

Márcia Denise Rossarolla

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES  
MICROSSATÉLITES E ANÁLISE DA DIVERSIDADE  
GENÉTICA DE *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P M.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Ciência, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosete Pescador

Coorientador: Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari

Florianópolis  
2016

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

Rossarolla, Márcia Denise  
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES  
MICROSSATÉLITES E ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE Guadua  
chacoensis (Rojas) Londoño & P M. / Márcia Denise  
Rossarolla ; orientadora, Rosete Pescador ; coorientador,  
Rubens Onofre Nodari. - Florianópolis, SC, 2016.  
87 p.

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

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Diversidade  
Genética. 3. Sequenciamento de nova geração. 4. Desenho de  
marcadores microssatélites. 5. Bambu. I. Pescador, Rosete.  
II. Nodari, Rubens Onofre. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos  
Genéticos Vegetais. IV. Título.

**Desenvolvimento de marcadores moleculares  
microssatélites e análise da diversidade genética  
de *Guadua Chacoensis* (Rojas) Londoño & P M.**

por

**Márcia Denise Rossarolla**

Dissertação julgada e aprovada em 29/02/2016, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.


Banca Examinadora:




Prof. Dr. Rosete Pescador (Presidente-CCA/UFSC)



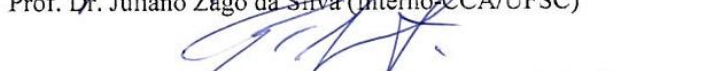
Prof. Dr. Leocir José Welter (Externo-CBS/UFSC)



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



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



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

Florianópolis, fevereiro de 2016



Aos meus pais Lenir e Osmar  
Rossarolla, meus irmãos Marcio e  
Miram e a toda minha família.

*Dedico*



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao PPG em Recursos Genéticos Vegetais docentes, discentes e colaboradores.

À Professora Rosete Pescador pela orientação e oportunidades proporcionadas.

Ao Professor Rubens Onofre Nodari, pela orientação durante todas as etapas deste trabalho e ensinamentos proporcionados.

Ao Professor Miguel Pedro Guerra pela orientação, ensinamentos e oportunidades proporcionadas.

Ao Professor Leocir Welter por me apresentar o PPG em Recursos Genéticos Vegetais e pelas oportunidades proporcionadas.

À secretária do PPG em Recursos Genéticos Vegetais Bernadete Ribas, ao Newton, e ao técnico do laboratório LFDGV André Knopp sempre dispostos a ajudar.

A toda minha família principalmente meus pais, irmãos, sobrinhos, pelo amor, confiança e apoio em todos os momentos;

Ao Tiago C. Tomazetti, namorado, amigo, colega de aula e de trabalho, pela contribuição no trabalho, pelo companheirismo de todos os momentos, principalmente nos intermináveis finais de semana no laboratório, pelo carinho e incentivo.

A toda equipe do ICMBio do Parque Nacional do Iguaçu, pela prestatividade, atendimento e auxílio nas coletas .

Ao Marcelo Venturi, Thiago Greco, Marcos Marques (Sitio Vagalume), Hans Kleine, Tiago T., Gustavo K., pelo auxílio nas coletas e identificação da espécie.

Ao Sitio Çarakura/Florianópolis/SC e Sitio Vagalume/Rancho/SC Queimado pela oportunidade de realizar as coletas de *Guadua Chacoensis*.

A todos integrantes e ex-integrantes do LFDGV que estiveram presentes durante o tempo de realização de meu mestrado, principalmente: Andréia, Alisson, Bianca (LAPAD), Caroline C., Caroline Z., Charlotte, Catarina, Djalma, Daniela C., Daniela W., Daniel H., Daniel R., Diogo, Dorival, Edson, Edyane, Fabiane, Fernando, Francis, Gustavo, Gregório, Jenny, Julia, Juliano Z., Heinrich, Hugo, Joseph, Ihangika, Joana, Josiane (LAPAD), Jaiane (LAPAD), Jamily, Juan, Karina, Leila, Lido, Liliana, Lilian, Luane, Luciano, Lara, Leo M., Miguel B., Maria Eduarda, Morgana, Montagna, Maiby, Marcia, Newton, Nadine, Patrick, Ramon, Rafael, Rubens, Rafaela, Rômulo (LAPAD), Sara, Sabrina, Thiago O., Vini, Vanessa S., Vanessa P., Vivian, Willian, Yohan.

Ao Professor Aparecido e ao NEUVIN pelos convites das jantas e degustações.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo e ao CNPq pelo apoio financeiro para desenvolvimento das atividades de pesquisa.

A Deus, e pelas forças do bem que me guiam.

Agradeço a todos que, de alguma forma, auxiliaram-me na execução deste trabalho.

Muito Obrigada!



## RESUMO

O bambu (Poaceae: Bambusoideae), tem sido utilizado pela humanidade desde tempos remotos até os dias atuais. Historicamente, tem sido cultivado e explorado intensamente em vários países asiáticos, no entanto, vários povos utilizaram as diferentes espécies de bambu como material de construção, utensílios e alimentação, entre outros. No Brasil, existem muitas espécies nativas pertencentes à subfamília Bambusoideae. Entre estas, destaca-se o *Guadua chacoensis*, pelas suas características morfológicas e de rusticidade no ambiente em que ocorre. Contudo, na literatura há um limitante número de estudos científicos sobre esta e demais espécies de bambu. Os principais dados gerados são em espécies asiáticas, onde o uso dos bambus é mais intenso. No Brasil, ainda há pouco conhecimento a respeito da diversidade genética existente e das características populacionais dos bambuzais. Devido a este panorama, o objetivo deste estudo foi desenvolver marcadores microssatélites para a espécie *G. chacoensis* e utilizar os microssatélites desenvolvidos em populações nativas desta espécie. Amostras de folhas de plantas identificadas morfológicamente como *G. chacoensis* foram coletadas e realizada a extração de DNA total, utilizando o KIT Nucleo Spin Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). O DNA isolado de tecidos foliares foi sequenciado na plataforma Illumina MiSeq (San Diego, Estados Unidos das Américas). As sequências obtidas foram analisadas com o software CLC Genomics Workbench<sup>®</sup> 8.0v. Para a identificação de locos microssatélites e desenho de iniciadores dos marcadores (*forward* | *reverse*) foram utilizados o software SSRLocator. Os marcadores selecionados foram validados para uso por meio da genotipagem de 168 indivíduos oriundos de oito populações distintas, sendo, seis destas, populações nativas da Mata Atlântica, coletadas no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR e duas populações cultivadas, uma em Florianópolis e outra em Rancho Queimado, SC, BR. Os marcadores com maior potencial de polimorfismo foram selecionados, sintetizados com fluorescência e utilizados para avaliar a diversidade genética nas populações nativas coletadas, totalizando 575 indivíduos coletados. Dentre os marcadores microssatélites obtidos, foram selecionados 35 pares (*forward* | *reverse*) para serem submetidos a testes de amplificação e otimização do protocolo de PCR. Destes, foram identificados 13 marcadores com maior potencial de uso. A validação dos marcadores para uso futuro foi realizada com indivíduos em seis populações distintas. Os 13 marcadores com maior potencial de polimorfismo foram selecionados e confeccionados com fluorescência

para serem genotipados na plataforma ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos das Américas). Dos 13 marcadores, sete (54%) detectaram polimorfismo, enquanto um não apresentou resultados satisfatórios de amplificação e foi descartado das análises seguintes. Os sete locos polimórficos encontrados são passíveis de serem empregados em estudos genéticos da espécie *G. chacoensis*. Com base na genotipagem das populações, foram verificados 25% de locos polimórficos, sendo *Gcha 02* o loco com maior número de alelos (5). Alelos privados foram identificados no loco *Gcha 02* para a população PF, no loco *Gcha 05* para a população AF e dois alelos do loco *Gcha 21* na população EF. A maior distância genética foi observada entre as populações IF e as demais, EF, AF e CF (0,150). As populações IF e PF apresentaram diferença genética menor entre si e maior distância genética quando comparadas as demais. A análise da estrutura populacional demonstra que a maior diversidade genética está entre os indivíduos, ao passo que as populações apresentaram elevada identidade genética. As populações de *G. chacoensis* presentes no Parque Nacional do Iguaçu apresentam reduzido polimorfismo nos locos microssatélites empregados neste estudo. Provavelmente devido à reduzida distância geográfica em que se encontram, bem como pela propagação vegetativa.

**Palavras-chave:** Bambu. SSR. Polimorfismo molecular. Conservação.

## ABSTRACT

Since ancient times, bamboo (Poaceae: Bambusoideae) has been used by mankind. Historically, several Asian countries have intensively cultivated and exploited bamboo species, mainly as building material, utensils, food, among others. Brazil holds many indigenous species belonging to the subfamily Bambusoideae. Among them, *Guadua chacoensis* stands out by their morphological characteristics and hardiness. However, a limited number of scientific studies on bamboo species can be found in the literature. In general, these studies focus on Asian species, which have most intense use. In Brazil, little is known about the genetic diversity and population characteristics of bamboo groves. Thus, the objective of this study was to develop microsatellite markers for *G. chacoensis* and use these developed microsatellites in naturally occurring populations. Leaf samples of individuals morphologically identified as *G. chacoensis* were collected for DNA extraction using the Nucleo Spin Plant II Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). A single individual were arbitrarily chosen for sequencing in Illumina MiSeq platform (San Diego, United States of America). The obtained sequences were analyzed with CLC Genomics Workbench® 8.0v software. Microsatellite identification and primer design (forward | reverse) were made on SSRLocator software. The selected markers were validated for use by genotyping 168 individuals from eight different populations: six naturally occurring populations of the Atlantic Florest, in the Iguaçu National Park, Foz do Iguaçu, PR; and two grown populations, one in Florianópolis and another in Rancho Queimado, SC, BR. Among the obtained microsatellite markers, 35 pairs were selected (forward | reverse) to undergo amplification testing and PCR optimization. The 13 markers with higher polymorphism potential were selected and fluorescence-dyed for genotyping in 3500xL ABI Genetic Analyzer platform (Applied Biosystems, Foster City, United States of America). The validation of these markers was performed with individuals of six different populations, totaling 575 individuals collected. Seven markers (54%) were polymorphic, five were monomorphic, and one was discarded for not showing satisfactory results of amplification. The seven polymorphic loci found are likely to be used in genetic studies *G. chacoensis* species. Based on the population genotyping, 25% of loci were polymorphic, with Gcha 02 presenting the highest number of alleles (5). Private alleles were identified in loci Gcha 02 (PF population), Gcha 05 (AF population), and Gcha 21 (EF population). The largest genetic distance (0.150) was

observed between IF population and the others (EF, AF, and CF). The IF and PF populations had lower genetic difference between them and greater genetic distance when compared with others. The population structure analysis shows that greater genetic diversity is among individuals, while populations showed high genetic identity. Populations of *G. chacoensis* in the Iguaçu National Park have reduced polymorphism in microsatellite loci used in this study, probably due to the limited geographical distance between them and the vegetative propagation characteristic of the species.

**Key words:** Bamboo. SSR. Primers. Molecular polymorphism. conservation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1.** Bambu *Guadua chacoensis*, em população nativa da espécie, com destaque para; A) Ramificação lateral e presença de espinho; B) Entrenós da base do colmo; C) Entrenós do colmo principal; D) Planta com presença de folhas do colmo (Esquerda) e com ausência das mesmas (Direita)..... 27
- Figura 4.1.** Frequência de locos microssatélites nas sequências obtidas para a espécie *Guadua chacoensis* distribuídas de acordo com o número de nucleotídeos nas repetições ..... 41
- Figura 4.2.** Produtos de PCR realizado em gradiente térmico, para os locos microssatélites testados em amostras de DNA extraídas a partir de *Guadua chacoensis*, revelados após eletroforese em gel de agarose..... 47
- Figura 4.3.** Imagem da genotipagem dos amplicons do multiplex “A”, revelado na plataforma ABI 3500 XL para a espécie *Guadua chacoensis*, A) amplicons para os locos *Gcha 04*, *Gcha 09*, *Gcha 03* e *Gcha 18* amplificados em conjunto, comparados com o marcador de peso molecular GeneScan 600 LIZ<sup>®</sup> (laranja); B) destaque para o loco *Gcha 04* em reação de amplificação dentro do multiplex A; C) destaque para o loco *Gcha 09* em reação de amplificação dentro do multiplex A; D) destaque para o loco *Gcha 03* em reação de amplificação dentro do multiplex A; E) destaque para o loco *Gcha 18* em reação de amplificação dentro do multiplex A..... 50
- Figura 4.4.** Imagem da genotipagem dos amplicons do multiplex “B”, revelado na plataforma ABI 3500 XL para a espécie *Guadua chacoensis*, A) amplicons para os locos *Gcha 08*, *Gcha 10*, *Gcha 21* e *Gcha 33*, amplificados em conjunto, comparados com o marcador de peso molecular GeneScan 600 LIZ<sup>®</sup> (laranja); B) destaque para o loco *Gcha 08* em reação de amplificação dentro do multiplex B; C) destaque para o loco *Gcha 10* em reação de amplificação dentro do multiplex B; D) destaque para o loco *Gcha 21* em reação de amplificação dentro do multiplex B; E) destaque para o loco *Gcha 33* em reação de amplificação dentro do multiplex B ..... 51
- Figura 4.5.** Imagem da genotipagem dos amplicons do multiplex “C”, revelado na plataforma ABI 3500 XL para a espécie *Guadua chacoensis*, A) amplicons para os locos *Gcha 02*, *Gcha 05* e *Gcha 06*, amplificados em conjunto, comparados com o marcador de peso molecular GeneScan 600 LIZ<sup>®</sup> (laranja); B) destaque para o loco *Gcha 02* em reação de amplificação dentro do multiplex C; C) destaque para o loco *Gcha 05* em reação de amplificação dentro do multiplex C; D)

destaque para o loco <i>Gcha 06</i> em reação de amplificação dentro do multiplex C .....	51
<b>Figura 4.6.</b> Imagem da genotipagem dos amplicons do multiplex “D”, revelado na plataforma ABI 3500 xL para a espécie <i>Guadua chacoensis</i> , A) amplicons para os locos <i>Gcha 01</i> e <i>Gcha 07</i> , amplificados em conjunto, comparados com o marcador de peso molecular GeneScan 600 LIZ® (laranja); B) destaque para o loco <i>Gcha 01</i> em reação de amplificação dentro do bplex D; C) destaque para o loco <i>Gcha 07</i> em reação de amplificação dentro do bplex D.....	52
<b>Figura 5.1</b> Distribuição das populações da espécie <i>Guadua chacoensis</i> coletadas para estudos de genética populacional, no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR, Brasil .....	65
<b>Figura 5.2</b> Dendrograma de distância baseado no $F_{st}$ par a par, utilizando a distância euclidiana, a partir de três locos microssatélites, avaliados em seis populações de <i>Guadua chacoensis</i> do Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR .....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1.</b> Distribuição dos locos microssatélites identificados por seqüências obtidas para a espécie <i>Guadua chacoensis</i> distribuídas de acordo com o motivo e o número de repetição.....	41
<b>Tabela 4.2.</b> Iniciadores ( <i>forward</i>   <i>reverse</i> ) para locos microssatélites encontrados no genoma de <i>Guadua chacoensis</i> .....	43
<b>Tabela 4.3.</b> Marcadores para loco microssatélites em genoma de <i>Guadua chacoensis</i> selecionados para testes de amplificação dos fragmentos por PCR.....	48
<b>Tabela 4.4.</b> Motivo do microssatélites, temperatura de anelamento ( $T_a$ °C), tamanho esperado e fluorescência para cada um dos locos agrupados em conjuntos de multiplex, utilizados na caracterização de marcadores para locos microssatélites em genoma de <i>Guadua chacoensis</i> .....	49
<b>Tabela 4.5.</b> Frequência alélica e conteúdo polimórfico (PIC) de 12 marcadores microssatélites caracterizados no genoma de <i>Guadua chacoensis</i> , obtida a partir de 144 indivíduos de populações nativas e 24 indivíduos de populações cultivadas, $n = 168$ .....	50
<b>Tabela 5.1</b> Distância geográfica entre populações da espécie <i>Guadua chacoensis</i> coletadas para análise de genética populacional, em fragmento nativo de Mata Atlântica, no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.....	64
<b>Tabela 5.2</b> Concentrações de reagentes para a reação de PCR utilizando marcadores microssatélites para a espécie <i>Guadua chacoensis</i> .....	66
<b>Tabela 5.3</b> Temperatura de anelamento ( $T_a$ °C), tamanho esperado e fluorescência para cada um dos locos agrupados em conjuntos de multiplex utilizados na caracterização de marcadores para loci microssatélites em genoma de <i>Guadua chacoensis</i> .....	67
<b>Tabela 5.4</b> Número de alelos encontrados em locos microssatélites polimórficos para seis populações naturais de <i>Guadua chacoensis</i> no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR .....	70
<b>Tabela 5.5</b> Alelos privados encontrados em estudo de diversidade genética de populações naturais da espécie <i>Guadua chacoensis</i> no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR .....	70
<b>Tabela 5.6</b> Distância (abaixo da diagonal) e identidade genética de Nei (acima da diagonal), entre populações naturais da espécie <i>Guadua chacoensis</i> no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR .....	71
<b>Tabela 5.7</b> Frequência de alelos para locos microssatélites polimórficos entre as populações naturais de <i>Guadua chacoensis</i> amostradas no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR .....	72

