

**IDENTIFICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES CANDIDATOS PARA *Brosimum gaudichaudii* Trécul.: UMA
ESPÉCIE MEDICINAL E NATIVA DO CERRADO**

ALUNO: ISADORA VIEIRA MARCELO

ORIENTADOR: RICARDO DIÓGENES DIAS SILVEIRA

COORIENTADOR: IVANDILSON PESSOA PINTO DE MENEZES

ISADORA VIEIRA MARCELO

**IDENTIFICAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES CANDIDATOS PARA *Brosimum gaudichaudii* Trécul.: UMA
ESPÉCIE MEDICINAL E NATIVA DO CERRADO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso em Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí como parte dos requisitos para conclusão do curso de graduação, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Diógenes Dias Silveira

Urutaí, GO 2021

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

MM314i Marcelo, Isadora Vieira
Identificação e desenvolvimento de marcadores
microssatélites candidatos para *Brosimum*
gaudichaudii Trécul.: Uma espécie medicinal e nativa
do Cerrado / Isadora Vieira Marcelo; orientador Dr.
Ricardo Diógenes Dias Silveira; co-orientador Dr.
Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes. -- Urutaí, 2021.
19 p.

TCC (Graduação em Ciências Biológicas) -- Instituto
Federal Goiano, Campus Urutaí, 2021.

1. Mama- Cadela. 2. Marcadores de DNA. 3. Primers
de Microssatélites. 4. Bioma Cerrado. I. Diógenes
Dias Silveira, Dr. Ricardo, orient. II. Pessoa
Pinto de Menezes, Dr. Ivandilson, co-orient. III.
Título.



TERMO DE CIÊNCIA E DEAUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Tese - Doutorado | <input type="checkbox"/> Monografia - Especialização |
| <input type="checkbox"/> Artigo Científico | <input type="checkbox"/> Dissertação - Mestrado |
| <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento | <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: |
| <input checked="" type="checkbox"/> TCC - Graduação | |

Nome Completo do Autor: Isadora Vieira Marcelo

Matrícula: 2017101220530010

Título do Trabalho: Identificação e desenvolvimento de marcadores microssatélites candidatos para *Brosimum gaudichaudii* Trécul.: Uma espécie medicinal e nativa do Cerrado

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 16/03/2022

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

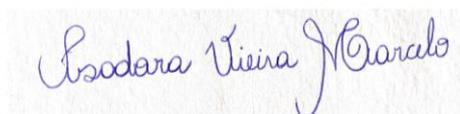
1. o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;

2. obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;

3. cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí, 16/03/2022

Local / Data



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO SECRETARIA DE EDUCAÇÃO
PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO

Formulário 57/2021 - CCPG-UR/DPGPI-UR/CMPURT/IFGOIANO

ATA DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO DE CURSO

Às 19 horas do dia 17 de agosto de 2021, reuniu-se

() Presencialmente na sala nº _____ do Prédio
_____ do Instituto Federal de Educação, Ciência
e Tecnologia Goiano - Campus Urutaí

() Por vídeo conferência

a Banca Examinadora do Trabalho de Curso intitulado "Identificação e desenvolvimento de marcadores microssatélites candidatos para *Brosimum gaudichaudii* Trécul.: Uma espécie medicinal e nativa do Cerrado "composta pelos professores

1	Ricardo	Diógenes	Dias	Silveira
2	Ivandilson	Pessoa	Pinto	de Menezes

3	Marco	Antônio	Moreira	de	Freitas
4	(suplente,	quando	necessário)	Guilherme	Malafaia Pinto

para a sessão de defesa pública do citado trabalho, requisito parcial para a obtenção do Grau de **Licenciado em Ciências Biológicas**. O Presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Ricardo Diógenes Dias Silveira, passou a palavra ao licenciando (a) Isadora Vieira Marcelo, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos membros da Banca Examinadora e respectiva defesa da licencianda. Logo após, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do(a) licenciado(a) e do público, para expedição do resultado final. A Banca Examinadora considerou que o(a) discente foi

(X) APROVADO / () NÃO APROVADO por unanimidade, tendo sido atribuído a nota (10) ao seu trabalho. O resultado foi então comunicado publicamente ao(a) licenciando(a) pelo Presidente da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora deu por encerrada a defesa.

Assinatura dos membros da Banca Examinadora	Notas
1. Ricardo Diógenes Dias Silveira	10
2. Marco Antônio Moreira de Freitas	10
3. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes	10
Média final:	10

Urutaí-GO, 16 de agosto de 2021

Documento assinado eletronicamente por:

- Marco Antonio Moreira de Freitas, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 11/10/2021 14:08:35.
- Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes, Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal de Educacao, Ciência e Tecnologia do Ceara (10744098000145), em 17/08/2021 10:23:21.
- Ricardo Diogenes Dias Silveira, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 17/08/2021 08:39:53.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 16/08/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 300172
Código de Autenticação: e2d5233974



AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me conceder discernimento e sabedoria para poder executar todas as etapas deste trabalho.

À minha mãe pelo incansável incentivo e apoio em todas as minhas decisões.

Ao Prof. Dr. Ricardo Diógenes Silveira pela orientação e valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes pela coorientação e, sobretudo, pelos conhecimentos transmitidos, confiança e todos os ensinamentos. Enfim, obrigada pela oportunidade.

Ao Laboratório de Genética Molecular (LaGeM) por oferecer a infraestrutura necessária para desenvolver este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Letícia de Maria Oliveira Mendes, que me auxiliou em diversas etapas do trabalho e por me ajudar a superar as dificuldades. Agradeço pela atenção.

Às minhas amigas e colegas de turma Karolline Aguirre S. Carvalho, Bruna C. Gonzaga e Fernanda de Jesus Valverde por todos os momentos vividos e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus amigos Carla Pereira da Silva e Carlos André Lopes da Silva por todas as conversas, atenção e apoio.

Ao Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí pelo suporte físico oferecido e por todo conhecimento adquirido.

