; BATISTA, J.S.; FORMIGA, K.M.; DA SILVA, P.P.; SAULO-MACHADO, A.C.; VEASEY, E.A. Microsatellite loci for tucumã of Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and amplification in other Arecaceae. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 99, p. e508–e510, Dec. 2012.

RAPOSO, A.; CIAMPI, A.Y.; WADT, L.H.O.; VEASEY, E.A. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n. 9, p.1291-1298, Sep. 2007.

RICE, W.R. Analyzing tables of statistical test. **Evolution**, Oxford, v. 43, p. 223-225, Jan. 1989.

RISTCHEL, P.S.; LINS, T.C.L.; TRISTAN, R.L.; BUSO, G.S.C.; FERREIRA, M.E. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). **BMC Plant Biology**, London, v. 4, p. 1-14, 2004.

RITLAND, K. Inferring the genetic basis of inbreeding depression in plants. **Genome**, Ottawa, v. 39, p. 1-8, 1996.

RIVERA-MADRID, R.; ESCOBEDO-GM, R.M.; BALAM-GALERA, E.; VERA-KU, M.; HUGES HARRIES, H. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 109, p.165-172, 2006.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. **Methods in molecular biology**. v.132, p. 365-386. 2000.

SCHOENFELDER, T.; CIRIMBELLI, T. M.; CITADINI-ZANETE, V. Acute effect of *Trema micrantha* (Ulmaceae) on serum glucose levels in normal and diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 456-459, 2006.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, New York, v.18, p. 233–234, Feb. 2000.

SEBBENN, A.M.; ETTORI, L.C. Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltroforum dubium* em teste de progênies misto. **Revista do Instituto Florestal**. São Paulo, v. 13, n. 22, p. 201-211, 2001.

SETOTAW, T. A; DIAS, L. A. S.; MISSIO, R. F. Genetic divergence among barley accessions from Ethiopia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 116-123, 2010.

SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J.O.; CARVALHO, J. G.; GUILHERME, L. R. G. Micorriza arbuscular e nutrição fosfática na toxidez de zinco para a trema [*Trema micrantha* (L.) Blum]. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.30, n.4, p.665-675, 2006.

TACUATIÁ, L.O.; CIDADE, F.W.; SOUZA, A. P.; SOUZA-CHIES, T.T. Development and characterization of nine microsatellite loci for *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v.99, p. e402–e404. Oct. 2012.

TARAZI, R.; MORENO, M.A.; GANDARA, F.B.; FERRAZ, E.M.; MORAES, M.L.T.; VINSON, C.C.; CIAMPI, A.Y.; VENCOVSKY, R.; KAGEYAMA, P.Y. High levels of genetic differentiation and selfing in the Brazilian Cerrado fruit tree *Dipteryx alata* Vog. (Fabaceae). **Genetics and Molecular Biology**, v.33, n.1, 2010. p.78-85.

TORRES, R. B. Biologia da reprodução de *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae). 1996. 140 f. **Tese** (Doutorado Biologia Vegetal)-Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

VENTURIN, N.; SOUZA, P. A.; VENTURIN, R. P. Avaliação nutricional da candiúva (*Trema micrantha* (L.) Blume) em casa de vegetação. **Floresta**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1/2, p. 15-26, 2000.