<b>Tabela 5.8</b> Índices de diversidade genética de populações naturais de <i>Guadua chacoensis</i> no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR .....	72
<b>Tabela 5.9</b> Estrutura populacional estimada pelas estatísticas F acessada por marcadores microssatélites em indivíduos de seis populações naturais de <i>Guadua chacoensis</i> dentro do Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR .....	72



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $\lambda$  DNA – Lambda DNA, marcador de peso e tamanho molecular
- $\mu\text{L}$  – Microlitro
- $\mu\text{M}$  – Micromolar
- AF – população coletada próxima a administração do Parque Nacional do Iguaçu
- BF – população coletada próximo a trilha das bananeiras, no Parque Nacional do Iguaçu
- CF – população coletada próximo as cataratas no Parque Nacional do Iguaçu
- DNA – Ácido desoxiribonucléico
- dNTPs – Deoxinucleotídeos trifosfatados
- EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
- EF – população coletada próxima a entrada do Parque Nacional do Iguaçu.
- F – Iniciador direto, “forward”
- g – Força centrífuga relativa
- IF – população coletada na Ilha das taquaras, no Parque Nacional do Iguaçu
- kb – kpb – Kilo Bases
- mg – Miligrama
- $\text{MgCl}_2$  – Cloreto de Magnésio
- mM – Milimolar
- $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  – Nanograma por microlitro
- ng – Nanograma
- pb – Pares de base
- PCR – Polymerase Chain Reaction / Reação em Cadeia da Polimerase
- PF – população coletada próximo a trilha de Poço Preto, no Parque Nacional do Iguaçu

pH – Potencial hidrogeniônico

R – Iniciador reverso, “reverse”

RNAse – Nuclease que catalisa a degradação do ácido ribonucléico

rpm – Rotações por minutos

SSR – Marcadores microssatélites - Sequências simples repetidas

TBE – Tampão Tris-HCl-Ácido Bórico-EDTA

U – Unidade enzimática

U  $\mu\text{L}^{-1}$  – Unidades enzimáticas por microlitro

W – Watts

10X – Concentração de soluções estoque de tampões

1X – Concentração de soluções trabalho de tampões

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2. HIPÓTESES E OBJETIVOS</b> .....	23
2.1. Hipóteses Testadas .....	23
2.2. Objetivos .....	23
2.2.1. Objetivo geral .....	23
2.2.2. Objetivos específicos.....	23
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	25
3.1. Bambu .....	25
3.2. Diversidade e estrutura genética de populações .....	27
3.3. Marcadores moleculares microssatélites (SSRs) .....	28
<b>4. CAPITULO I IDENTIFICAÇÃO, DESENHO E OTIMIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA <i>Guadua chacoensis</i></b> .....	31
4.1. Resumo .....	31
4.2. Abstract.....	33
4.3. Introdução.....	35
4.4. Material e Métodos.....	36
4.5. Resultados .....	40
4.6. Discussão .....	52
4.7. Conclusão .....	54
4.8. Referências .....	54
<b>5. CAPITULO II DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Guadua chacoensis</i> (Rojas) Londoño &amp; P M</b> .....	61
5.1. Resumo .....	61
5.2. Abstract.....	62
5.3. Introdução.....	63
5.4. Material e Métodos.....	64
5.5. Resultados .....	70
5.6. Discussão .....	73
5.7. Conclusão .....	74
5.8. Referências .....	75
<b>6. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	79
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	81



## 1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho de dissertação foi realizado no âmbito do projeto “Tecnologias para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do bambu no sul do Brasil”, aprovado e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Deste projeto constam também outros nove subprojetos, desenvolvidos em parceria entre a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Universidade Comunitária da Região de Chapecó (Unochapecó), Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul), Universidade de Costa Rica (UCR), e Associação Catarinense do Bambu (BambuSC).

Este conjunto de projetos visa elucidar as principais questões pertinentes ao cultivo de bambu e desenvolvimento da cadeia produtiva deste grupo de plantas no sul do Brasil e, de forma ampla, no cenário nacional. No país há utilização histórica e cultivo do bambu, principalmente por povos nativos, que o utilizavam para diversas finalidades, resultando em populações nativas de bambu distribuídas na paisagem (Noia, 2012).

Sobretudo, a utilização econômica atual do bambu tem sido a produção de celulose, não obstante, outros usos podem ser empregados. Como na construção urbana ou rural, em telhados, estruturas, pisos, revestimentos, paredes, sistemas de irrigação, artesanato, móveis, utensílios domésticos, carvão, álcool, bebidas, alimentação, fertilizantes, produtos farmacêuticos, plantas ornamentais e laminados (Oliveira, 2006). Acima das utilidades domésticas, os bambuzais nativos apresentam benefícios ecológicos, pois proporcionam a infiltração da água no solo, auxiliam no controle da erosão, reduzem o assoreamento de corpos d’água e capturam o gás carbono da atmosfera, que é incorporado em sua biomassa (Delgado, 2011).

Mesmo com diversas utilidades, existe carência de estudos científicos visando à conservação e a utilização das espécies de bambu, principalmente as nativas da América, pois a maior parte dos estudos divulgados com estas plantas é realizada no continente asiático, devido ao seu uso intensivo nos países desta região. Conhecer a forma como os recursos genéticos entre as populações estão distribuídos e a diversidade genética, é de importância primária para a conservação do potencial evolutivo e da diversidade genética das espécies (Hamrick; Godt, 1989).

Atualmente, pouco se conhece a respeito dos recursos genéticos das espécies nativas da América do Sul, havendo carência de

ferramentas para identificação e diferenciação molecular destas espécies, bem como entender as dinâmicas de fluxo gênico existente nestas populações e como se encontra a estrutura e diversidade genética das mesmas.

Assim, como a riqueza de espécies, é também importante conhecer a diversidade e os recursos genéticos disponíveis, possibilitando traçar planos de conservação e melhoramento (Kageyama et al., 2003; Vieira et al., 2009). Para conhecimento da dinâmica de populações vegetais, tem-se utilizado estudos baseados na genética de populacional, através da genotipagem dos indivíduos que a compõe. Nestes estudos, preferencialmente é empregado o uso de marcadores moleculares baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction). Como é o caso dos microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), devido a estes possuírem caráter co-dominante.

Marcadores microssatélites são compostos por pares de iniciadores específicos (*primers*) complementares às sequências únicas que flanqueiam uma região repetitiva do genoma, normalmente não codificante para proteína e praticamente isenta de seleção. Os microssatélites destacam-se ainda por apresentarem elevado conteúdo de informação por loco gênico, discriminação entre heterozigotos e homozigotos (codominante), natureza multialélica e requerem pequena quantidade de DNA para sua amplificação (Weber; Wong, 1993; Priori et al., 2013), necessitando da técnica de eletroforese para detecção do tamanho dos fragmentos amplificados.

Tais características permitem inferências mais robustas quanto à diversidade e estrutura genética de populações, comparativamente a marcadores dominantes como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Powell et al., 1996). Além disso, após a obtenção de microssatélites polimórficos, os custos da utilização desses marcadores reduzem-se drasticamente (Buso et al., 2003).

## **2. HIPÓTESES E OBJETIVOS**

### **2.1. Hipóteses Testadas**

- a) O genoma de *Guadua chacoensis* possui regiões microssatélites polimórficas possíveis de serem empregadas para estudos de genética populacional.
- b) O uso de marcadores para as regiões microssatélites pode ser utilizado para a espécie *Guadua chacoensis* em genética de populações.
- c) As populações de *Guadua chacoensis* presentes no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR, estão estruturadas geneticamente, apresentando diferenças alélicas e genotípicas entre si.

### **2.2. Objetivos**

#### **2.2.1. Objetivo geral**

Identificar, desenhar e validar marcadores microssatélites nucleares para analisar a diversidade e estrutura genética de populações nativas de *Guadua chacoensis*.

#### **2.2.2. Objetivos específicos**

a) Identificar locos microssatélites no genoma nuclear de *Guadua chacoensis*.

b) Desenhar, testar e caracterizar marcadores microssatélites identificados.

c) Caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações nativas de *Guadua chacoensis*.





### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Bambu

A origem do bambu ocorreu muito provavelmente no Mioceno, junto a outras gramíneas, antes mesmo do surgimento do homem. Seu provável centro de origem é a Ásia; entretanto está espalhado por todo o planeta (Wang et al., 2014). Devido aos bambus terem sido muito útil para o crescimento e desenvolvimento da população humana, desde o início da história da humanidade, principalmente quando o homem chegou a Ásia. Estas plantas serviram de matéria-prima para a confecção de elementos mecânicos ou estruturais necessários à vida. Sendo obtida nos próprios locais de confecção (Ghavami; Marinho, 2005).

Botanicamente, os bambus pertencem à subfamília Bambusoideae, família Poaceae, que possui elevada importância ecológica e econômica. A distribuição das diferentes espécies de bambu ocorre mundialmente entre os paralelos 47°S e 46°N, em altitudes que vão desde o nível do mar a até 4.300 m (Nirmala et al., 2014). Devido à vasta distribuição geográfica e ampla utilização, poucas espécies vegetais foram ao longo da história tão intensamente utilizadas e difundidas como os bambus (Beraldo; Rivero, 2003).

Na atualidade, o número de espécies de bambu distribuídas pelo mundo, não é totalmente conhecida. Pouco se sabe sobre a dimensão da diversidade genética destas espécies. Por volta da década de 1970 foi estimado que os bambus estivessem divididos em 60 gêneros, com aproximadamente 600 a 700 espécies (Grosser; Liese, 1971). Contudo, estudos recentes baseados em biologia molecular apontam que existem ao menos 1.439 espécies, alocadas em 116 gêneros (Nirmala et al., 2014), embora outros autores tenham apontado anteriormente para uma estimativa de aproximadamente 1.575 espécies (Singh et al., 2012). Por outro lado, há consenso de que a Ásia detém o maior número de espécies de bambu (Sungkaew et al., 2009).

Nas Américas estão presentes 473 espécies distribuídas em 41 gêneros. Somente no Brasil, há relatos da presença de 34 gêneros nativos, dos quais, 16 são herbáceos, com aproximadamente 75 espécies e 18 são lenhosos, com aproximadamente 155 espécies (Noia, 2012; Marinho et al., 2014). Esta riqueza de espécies representa aproximadamente 14% do número total de espécies de bambu estimado por Singh et al. (2012). Contudo, devido à aplicabilidade intensiva de ferramentas moleculares, novos agrupamentos filogenéticos estão

constantemente sendo criados para melhor classificação dos gêneros e espécies pertencentes aos bambus (Goh et al., 2013).

Em países ocidentais, especialmente no Brasil, pouco do potencial das espécies de bambu disponíveis é utilizado, isto se torna evidente quando comparado a países como a China, maior produtor e consumidor de produtos oriundos de bambus (Moizés, 2007). As espécies de bambu são historicamente subutilizadas no Brasil, principalmente devido à falta de estratégias de uso e manutenção da diversidade e potencial genético disponível (Pereira Neto et al., 2009), não havendo programas de conservação ou melhoramento do material genético para utilização.

Dentre os gêneros de bambu com potencial comercial, está o gênero *Guadua*, nativo da América do Sul, mais especificamente do bioma Amazônia, está distribuído por toda a América do Sul, sendo relatada a presença na Argentina (Agrasar; Rodríguez, 2003; Guerreiro, 2014), região sul do Brasil pertencente ao bioma Mata Atlântica (Greco, 2013) e ao bioma Pampa (Guadagnin, 2015), demonstrando que o gênero apresenta ampla base genética adaptando-se a diversos ambientes.

Dentre as espécies pertencentes ao gênero *Guadua*, encontradas no sul do Brasil, está *G. chacoensis* (Figura 3.1). O uso desta espécie é descrita na literatura principalmente para artesanato (Greco, 2013), devido as suas características botânicas propícias. Contudo, estudos recentes demonstram a potencialidade de seu uso para descontaminação hídrica (Mendonça, 2010), entre outros usos. Entretanto, uma fração muito pequena do material genético disponível desta espécie já foi estudada e pouco se conhece do real potencial de sua utilidade.



**Figura 3.1.** Bambu *Guadua chacoensis*, em população nativa da espécie, com destaque para; A) Ramificação lateral e presença de espinho; B) Entrenós da base do colmo; C) Entrenós do colmo principal; D) Planta com presença de folhas do colmo (Esquerda) e com ausência das mesmas (Direita).

### 3.2. Diversidade e estrutura genética de populações

Estudos visando conhecer a estrutura e a diversidade genética em populações nativas vem sendo desenvolvidos para conhecer o comportamento genético de algumas espécies, principalmente em biomas deteriorados. Como é o caso da Mata Atlântica, onde atualmente, resta 1% de sua área original (Ribeiro et al., 2009).

Ainda, neste ambiente há fragmentação do contínuo florestal, este cenário possui influência sobre a estrutura genética da população de algumas espécies. Como evidenciado em estudos com *Dermanura watsoni* (Ripperger et al., 2013), *Cistus salvifolius*, *Myrtus communis*, *Pistacia lentiscus*, *Quercus coccifera* (Aparicio et al., 2012) e *Vochysia ferruginea* (Davies et al., 2015).

No atual cenário, torna-se necessário conhecer a diversidade presente em algumas espécies, assim como a estrutura genética de suas populações presentes em ambientes como a Mata Atlântica. Para estudos com maior precisão dos estimadores de genética populacional, tem sido utilizado marcadores moleculares. Ferramenta capaz de acessar a base genética dos indivíduos amostrados, estando tais marcadores livres de influências ambientais ou fenológicas (Belaj et al., 2012; Manel; Holderegger, 2013; Xu et al., 2012).

Dentre os marcadores moleculares, para tomar inferências dos estimadores genéticos populacionais, os marcadores para locos microssatélites tem sido largamente empregados, devido a sua natureza co-dominante, permitindo separar homozigotos de heterozigotos e elevado potencial informativo (Emanuelli et al., 2013; Poczai et al., 2013).

### **3.3. Marcadores moleculares microssatélites (SSRs)**

Os genomas eucariotos são densamente povoados por microssatélites ou sequências simples repetidas, as quais consistem em sequências curtas adjacentes repetidas, e apresentam ampla aplicabilidade de uso em estudos genéticos vegetais (Morgante; Olivieri, 1993). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de iniciadores (*primers*) específicos que amplificam, via reação da polimerase em cadeia (PCR, na sigla em inglês), fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (Vieira, 2004).

Os microssatélites destacam-se ainda por apresentarem elevado conteúdo de informação por loco gênico, discriminação entre heterozigotos e homozigotos (codominante), natureza multialélica e requerem pequena quantidade de DNA para sua amplificação (Weber; Wong, 1993; Priori et al., 2013). Devido a estas características, é passível o uso de marcadores microssatélites em estudos de genética populacional, como diversidade, estimativa do coeficiente de endogamia, ou fixação gênica, fluxo gênico, além de auxiliar na seleção de genótipos em programas de melhoramento, análise de pedigree, estimativa de distância genética entre indivíduos e caracterização de cultivares (Moreira et al., 2007; Vieira et al., 2009).

O polimorfismo existente entre os alelos é verificado pelo tamanho do fragmento gerado, devido à variação do número de cópias da repetição (Oliveira et al., 2008). Entretanto, para isto, é necessário o sequenciamento prévio de regiões do genoma em que há sequências microssatélites, possibilitando construir marcadores (*forward* | *Reverse*)

específicos para flanquear estas regiões. Visando assegurar maior precisão devem-se desenvolver marcadores que apresentem sequências relativamente curtas (aproximadamente 20 pb) e apresentar regiões flanqueadoras conservadas para o desenvolvimento de iniciadores universais (Kress et al., 2005; Dal Ri, 2012).

O sequenciamento prévio foi um dos grandes gargalos do desenvolvimento e, conseqüentemente, do uso de marcadores microssatélites. Contudo, devido ao advento de novas tecnologias, como o sequenciamento de nova geração, nos últimos anos ocorreu uma significativa redução dos custos e melhor acessibilidade às técnicas de sequenciamento de DNA. Este fato proporcionou a expansão no uso de marcadores microssatélites em estudos populacionais de diversas espécies animais, vegetais e micro-organismos (Alzate-Marin et al., 2005; Gonçalves, 2010; Menezes et al., 2006; Moreira et al., 2007; Reis et al., 2011; Torga et al., 2010).