Lista de ilustrações

Figura 1. Acesso MM12 de Mama- Cadela (seta) usado para obtenção de DNA genômico para construção da biblioteca enriquecida em microssatélites..... 6

Figura 2. Gel de agarose e quantificação de DNA genômico de um único acesso de Mama-Cadela em 12 repetições. Três primeiros poços são DNA lambda com concentrações conhecidas de 50, 100 e 200 ng.µL⁻¹, os demais poços são as repetições DNA genômico extraídos do acesso de Mama-Cadela.....11

Figura 3. Géis de agarose correspondentes as etapas da construção da biblioteca genômica enriquecida em SSR da espécie de *B. gaudichaudii* (Mama-Cadela). A- Gel de digestão do DNA genômico; B – Gel da pré-amplificação via PCR usando primer Rsa 21 dos fragmentos ligados aos adaptadores Rsa 21 e Rsa 25;. C – Gel da amplificação de fragmentos selecionados contendo SSR na faixa de 500 a 1500 pares de bases (setas amarelas); D – Gel de amplificação dos insertos clonados; D- Gel de eletroforese do produto do isolamento do DNA plasmidial dos insertos clonados (Miniprep).....13

Lista de tabelas

Tabela 1. Localização geográfica de acessos de Mama- Cadela amostrada em área de reserva do Cerrado sentido restrito no município de Urutaí, Goiás. 4

Tabela 2. Descrição da quantificação de DNA genômico de duas repetições de Mama- Cadela usando nanodrop.11

Tabela 3. Descrição dos seis loci microssatélites de *B. gaudichaudii* Trécul, incluindo as sequências dos primers (F- forward) e (R- reverse), temperatura de melting, conteúdo de GC, motivos de repetição da região microssatélite, tamanho alélico esperado de cada loco15

Lista de abreviaturas e siglas

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

IPTG– Isopropil-β-D-tiogalactopyranoside

Mc – Mama- Cadela

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

NCBI– National Center for Biotechnology Information

Pb – Pares de bases

PCR– Reação em cadeia da polimerase

RNA– Ácido ribonucleico

RNAse – Enzima que degrada RNA

SAM– Seleção assistida por marcadores

SSR- *Simple Sequence Repeat*

Tm – Temperatura de melting

X – GAL – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -d-galactopiranosideo

Sumário

1. Introdução	2
2. Materiais e Métodos	4
2.1 Local, população e material vegetal para o estudo	4
2.2. Extração do DNA genômico	5
2.3. Construção da biblioteca genômica enriquecida em microssatélites (Sequences Simple Repeats – SSR)	7
2.4. Sequenciamento dos fragmentos de DNA	9
2.5. Análises das sequências, identificação dos <i>SSR</i> e desenho dos <i>primers</i>	9
3. Resultados e Discussão	10
3.1. Extração de DNA	10
3.2. Construção da biblioteca genômica enriquecida com SSR	12
3.3. Identificação e desenho dos <i>primers</i> de microssatélite	13
4. Conclusão.....	16
5. Referências	16

1 **Identificação e desenvolvimento de marcadores microsatélites candidatos para**
2 ***Brosimum gaudichaudii* Trécul.: Uma espécie medicinal e nativa do Cerrado**

3
4 **Resumo**

5
6 A espécie *Brosimum gaudichaudii* é pertencente à família Moraceae e apresenta ampla
7 distribuição no Cerrado brasileiro. É uma espécie frutífera e de uso medicinal, muito utilizada
8 no tratamento de doenças cutâneas, tornando-se alvo do extrativismo predatório. A falta de
9 reposição e a ausência de estudos de conservação e manejo fazem com que a mama-cadela seja
10 afetada, diretamente, pelo extrativismo predatório tendo assim uma diminuição em sua
11 população natural. Diante à falta de informações sobre a genética populacional da espécie os
12 marcadores microsatélites configuram-se como uma ferramenta biotecnológica eficiente e
13 adequada em avaliar o fluxo gênico, dinâmica populacional e dispersão para que assim
14 estratégias de manejo possam ser traçadas. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo
15 promover o desenvolvimento dos primeiros marcadores microsatélites para *B. Gaudichaudii*.
16 Para isto, foi utilizada uma amostra populacional com 27 indivíduos adultos, sendo utilizado
17 um único acesso de Mama-Cadela para obtenção do DNA genômico. Com isso o DNA foi
18 extraído, quantificado, digerido com endonucleases e ligado a adaptadores; os fragmentos
19 foram pré-amplificados via PCR e purificados para seleção de fragmentos de interesse contendo
20 microsatélites por hibridação; os fragmentos selecionados foram ligados ao vetor de clonagem
21 e por eletroporação foram inseridos em células competentes de *E. coli*; por fim, as células
22 transformadas foram repicadas em meio LB sólido para crescimento e selecionados os clones
23 positivos para construção da biblioteca genômica. Para obtenção dos *primers* foram utilizados
24 softwares disponibilizados na internet de forma gratuita. Desse modo, dos 48 clones
25 sequenciados no sentido de ida e volta a partir da biblioteca genômica obtida, produzimos um
26 total de 96 sequências, das quais 78 foram descartadas no processo de edição por apresentarem
27 baixa qualidade, as dezoito sequências restantes foram analisadas e encontramos 10 SSRs. Do
28 total de 10 sequências contendo microsatélites apenas seis foram apropriadas para o desenho
29 dos *primers*. Portanto, o presente estudo descreve os seis primeiros loci de microsatélites para
30 a espécie em questão.

31
32 **Palavras chave:** Mama- Cadela; Marcadores de DNA; Primers de Microsatélites; Bioma
33 Cerrado

34
35
36

37 1. Introdução

38

39 Considerado o segundo maior bioma da América do Sul, o Cerrado caracteriza-se por
40 apresentar grande diversidade biológica sendo possível, assim, encontrar várias espécies
41 endêmicas (Machado, 2016). Entretanto, nos últimos anos a expansão da fronteira agrícola vem
42 fazendo com que o bioma perca tanto sua área original quanto sua diversidade (Assis et
43 al.,2021).

44 Em virtude do alto grau de degradação do Cerrado e do elevado número de espécies
45 encontradas aqui o bioma acaba sendo classificado como uns dos hotspots de biodiversidade
46 (Myres, 1988). Nesse sentido espécies alimentícias, madeireiras, medicinais, forrageiras, entre
47 outras, podem ser perdidas devido as atividades antrópicas e com isso os estudos relacionados
48 a caracterização da estrutura genética das populações são importantes para o desenvolvimento
49 de medidas de conservação e manejo.