## 4. CAPÍTULO I IDENTIFICAÇÃO, DESENHO E OTIMIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *Guadua chacoensis*

### 4.1. Resumo

O bambu (Poaceae: Bambusoideae) é uma das gramíneas florestais mais rústicas encontradas. Muito embora, a maior diversidade de espécies esta na Ásia, muitas espécies são nativas de praticamente todos os continentes, com exceção de Europa e Antártica. A espécie de bambu lenhoso, conhecida como *Guadua chacoensis*, é nativa da América do Sul. Esta espécie destaca-se como promissora para uso e conservação, devido suas características morfológicas e adaptabilidade ao ambiente. Contudo, é limitante o número de estudos científicos sobre diversidade genética desta espécie de bambu. Devido ao cenário exposto, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver marcadores microssatélites para serem aplicados em estudos genéticos de *Guadua chacoensis*. Foram coletadas amostras de folhas de uma planta da espécie *G. chacoensis*, devidamente identificada por caracteres morfológicos. Foi realizada a extração de DNA e sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq. As sequências obtidas foram analisadas com o software CLC Genomics Workbench<sup>®</sup> 8.0v. Foram encontrados 92 locos microssatélites nos fragmentos sequenciados do genoma de *G. Chacoensis*, dos quais os motivos mais frequentes foram do tipo di-, tri- e tetranucleotídeos. A identificação de locos microssatélites e desenho de iniciadores foi realizado com auxílio do software SSRLocator. Foram desenhados iniciadores para 70 motivos microssatélites. Os demais 22 motivos foram encontrados em regiões não passíveis de serem flanqueadas por marcadores isentos de estruturas secundárias. Dentre os marcadores construídos, foram selecionados 35 pares (*forward* | *reverse*) para confecção e testes de amplificação e otimização do protocolo de PCR. Destes, foram selecionados marcadores para 13 locos microssatélites com maior potencial de uso. A validação dos marcadores para uso futuro foi realizada com indivíduos em populações distintas. Estes marcadores com maior potencial de polimorfismo foram confeccionados com fluorescência para serem genotipados na plataforma ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Dos 13 marcadores, sete (54%) foram polimórficos, enquanto um não apresentou resultados satisfatórios de amplificação e foi descartado das análises seguintes. Os sete locos polimórficos encontrados são passíveis de serem empregados em estudos genéticos da espécie *G. chacoensis*. Os cinco locos que não revelaram polimorfismo com as amostras testadas necessitam de novos

testes com indivíduos de outras populações, a fim de exaurir as possibilidades de uso dos mesmos. Há ainda, marcadores para outros 57 locos encontrados, que necessitam ser caracterizados e otimizados para testar sua aplicabilidade de uso em estudos genéticos para *Guadua chacoensis*.

**Palavras-Chave:** Bambu. SSR. Iniciadores. Diversidade Genética. Polimorfismo.



## 4.2. Abstract

Bamboo (Poaceae: Bambusoideae) is considered one of the most rustic forest grasses. Asia holds the greatest diversity of bamboo species, but they are indigenous of all continents, except Europe and Antarctica. The woody bamboo species, *Guadua chacoensis*, is indigenous of South America. This species stands out as promising for use and conservation, specially because its morphological characteristics and hardiness. However, limiting scientific studies on genetic diversity of this bamboo species were made. Thus, the objective of this study was to develop microsatellite markers to be used in genetic studies of *G. chacoensis*. Leaf samples of a single individual of *G. chacoensis* species identified by morphological characters were collected for DNA extraction. Sequencing was performed on Illumina MiSeq platform. The obtained reads were analyzed with CLC Genomics 8.0V Workbench® software. The sequenced fragments of *G. chacoensis* genome revealed 92 microsatellite loci, of which the most frequent motifs were di-, tri-, and tetranucleotide repeats. Microsatellite loci identification and primer design was carried out with SSRLocator software. Primers could be designed for 70 microsatellite motifs, the other 22 motifs were not flanked by regions free of secondary structure. Among the 70 markers, 35 pairs were selected (forward | reverse) for synthesis and PCR protocol optimization. Among them, 13 SSR loci with potential for use were selected and validated for future use with individuals in different populations. These markers with greater potential polymorphism were fluorescence-dyed for genotyping in ABI platform 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Seven (54%) markers were polymorphic, and only one did not show satisfactory results and was discarded. The seven polymorphic loci found are likely to be used in genetic studies of *G. chacoensis* species. The five monomorphic loci need further tests with other populations in order to exhaust the possibilities of use. There are also other 57 loci markers found, they need to be characterized and optimized to test its applicability for use in future genetic studies of *G. chacoensis*.

**Key words:** Bamboo. SSR. Primers. Genetic diversity. Polymorphism.



### 4.3. Introdução

O bambu (Poaceae: Bambusoideae) é uma das principais subfamílias das gramíneas. Sua maior diversidade de espécies é encontrada na Ásia, mais especificamente no sul da China, onde os bambus possuem elevada importância econômica, ecológica e social (Yuming et al., 2004). Espécies de diferentes gêneros de bambu estão distribuídas por todo o mundo, exceto Europa e Antártida (Clark et al., 2015), possuindo diferentes usos por diversas populações nativas nos locais mais remotos.

Estas plantas são extremamente robustas, compostas por mais de 115 gêneros onde se concentra mais de 1.400 espécies descritas (Kelchner; Group, 2013). Estudos filogenéticos demonstraram que os bambus lenhosos temperados possuem divergência dos demais bambus desde o início da história evolutiva destas espécies (Zhang et al., 2011), com peculiaridades que os tornam um grupo distinto das demais espécies de bambus.

O gênero *Guadua*, representante de bambu lenhoso, abrange grande número de espécies, algumas endêmicas da América do Sul (Clark, 2001), dentre estas, o *G. chacoensis* ( $2n = 2x = 46$ ) (Andrada et al., 2007; Rincón; Castillo, 2012). Mesmo sendo relatada na literatura a importância ecológica desta espécie nos habitats em que ocupa, há pouco conhecimento científico sobre seu comportamento reprodutivo (Areta et al., 2009). Desconhece-se também a estrutura e a diversidade genética existente nas populações nativas remanescentes desta espécie.

Dentre as espécies conhecidas, os bambus lenhosos distinguem-se das demais devido ao seu caule lenhoso e pela reprodução sexual em intervalos que variam de 40 a 120 anos (Janzen, 1976). Estudos de acompanhamento do ciclo reprodutivo descrevem que esta espécie possui floração, em intervalos de aproximadamente 31 anos (Guerreiro, 2014). No entanto, não há conhecimento de como o processo de florescimento interfere na composição genética das populações.

Com o avanço do conhecimento científico e tecnológico da genética molecular, novas tecnologias tornam possíveis caracterizar a diversidade, estrutura genética e descritores de seleção assistida, para espécies como o *G. chacoensis*. Com isso, superam-se as limitações encontradas em estudos anteriores, que empregaram marcadores moleculares dominantes, assim, pouco informativos, para espécies de bambu (Rugeles-Silva et al., 2012).

Dentre os marcadores mais informativos estão as Sequências Simples Repetidas (SSR, na sigla em inglês), ou microssatélites, fragmentos do DNA repetidos em tandem, amplamente distribuídos em

genomas de eucariotos, que apresentam alta taxa de mutação devido a fatores como a desigual recombinação nestes locos e o escorregamento ocasionado pela enzima DNA-polymerase durante a replicação das células (Tóth et al., 2000). Devido a estas características, marcadores microssatélites possuem alto valor informativo, natureza multialélica, herança codominante e ampla cobertura do genoma (Powell et al., 1996), motivos pelos quais vem sendo universalmente utilizado em estudos genéticos diversos (Varshney et al., 2005).

Contudo, marcadores microssatélites somente podem ser utilizados em alguma espécie por meio de duas formas, serem transferidos de espécies próximas na escala evolutiva, ou construídos para a própria espécie. O desenvolvimento de microssatélites específicos requer o sequenciamento de fragmentos do genoma, análise e montagem dos fragmentos sequenciados (obtenção dos *contigs*), identificação de locos microssatélites, desenho de iniciadores nas regiões flangeadoras dos locos e validação dos mesmos (Powell et al., 1996).

Para o gênero *Guadua*, estudos relatam sucesso na transferência de marcadores microssatélites provenientes de outras espécies, como o arroz e a cana-de-açúcar (Marulanda et al., 2007). Contudo, não há estudos genéticos empregando estes locos para elucidar o estado da diversidade genética da espécie. Bem como, a ausência de marcadores microssatélites específicos para *G. chacoensis*, motivaram a realização deste estudo que teve como objetivo desenvolver e validar marcadores microssatélites para serem aplicados em estudos genéticos em *Guadua chacoensis*.

#### **4.4. Material e Métodos**

As amostras foliares, oriundas de populações naturais, empregadas neste estudo, foram coletadas com autorização de coleta (processos 45390 e 48802-1) emitida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) SISBIO. A amostra, constituída de 10 g de folhas frescas, utilizada para o desenvolvimento dos microssatélites, foi coletada de uma planta identificada, por caracteres botânicos, como *Guadua chacoensis*, cultivada em Florianópolis, SC (Brasil). Desta mesma planta foi coletada uma exsiccata e depositada no herbário FLOR-UFSC (FLOR0058621).

As demais amostras populacionais foram compostas de aproximadamente 10 g de limbo foliar fresco para cada indivíduo, desidratado com sílica gel para transporte e extração do DNA. Para validação e caracterização dos microssatélites foram utilizadas amostras de seis populações nativas da Mata Atlântida, dentro de um contínuo

florestal, no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil com 24 indivíduos em cada, somadas à amostras de duas populações cultivadas de 12 indivíduos cada.

A extração do DNA foi realizada com uso do kit comercial Nucleo Spin Plant II (Macherey-Nagel). Assim, para cada amostra, 100 mg de material vegetal previamente desidratado foi triturada e homogeneizada em Precellys. Em cada amostra triturada foi adicionado 400  $\mu\text{L}$  de buffer PL1 e 10  $\mu\text{L}$  de solução RNase A, sendo homogeneizada e incubada em banho-maria a 65 °C por 10 min. Então cada solução foi transferida para uma membrana filtro e centrifugada por 2 min a 11.000 g visando, filtrar a fase líquida dos detritos vegetais. Na sequência foi adicionado 450  $\mu\text{L}$  de buffer PC, homogeneizado por meio da pipetagem *up and down* por 5 vezes, e então 700  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi transferido para outra coluna de 2 ml com membrana de sílica e novamente centrifugado por 1 min a 10.000 g. Nesse passo o buffer PC promove a ligação do DNA vegetal à membrana (filtro). Assim foi descartado o sub-nadante, a membrana foi mantida e o DNA (ligado à membrana) foi purificado, por meio da adição de 400  $\mu\text{L}$  de buffer PW1 na coluna, seguido de centrifugação por 1 min a 11.000 g e descarte do sub-nadante. Em seguida foi adicionado mais 500  $\mu\text{L}$  de buffer PW2 e realizada a centrifugação por 1 min a 10.000 g. Novamente descartou-se o sub-nadante, e adicionaram-se outros 500  $\mu\text{L}$  de buffer PW2 seguido de centrifugação por 2 min a 11.000 g, descartando-se, mais uma vez, o sub-nadante. Na sequência a coluna foi alocada em um novo microtubo de 1,5 mL e ambos foram mantidos em uma estufa a 65 °C, em seguida adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de buffer PE (65 °C) no centro da membrana que foi incubada por mais 5 min a 65 °C, seguida de centrifugação por 1 min a 11.000 g. Foi feita nova adição de 50  $\mu\text{L}$  de buffer PE e uma nova incubação por 5 min a 65 °C seguida de centrifugação por 2 min a 11.000 g. O PE utilizado para eluir o DNA faz com que o DNA desligue-se da membrana e permaneça eluído no sub-nadante junto ao PE. Ao final foram obtidos 100  $\mu\text{L}$  de DNA extraído, que foram imediatamente congelados a -20 °C até seu posterior uso.

As estimativas de quantidade e qualidade das amostras de DNA foram obtidas com auxílio de eletroforese de gel de agarose e da leitura em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos das Américas). A eletroforese foi realizada a 100 V por 60 min em gel de agarose +TBE 1x [0,8%], com 2 $\mu\text{L}$  das amostras acrescidos de três  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento com GelRed® (1:500). No mesmo gel foram carregadas amostras de DNA-lambda ( $\lambda$  DNA) nas concentrações de 12,5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , 25 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , 50 ng

$\mu\text{L}^{-1}$  e  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  para comparação da fluorescência com as demais amostras.

A leitura das fluorescências das amostras foi realizada em fotodocumentador (UVP, Upland, Califórnia, Estado Unidos das Américas) em comprimento de onda na faixa de ultravioleta. Nas análises via Nanodrop foi utilizado  $1\mu\text{L}$  de DNA para leitura da absorbância nas faixas de 230, 260 e 280 nm, o que permite tanto a quantificação de ácidos nucleicos ( $A_{260}$ ), quanto à qualidade informada pelo valor das relações  $A_{260}/A_{230}$  (ácidos nucleico/compostos fenólicos) e  $A_{260}/A_{280}$  (ácidos nucleico/compostos orgânicos).

O sequenciamento do DNA para o desenvolvimento dos microssatélites foi realizado no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná, utilizando o kit Nextera XTDNA Sample Prep Kit (Illumina Inc., San Diego, Califórnia, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A extração do DNA e a genotipagem dos locos microssatélites das amostras para os estudos genéticos foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina (LFDGV/UFSC).

Os *reads* obtidos no sequenciamento do DNA foram analisados com auxílio do software CLC Genomics Workbench<sup>®</sup> 8.0v. Para realizar o *trimming* foi utilizado o escore limite de qualidade de 0,01 e descartados os *reads* menores que 50 bases para a construção da fita consenso, utilizando a abordagem *de novo* para montagem e obtenção dos *contigs*. A limpeza das sequências não nucleares foi realizada utilizando os acessos gb|JN120789.1, gb|EU365401.1 e gb|KT373814.1 (Vieira et al., 2015), disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (Wheeler et al., 2007) e a ferramenta *on line Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul et al., 1990).

Após a obtenção dos *contigs* nucleares, foi realizado o mapeamento dos locos microssatélites com auxílio do software SSRLocator (Maia et al., 2008), considerando como locos microssatélites os fragmentos contendo no mínimo 12 repetições para mononucleotídeos, 6 repetições para dinucleotídeos, 4 repetições para trinucleotídeos, 3 repetições para tetranucleotídeos e pentanucleotídeos e duas repetições para hexanucleotídeos.

O software SSRLocator também foi utilizado para desenho dos iniciadores em sequências flanqueadoras aos locos mapeados, empregando-se o algoritmo do software Primer3. Os parâmetros adotados para a construção dos iniciadores (*forward* / *reverse*) foram: *temperature of melting* (TM) mínima  $57^\circ\text{C}$ , máxima  $63^\circ\text{C}$  e ótima  $60$

°C, máximo de 1 °C de diferença na TM entre *forward* e *reverse*; conteúdo GC mínimo 40% e máximo 60%; tamanho de fragmentos amplificados (*amplicon*) mínimo de 100 e máximo de 350 pares de base; comprimento dos iniciadores (*primer length*) com mínimo de 18, máximo de 22 e ótimo de 20 nucleotídeos. Os marcadores gerados foram analisados com o *software* Gene Runner® para assegurar a inexistência de formação de estrutura secundária.

Dentre os locos microssatélites obtidos e para os quais foi possível desenhar iniciadores, foram selecionados os 35 com maior potencialidade de uso em estudos de genética de populações. Levando em conta para isto critérios como ausência de formação de estruturas secundárias e temperatura *melting* próximas entre *forward* e *reverse*. Os iniciadores foram confeccionados e as reações de amplificação otimizadas, utilizando-se diferentes concentrações de reagentes e ciclos de amplificação em temperaturas de anelamento entre 52 e 62 °C, com intervalos de 2 °C. Para isto foi utilizado amostras de DNA obtidas de 8 indivíduos *Guadua chacoensis*, amostrados em 4 populações naturais do Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR (BR).

O protocolo inicial de amplificação utilizado consistiu de 1,5 µL de tampão de PCR 10 x, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 0,2 µM do *primer Forward* e 0,2 µM do *primer Reverse* e 1 unidade de *Taq* polimerase, em 10 µL de reação final. Em programa de ciclagem térmica: 95 °C durante 3 min; 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, temperatura de anelamento durante 30 s e 72 °C durante 1 min, seguido de extensão final de 72 °C durante 30 min.

Para verificar a qualidade de amplificação dos marcadores, após a PCR, foram realizadas eletroforeses horizontais em géis de agarose (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos das Américas) e tampão TBE 1X [3%], por aproximadamente 120 min em corrente continua com voltagem de 100 volts. Cada amostra foi preparada utilizando-se 2 µL do produto de PCR adicionados a 3 µL de tampão de carregamento com GelRed® (1:500). O marcador de peso molecular conhecido (*ladder* de 1 kb) foi adicionado ao gel para possibilitar a estimativa do tamanho dos fragmentos gerados.

Os marcadores que apresentaram resultados duvidosos, ou ausência de bandas visíveis, foram submetidos novamente à PCR, em diferentes condições, como diferentes temperaturas de anelamento, tempo de extensão e concentração de reagentes. Para buscar um ajuste e verificar a possibilidade de uso.

Após a otimização das reações para os iniciadores, foram realizadas eletroforeses verticais em géis de poliacrilamida para verificar

a existência de polimorfismo. Esta eletroforese foi realizada em gel desnaturante de Bis-acrilamida [4%], em tampão TBE 1X, por aproximadamente 90 min sob correntes continua com voltagem de 75 volts.

Foram selecionados os locos com maior potencial de polimorfismo e confeccionados marcados com fluorescência para realizar a validação e caracterização destes locos. Para isso foi empregada a genotipagem na plataforma ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) com 168 indivíduos em 8 populações. Devido à marcação fluorescente dos marcadores possuírem diferentes espectros de leitura, as reações para caracterização dos locos foram realizadas em conjuntos (multiplex).

O nível de potencial de polimorfismo de cada loco, denominado de conteúdo polimórfico, (*Polymorphism Information Content - PIC*), foi estimado conforme descrito na equação abaixo (Maroof et al., 1994; Anderson et al., 1993):

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

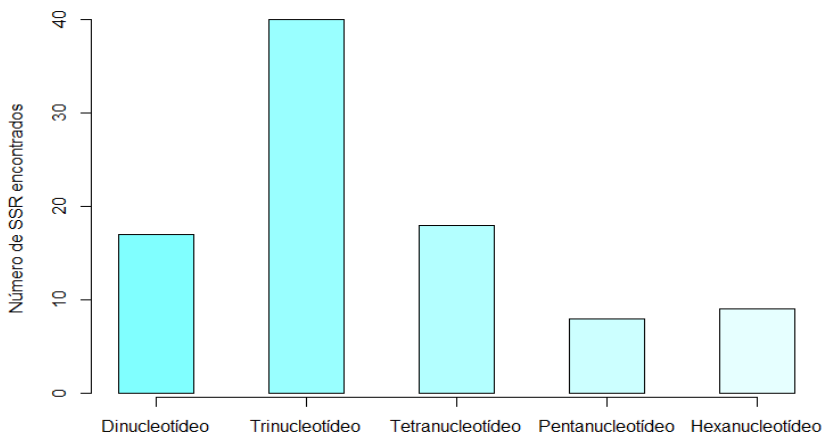
Onde  $p_i$  é a frequência do alelo  $i$ .

#### 4.5. Resultados

O sequenciamento genômico do DNA de *G. chacoensis* resultou em 296.699 *reads* de alta qualidade. Após o *trimming* (qualidade mínima de 0,01) e excluído *reads* de organelas, foram obtidos 239.621 *reads* (tamanho médio de 238,79 bases). Após a abordagem “*de novo*” foram obtidos 6.013 *contigs* ( $N_{50} = 685$  bases).

Nas regiões sequenciadas, foram encontrados 17 locos microssatélites dinucleotídeos, 40 trinucleotídeos, 18 tetranucleotídeos, 8 pentanucleotídeos e 9 hexanucleotídeos, totalizando 92 locos microssatélites (Figura 4.1). Nestes locos, os motivos, das sequências repetidas, mais frequentes foram AT (7,6 %), TA (6,5%), TTC (5,4%) e TTA (4,3%) (Tabela 4.1). Contudo, devido à posição destes locos dentro dos *contigs*, foi possível construir os iniciadores em sequências flanqueadoras para 70 locos (Tabela 4.2), dos quais foram selecionados os marcadores microssatélites descritos na tabela 4.3.





**Figura 4.1.** Frequência de locos microssatélites nas sequências obtidas para a espécie *Guadua chacoensis* distribuídas de acordo com o número de nucleotídeos nas repetições.

**Tabela 4.1.** Distribuição dos locos microssatélites identificados por sequências obtidas para a espécie *Guadua chacoensis* distribuídas de acordo com o motivo e o número de repetição

Motivo	Número de repetições											$\Sigma$	
	3	4	5	6	7	8	10	16	18	20	27		34
AC				1									1
AT				1	2	1		1		1	1		7
CT					1								1
GC							1						1
GT					1								1
TA				3	1				1			1	6
AAC		1											1
AAG		2											2
AGA		1											1
AGC		1											1
CAA				1									1
CCG		1	1										2
CCT		1											1
CGA		1											1
CGC		1											1
CGG		1											1
CTC				1									1
GAA		1											1
GAC		1	1										2
GCC		1											1
GCG		1											1

GCT		1										1
GGA		2	1									3
GGC		1										1
GTC		1										1
TCA		2										2
TCC		2										2
TCT		1										1
TGC		1										1
TTA		4										4
TTC		5										5
TTG		1										1
AATA	1											1
AATC	3											3
AATT	1											1
ACTC	1											1
CAAC	1											1
CAAG		1										1
CAAT	1											1
CTTC	1											1
GAAA	1											1
TAGC	3											3
TCGA		1										1
TTAA		1										1
TTCT	1											1
TTTA	1											1
ATTAA	1											1
CGGCT	2											2
CTCGC		1										1
GCTCG	1											1
GCGGA		1										1
TTGCC	1											1
TTTGA	1											1
ACGGAT	1											1
AGCCAG	1											1
CGGGTA		1										1
GCAGGA		1										1
GCCACC	1											1
GTCGGG	1											1
TACCCG		1										1
TATCCG	1											1
TCACAT			1									1
Total	26	43	6	5	5	1	1	1	1	1	1	92

**Tabela 4.2.** Iniciadores (*forward / reverse*) para locos microssatélites encontrados no genoma de *Guadua chacoensis*

Loco		Iniciador	TM (°C)	Motivo
SSR 1	F	CACTCTATCCAGAGGATTGG	55	(AGCCAG) <sub>3</sub>
	R	GTACAAACCTATCCCAACGA	55	
SSR 2	F	CCAGTTGATATGCAGAACCT	55	(GCC) <sub>4</sub>
	R	TTCTCTCTATCGTCCTCAGC	55	
SSR 3	F	TAGCACGTACCATCAAACAA	55	(GCG) <sub>4</sub>
	R	CCTACCGTAAGCTCTCTGAA	55	
SSR 4	F	TTTAACCCCTCTGCACGTTT	56	(GTCGGG) <sub>3</sub>
	R	TAAGAAGTTCCAAGGACAGC	55	
SSR 5	F	GGAGTTTGCTTCTTGCTTTA	55	(AT) <sub>8</sub>
	R	ACGAAGATGCTTGTCTAGA	55	
SSR 6	F	AGGAATTAGTAGTACCCGCC	55	(TACCCG) <sub>4</sub> -
	R	TACCCGCATCTAACCTACC	55	
SSR 7	F	TTCACCTAGACTTCTGGCAT	55	(TTC) <sub>4</sub>
	R	TGAGGAGAGAAAGTTGAGA	55	
SSR 8	F	TTGTGCATGACTTGTTGAGT	55	(AGA) <sub>4</sub>
	R	TCACCTTACAATAATTCCGC	55	
SSR 9	F	CTACGAGAGACCAGGCAG	54	(CGA) <sub>4</sub>
	R	CTGAAAGAAATCACTCCTCG	55	
SSR 10	F	AGATCTCGCTTGTAGAACCA	55	(TAGC) <sub>3</sub>
	R	GTAGTGCGTATGCACACATT	55	
SSR 11	F	TAGTCGGGTGATCATGAAAT	55	(AT) <sub>6</sub> -
	R	GTCGATATATTCTTGGCTGC	55	
SSR 12	F	AGGGGAATACAGATATGCAA	55	(GGA) <sub>4</sub>
	R	CGTTCTCATGATACTCCCAT	55	
SSR 13	F	AGCTTACAGATGACGAACT	55	(GGA) <sub>4</sub> -
	R	AAGATGACAACGACGATGAT	55	
SSR 14	F	AATAAAGGTAGTATGGCGGC	56	(CGGCT) <sub>3</sub>
	R	GGTAGCCGGTTCTGTAGTAG	54	
SSR 15	F	AACTTCTCCCTCGAAACCT	55	(AATA) <sub>3</sub>
	R	GTGTCACAGATGACGCAATA	55	
SSR 16	F	GCGGGTTGTAGAATTAACAG	55	(TGC) <sub>4</sub>
	R	GAGAATGTTGCACTGGATTT	55	
SSR 17	F	CTGTGGACATGAACAATCTG	55	(AAC) <sub>4</sub>
	R	ATGTGCAGCTTTCTCTCAAT	55	
SSR 18	F	GATTGAGGAATGAGATGGAA	55	(CAAG) <sub>3</sub>
	R	GAAC TTGGCTTGAAAGATTG	55	
SSR 19	F	CAATCACATCACTGTTTACG	55	(TA) <sub>6</sub>
	R	CTGCACCTGGAGAGTTTTAC	55	
SSR 20	F	ATGTTGAGGATGAGATCGAC	55	(AGC) <sub>4</sub>
	R	CGAAGAAAATCTGGAACAAG	55	
SSR 21	F	GAGTACTTCGCCTTGCTAGA	55	(GAA) <sub>4</sub>

	R	GTGCTGGTGTTCCTTCTTCT	55	
SSR 22	F	CTCTTCGTTACACTTCTCC	55	(TCT) <sub>4</sub>
	R	AAGGAAATACCGAAGAGGAC	55	
SSR 23	F	GTGGGAGAAAGGGAGAAG	55	(CTCGC) <sub>4</sub>
	R	ACAATCCGAGTAGCAAAAAG	55	
SSR 24	F	GGACCTAAACGCAATTTCTA	55	(TA) <sub>18</sub>
	R	CACCAAAGTTGGAGATGTTT	55	
SSR 25	F	GAACTACGGCAAGAACAAAAG	55	(AAG) <sub>4</sub>
	R	AACACACATGAACGTTAGCA	55	
SSR 26	F	GTATTGGGCCGAGTACTGT	55	(CCG) <sub>5</sub>
	R	GGCATAAAAGGTAGCAAATG	55	
SSR 27	F	TGTCGTGATCCTCACCTC	55	(CCG) <sub>4</sub>
	R	GAGAGGAACTCCAAGGGA	55	
SSR 28	F	CATGTGTTTCCATAGACCCT	55	(AT) <sub>27</sub>
	R	GATAGCATGATGGTTTTGCT	55	
SSR 29	F	GTGATTATTCTCGGACTTGC	55	(AT) <sub>7</sub>
	R	CCAACCAGAACAAGACATT	55	
SSR 30	F	AATGCTTTTGTCTGGTTGG	55	(AT) <sub>16</sub>
	R	AGACAGTTTGAATAGAGC	55	
SSR 31	F	AACTAGGGAATTGGAAGCTC	55	(TAGC) <sub>3</sub>
	R	TATGAAGTTGACACCCCTTT	55	
SSR 32	F	ATATCTTGAACCCGACCTC	56	(TAGC) <sub>3</sub>
	R	CAGACAGTTTGGAAACCATT	55	
SSR 33	F	GCGAGACATATTTCCAAGA	55	(TA) <sub>34</sub> -(TA) <sub>7</sub>
	R	GGCTAAAATTGAGACCTCC	54	
SSR 34	F	CGAAGAAAAGGAGATCAACTG	55	(CGG) <sub>4</sub>
	R	GGGACGTTACAGCAATAGAG	55	
SSR 35	F	TCCGCCTATATTGTTGAGTT	55	(TTTA) <sub>3</sub>
	R	CTAGTCTTCTTCCTCATGG	55	
SSR 36	F	TCTCAAAGCTGTACCGAAGT	55	(TTGCC) <sub>3</sub>
	R	TAACGTTCAACAACAGCAGAG	55	
SSR 37	F	TCTCTTCGGGACATCGTAT	56	(GAAA) <sub>3</sub>
	R	AGGAATCCCTCTCCTAGGTT	56	
SSR 38	F	GGTGAAGAAGGATGTATGGA	55	(AC) <sub>6</sub>
	R	TATTGCGTGATGTAGTTTGC	55	
SSR 39	F	GGTCTGTTCTTCTTCCTTCC	55	(TTC) <sub>4</sub>
	R	CTCCAAAATTGAAGATGAGG	55	
SSR 42	F	GAGCCCATATGTCATTGTCT	55	(TTCT) <sub>3</sub>
	R	GATCTTCAATCTCTGCTTGC	55	
SSR 43	F	GAGGGCTGTAAGCAACTAAA	55	(TTC) <sub>4</sub>
	R	ACATGAAGAACAGGGATGAG	55	
SSR 44	F	AGCAACGAGAGCTGGAGT	56	(GC) <sub>10</sub>
	R	AATGGGACCTCGAGTGAT	55	
SSR 46	F	AACGTATTTTCGACCGC	55	(TCA) <sub>4</sub>

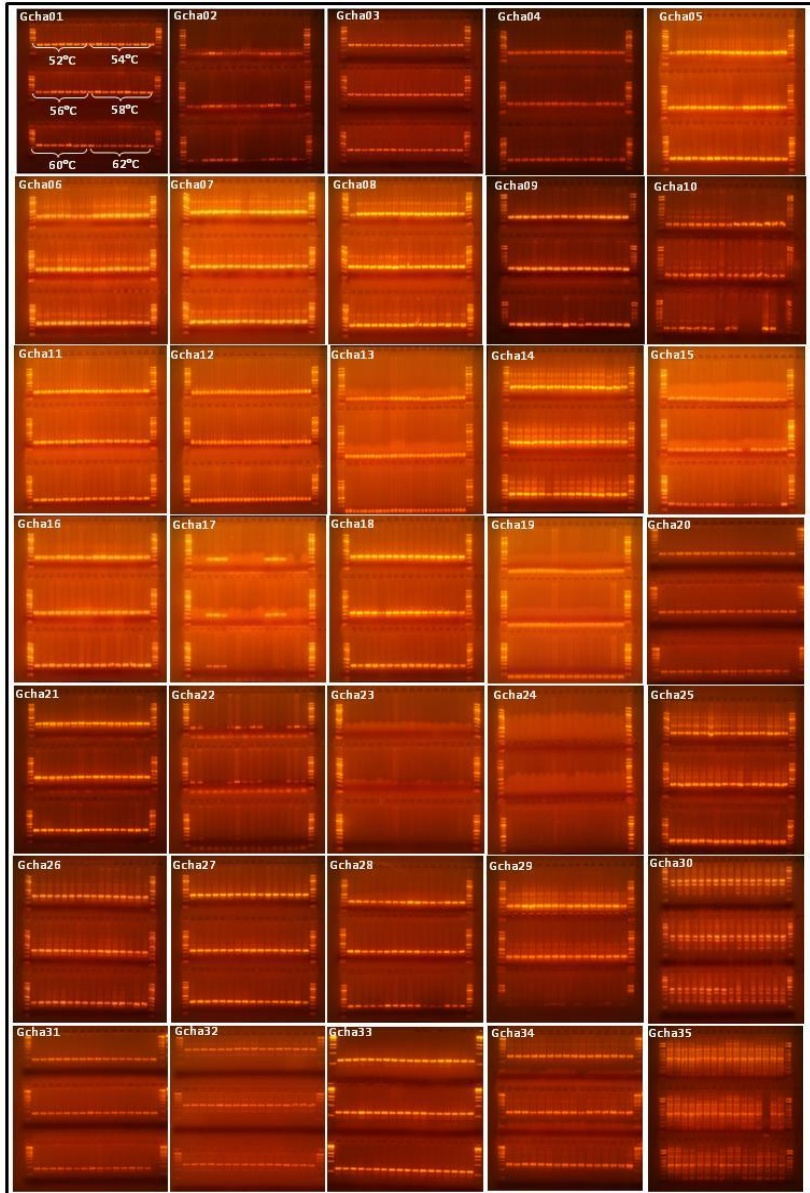
	R	GTAGATGGATCGAAGATGGA	55	
SSR 47	F	GTGTACGCTGAGTATGCACT	54	
	R	CGATGCAAGTACTGTCTCAA	55	(GCT) <sub>4</sub>
SSR 48	F	TCTATTGTCCTTAGCCAGTCA	55	
	R	CTGGA AACATCAATGAGGAC	55	(GGC) <sub>4</sub>
SSR 49	F	CACITCACTTTTTCGGTTTC	55	
	R	CCTAGCAAGGTCTAGAACGA	55	(TTC) <sub>4</sub>
SSR 51	F	GAGCACAAAAACCTCAAAC	55	
	R	AAGGAATGGATGAGATGCTA	55	(ACTC) <sub>3</sub>
SSR 52	F	AGAAAGATTGTTGATGGTGG	55	
	R	GCCATGGTAACTTGGTAAGA	55	(CT) <sub>7</sub>
SSR 53	F	TCACAACACTTGGGATTGTA	55	
	R	GTCAATAGGTTGAGAGAGCG	55	(TCGA) <sub>4</sub>
SSR 54	F	AACGGATAAGCTCAACACAT	55	
	R	GTATTCGAATCAGCGACG	55	(AATC) <sub>3</sub>
SSR 55	F	GGGACTACGAGGTAGGACTT	55	
	R	GAGCTGGGTTAAATGAGTG	55	(CAAT) <sub>3</sub>
SSR 56	F	AGTCCAGTCGCACTCTTCTA	55	
	R	TGTGTAATATAACCCGAGG	55	(CTTC) <sub>3</sub>
SSR 58	F	GTCTATTGCAGTCCCAAATC	55	
	R	GTTGTGCAGATGTGAATGTG	56	(TCACAT) <sub>5</sub>
SSR 59	F	CCCCATACGTTGTGAGATAC	55	
	R	CTCCTAAAATCCTACGTGACA	55	(AT) <sub>20</sub>
SSR 60	F	GAAATCGTCAATAAGGAAG	54	
	R	TAATTAGGAGTTGGTGGTGG	55	(AATC) <sub>3</sub>
SSR 61	F	GAAGAAGATGCTGGATGAAG	55	
	R	CTTTCTTCGCGACCTTG	55	(AAG) <sub>4</sub>
SSR 62	F	ATACCGCCTGGAGAAGTT	55	
	R	GACAATCATCCTTGGAGAAA	55	(GAC) <sub>5</sub>
SSR 65	F	ATGAGCGAGAATGTAGGTGT	55	
	R	CTTTGAGACATTCTGGACTT	52	(TTAA) <sub>3</sub>
	F	ATGACCGATCGGAGTTG	55	(CTC) <sub>5</sub> -
SSR 67				(GTC) <sub>4</sub> -
				(TCC) <sub>4</sub> -
	R	CACACAATCCACTTTTGTTG	55	(TCC) <sub>4</sub> -
				(CCT) <sub>4</sub>
SSR 68	F	GATCTCAGAAGATGGATTCTG	55	
	R	ATACATAATGAATGGGTGGC	55	(CAAC) <sub>3</sub>
SSR 69	F	TTGAGTACAAGGGATGCTCT	55	
	R	GGATCTAGGTCGAACATTCA	55	(GT) <sub>7</sub>
SSR 70	F	TTCTGGTTTTTGATCTGTC	55	
	R	TCATGTTGCATTGGAGTATC	54	(AT) <sub>7</sub>
SSR 71	F	GCAGGCACAGTCAGAGTC	55	
	R	CTTCTCAATGTCTCTCAGCC	55	(GCCACC) <sub>3</sub>
SSR 72	F	TCTGCTAGTAGGGTTGGAAA	55	(GCTCG) <sub>3</sub> -