50 No âmbito do bioma Cerrado o desmatamento e a fragmentação são fatores
51 preocupantes, pois promovem a perda da biodiversidade e afetam o funcionamento do
52 ecossistema. Dessa forma perante a perda de espécies o desenvolvimento de marcadores
53 microssatélites acaba sendo de suma importância, uma vez que possibilitam a realização de
54 análises populacionais em várias escalas e a identificação de áreas prioritárias para conservação
55 (Dantas et al., 2019). Sendo assim nos últimos anos SSRs vêm sendo desenvolvidos para várias
56 espécies encontradas no bioma, *Chrysoleaena obovata*, *Campomanesia adamantium* e *Alibertia*
57 *edulis*, fator esse que possibilitou estimar a diversidade genética e a realização de análises
58 filogeográficas (Camacho et al., 2017; Crispim et al., 2019; Dantas et al., 2019).

59 Entre as diversas espécies presente no bioma Cerrado *Brosimum gaudichaudii* Trécul.,
60 popularmente conhecida como mama-cadela, mamica-de-cadela, inharé e algodãozinho, merece
61 destaque, uma vez que possui potencial madeireiro, alimentício, e ainda é utilizada pela

62 indústria farmacêutica na produção de medicamentos voltados para o tratamento de doenças
63 cutâneas, como o vitiligo, sendo assim, apresenta relativa importância econômica.

64 A espécie *B. gaudichaudii* é pertencente à família Moraceae e apresenta ampla
65 distribuição no cerrado brasileiro. É uma espécie lactescente, decídua, heliófita, xerófita,
66 monoica, que de acordo com Almeida et al. (1998) mede entre 4 e 10 metros de altura, sendo
67 classificada, assim, como um arbusto de médio porte. Segundo Bucher (2002) a crescente
68 procura por esta espécie atrelada a falta de reposição e a ausência de estudos de conservação e
69 manejo fazem com que a mama-cadela seja afetada, diretamente, pelo extrativismo predatório
70 tendo assim uma diminuição em sua população natural.

71 Diante do exposto percebe-se que é de suma importância a realização de estudos que
72 gerem informações sobre a dinâmica populacional de *B. gaudichaudii*. Desse modo, os
73 marcadores microssatélites conhecidos também como *Simple Sequence Repeat* (SSR) são
74 considerados ferramentas moleculares essenciais, uma vez que são altamente informativos,
75 frequentes, baseados em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), necessitam de pequena
76 quantidade de DNA, são altamente reproduzíveis e distribuídos ao acaso no genoma de
77 eucariotos (Souza, 2015). Além do que cada “ilha microssatélite” constitui um loco genético
78 altamente polimórfico, multialélico e de herança codominante (Lacape et al., 2007).

79 Por apresentarem um elevado grau de polimorfismo os microssatélites vêm sendo
80 empregados no melhoramento de plantas, caracterização da estrutura e diversidade
81 genética, seleção assistida por marcadores (SAM), e mapeamento (Semagn et al., 2006). Além
82 do que o fato das unidades repetitivas serem flanqueadas por sequências únicas possibilita com
83 que essas sejam amplificadas individualmente por meio da Reação em Cadeia da Polimerase.
84 Desse modo para que se possa identificar as regiões repetitivas, ou seja, os microssatélites torna-
85 se necessário a utilização de uma das diversas metodologias existentes. Uma delas é a
86 construção de bibliotecas genômicas enriquecidas com SSR da espécie de interesse, que tem

87 como base a fragmentação do DNA e o desenvolvimento de *primers* específicos que
88 amplifiquem as regiões microssatélites.

89 Portanto, objetivou-se com o presente estudo promover o desenvolvimento dos
90 primeiros marcadores microssatélites para *B. gaudichaudii*, para que assim tais informações
91 possam impulsionar possíveis estudos de conservação e manejo dos recursos genéticos
92 populacionais da espécie.

93

94 2. Materiais e Métodos

95 2.1 Local, população e material vegetal para o estudo

96

97 Uma amostra populacional de Mama-Cadela com 27 plantas adultas foi selecionada a
98 partir de um fragmento de vegetação de área de reserva do bioma Cerrado pertencente ao
99 município de Urutaí, Goiás, Brasil (Tabela 1). Esta área apresenta fitofisionomia Cerrado
100 sentido restrito de solos profundos e relevo plano, classificados como latossolos. Embora, seja
101 uma área com sinais de interferência antrópica, a exemplo, de atividade pecuária e circundada
102 por área de lavoura, apresenta indicativos relativos de bem preservado (Silva filho et al., 2020).

103

104 **Tabela 1.** Localização geográfica de acessos de Mama-Cadela amostrada em área de reserva
105 do Cerrado sentido restrito no município de Urutaí, Goiás.

Município	Indivíduo	Altitude(m)	Longitude(W)	Latitude (S)
Urutaí	MM1	783	48,168750	17,376117
	MM2	787	48,168833	17,376383
	MM3	785	48,168717	17,376483
	MM4	786	48,168750	17,376467
	MM5	786	48,168750	17,376500
	MM6	787	48,168550	17,377083

MM7	787	48,168550	17,377117
MM8	787	48,168567	17,377117
MM9	786	48,168600	17,377100
MM10	786	48,168567	17,377200
MM11	786	48,168567	17,377200
MM12	787	48,168617	17,377267
MM13	788	48,168667	17,377250
MM14	787	48,168750	17,377400
MM15	786	48,168750	17,377433
MM16	786	48,168817	17,377483
MM17	786	48,168800	17,377617
MM18	787	48,168867	17,377650
MM19	786	48,168933	17,377617
MM20	787	48,168950	17,377633
MM21	790	48,169033	17,378000
MM22	790	48,168950	17,378117
MM23	787	48,168933	17,378250
MM24	788	48,168950	17,378317
MM25	789	48,168900	17,378317
MM26	782	48,169100	17,378150
MM27	786	48,169383	17,378267

106

107 **2.2. Extração do DNA genômico**

108

109 Um único acesso de Mama-Cadela da população amostrada (Figura 1) foi utilizado para
110 obtenção do DNA genômico em dez repetições. Esse número de repetições foi necessário para
111 otimizar o processo de obtenção da quantidade e qualidade de DNA recomendada de 5 µg

112 (aproximadamente 5000 ng) com relação de $260/280 \geq 2,0$ e $260/230 \geq 1,8$ para construção da
113 biblioteca genômica enriquecida com SSR.



114

115 **Figura 1.** Acesso MM12 de Mama-Cadela (seta) usado para obtenção de DNA genômico para
116 construção da biblioteca enriquecida em microssatélites
117

118 Desta maneira, o DNA genômico foi extraído de dez amostras foliares de um único
119 genótipo, separadamente, usando método do CTAB 2% (Doyle & Doyle, 1990). O DNA
120 genômico foi ressuspensionado em 50 μL de água milliq com RNase (10 mg/mL), quantificado em
121 agarose a 1%, corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e visualizado em transluminador de
122 UV. Após verificar a qualidade e quantidade do DNA produzimos duas repetições de volume
123 final de 250 μL reunindo cinco das repetições iniciais e, em seguida, foram quantificadas em
124 nanodrop. Por fim, as alíquotas finais foram liofilizadas para transporte para o CBMEG, onde

125 foi produzido a biblioteca genômica enriquecida com microssatélites sob supervisão da
126 professora e pesquisadora Dra. Anete Pereira de Souza no curso NT 264A – microssatélites
127 para estudos genéticos de eucariotos.

128

129 **2.3. Construção da biblioteca genômica enriquecida em microssatélites (Sequences** 130 **Simple Repeats – SSR)**

131

132 Para construção da biblioteca genômica foi utilizado o protocolo descrito por Billiote
133 et- al. (1999), com algumas modificações. Uma alíquota de 25 µL do DNA genômico extraído
134 foi digerido com 10 U da endonuclease *AfaI* (Invitrogen) em uma reação de volume final de
135 100 µL conforme a recomendação do fabricante. A reação foi incubada a 37°C em overnight e
136 visualizada posteriormente em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

137 Os fragmentos digeridos foram ligados aos adaptadores *Rsa21* (5'
138 CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3') e *Rsa25* (5'-
139 TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACACA-3'). A reação de ligação dos adaptadores foi
140 realizada em um volume final de 25 µL, contendo 3 µL do DNA digerido, 5 µL tampão 5x, 10
141 µM dos adaptadores, 1 U T4 da DNA ligase (Invitrogen) e, em seguida, a reação foi incubada
142 a -20°C por 2 h. Após a ligação dos adaptadores foi realizado uma pré-amplificação por PCR
143 (*Polymerase Chain Reaction*) usando *primer Rsa21* (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3)
144 e, em seguida, a purificação do produto da PCR usado *Quiaquick PCR purification Kit - Qiagen*,
145 conforme a recomendação do fabricante.

146 A pré-amplificação de PCR foi realizada para volume final de 50 µL, contendo 5 µL do
147 DNA ligado, tampão 1x, 25 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTP, 10 µM do *Rsa 21* e 1 U Taq DNA
148 polimerase (Invitrogen). A programação em termociclador para amplificação seguiu as
149 condições: desnaturação inicial a 95°C por 4 min, seguida por 20 ciclos de desnaturação (94°C
150 por 30s), anelamento (60°C por 1 min) e extensão (72°C por 1 min); e, por fim, uma extensão

151 final a 72°C por 8 min. As etapas de PCR e purificação têm o objetivo de amplificar e preparar
152 os fragmentos de DNA de interesse para posterior seleção dos fragmentos com SSR, removendo
153 resíduos das reações, tais como as enzimas (Taq, DNA ligase), adaptadores, *primers* e sais da
154 solução que possam interferir na seleção de fragmentos contendo SSR.

155 O enriquecimento da biblioteca foi realizado através da seleção dos fragmentos
156 contendo SSR por meio de hibridização usando sondas dinucleotídeos biotinizadas de motivos
157 de repetições biotina – IIII (CT)8 e biotina – IIII (GT)8 com o produto digerido e purificado.
158 Os fragmentos contendo SSR foram recuperados por meio da afinidade química biotina-
159 streptavidina usando *beads* magnéticas associadas a *streptavidina* de acordo com as
160 recomendações do kit *Streptavidine-Magnisphere* da Promega.

161 Os fragmentos de DNA contendo microssatélites selecionados foram então amplificados
162 por PCR usando o iniciador *Rsa21* novamente. O *mix* da reação foi construído para um volume
163 final de 100 µL, contendo 20 µL dos fragmentos de DNA selecionados e as concentrações dos
164 demais componentes foram as mesmas da PCR supracitada. As condições de programação em
165 termociclador foram as seguintes: 95°C por 1 min, seguido de 25 ciclos (94°C por 40s, 60°C
166 por 1 min, 72°C por 2 min) e, por fim, 72°C por 5 min. Em seguida os amplicons foram clonados
167 usando o vetor *pGEM-T Easy* (Promega) e transformados em células competentes de
168 *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen) por eletroporação conforme as recomendações do
169 fabricante. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido, contendo ampicilina
170 (100 µg.mL⁻¹), tetraciclina (100 µg.mL⁻¹), IPTG 20% e X-Gal 2%. As placas foram incubadas
171 overnight por 18 horas a 37°C, em estufa para o crescimento de colônias e então armazenadas
172 na geladeira por 2 horas.

173 A biblioteca genômica enriquecida em SSR foi formada a partir dos clones positivos
174 (colônias brancas) selecionados. Essa seleção foi realizada com base na marcação do gene β-
175 galactosidase do vetor *pGEM-T*. Os clones positivos foram transferidos para uma placa Elisa
176 de fundo U com auxílio de palitos esterilizados, contendo 200 µL de meio 2YT-HMFM com

177 ampicilina (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e tetraciclina (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em cada poço. Em seguida, foram
178 incubados a 37 °C por 20 h em estufa sob agitação e, posteriormente, foram congelados
179 inicialmente em freezer a -20 °C por 30 min e, por fim, mantidos em freezer a -80 °C.

180

181 **2.4. Sequenciamento dos fragmentos de DNA**

182

183 As etapas de extração plasmidial e sequenciamento dos insertos foram terceirizadas e,
184 com isso, realizadas pelo Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – CBMEG, na
185 UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas.

186 As etapas contratadas foram as seguintes: *i)* A amplificação via PCR dos 96 clones
187 selecionados na construção da biblioteca genômica para confirmar a presença de insertos e, com
188 isso selecionar 48 clones de tamanhos diferentes acima de 500 pares de bases (pb); *ii)*
189 Inoculação e extração do DNA plasmidial (MINIPREP). Esta etapa compreende no isolamento
190 do DNA plasmidial das colônias recombinantes para posterior sequenciamento; *iii)* Por fim, as
191 reações de sequenciamento. Nesta etapa, a reação de sequenciamento foi realizada para 48
192 clones usando os *primers* universais T7 e SP6 tanto para o sentido de ida (*forward*) e volta
193 (*reverse*), respectivamente, utilizando o conjunto de reagentes “*Big Dye Terminator v.3.1*”
194 (*Applied Biosystems*) com base nas instruções do fabricante. Em seguida, as sequências de DNA
195 produzidas foram obtidas utilizando a plataforma ABI 3500 (*Applied Biosystems*).