	R	AGCTCATTGGCTCGC	54	(CGGCT) <sub>3</sub>
SSR 74	F	TCGATATTATCCGTATCCGT	55	(TATCCG) <sub>3</sub>
	R	GATTATGATCACCTGGAAA	55	
SSR 75	F	CATGGATGTCTTCATGATTG	55	(TTC) <sub>4</sub>
	R	ACAACAGAGACAAGAAGGGA	55	
SSR 76	F	CTCAAGACTAGTCACCTCGG	55	(TCA) <sub>4</sub>
	R	GCACGATAGCGATAGTGATA	54	
SSR 77	F	ATAAAATCTCCCGAGACACA	55	(CAA) <sub>5</sub>
	R	CATTTGCTTGAGCTAGGGT	56	
SSR 79	F	AACTCAAGACCCTGGACC	55	(GAG) <sub>4</sub>
	R	GATTTCCAACACTACGAAGTGC	55	
SSR 80	F	ATCAAAAGTCAGAAGTTGGC	54	(CGC) <sub>4</sub>
	R	AGTAGAGAGTCGCCCTTGAT	56	

A genotipagem das plantas em gradiente térmico, empregando os marcadores selecionados, e posterior revelação dos amplicons em gel de agarose, revelou que os iniciadores desenhados para os locos *Gcha 17*; *Gcha 19*, *Gcha 22*, *Gcha 23* e *Gcha 24* não amplificaram em todas as amostras independentemente das temperaturas testadas. Resultados distintos foram obtidos para os iniciadores desenhados para os locos *Gcha 25*, *Gcha 30* e *Gcha 35*, pois estes apresentaram presença abundante de bandas inespecíficas (Figura 4.2).

Estas características foram utilizadas como critérios para descarte dos marcadores a serem caracterizados. Outros critérios também foram levados em consideração como a nitidez e qualidade dos amplicons revelados após a eletroforese. Assim, 13 marcadores foram selecionados para serem caracterizados e, posteriormente, marcados com fluorescência (Tabela 4.4), para uso subsequente nos estudos genéticos.

Com a caracterização dos marcadores, constatou-se que os iniciadores do loco *Gcha 33* amplificaram bandas inespecíficas, possivelmente decorrente da instabilidade de amplificação durante as reações ou por inconsistências do anelamento. Sendo assim, este foi descartado das análises para revelação de polimorfismo.



**Figura 4.2.** Produtos de PCR realizado em gradiente térmico, para os locos microssatélites testados em amostras de DNA extraídas a partir de *Guadua chacoensis*, revelados após eletroforese em gel de agarose.

**Tabela 4.3.** Marcadores para loco microssatélites em genoma de *Guadua chacoensis* selecionados para testes de amplificação dos fragmentos por PCR

<b>Loco</b>	<b>TM (°C)</b>	<b>Produto (pb)</b>	<b>Motivo</b>
<i>Gcha01</i>	55	238	(GCC) <sub>4</sub>
<i>Gcha02</i>	55	249	(GCG) <sub>4</sub>
<i>Gcha03</i>	55	289	(TTC) <sub>4</sub>
<i>Gcha04</i>	55	239	(AGA) <sub>4</sub>
<i>Gcha05</i>	55	291	(AT)6-(AATT) <sub>3</sub>
<i>Gcha06</i>	55	312	(GGA) <sub>4</sub>
<i>Gcha07</i>	55	250	(GGA) <sub>4</sub> -(GGA) <sub>5</sub>
<i>Gcha08</i>	55	285	(AATA) <sub>3</sub>
<i>Gcha09</i>	55	265	(TGC) <sub>4</sub>
<i>Gcha10</i>	55	244	(AAC) <sub>4</sub>
<i>Gcha11</i>	55	214	(CAAG) <sub>3</sub>
<i>Gcha12</i>	55	166	(TA) <sub>6</sub>
<i>Gcha13</i>	55	177	(AGC) <sub>4</sub>
<i>Gcha14</i>	55	243	(GAA) <sub>4</sub>
<i>Gcha15</i>	55	159	(TCT) <sub>4</sub>
<i>Gcha16</i>	55	246	(TTC) <sub>4</sub>
<i>Gcha17</i>	55	226	(TA) <sub>18</sub>
<i>Gcha18</i>	55	305	(AAG) <sub>4</sub>
<i>Gcha19</i>	55	254	(CCG) <sub>5</sub>
<i>Gcha20</i>	55	194	(AT) <sub>16</sub>
<i>Gcha21</i>	55	310	(TAGC) <sub>3</sub>
<i>Gcha22</i>	55	210	(CGG) <sub>4</sub>
<i>Gcha23</i>	55	244	(TTTA) <sub>3</sub>
<i>Gcha24</i>	55	304	(AC) <sub>6</sub>
<i>Gcha25</i>	55	328	(TTCT) <sub>3</sub>
<i>Gcha26</i>	55	309	(TTC) <sub>4</sub>
<i>Gcha27</i>	55	315	(TCA) <sub>4</sub>
<i>Gcha28</i>	55	280	(GGC) <sub>4</sub>
<i>Gcha29</i>	55	297	(ACTC) <sub>3</sub>
<i>Gcha30</i>	55	318	(CAAT) <sub>3</sub>
<i>Gcha31</i>	55	167	(CTTC) <sub>3</sub>
<i>Gcha32</i>	55	284	(GAC) <sub>5</sub>
<i>Gcha33</i>	55	208	(CAAC) <sub>3</sub>
<i>Gcha34</i>	55	283	(GT) <sub>7</sub>
<i>Gcha35</i>	55	187	(GAG) <sub>4</sub>

Os locos *Gcha 01*, *Gcha 02*, *Gcha 04*, *Gcha 05*, *Gcha 07*, *Gcha 10* e *Gcha 21* apresentaram mais de um alelo dentre os 168 indivíduos genotipados; o loco *Gcha 02* apresentou o maior número de alelos (5) e maior valor polimórfico (PIC) para os indivíduos analisados (0,426). O *Gcha 07*, com somente dois alelos, sendo um alelo raro (frequência



inferior a 1%), apresentou o menor valor PIC (0,012). Dentre os locos polimórficos, foram identificados 23 alelos, dos quais cinco foram alelos raros, estando estes todos em heterozigose nos indivíduos (Tabela 4.5).

O multiplex “A”, composto pelos locos *Gcha 03*, *Gcha 04*, *Gcha 09* e *Gcha 18* (Tabela 4.4), apresentou resultados satisfatórios de amplificação para todos os locos. Contudo, *Gcha 04* foi o único deste conjunto de locos que apresentou polimorfismo para os indivíduos avaliados (Figura 4.3). No multiplex “B”, composto pelos locos *Gcha 08*, *Gcha 10*, *Gcha 21* e *Gcha 33*, houve dificuldades na amplificação do loco *Gcha 33*, que foi retirado do conjunto.

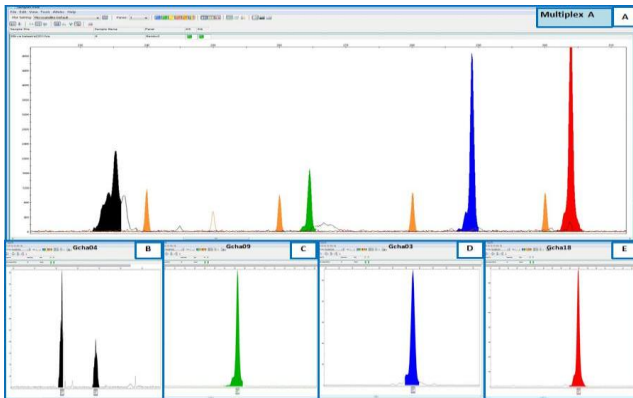
Quando avaliado isoladamente, este loco apresentou resultados inespecíficos e instáveis, motivo pelo qual foi também retirado da caracterização. Os demais locos para este conjunto (multiplex “B”) apresentaram resultados satisfatórios de amplificação (Figura 4.4). Os multiplex “C”, composto pelos locos *Gcha 02*, *Gcha 05* e *Gcha 06*, e “D”, composto pelos locos *Gcha 01* e *Gcha 07*, apresentaram resultados de amplificação satisfatórios em todos os locos (Figuras 4.5 e 4.6).

**Tabela 4.4.** Motivo do microssatélites, temperatura de anelamento ( $T_a$  °C), tamanho esperado e fluorescência para cada um dos locos agrupados em conjuntos de multiplex, utilizados na caracterização de marcadores para locos microssatélites em genoma de *Guadua chacoensis*

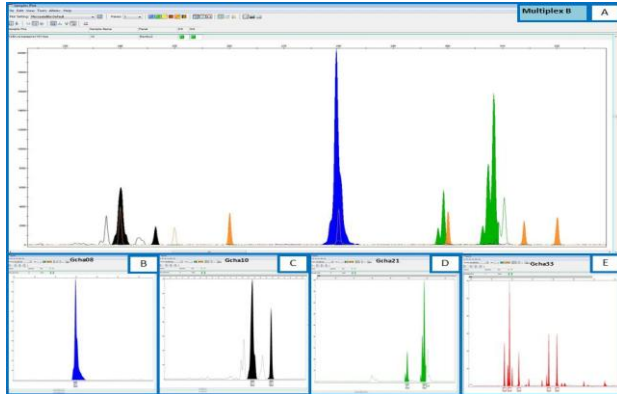
Loco	Motivo	$T_a$ °C	Tamanho esperado	Fluorescência
<b>Multiplex A</b>		58		
<i>Gcha 03</i>	(TTC) <sub>4</sub>		289	FAM
<i>Gcha 04</i>	(AGA) <sub>4</sub>		239	NED
<i>Gcha 09</i>	(TGC) <sub>4</sub>		265	VICK
<i>Gcha 18</i>	(AAG) <sub>4</sub>		305	PET
<b>Multiplex B</b>		58		
<i>Gcha 08</i>	(AATA) <sub>3</sub>		285	FAM
<i>Gcha 10</i>	(AAC) <sub>4</sub>		244	NED
<i>Gcha 21</i>	(TAGC) <sub>3</sub>		310	VICK
<i>Gcha 33</i>	(CAAC) <sub>3</sub>		330	PET
<b>Multiplex C</b>		58		
<i>Gcha 02</i>	(GCG) <sub>4</sub>		249	FAM
<i>Gcha 05</i>	(AT) <sub>6</sub> -(AATT) <sub>3</sub>		291	NED
<i>Gcha 06</i>	(GGA) <sub>4</sub>		312	VICK
<b>Multiplex D</b>		58		
<i>Gcha 01</i>	(GCC) <sub>4</sub>		238	FAM
<i>Gcha 07</i>	(GGA) <sub>4</sub> -(GGA) <sub>5</sub>		250	NED

**Tabela 4.5.** Frequência alélica e conteúdo polimórfico (PIC) de 12 marcadores microssatélites caracterizados no genoma de *Guadua chacoensis*, obtida a partir de 144 indivíduos de populações nativas e 24 indivíduos de populações cultivadas,  $n = 168$

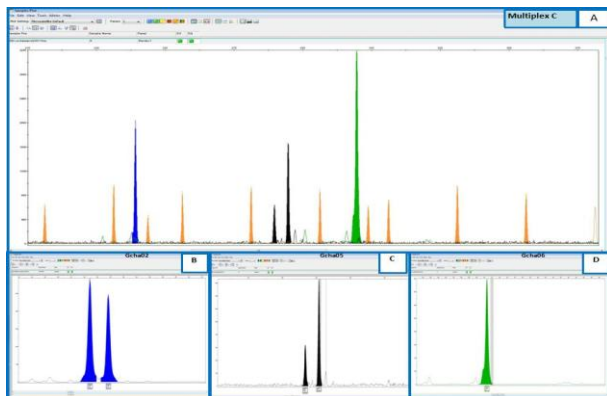
Loco	Frequência					PIC
	Alelo A	Alelo B	Alelo C	Alelo D	Alelo E	
<i>Gcha 01</i>	0,98	0,02				0,046
<i>Gcha 02</i>	0,70	0,27	0,01	0,01	0,01	0,426
<i>Gcha 03</i>	1,00					0,000
<i>Gcha 04</i>	0,98	0,02				0,035
<i>Gcha 05</i>	0,92,	0,08				0,153
<i>Gcha 06</i>	1,00					0,000
<i>Gcha 07</i>	0,99	0,01				0,012
<i>Gcha 08</i>	1,00					0,000
<i>Gcha 09</i>	1,00					0,000
<i>Gcha 10</i>	0,97	0,02	0,01			0,052
<i>Gcha 18</i>	1,00					0,000
<i>Gcha 21</i>	0,96	0,04				0,069



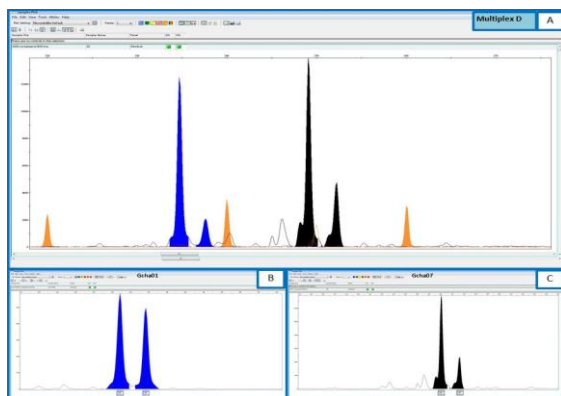
**Figura 4.3.** Imagem da genotipagem dos amplicons do multiplex “A”, revelado na plataforma ABI 3500 XL para a espécie *Guadua chacoensis*, A) amplicons para os locos *Gcha 04*, *Gcha 09*, *Gcha 03* e *Gcha 18* amplificados em conjunto, comparados com o marcador de peso molecular GeneScan 600 LIZ® (laranja); B) destaque para o loco *Gcha 04* em reação de amplificação dentro do multiplex A; C) destaque para o loco *Gcha 09* em reação de amplificação dentro do multiplex A; D) destaque para o loco *Gcha 03* em reação de amplificação dentro do multiplex A; E) destaque para o loco *Gcha 18* em reação de amplificação dentro do multiplex A.