196

197 **2.5. Análises das sequências, identificação dos SSR e desenho dos primers**

198

199 Com a obtenção das sequências de *B. gaudichaudii*, o software Chromas v.2.6.5
200 (Goodstadt & Ponting 2001) e o Chromatogram Explorer (Heracle BioSoft 2015) foram usados
201 para remover os adaptadores, realizar o corte de sequência e analisar a qualidade dos
202 eletroforegramas, produzindo um arquivo do tipo “FASTA” para cada clone.

203 Quando possível, a sequência de consenso do clone era gerada usando CAP3 (Huang &
204 Madan 1999). Caso contrário, a análise das sequências era feita separadamente para cada
205 sequência *forward* e *reverse* de cada clone. O programa online VecScreen (disponível na
206 plataforma NCBI) com os parâmetros do BLASTn (Altschul et al. 1997) foi usado para
207 pesquisar segmentos de vetor e contaminação, com os seguintes parâmetros: '*Algorithm*
208 *parameters*' (*expect threshold* = 1e-6; *Word size* = 24), realizando uma comparação das
209 sequências consensus ou não, no banco de dados *GenBank - NCBI Blast*.

210 O software *Simple Sequence Repeat Identification Tool – SSRIT* (Temnykh et al. 2001)
211 foi utilizado na identificação das regiões microssatélites dentro das sequências selecionadas.
212 Por fim, o programa *Primer3 Plus* (Rozen e Skaletsky, 2000) foi empregado na obtenção das
213 sequências dos *primers* com base nos seguintes parâmetros: o comprimento dos pares de
214 *primers*, variando de 18 a 25 pares de bases (pb); variação de temperatura de melting (T_m) entre
215 52 a 65°C, com diferença inferior a 3°C entre os *primers forward* e *reverse*; proporção de GC
216 variando entre 40% a 60%; e tamanho de amplicon variando entre 100 e 700 pb.

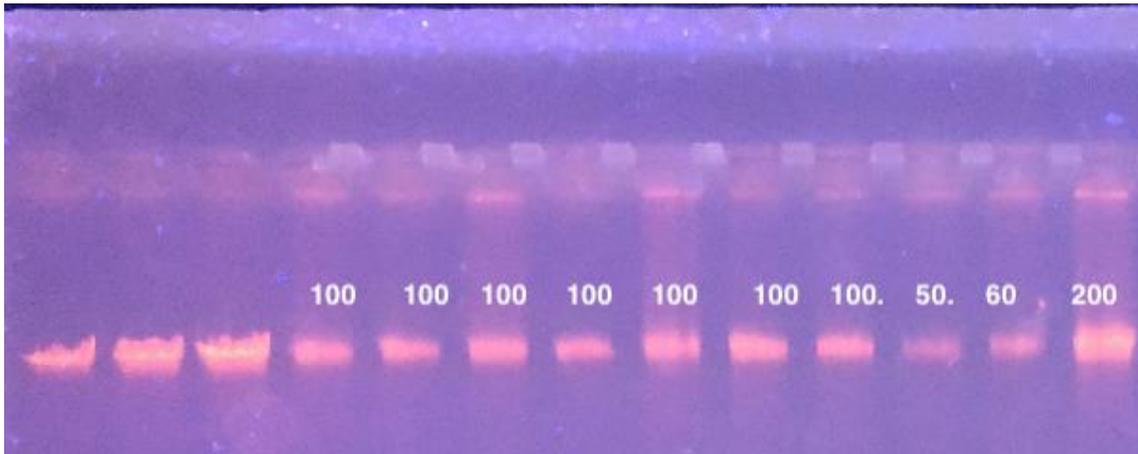
217

218 **3. Resultados e Discussão**

219 **3.1. Extração de DNA**

220

221 O DNA genômico foi extraído com sucesso e em quantidade superior a 50 ng. μL^{-1} para
222 todas as dez repetições (Figura 2). Em comparação entre as bandas geradas com o DNA lambda,
223 constatamos que conseguimos obter DNA genômico que variaram de 50 a 100 ng. μL^{-1} . Essa
224 etapa de quantificação na agarose é importante para verificar a presença de RNA, compostos
225 secundários e degradação do DNA genômico. Notamos bandas bem definidas sem bandas
226 secundárias (RNA) depois da banda principal, nem tão pouco rastro intenso de DNA antes da
227 banda principal (DNA degradado), indicando uma boa qualidade do DNA extraído.



228
 229 **Figura 2.** Gel de agarose e quantificação de DNA genômico de um único acesso de Mama-
 230 Cadela em 12 repetições. Os três primeiros poços são DNA lambda com concentrações
 231 conhecidas de 50, 100 e 200 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, os demais poços são as repetições DNA genômico
 232 extraídos do acesso de Mama-Cadela.
 233

234 Duas amostras de DNA de volume final de 250 μL foram obtidas, tendo que para a
 235 construção da biblioteca genômica é necessário 5 μg de DNA puro, sendo a amostra-A formada
 236 pelas repetições 1, 2, 3, 4 e 5 e amostra-B pelas repetições 6, 7, 8, 9 e 10. Ambas apresentaram
 237 uma elevada quantidade de DNA dentro dos padrões de qualidade exigidos para construção da
 238 biblioteca genômica, com relação de $260/280 \geq 2,0$ e $260/230 \geq 1,8$ (Tabela 2). Estas relações
 239 são indicativas de pureza do DNA, sendo que os ácidos nucleicos absorvem a luz no
 240 comprimento de onda de 260 nm, as proteínas no de 280 nm e contaminantes (carboídratos,
 241 radicais fenólicos etc) no de 230 nm. Desta forma, pode-se mostrar a eficiência do protocolo de
 242 extração de DNA baseado no método de CTAB, usando como material folhas sem sinais de
 243 senescência de Mama-Cadela.

244

245 **Tabela 2.** Descrição da quantificação de DNA genômico de duas repetições de Mama-Cadela
 246 usando nanodrop.

	DNA $\text{ng} / \mu\text{L}$	A260	A280	260/280	260/230	
247						
248	Amostra A	826,4	17,46	8,20	2,01	1,90
249	Amostra B	774,1	16,88	7,89	2,01	1,88

250

251 Um importante passo para realização de estudos genômicos de plantas é a purificação
252 do DNA, processo que deve ser testado e adaptado para cada espécie vegetal de interesse. Essa
253 premissa deve-se a diferentes espécies apresentarem diferentes comportamentos bioquímicos e,
254 com isso, produzir diferentes compostos secundários e radicais livres que podem afetar não
255 apenas a quantidade, mas a qualidade do DNA extraído (Cavallari et al., 2014). Neste contexto,
256 foram desenvolvidos e praticados diferentes protocolos de purificação de DNA (Edwards et al.,
257 1991; Doyle&Doyle, 1990; Dellaporta et al., 1983), os quais ainda passaram por adaptações a
258 depender, principalmente, da espécie e do tipo de tecido utilizado no processo (Lade et al. 2014;
259 Mogni et al. 2016; Romano e Brasileiro, 1999; Tamari et al. 2016). Essas modificações são
260 bastante comuns nos processos de extração de DNA em plantas nativas do cerrado, devido a
261 estas apresentarem elevado nível de polifenóis e mucilagem foliar (Faleiro et al. 2003; Silva,
262 2011).

263 Neste estudo para Mama-Cadela a partir de tecido foliar jovem obtivemos indicadores
264 de quantidade e qualidade superiores daqueles obtidos por Faleiro et al. (2003), para dez
265 diferentes espécies de plantas nativas do Cerrado com características diversas e marcantes em
266 seus tecidos foliares, como presença de pelos, nervuras, presença de mucilagem e produção de
267 látex entre outras. Em síntese, o autor, obteve uma quantidade de DNA que variou de 250 a 590
268 ng/ μ L e qualidade de A260/280 de 1,471 a 1,887 por espécie. Desta forma, podemos constatar
269 que o uso do protocolo CTAB para obtenção de DNA a partir de tecido foliar de Mama-Cadela
270 foi adequado gerando indicadores de quantidade e qualidade satisfatórios.

271

272 **3.2. Construção da biblioteca genômica enriquecida com SSR**

273

274 A construção da biblioteca enriquecida em microssatélites seguiu a partir da amostra A
275 (Tabela 2). Todas as etapas que compõe a construção da biblioteca enriquecida em SSR foram
276 exitosas (Figura 3). O DNA genômico da mama-cadela (Mc) foi completamente digerido pela
277 enzima de restrição *AfaI*, produzindo um rastro contínuo com fragmentos entre 500 e 1200 pb,

278 como indicado pelas setas amarelas, (Figura 3A); os fragmentos ligados aos adaptadores, esses
 279 são importantes para que os fragmentos fiquem com extremidades comuns e conhecidas, foram
 280 produzidos e amplificados por PCR com sucesso (Figura 3B), assim como, as etapas de
 281 purificação, seleção e amplificação dos fragmentos contendo SSR (Figura 3C); obtenção e
 282 amplificação de pelo menos 96 clones com fragmento contendo SSR (Figura 3D); e, por fim, o
 283 produto da extração do DNA plasmidial dos 96 clones (Figura 3E).

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296 **Figura 3.** Géis de agarose correspondentes as etapas da construção da biblioteca genômica
 297 enriquecida em SSR da espécie de *B. gaudichaudii* (Mama-Cadela). A- Gel de digestão do DNA
 298 genômico; B – Gel da pré-amplificação via PCR usando primer Rsa 21 dos fragmentos ligados
 299 aos adaptadores Rsa 21 e Rsa 25;. C – Gel da amplificação de fragmentos selecionados contendo
 300 SSR na faixa de 500 a 1500 pares de bases (setas amarelas); D – Gel de amplificação dos
 301 insertos clonados; E - Gel de eletroforese do produto do isolamento do DNA plasmidial dos
 302 insertos clonados (Miniprep).

303

304

305

3.3. Identificação e desenho dos *primers* de microsatélite

306

307 Os marcadores microsatélites são formados por sequências de poucos pares de bases
308 com 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem, sendo flanqueados por regiões constantemente
309 conservadas entre indivíduos da mesma espécie. Dessa forma, as regiões flanqueadoras são
310 utilizadas na construção dos *primers*, ou seja, iniciadores possibilitando assim a amplificação
311 específica da região contendo o SSR (Bajay, 2014). Desse modo os *primers* são utilizados na
312 amplificação do loco por meio da reação em cadeia da polimerase.

313 Nesse sentido o desenvolvimento de *primers* possibilita tanto à amplificação do loco de
314 interesse e conseqüentemente sua caracterização quanto a utilização desses em uma
315 amplificação heteróloga. Tal amplificação é possível devido as regiões flanqueadoras dos
316 microsatélites serem em geral conservadas entre indivíduos de uma mesma espécie ou gêneros
317 próximos (ARNOLD et al., 2002). Dessa maneira, o desenho dos iniciadores possibilita tanto a
318 caracterização genética da Mama- Cadela quanto disponibiliza informações que podem ser
319 usadas no estudo de espécies correlacionadas.

320 Com isso dos 48 clones sequenciados no sentido de ida e volta a partir da biblioteca
321 genômica obtida, produzimos um total de 96 sequencias, das quais 78 foram descartadas por
322 apresentarem dados de baixa qualidade (cromatogramas). As dezoito sequências restantes
323 pertencentes a clones diferentes foram analisadas e encontramos 10 SSRs. Estas regiões SSR
324 foram classificados como perfeitos (9) e compostos (1). Os SSRs perfeitos apresentam
325 sequência ininterrupta, ou seja, possuem apenas nucleotídeos pertencentes ao motivo de
326 repetição e os compostos são formados com pelo menos dois motivos de repetição distintos
327 (Oliveira et al., 2006). Os motivos de repetição mais comuns foram dinucleotídeos seguidos
328 por trinucleotídeos.