**Figura 4.4.** Imagem da genotipagem dos amplicons do multiplex “B”, revelado na plataforma ABI 3500 XL para a espécie *Guadua chacoensis*, A) amplicons para os locos *Gcha 08*, *Gcha 10*, *Gcha 21* e *Gcha 33*, amplificados em conjunto, comparados com o marcador de peso molecular GeneScan 600 LIZ® (laranja); B) destaque para o loco *Gcha 08* em reação de amplificação dentro do multiplex B; C) destaque para o loco *Gcha 10* em reação de amplificação dentro do multiplex B; D) destaque para o loco *Gcha 21* em reação de amplificação dentro do multiplex B; E) destaque para o loco *Gcha 33* em reação de amplificação dentro do multiplex B.



**Figura 4.5.** Imagem da genotipagem dos amplicons do multiplex “C”, revelado na plataforma ABI 3500 XL para a espécie *Guadua chacoensis*, A) amplicons para os locos *Gcha 02*, *Gcha 05* e *Gcha 06*, amplificados em conjunto, comparados com o marcador de peso molecular GeneScan 600 LIZ® (laranja); B) destaque para o loco *Gcha 02* em reação de amplificação dentro do multiplex C; C) destaque para o loco *Gcha 05* em reação de amplificação dentro do multiplex C; D) destaque para o loco *Gcha 06* em reação de amplificação dentro do multiplex C.



**Figura 4.6.** Imagem da genotipagem dos amplicons do multiplex “D”, revelado na plataforma ABI 3500 xL para a espécie *Guadua chacoensis*, A) amplicons para os locos *Gcha 01* e *Gcha 07*, amplificados em conjunto, comparados com o marcador de peso molecular GeneScan 600 LIZ® (laranja); B) destaque para o loco *Gcha 01* em reação de amplificação dentro do bplex D; C) destaque para o loco *Gcha 07* em reação de amplificação dentro do bplex D.

#### 4.6. Discussão

Atualmente, o conteúdo AT e GC genômico vem sendo empregado em estudos de ecologia evolutiva em monocotiledôneas (Smarda et al., 2014). Os locos microssatélites com repetições AT e TA foram os mais frequentes no genoma de *G. chacoensis*, estando de acordo com o relatado em estudos com outras espécies de bambu (Liu et al., 2012), assim como em outros vegetais, a exemplo de *Zea mays*, *Oriza sativa*, *Beta vulgaris* e *Arabidopsis thaliana*, ao passo que em genomas animais é observado maior conteúdo C+G e consequentemente maior concentração de locos com este conteúdo (Beven et al., 1998; Kubo et al., 2000; Barow; Meister, 2002; McCouch et al., 2002; Jaillon et al., 2004; Yu et al., 2012).

A elevada frequência de motivos dinucleotídeos e trinucleotídeos em microssatélites é citada para o bambu *Dendrocalamus latiflorus* (Bhandawat et al., 2015) e em outras espécies vegetais, como *Pinus taeda* e *Picea glauca* (Bérubé et al., 2007). Estes motivos microssatélites são reportados como mais informativos, devido ao maior polimorfismo, em comparação aos motivos maiores, como tetranucleotídeos a hexanucleotídeos (Samadi et al., 1998, Bérubé et al., 2007; Correia, 2011).

Dentre os locos caracterizados, em que foi confirmado polimorfismo, neste trabalho, somente o loco *Gcha 05* (dinucleotídeo + tetranucleotídeo) e o *Gcha 21* (tetranucleotídeo) não possuem motivo microssatélites trinucleotídeo, demonstrando que estes motivos foram informativos também em sequências de *Guadua chacoensis*. Entretanto, os valores de número de alelos e PIC demonstram reduzida diversidade para estes locos em comparação a outras espécies, em que locos microssatélites apresentam maior polimorfismo (Hammami et al., 2014; Cubry et al., 2014). Contudo, este tipo de resultado pode ser uma característica intrínseca aos bambus, pois resultados similares também foram verificados na espécie *Dendrocalamus giganteus* (Tian et al., 2012). É relevante mencionar que, estes estimadores e valores podem estar viesados em razão de características intrínsecas dos bambus, como a peculiar forma de propagação vegetativa, formando elevado número de clones.

O ciclo fenológico e a biologia reprodutiva da espécie podem ser apontados como causas do reduzido polimorfismo encontrado neste estudo. A floração e a possível recombinação alélica em bambus são governadas por fatores ambientais ainda não bem não elucidados (Campanello et al., 2007). Nesta espécie, a floração ocorre em intervalos de aproximadamente 31 anos (Areta et al., 2009).

A distribuição do pólen é predominantemente através do vento e as sementes são predominantemente distribuídas pela fauna associada, principalmente pássaros da espécie *Tiaris fuliginosa*. Além disto, e este comportamento reprodutivo é encontrado também em outras espécies de bambus lenhosos (Areta; Bodrati, 2008; Monti et al., 2011a). De maneira geral, esta estratégia não favorece muito a rapidez na fixação ou disseminação de novos alelos (Eriksson, 1997). Porém, pouco se conhece a respeito dos efeitos do comportamento reprodutivo na ecologia e estrutura das populações de bambu (Budke et al., 2010; Monti et al., 2011b).

O conteúdo polimórfico de cada loco microssatélites desenvolvido neste trabalho deve ser considerado conservador, pois pode variar com a análise de outras populações, uma vez que este foi o primeiro estudo com os referidos locos. Neste sentido, outras populações, distantes geograficamente daquelas já testadas, devem ser empregadas em estudos genéticos com estes mesmos marcadores aqui desenvolvidos. Assim, será possível acumular dados e ter estimativas mais acuradas do potencial polimórfico de cada loco.

Contudo, os locos polimórficos encontrados neste estudo representam um avanço para estudos genéticos com a espécie *Guadua*

*chacoensis*, bem como para outras espécies nas quais é possível a transferibilidade dos locos desenvolvidos. Devido aos microssatélites apresentarem natureza co-dominante e possuírem elevado grau informativo do genoma. Permitindo a novas pesquisas genéticas com a espécie empregando estas ferramentas.

#### 4.7. Conclusão

Através do sequenciamento de fragmentos do genoma nuclear de *Guadua chacoensis* foi possível identificar, validar e caracterizar 12 locos microssatélites, dos quais, até agora, sete são polimórficos, imediatamente passíveis de serem empregados em estudos genéticos da espécie. Os cinco locos que com os testes realizados não apresentaram polimorfismo necessitam de testes com DNAs de indivíduos de outras populações a serem coletadas em outras localidades. Há também a necessidade de realizar testes e caracterizar os demais locos microssatélites encontrados neste estudo, porém ainda não caracterizados. Caso outros sejam polimórficos, seu uso pode proporcionar maior robustez e maior poder de exclusão em estudos genéticos futuros.

#### 4.8. Referências

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, p. 403-410, 1990.
- ANDERSON, J. A.; CHURCHILL, G. A.; AUTRIQUE, J. E.; TANKSLEY, S. D.; SORRELS, M. E. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. **Genome**, v. 36, p. 181-186, 1993.
- ANDRADA, A. R.; LOZZIA, M. E.; CRISTÓBAL, M. E. Contribución al conocimiento citológico de *Guadua chacoensis*. **Lilloa**, v. 44, p. 3-6, 2007.
- ARETA, J. L.; BODRATI, A. Comportamiento, identificación y relación con la floración de cañas del espiguero negro (*Tiaris fuliginosa*) en Misiones, Argentina. **Hornero**, v. 23, n. 2, p. 77-86, 2008.

- ARETA, J. I.; BODRATI, A.; COCKLE, K. Specialization on *Guadua* Bamboo seeds by three bird species in the Atlantic forest of Argentina. **Biotropica: The Journal of Tropical Biology and Conservation**, v. 41, n. 1, p. 66-73, 2009. DOI:10.1111/j.1744-7429.2008.00458.x.7
- BAROW, M.; MEISTER, A. Lack of correlation between AT frequency and genome size in higher plants and the effect of nonrandomness of base sequences on dye binding. **Cytometry**, v. 47, p. 1-7, 2002. DOI 10.1002/cyto.10030.
- BÉRUBÉ, Y.; ZHUANG, J.; RUNGIS, D.; RALPH, S.; BOHLMANN, J.; RITLAND, K. Characterization of EST-SSRs in loblolly pine and spruce. **Tree Genetics & Genomes**, v. 3, p. 251-259, 2007. DOI 10.1007/s11295-006-0061-1.
- BEVEN, M.; BANCROFT, I.; BENT, E.; LOVE, K.; GOODMAN, H.; DEAN, C.; BERGKAMP, R.; DIRKSE, W.; STAVAREN, V.; STIEKEMA, W.; DROST, L.; RIDLEY, P.; HUDSON, S. A.; PATELL, K.; MURPHY, G.; PIFFANELLI, P.; WEDLER, H.; WEDLER, E.; WAMBUTT, R.; WEITZENEGGER, T.; POHL, T. M.; TERRY, N.; GIELEN, J.; VILLARROE, R.; DE CLERCK, R.; VAN MONTAGU, M.; LECHARNY, A.; AUBORG, S.; GY, I.; KREIS, M.; LAO, N.; KAVANAGH, T.; HEMPEL, S.; KOTTER, P.; ENTIAN, K. D.; RIEGER, M.; MONTFORT, A.; PONS, A.; PUIGDOMENECH, P.; DOUKA, A.; COUKELATOU, E.; MILIONI, D.; HARZOPOULOS, P.; PIRAVANDI, E.; OBERMAIER, B.; HILBERT, H.; DÜSTERHÖFT, A.; MOORES, T.; JONES, J. D. G.; ENEVAL, T.; PALME, K.; BENES, V.; RECHMAN, S.; ANSORGE, W.; COOKE, R.; BERGER, C.; DELSENY, M.; VOET, M.; VOLCKAERT, G.; MEWES, H. W.; KLOSTERMAN, S.; SCHUELLER, C.; CHALWATZIS. Analysis of 1.9 Mb of contiguous sequence from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 391, n. 29, p. 485-493, 1998.
- BHANDAWAT, A.; SINGH, G.; RAINA, A. S.; KAUR, J.; SHARMA, R. K. Development of genic SSR marker resource from RNA-Seq data in *Dendrocalamus latiflorus*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 2015. DOI:10.1007/s13562-015-0323-9.

- BUDKE, J. C.; ALBERTI, M. S.; ZANARDI, C.; BARATTO, C.; ZANIN, E. M. Bamboo dieback and tree regeneration responses in a subtropical forest of South America. **Forest Ecology and Management**, v. 260, p. 1345-1349, 2010. DOI:10.1016/j.foreco.2010.07.028.
- CAMPANELLO, P. I.; GATTI, M. G.; ARES, A.; MONTTI, L.; GOLDSTEIN, G. Tree regeneration and microclimate in a liana and bamboo-dominated semideciduous Atlantic Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 252, p. 108-117, 2007. DOI:10.1016/j.foreco.2007.06.032.
- CLARK, L. G. Diversification and endemism in and woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, v. 15, n. 1, p. 14-19, 2001.
- Clark LG, Londoño X, Ruiz-Sanchez E (2015) Bamboo taxonomy and habitat. In: Liese W, Kohl M (eds) *Bamboo, Tropical forestry*. Springer International Publishing, Switzerland, pp 1–30.
- CORREIA, Leandro Queiroz. **Avaliação comparativa de SNP's e microssatélites para identificação individual, determinação de parentesco e ancestralidade em espécies de *Eucalyptus***. Dissertação de mestrado - Universidade Católica de Brasília. Brasília-DF, 2011.
- CUBRY, P.; PUJADE-RENAUD, V.; GARCIA, D.; ESPEOUT, S.; GUEN, V. L.; GRANET, F.; SEGUIN, M. Development and characterization of a new set of 164 polymorphic EST-SSR markers for diversity and breeding studies in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). **Plant Breeding**, v. 133, p. 419-426, 2014. DOI:10.1111/pbr.12158.
- ERIKSSON, G. Sampling for genetic resources populations in the absence of genetic knowledge. **Noble Hardwoods Network**, p. 61-75, 1997.
- GUERREIRO, C. Flowering cycles of woody bamboos native to southern south America. **Journal of Plant Research**, v. 127, p. 307-3013, 2014. DOI 10.1007/s10265-013-0593-z.



- HAMMAMI, R.; JOUVE, N.; SOLER, C.; FRIEIRO, E.; GONZÁLEZ, J. M. Genetic diversity of SSR and ISSR markers in wild populations of *Brachypodium distachyon* and its close relatives *B. stacei* and *B. hybridum* (Poaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, p. 2029-2040, 2014. DOI:10.1007/s00606-014-1021-0.
- JAILLON, O.; AURY, J. M.; BRUNET, F.; PETIT, J. L.; THOMANN, N. S.; MAUCELL, E.; BOUNEAU, L.; FISCHER, C.; OZOUF-COSTAZ, C.; BERNOT, A.; NICAUD, S.; JAFFE, D.; FISHER, S.; LUTFALLA, G.; DOSSAT, C.; SEGURENS, B.; DASILVA, C.; SALANOUBAT, M.; LEVY, M.; BOUDET, N.; CASTELLANO, S.; ANTHOUARD, V.; JUBIN, C.; CASTELLI, V.; KATINKA, M.; VACHERIE, B.; BIÉMONT, C.; SKALLI, Z.; CATTOLICO, L.; POULAIN, J.; BERARDINIS, V.; CRUAUD, C.; DUPRAT, S.; BROTTIER, P.; COUTANCEAU, J. P.; GOUZY, J.; PARRA, G.; LARDIER, G.; CHAPPLE, C.; McKERNAN, K. J.; McEWAN, P.; BOSAK, S.; KELLIS, M.; VOLFF, J. N.; GUIGO, R.; ZODY, M. C.; MESIROV, J.; LINDBLAD-TOH, K.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; KAHN, D.; ROBINSON-RECHAVI, M.; LAUDET, V.; SCHACHTER, V.; QUÉTIER, F.; SAURIN, W.; SCARPELLI, C.; WINCKER, P.; LANDER, E. S.; WEISSENBACH, J.; CROLLIUS, H. R. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. **Nature**, v. 431, n. 21, 2004.
- JANZEN, D. H. Why bamboos wait so long to flower. **Annual Reviews Ecology Systematics**, v. 7, p. 347-391, 1976.
- KELCHNER, S. A.; GROUP, B. P. Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 67, n. 2, p. 404-413, 2013. doi:10.1016/j.ympev.2013.02.005.
- KUBO, T.; NISHIZAWA, S.; SUGAWARA, A.; ITCHODA, N.; ESTIATI, A.; MIKAMI, T. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA<sup>Cys</sup>(GCA). **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 13, p. 2571-2576, 2000.

- LIU, M.; QIAO, G.; JIANG, J.; YANG, H.; XIE, L.; XIE, J.; ZHUO, R. Transcriptome sequencing and *de novo* analysis for Ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus* Munro) using the illumina platform. **PlosOne**, v. 7, n. 10, 2012.
- MAIA, L. C.; PALMIERI, D. A.; SOUZA, V. Q.; KOPP, M. M.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. SSR Locator: Tool for Simple Sequence Repeat Discovery Integrated with Primer Design and PCR simulation. **Internacional Journal of Plant Genomics**, v. 2008, 2008. DOI:10.1155/2008/412696.
- MAROOF, M. A.; S.; BIYASHEV, R. M.; YANG, G. P.; ZHANG, Q.; ALLARD, W. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 5466-5470, 1994.
- MARULANDA, M. L.; LÓPEZ, A. M.; CLAROZ, J. L. Analyzing the genetic diversity of *Guadua* spp. In Colombia using rice and sugarcane microsatellites. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 7, p. 43-51, 2007.
- McCOUCH, S.; R.; TEYTELMAN, L.; XU, KATARZYNA, B. LOBOS, CLARE, K.; WALTON, M.; FU, B.; MAGHIRANG, R.; LI, Z.; XING, Y.; ZHANG, Q.; KONO, I.; YANO, M.; FJELLSTROM, R.; DECLERCK, G.; SCHNEIDER, D.; CARTINHO, S.; WARE, D.; STEIN, L. Development and mapping of 2240 new SSR Markers for rice (*Oriza sativa* L.). **DNA Research**, v. 9, p. 199-207, 2002.
- MONTTI, L.; CAMPANELLO, P. I.; GOLDSTEIN, G. Flowering, die-back and recovery of a semelparous woody bamboo in the Atlantic Forest. **Acta Oecologica**, v. 37, p. 361-368, 2011a. DOI:10.1016/j.actao.2011.04.004.
- MONTTI, L.; CAMPANELLO, P. I.; GATTI, M. G.; BLUNDO, C.; AUSTIN, A. T.; SALA, O. E.; GOLDSTEIN, G. Understory bamboo flowering provides a very narrow light window of opportunity for canopy-tree recruitment in a neotropical forest of Misiones, Argentina. **Forest Ecology and Management**, v. 262, p. 1360-1369, 2011b. DOI:10.1016/j.foreco.2011.06.029.

- POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 7, p. 215-222, 1996.
- RINCÓN, J. C. V.; CASTILLO, N. R. Estimación de la duración del ciclo celular y estandarización del protocolo citogenético en *Guadua angustifolia* Kunth var. *angustifolia* (Bambusoideae, Poaceae). **Revista de Investigaciones - Universidad del Quindío**, v. 23, n. 2, p. 81-91, 2012.
- SMARDA, P.; BURES, P.; HOROVÁ, L.; LEITCH, I. J.; MUCINA, L.; PACINI, E.; TICHÝ, L.; GRULICH, V.; ROTREKLOVÁ, O. Ecological and evolutionary significance of genomic GC content diversity in monocots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 39, p. E4096-E4102, 2014. DOI:10.1073/pnas.1321152111.
- TIAN, B.; YANG, H-Q.; WONG, K-M.; LIU, A-Z.; RUAN, Z-Y. ISSR analysis shows low genetic diversity versus high genetic differentiation for giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* (Poaceae: Bambusoideae), in China populations. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, p. 901-908, 2012. DOI:10.1007/s10722-011-9732-3.
- TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967-981, 2000.
- VIEIRA, L. N.; ANJOS, K. G.; FAORO, H.; FRAGA, H. P. F.; GRECO, T. M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; ROGALSKI, M.; SOUZA, R. F.; GUERRA, M. P. Phylogenetic inference and SSR characterization of tropical woody bamboos tribe Bambuseae (Poaceae: Bambusoideae) based on complete plastid genome sequences. **Current Genetics**, 2015. DOI 10.1007/s00294-015-0549-z.
- RUGELES SILVA, P. A.; POSSO-TERRANOVA, A. M.; LODOÑO, X.; BARRERA-MARÍN, N.; MUÑOS-FLÓREZ, J. E. Caracterización molecular de *Guadua angustifolia* Kunth mediante marcadores RAM's. **Acta Agronómica**, v. 61, n. 4, p. 325-330, 2012.

- SAMADI, S.; ARTIGUEBIELLE, E.; ESTOUP, A.; POINTIER, J. P.; SILVAIN, J. F.; HELLER, J.; CARIOU, M. L.; JARNE, P. Density and variability of dinucleotide microsatellites in the parthenogenetic polyploid snail *Melanoides tuberculata*. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1233-1236, 1998.
- VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **TRENDS in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005. doi:10.1016/j.tibtech.2004.11.005.
- WHEELER, D. L.; BARRET, T.; BENSON, D. A.; BRYANT, S. H.; CANESE, K.; CHETVERNIN, V.; CHURCH, D. M.; DICUCCIO, M.; EDGAR, R.; FEDERHEN, S.; GEER, L. Y.; KAPUSTIN, Y.; KHOVAYKO, O.; LANDSMAN, D.; LIPMAN, D. J.; MADDEN, T. L.; MAGLOTT, D. R.; OSTELL, J.; VILLER, V.; PRUITT, K. D.; SCHULER, G. D.; SEQUEIRA, E.; SHERRY, S. T.; SIROTKIN, K.; SOUVOROV, A.; STARCHENKO, G.; TATUSOV, R. L.; TATUSOVA, T. A.; WAGNER, L.; YASCHENKO, E. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. D5-D12, 2007. DOI:10.1093/nar/gkl1031.
- YU, M.; HON, G. C.; SZULWACH, K. E.; SONG, C. X.; ZHANG, L.; KIM, A.; LI, X.; DAI, Q.; SHEN, Y.; PARK, B.; MIN, J. H.; JIN, P.; REN, B.; HE, C. Base-Revolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. **Cell**, 149, p. 1368-1380, 2012. DOI:10.1016/j.cell.2012.04.027.
- YUMING, Y.; KANGLIN, W.; SHENGJI, P.; JIMING, H. Bamboo diversity and traditional uses in Yunnan, China. **BioOne**, v. 24, n. 2, p. 157-165, 2004. DOI:10.1659/0276-4741(2004)024[0157:BDATUI]2.0.CO;2.
- ZANG, Y. J.; MA, P. F.; LI, D. Z. High-throughput sequencing of six bamboo chloroplast genomes: phylogenetic implications for temperate woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **PlosOne**, v. 6, n. 5, 2011, DOI:10.1371/journal.pone.0020596.

## 5. CAPITULO II DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P M

### 5.1. Resumo

O objetivo deste trabalho foi utilizar marcadores microsatélites desenhados para a espécie *Guadua chacoensis* visando caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações naturais desta espécie. Foram amostradas seis populações nativas da espécie *G. chacoensis* (denominadas de AF, EF, BF, CF, PF e IF), dentro do Parque Nacional do Iguaçu BR, totalizando 575 indivíduos amostrados. Destes, o DNA extraído foi utilizado para amplificar 12 locos microsatélites em reações de PCR. Posteriormente os fragmentos amplificados foram analisados em eletroforese capilar, na plataforma ABI 3500 XL. Os dados desta genotipagem foram usados para estimar as frequências alélicas, percentagem de locos polimórficos, número total de alelos, número médio de alelos por loco, número médio de alelos por loco polimórfico, heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), índice de fixação ( $f$ ), estatísticas F de Wright, bem como a distância e identidade genética de NEI. Dos 12 testados, 3 (25%) locos foram polimórficos, sendo *Gcha 02*, o loco com maior número de alelos (5). Nas populações PF, EF e AF foram identificados alelos privados para os locos *Gcha 02*, *Gcha 21* e *Gcha 05*, respectivamente. A maior distância genética foi observada entre as populações IF e as demais EF, AF e CF (0,150). As populações IF e PF apresentaram reduzida diferença genética em comparação às demais populações amostradas, que, por sua vez, apresentaram elevada similaridade. A estrutura populacional demonstrou que a maior diversidade genética encontrada está dentro e não entre populações. As populações amostradas apresentaram elevada identidade genética, com alto número de migrantes. Estes resultados sugerem que as populações amostradas, mesmo isoladas dentro do mesmo contínuo florestal, podem ser parte de uma população maior, com elevado fluxo gênico entre si, ou apresentam altas taxas de multiplicação vegetativa, ou ainda os espaçados eventos mitóticos são ineficazes na produção de recombinantes, pois a homozigose das plantas deve estar elevada, contudo são necessários outros estudos com maior número de marcadores para comprovar os resultados obtidos. Com base no que foi constatado, as populações de *G. chacoensis* presentes no Parque Nacional do Iguaçu apresentam reduzido polimorfismo nos locos microsatélites empregados neste estudo.

**Palavras-Chave:** Bambu, polimorfismo, Estrutura genética

## 5.2. Abstract

The aim of this study was to use the microsatellite markers designed for *Guadua chacoensis* to characterize genetic diversity and structure of naturally occurring populations of this species. Six populations within the Iguaçu National Park BR were sampled (AF, EF, LF, CF, PF, and IF), totaling 575 individuals. The extracted DNA was used to amplify 12 microsatellite loci in PCR reactions. Subsequently, the amplified fragments were analyzed by capillary electrophoresis on ABI 3500 XL platform. The genotyping data were used to estimate the allele frequencies, percentage of polymorphic loci, total number of alleles, average number of alleles per locus, mean number of alleles per polymorphic locus, observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity, fixation index ( $f$ ), Wright's F statistics as well as NEI's genetic distance and identity. Among the 12 microsatellite loci evaluated, 3 (25%) were polymorphic, and Gcha 02 presented the highest number of alleles (5). Private alleles were identified in PF (Gcha 02), EF (Gcha 21), and AF (Gcha 05) populations. The largest genetic distance (0.150) was observed between IF and other populations (EF, AF, and CF). The IF and PF populations showed reduced genetic difference compared with other populations sampled, which, in turn, showed high similarity. The population structure analysis shown that the greater genetic diversity is within and not between populations. The sampled populations showed high genetic identity, with a high number of migrants. These results suggest that populations sampled, even isolated in the same forest solid, may be: part of a larger population with high gene flow between them; present high rates of vegetative propagation; the spaced mitotic events are ineffective in producing recombinants. Although, further studies are needed with larger numbers of markers to confirm these results. According to our results, *G. chacoensis* populations from the Iguaçu National Park have reduced polymorphism in the microsatellite loci used in this study.

**Key words:** Bamboo. Polymorphism. Genetic structure.

### 5.3. Introdução

Marcadores microssatélites (SSR), são marcadores codominantes, por distinguirem heterozigotos de homozigotos (Powell et al., 1996), possuem herança mendeliana e, normalmente, elevado polimorfismo, pois cada loco microssatélites pode conter inúmeros alelos e, com isto, elevado poder de exclusão, permitindo realizar inferências de estimadores da genética populacional, forças evolutivas e seleção de genótipos (Selkoe; Toonen, 2006; Ellstrand, 2014; Shahriar et al., 2014).

O emprego de marcadores microssatélites tem sido frequente em estudos de diversidade e estrutura populacional, assim como para compreender forças evolutivas presentes em populações naturais de inúmeras espécies vegetais, como fixação alélica ou fluxo gênico entre e dentro de populações (Lian et al., 2001; Bittencourt; Sebbenn, 2007). Contudo, em bambu (Poaceae: Bambusoideae), os estudos genéticos ainda utilizam, em sua maioria, marcadores dominantes, como RAPD e AFLP, principalmente visando conhecer as distâncias genéticas e diversidade existente entre espécies (Loh et al., 2000; Nayak et al., 2003; Ramanayake et al., 2007). Este fato se deve principalmente ao pouco conhecimento do seu genoma para desenho de marcadores flanqueadores de regiões microssatélites.

Outro avanço está relacionado com o sucesso na transferibilidade de marcadores microssatélites de espécies de gramíneas, como *Saccharum officinarum* e *Oryza sativa* para espécies de bambu (Sharma et al., 2008). Igualmente importante foram os estudos que relatam sucesso na transferibilidade de marcadores microssatélites entre espécies de bambu, com isto gerando subsídios científicos para avanço do conhecimento da diversidade genética das populações destas espécies secundárias da subfamília Bambusoideae (Kaneko et al., 2008; Sharma et al., 2009).

Atualmente, os estudos genéticos populacionais com marcadores moleculares, realizados para bambu, têm como alvo espécies do continente asiático. Como *Bashania fangiana*, em que foi verificada elevada diversidade genética em populações, contudo, clones também estão presentes em raios de aproximadamente 30 metros (Ma et al., 2013). Foi elucidado também comportamento reprodutivo e biologia floral da espécie *Sasa veitchii* var. *hirsuta* (Matsuo et al., 2014) e a influência de fatores bióticos e abióticos na história evolutiva de *Ceracris kiangsu* (Fan et al., 2014). Bem como o desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Phyllostachys edulis* (Jiang et al., 2013).

Por outro lado, as informações genéticas a respeito da diversidade e estrutura genética em populações da maioria das espécies de bambu são escassas. Tratando-se dos bambus nativos da América do Sul, como *Guadua chacoensis*, há poucas informações acerca da diversidade ou da estrutura genética de suas populações nativas. Desta forma, o objetivo com este trabalho foi caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Guadua chacoensis* com a utilização de marcadores microssatélites específicos à espécie.

#### 5.4. Material e Métodos

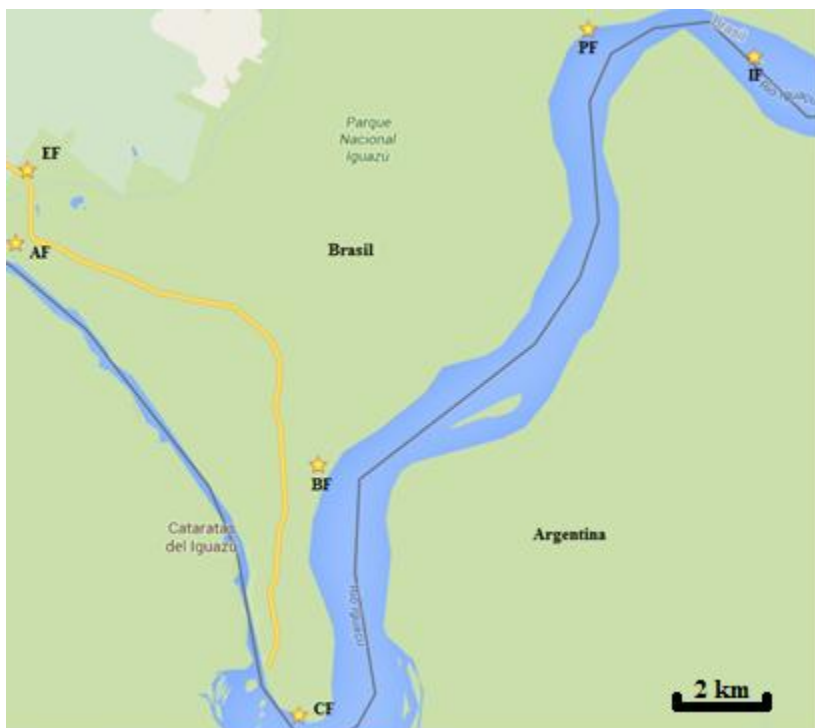
Foram amostradas seis populações nativas da espécie *Guadua chacoensis*, dentro do Parque Nacional do Iguaçu (Tabela 5.1), em que foram coletados ao total 575 indivíduos, dos quais 110 indivíduos das populações de Poço Preto (PF, 25° 37' 40" S, 54° 27' 46" W), Entrada do Parque (EF, 25° 36' 54" S, 54° 28' 39" W) e Macuco Ecoaventura trilha das Bananeiras (BF, 25° 39' 24" S, 54° 25' 54" W), 101 indivíduos da população Administração do Parque (AF, 25° 37' 31" S, 54° 28' 45" W) e 72 indivíduos das populações Cataratas (CF, 25° 41' 28" S, 54° 26' 10" W) e Ilha das Taquaras (IF, 25° 35' 57" S, 54° 21' 49" W), conforme ilustrado na Figura 5.1.

**Tabela 5.1** Distância geográfica entre populações da espécie *Guadua chacoensis* coletadas para análise de genética populacional, em fragmento nativo de Mata Atlântica, no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR, Brasil

	PF	EF	BF	AF	CF
EF	9,13 km				
BF	8,08 km	6,52 km			
AF	9,71 km	1,22 km	5,81 km		
CF	11,56 km	9,57 km	3,90 km	9,46 km	
IF	2,66 km	11,46 km	9,35 km	11,61 km	12,54 km

As coletas foram realizadas com a autorização n°. 45390 expedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) SISBIO. Cada amostra consistiu de aproximadamente 10 g de tecido do limbo foliar fresco de cada indivíduo amostrado e uma exsicata por população coletada. As amostras foram embaladas e desidratadas individualmente utilizando sílica gel e as exsicatas foram herborizadas e depositadas no herbário FLOR, sob a custódia da Universidade Federal de Santa Catarina.





**Figura 5.1** Distribuição das populações da espécie *Guadua chacoensis* coletadas para estudos de genética populacional, no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

A extração do DNA e genotipagem foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV/UFSC). Para extração do DNA foi utilizado o kit comercial Nucleo Spin Plant II (Macherey-Nagel), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, o DNA foi quantificado via espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) e eletroforese horizontal em gel de agarose [0,8%], seguido de diluição em água ultrapura (mili-Q) para solução trabalho de DNA na concentração de  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ .

As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para genotipagem dos indivíduos foram realizadas utilizando o mastermix comercial KAPA2G Fast Multiplex PCR kit (Biosystems) (3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dNTPs e 1U de DNA Polimerase, para concentração de 1X), com volume de reação de  $5 \mu\text{L}$  (Tabela 5.2). A termociclagem

ocorreu em termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems), com a seguinte ciclagem: em ciclo em 95 °C durante 3 min; 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 58°C durante 30 s e 72 °C durante 1 min., seguido de extensão final de 72 °C durante 40 min. As reações foram realizadas em conjuntos de multiplex empregando marcadores marcados com fluorescências distintas para marcadores do mesmo conjunto (Tabela 5.3).