329 Do total de 10 sequências com microsatélites apenas seis foram apropriadas, pois
330 geraram sequências de *primers foward* e *reverse* (Tabela 2). Este número de seis loci SSR
331 desenhados para o genoma de Mama-Cadela representa uma taxa de eficiência de 6,3%,
332 considerando os 96 clones positivos selecionados. Essa relativa porcentagem de sucesso para o

333 desenvolvimento de SSR candidatos também tem sido observada para outras espécies de plantas
 334 nativas do cerrado usando a metodologia de Billiote et al. (1999). Para a espécie *Qualea*
 335 *grandiflora*, nome popular Pau Terra, Buzatti et al. (2014) obtiveram 29 loci SSR a partir de
 336 480 clones positivos; Souza et al. (2012) produziram 21 loci SSR analisando também 480 clones
 337 positivos obtidos para *Dimorphandra mollis*, nome popular Faveiro; por fim, Vidal et al. (2018)
 338 e Rodrigues et al. (2015) analisando 200 e 576 clones positivos desenvolveram 10 e 35 loci SSR
 339 para as espécies *Rauvolfia weddelliana* e *Hancornia speciosa* (Mangaba), respectivamente.

340

341 **Tabela 3:** Descrição dos seis loci microssatélites de *B. gaudichaudii* Trécul, incluindo as
 342 sequências dos *primers* (F- *foward*) e (R - *reverse*), temperatura de melting, conteúdo de GC,
 343 motivos de repetição da região microssatélite, tamanho alélico esperado de cada loco.

Locus	Sequência de primers 5'-3'	Tm (°C)	GC (%)	Motivo	Tamanho esperado (Pb)
MM-A8	F: AGAGTCCCTTCTGTCATCCT R: TGGGTATGTTTGGTAAGAGAGA	57.1 56.2	50.0 40.9	(CT) ₃ ; (CTT) ₃	124
MM-B10	F: GGTGTAAGCTCCCCATTTTC R: AAAAATTCCTGCAGTGTGGG	56.4 56.8	50.0 45.0	(CT) ₅	319
MM-C8	F: CGTCTCTGCCTTCTTCTCTT R: GCACGGAGAATCGAACTCTA	57.0 57.2	50.0 50.0	(TC) ₁₃	116
MM-C8 ₂	F: AGCAAACAGAATTCCTCCTAGA R: GCTGGTTGCTTTTCTGTTGA	56.8 57.1	40.9 45.0	(CT) ₅	231
MM-D11	F: TAAATTCACCTACCCCCACC R: TTGTGGGTTTTCCTCGGTTA	57.1 57.0	50.0 45.0	(CA) ₉	346
MM-G11	F: ACAAGATACTTCGCTTTCCCT R: CGAGGAAGGAAGAGACTTGT	57.0 56.6	42.9 50.0	(TC) ₅	306

344

345 Vale destacar que um número maior de clones com prováveis microssatélites obtidos a
 346 partir de Bibliotecas enriquecidas em SSR para Mama-Cadela serão necessários para se obter

347 um número adequado de loci SSR para análises robustas da diversidade genética e estrutura
348 populacional da espécie.

349

350 **4. Conclusão**

351

352 O presente estudo descreve os seis primeiros loci de microssatélites para a espécie
353 *Brosimum gaudichaudii*. Loci que após serem validados poderão ser usados como marcadores
354 SSR para auxiliar em possíveis estratégias de conservação e manejo dos recursos genéticos da
355 espécie no bioma Cerrado.

356

357 **5. Referências**

358 ABREU, G. M. Adubação fosfatada e microrganismos simbioses na produção de mudas de
359 mangaba e mama-cadela. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Ciência Florestal) –
360 **Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2018.**

361

362 ARNOLD, C.; ROSSETTO, M.; MCNALLY, J.; HENRY, R. J. The application of SSRs
363 characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. **American Journal**
364 **of Botany**, v. 89, n. 1, p. 22-28, 2002.

365

366 ALMEIDA. S; PROENÇA, C; SANO, S; RIBEIRO. J. Cerrado: Espécies Vegetais Úteis.
367 **Brasília: Embrapa-Planaltina, 1998.**

368

369 ALTSCHUL, STEPHEN F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein
370 database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

371

372 ASSIS, TAINÁ OLIVEIRA; ESCADA, MARIA ISABEL SOBRAL; AMARAL, SILVANA.
373 Effects of Deforestation over the Cerrado Landscape: A Study in the Bahia Frontier. **Land**, v.
374 10, n. 4, p. 352, 2021.

375

376 BAJAY, MIKLOS MAXIMILIANO. Diversidade e estrutura genética de *Piptadenia*
377 *gonoacantha* (Mart.) JF Macbr. em áreas em processo de restauração florestal e remanescentes
378 de Mata Atlântica. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo

379

380 BARATELI, LUCIANA OLIVEIRA et al. Desenvolvimento de marcadores microssatélites
381 para *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão-Fabaceae). 2018.

382

- 383 BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite
384 enriched libraries: Applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops.
385 **Fruits**, n.54, p. 277– 288, 1999.
- 386
- 387 BUCHER, J. P. Aspectos de conservação *in vitro* e micropropagação de mama-cadela
388 (*Brosimum gaudichaudii* Tréc., Moraceae). Dissertação (Mestrado em Botânica) -
389 **Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2002.**
- 390
- 391 CAMACHO, LEILA MILENA DIAZ et al. Development, characterization and cross-
392 amplification of microsatellite markers for *Chrysolaena obovata*, an important Asteraceae from
393 Brazilian Cerrado. **Journal of genetics**, v. 96, n. 1, p. 47-53, 2017.
- 394
- 395 CAVALLARI, M. M. et al. A modified acidic approach for DNA extraction from plant species
396 containing high levels of secondary metabolites. **Genetics and molecular research: GMR**,
397 2014.
- 398
- 399 CRISPIM, BRUNO DO AMARAL et al. Development and characterization of microsatellite
400 markers in *Campomanesia adamantium*, a native plant of the Cerrado ecoregions of South
401 America. **Applications in plant sciences**, v. 7, n. 9, p. e11287, 2019.
- 402
- 403 DA MAIA, LUCIANO CARLOS et al. SSR locator: tool for simple sequence repeat discovery
404 integrated with primer design and PCR simulation. **International journal of plant genomics**,
405 v. 2008, 2008
- 406
- 407 DANTAS, LILIANE G. et al. Development of ten microsatellite markers for *Alibertia edulis*
408 (Rubiaceae), a Brazilian savanna tree species. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 4, p. 4593-
409 4597, 2019.
- 410
- 411 DE OLIVEIRA BUZATTI, RENATA SANTIAGO; DE LEMOS-FILHO, JOSÉ PIRES;
412 LOVATO, MARIA BERNADETE. Development of microsatellite markers in *Qualea*
413 *grandiflora* (Vochysiaceae) and transferability to congeneric species, typical trees of the
414 Brazilian savanna. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 75-79, 2014.
- 415
- 416 DE DEUS VIDAL JR, JOAO et al. Development and cross-validation of microsatellite markers
417 for *Rauvolfia weddeliana* Müll. Arg.(Apocynaceae) species complex. **Brazilian Journal of**
418 **Botany**, v. 41, n. 3, p. 681-686, 2018.
- 419
- 420 DELLAPORTA, STEPHEN L.; WOOD, JONATHAN; HICKS, JAMES B. A plant DNA
421 miniprep: version II. **Plant molecular biology reporter**, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.
- 422 Diversity Array Technology PTY LTD. Plant DNA extraction protocol for DArT. Acessado
423 em: 27/05/2021. Disponível em: <<http://www.diversityarrays.com>
- 424
- 425 DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus, Rockville**, v. 12,
426 n. 27, p. 13-15, 1990.
- 427
- 428 EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C1. A simple and rapid method for the
429 preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 6, p.
430 1349, 1991.

- 431
432 FALEIRO, FÁBIO GELAPE et al. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de
433 espécies nativas do cerrado visando a análises moleculares. **Embrapa Cerrados-Comunicado**
434 **Técnico (INFOTECA-E)**, 2003.
435
- 436 FERREIRA, M. E & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em
437 análise genética. **Embrapa: Brasília**. p.220, 1998.
438
- 439 GOODSTADT, L., & PONTING, C.P. CHROMA: consensus-based colouring of multiple
440 alignments for publication. **Bioinformatics**, v. 17, n. 9, p. 845-846, 2001.
441
- 442 HERACLE BIOSOFT. (2015). **Chromatogram Explorer**.
443 <http://www.dnabaser.com/download/chromatogram-explorer/> (Acessado em 08 de março de
444 2020).
445
- 446 HUANG, XIAOQIU; MADAN, ANUP. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome**
447 **research**, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.
448
- 449 LACAPE, J.-M. et al. Microsatellite diversity in tetraploid *Gossypium* germplasm: assembling
450 a highly informative genotyping set of cotton SSRs. **Molecular Breeding**, v. 19, n. 1, p. 45-58,
451 2007.
452
- 453 LADE, BIPIN DEOCHAND; PATIL, ANITA SURENDRA; PAIKRAO, HARIPRASSAD
454 MADHUKARRAO. Efficient genomic DNA extraction protocol from medicinal rich *Passiflora*
455 *foetida* containing high level of polysaccharide and polyphenol. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1-
456 7, 2014.
457
- 458 MACHADO, RICARDO B. Estimativa de perda da área do Cerrado brasileiro. 2016.
459
- 460 MOGNI, VIRGINIA Y. et al. Optimization of DNA extraction and PCR protocols for
461 phylogenetic analysis in *Schinopsis* spp. and related Anacardiaceae. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1,
462 p. 1-7, 2016.
463
- 464 MYERS, NORMAN. Florestas tropicais e suas espécies-sumindo, sumindo. **Biodiversidade**.
465 **Rio de Janeiro: Nova Fronteira**, p. 36-45, 1997.
466
- 467 MORA, FREDDY et al. Genetic diversity and population structure of a drought-tolerant species
468 of *Eucalyptus*, using microsatellite markers. **Journal of Plant Biochemistry and**
469 **Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 274-281, 2017.
470
- 471 NCBI. BLAST. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Acessado em 15 de março de 2020).
472
- 473 NCBI. VecScreen. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen> (Acessado em 10 de março
474 de 2020).
475

- 476 OLIVEIRA, DANIELA ALMEIDA; PIETRAFESA, JOSÉ PAULO; DA SILVA
477 BARBALHO, MARIA GONÇALVES. Manutenção da biodiversidade e o hotspot
478 cerrado. **Caminhos de Geografia**, v. 9, n. 26, 2008.
- 479
480 OLIVEIRA, EDER JORGE et al. Origin, evolution and genome distribution of
481 microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.
- 482
483 POZET, G.L. *Brosimum gaudichaudii* Trec. (Moraceae): da planta ao medicamento. **Rev.**
484 **Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 26, n. 3, p. 159-166, 2005.
- 485
486 RODRIGUES, ANDREIA JULIANA LEITE et al. Development of microsatellite markers for
487 *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). 2015.
- 488
489 ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia**, v. 2, n.
490 9, p. 40-43, 1999.
- 491
492 ROZEN S, SKALETSKY H . Primer3 on the WWW for general users and for biologist
493 programmers. **Methods Mol Biol**. N. 132, p. 365-386, 2000.
- 494
495 SEMAGN, K.; BJORNSTAD, A.; NDJIONDJOP, M.N. An overview of molecular marker
496 methods for plants. **Afr. J. Biotechnol.**, v.5, n.25, p.2540-2568, 2006.
- 497
498 SILVA, MÁRCIA NARA DA. Extraction of genomic DNA from leaf tissues of mature native
499 species of the cerrado. **Revista Árvore**, v. 34, n. 6, p. 973-978, 2010.
- 500
501 SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas
502 medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3,
503 p. 495-503, 2015.
- 504
505 SOUZA, HELENA AV et al. Development of microsatellite markers for *Dimorphandra mollis*
506 (Leguminosae), a widespread tree from the Brazilian cerrado. **American journal of botany**, v.
507 99, n. 3, p. e102-e104, 2012.
- 508
509 TAMARI, FARSHAD; HINKLEY, CRAIG S. Extraction of DNA from plant tissue: Review
510 and protocols. **Sample preparation techniques for soil, plant, and animal samples**, p. 245-
511 263, 2016.
- 512
513 TECHNELYSIUM. CHROMAS v.2.6.5 - DNA sequencing software.
514 <https://technelysium.com.au/wp/chromas/> (Acessado em 6 de março de 2020).
- 515
516 TEMNYKH, SVETLANA et al. Computational and experimental analysis of microsatellites in
517 rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker
518 potential. **Genome research**, v. 11, n. 8, p. 1441-1452, 2001.
- 519
520 UNTERGASSER, ANDREAS et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic acids**
521 **research**, v. 40, n. 15, p. e115-e115, 2012.