**Tabela 5.2** Concentrações de reagentes para a reação de PCR utilizando marcadores microssatélites para a espécie *Guadua chacoensis*

Reagente	Concentração Inicial	Concentração Final
Kapa 2G	2 X	1 X
<i>Gcha 03</i> f	10 µM	20 pM
<i>Gcha 03</i> r	10 µM	20 pM
<i>Gcha 04</i> f	10 µM	40 pM
<i>Gcha 04</i> r	10 µM	40 pM
<i>Gcha 09</i> f	10 µM	10 pM
<i>Gcha 09</i> r	10 µM	10 pM
<i>Gcha 18</i> f	10 µM	20 pM
<i>Gcha 18</i> r	10 µM	20 pM
<i>Gcha 08</i> f	10 µM	40 pM
<i>Gcha 08</i> r	10 µM	40 pM
<i>Gcha 10</i> f	10 µM	30 pM
<i>Gcha 10</i> r	10 µM	30 pM
<i>Gcha 21</i> f	10 µM	40 pM
<i>Gcha 21</i> r	10 µM	40 pM
<i>Gcha 02</i> f	10 µM	30 pM
<i>Gcha 02</i> r	10 µM	30 pM
<i>Gcha 05</i> f	10 µM	20 pM
<i>Gcha 05</i> r	10 µM	20 pM
<i>Gcha 06</i> f	10 µM	20 pM
<i>Gcha 06</i> r	10 µM	20 pM
<i>Gcha 01</i> f	10 µM	12 pM
<i>Gcha 01</i> r	10 µM	12 pM
<i>Gcha 07</i> f	10 µM	20 pM
<i>Gcha 07</i> r	10 µM	20 pM
Amostra de DNA	10 ng	10 ng

**Tabela 5.3** Temperatura de anelamento ( $T_a$  °C), tamanho esperado e fluorescência para cada um dos locos agrupados em conjuntos de multiplex utilizados na caracterização de marcadores para loci microssatélites em genoma de *Guadua chacoensis*

Loco	$T_a$ °C	Tamanho esperado	Fluorescência
<b>Multiplex A</b>	58		
<i>Gcha 03</i>		289	FAM
<i>Gcha 04</i>		239	NED
<i>Gcha 09</i>		265	VICK
<i>Gcha 18</i>		305	PET
<b>Multiplex B</b>	58		
<i>Gcha 08 F</i>		285	FAM
<i>Gcha 10 F</i>		244	NED
<i>Gcha 21 F</i>		310	VICK
<b>Multiplex C</b>	58		
<i>Gcha 02 F</i>		249	FAM
<i>Gcha 05 F</i>		291	NED
<i>Gcha 06 F</i>		312	VICK
<b>Multiplex D</b>	58		
<i>Gcha 01 F</i>		238	FAM
<i>Gcha 07 F</i>		250	NED

Para confirmar a amplificação dos loci microssatélites foi realizada eletroforese horizontal em gel de agarose [2,5%] com 2  $\mu$ L de produto de PCR e 3  $\mu$ L do tampão de carregamento de eletroforese (500  $\mu$ L de tampão de eletroforese + 1  $\mu$ L de gel red), utilizando marcador de peso molecular *ladder* de 100 pb (DNA *ladder*-NORGEN) para verificar o tamanho dos fragmentos gerados.

As amostras amplificadas com sucesso foram utilizadas para genotipagem via eletroforese capilar. Os produtos de PCR foram diluídos na proporção de 1  $\mu$ L de produto de PCR para 10  $\mu$ L de água ultra-pura (Milli-Q), homogeneizados e adicionados ao mix contendo 8,75  $\mu$ L de HiDi™ Formamide (Applied Biosystems) e 0,25  $\mu$ L de GeneScan™ 600 Liz Size Standard v2.0® (Applied Biosystems). O mix foi submetido à desnaturação, aquecido a 95 °C por 5 min e acondicionado em gelo por 3 min, para iniciar a eletroforese capilar, utilizando a plataforma ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Com os dados obtidos da genotipagem dos indivíduos, foram estimadas, as frequências alélicas, os índices de diversidade porcentagem de locos polimórficos, número total de alelos, número médio de alelos por loco, número médio de alelos por loco polimórfico,

heterozigidade observada ( $\hat{H}_o$ ) (Brown; Weir, 1983) e esperada ( $\hat{H}_e$ ) (Nei, 1987), índice de fixação ( $f$ ) e estimadas as estatísticas F de Wright (Wright, 1951), conforme segue:

$$H_o = 1 - \sum p_{ii}$$

Em que:

$H_o$ : heterozigose observada;

$P_{ii}$ : frequência observada de genótipos homozigotos para o alelo  $i$ .

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

Em que:

$H_e$ : heterozigose esperada;

$P_i$ : frequência alélica estimada para o  $i$ -ésimo alelo.

$$f = 1 - \frac{H_o}{H_e}$$

Em que:

$f$ : índice de fixação, ou,  $F_{IS}$ ;

$H_o$ : heterozigose observada;

$H_e$ : heterozigose esperada.

$$F_{st} = 1 - \left( \frac{H_S}{H_T} \right)$$

Em que:

$F_{st}$ : índice de fixação de sub-populações;

$H_S$ : heterozigidade esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg para as populações;

$H_T$ : heterozigidade esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg para a população total.

$$F_{IT} = 1 - \left( \frac{H_I}{H_T} \right)$$

Em que:

$F_{IT}$  : índice de fixação para população;

$H_I$ : heterozigosidade observada obtida pela média de todas as populações;

$H_T$ : heterozigosidade esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg para a população total.

$$N_m = \frac{\left[ \left( \frac{1}{F_{ST}} \right) - 1 \right]}{4 \cdot \left[ \left( \frac{n}{n-1} \right) \right]^2}$$

Em que:

$N_m$  : número de migrantes;

$n$ : número de populações.

A análise estatística foi realizada com auxílio do software GenAlex 6 (Peakall; Smouse, 2006). O dendrograma foi construído utilizando o método “hierárquico do vizinho mais próximo” com base na distância genética de NEI (1972) para os locos polimórficos.

$$D = \ln (I)$$

Em que:

$D$ : Distância genética;

$I$ : identidade genética entre populações; obtido conforme segue:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^m (p_{ix} p_{iy})}{\sqrt{(\sum_{i=1}^m (p_{ix}^2)) (\sum_{i=1}^m (p_{iy}^2))}}$$

Em que:

$I$ : identidade genética entre populações;

$p_{ix}$ : frequência do alelo  $i$  na população  $x$ ;

$p_{iy}$ : frequência do alelo  $i$  na população  $y$ ;

$m$ : número de alelos por loco.

## 5.5. Resultados

Com os 12 locos microssatélites utilizados na genotipagem, foram obtidos 18 alelos, dos quais, dois foram privados para a população EF, no loco *Gcha 21*, um para a população PF, no loco *Gcha 02* e um para a população AF, no loco *Gcha 05* (Tabela 5.5). Somente a população PF apresentou mais de um loco polimórfico. Foram verificados dois alelos raros (frequência inferior a 1%), um para a população AF no loco *Gcha 02* e outro na população EF no loco *Gcha 21*, ambos com frequência de 0,5%.

Dentre os indivíduos genotipados, das 6 populações, foi verificado 3 (25%) locos polimórficos, sendo *Gcha 02* o loco com maior número de alelos (Tabela 5.4). Na análise de agrupamento, através do  $F_{st}$  par a par, pode-se observar uma maior diferença genética entre as populações mais distantes (Figura 5.2). A maior distância genética foi observada entre as populações IF e as demais EF, AF e CF (0,150). As populações IF e PF apresentaram diferença genética baixa em contraste entre si e elevada distância genética com as demais populações amostradas, que apresentaram elevada identidade genética entre si (Tabela 5.6).

**Tabela 5.4** Número de alelos encontrados em locos microssatélites polimórficos para seis populações naturais de *Guadua chacoensis* no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR

	PF	EF	BF	AF	IF	CF	Total
<i>Gcha 02</i>	4	1	2	2	2	1	4
<i>Gcha 05</i>	1	1	1	2	1	1	2
<i>Gcha 21</i>	1	3	1	1	1	1	3
TOTAL	6	4	4	5	4	3	9

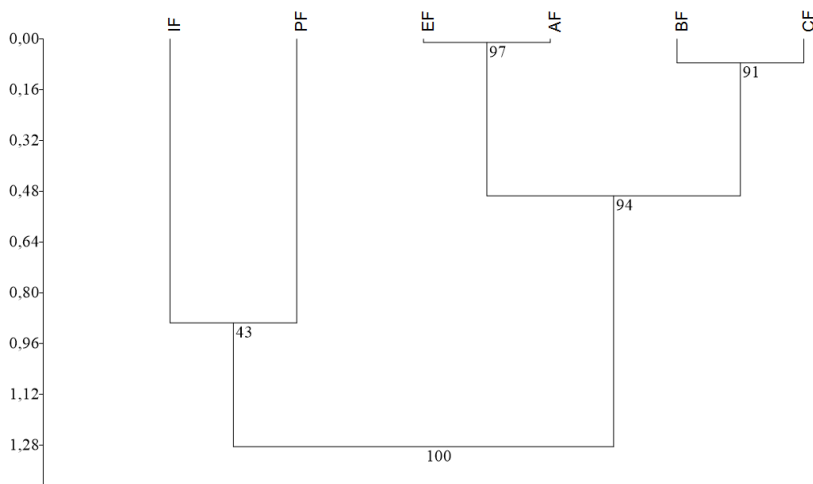
**Tabela 5.5** Alelos privados encontrados em estudo de diversidade genética de populações naturais da espécie *Guadua chacoensis* no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR

População	Loco	Alelo	Frequência (%)
PF	<i>Gcha 02</i>	222	2,3
EF	<i>Gcha 21</i>	280	1,4
EF	<i>Gcha21</i>	300	0,5
AF	<i>Gcha 05</i>	286	2,0

**Tabela 5.6** Distância (abaixo da diagonal) e identidade genética de Nei (acima da diagonal), entre populações naturais da espécie *Guadua chacoensis* no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR

Populações	PF	EF	BF	AF	IF	CF
<b>PF</b>	*	0,943	0,946	0,943	0,981	0,943
<b>EF</b>	0,059	*	1,000	1,000	0,860	1,000
<b>BF</b>	0,056	0,000	*	1,000	0,865	1,000
<b>AF</b>	0,059	0,000	0,000	*	0,861	1,000
<b>IF</b>	0,019	0,150	0,146	0,150	*	0,861
<b>CF</b>	0,059	0,000	0,000	0,000	0,150	*

Devido ao reduzido número de locos polimórficos (25%), somente os locos *Gcha 02*, *Gcha 05* e *Gcha 21* apresentaram mais de um alelo entre os 575 indivíduos genotipados (Tabela 5.7). A heterozigosidade observada e esperada, o índice de fixação e as estatísticas F de Wright foram realizados com os dados destes três locos. Assim, na população CF, onde foi constatada a ocorrência de alelo fixado para todos os locos, não foi possível obter estas estimativas (Tabelas 5.8 e 5.9).



**Figura 5.2** Dendrograma de distância baseado no  $F_{st}$  par a par, utilizando a distância euclidiana, a partir de três locos microssatélites, avaliados em seis populações de *Guadua chacoensis* do Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR.

**Tabela 5.7** Frequência de alelos para locos microssatélites polimórficos entre as populações naturais de *Guadua chacoensis* amostradas no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR

Loco	Alelo	PF	EF	BF	AF	IF	CF
----- Frequência (%) -----							
	222	2,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Gcha	225	3,20	0,00	3,20	0,50	0,00	0,00
02	243	59,50	0,00	0,00	0,00	98,60	0,00
	246	35,00	100,00	96,80	99,50	1,40	100,00
Gcha	286	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00
05	290	100,00	100,00	100,00	98,00	100,00	100,00
Gcha	280	0,00	1,40	0,00	0,00	0,00	0,00
21	300	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
	308	100,00	98,10	100,00	100,00	100,00	100,00

**Tabela 5.8** Índices de diversidade genética de populações naturais de *Guadua chacoensis* no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR

	n	alelos	$\hat{P}_{99\%}$	$\hat{A}$	$\hat{A}_p$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{f}$
PF	110	15	8,33	1,25	4,00	0,074	0,012	0,843
EF	110	14	8,33	1,17	3,00	0,005	0,001	0,746
BF	110	13	8,33	1,08	2,00	0,009	0,009	-0,033
AF	101	14	16,67	1,17	2,00	0,007	0,001	0,498
IF	72	13	8,33	1,08	2,00	0,004	0,000	1,000
CF	72	12	0,00	1,00	1,00	0,000	0,000	1,000
Média	96	13,5	8,33	0,96	2,17	0,017	0,004	0,832

n = tamanho da amostra; alelos = número total de alelos da amostra;  $\hat{P}_{99\%}$  = porcentagem de locos polimórficos;  $\hat{A}$  = número médio de alelos por loco; e  $\hat{A}_p$  = número médio de alelos por loco polimórfico;  $\hat{H}_E$  = heterozigosidade esperada;  $\hat{H}_O$  = heterozigosidade observada e  $\hat{f}$  = índice de fixação.

**Tabela 5.9** Estrutura populacional estimada pelas estatísticas F acessada por marcadores microssatélites em indivíduos de seis populações naturais de *Guadua chacoensis* dentro do Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR

Locos	$F_{is}$	$F_{it}$	$F_{st}$	Nm
<i>Gcha 02</i>	0,750	0,937	0,748	0,084
<i>Gcha 05</i>	1,000	1,000	0,017	14,850
<i>Gcha 21</i>	0,746	0,749	0,012	20,008
<b>Média</b>	0,832	0,895	0,259	11,647
<b>Desvio Padrão</b>	0,146	0,130	0,424	10,341
<b>Int. Conf. (<math>\alpha=0,05</math>)</b>	0,74 - 1,00	0,75 - 1,00	0,01 - 0,76	



## 5.6. Discussão

Neste estudo, foi encontrado reduzido polimorfismo dentro das populações e entre as populações genotipadas, comparativamente a outras espécies da mesma tipologia florestal. Isto se deve provavelmente a (i) reduzida distância geográfica entre as populações amostradas, estando todas dentro de um mesmo contínuo florestal e (ii) ao modo de reprodução, que inclui propagação vegetativa. Resultados semelhantes, com plantas multiplicadas vegetativamente dentro das populações são relatados para a espécie de bambu *Dendrocalamus giganteus* (Tian et al., 2012).

Este cenário deve-se ao comportamento reprodutivo intrínseco dos bambus, com recorrente propagação assexuada destas espécies, passando por ciclos de florescimento e recombinação gênica em intervalos de aproximadamente 31 anos (Guerreiro, 2014). Estas inferências são corroboradas pelos resultados encontrados anteriormente para populações naturais da espécie *Sasa senanensis*, onde é relatado ocorrência de elevada frequência de clones dentro da população (Suyama et al., 2000), reduzindo expressivamente o tamanho efetivo populacional e, conseqüentemente, a diversidade genética dentro da população.

Outros relatos de genética populacional em bambu são limitados e realizados principalmente com marcadores dominantes (Nayak et al., 2003; Yeasmin et al., 2015). Nos estudos com marcadores do tipo microssatélite, o reduzido polimorfismo encontrado nesta pesquisa é também relatado em outras espécies (Suyama et al., 2000; Yang et al., 2012). Também por este fato, estes marcadores são principalmente utilizados para a análise da diversidade genética entre espécies de bambu (Sharma et al., 2009). Contudo, devido a abordagem distinta, não é possível a comparação dos estimadores populacionais, com os resultados obtidos no presente trabalho.

Estudo populacional com espécies de bambu, no bioma Mata Atlântica, corroboram os achados nesta pesquisa, demonstrando que as populações estudadas apresentaram baixo número de locos polimórficos e também reduzido número de alelos por loco (Abreu et al., 2014). Entretanto, elevado número de locos polimórficos e alelos por loco microssatélites foi constatado em acessos da espécie de bambu *Dendrocalamus latiflorus* pertencentes a uma coleção de germoplasma, assim como outras espécies de bambu pertencentes à mesma coleção (Bhandawat et al., 2015).

Assim, existe maior variabilidade genética em espécies de bambu comparativamente ao que foi obtido no presente estudo. Esta

divergência é decorrente da maior variabilidade genética dos indivíduos utilizados para genotipagem, por serem provenientes de distintas populações, pois fazem parte de bancos de germoplasma distintos. É relevante ressaltar que novas abordagens estão sendo empregadas para genotipagem de populações, como o desenvolvimento de marcadores SNPs (Wang et al., 2013).

A estrutura populacional, obtida através das estatísticas  $F$  de Wright, demonstra que há menor distância genética entre as populações IF e PF, que estão geograficamente próximas entre si e distantes das demais, que, apresentaram elevada identidade genética. Assim, com este padrão de estrutura populacional, sugere-se para estudos posteriores redirecionar os esforços de coleta para populações que estejam a maiores distâncias, em razão do alto índice de fixação na população ( $F_{it}$ ), e fluxo gênico entre os indivíduos coletados, sendo menor em populações a maiores distâncias, elevando o  $F_{st}$  observado, reforçando a maior importância de coletas em populações mais afastadas.

Contudo, é importante ressaltar que estes dados estão sob influência do reduzido polimorfismo dos locos estudados e o elevado número de migrantes encontrados está possivelmente distorcido devido aos locos *Gcha 05* e *Gcha 21*, praticamente fixados, elevando o valor do intervalo de confiança. Este efeito é reduzido para o loco *Gcha 02* que, devido ao maior polimorfismo apresenta dados de maior confiabilidade para esta estatística.

Os valores estimados para a estrutura populacional são também prejudicados pelo reduzido polimorfismo encontrado, tornando pouco informativo o intervalo de confiança obtido. A elevada identidade genética presente dentro das populações corrobora com os dados encontrados para a espécie *Sasa cernua*, onde o elevado número de clones foi encontrado dentro de populações, reduzindo o tamanho efetivo das mesmas e elevando a identidade genética (Kitamura; Kawahara, 2009). Este cenário possivelmente está influenciando também as populações estudadas de *G. chacoensis*.

## 5.7. Conclusão

As populações amostradas de *Guadua chacoensis* presentes no Parque Nacional do Iguazu apresentam reduzido polimorfismo para os locos microssatélites empregados. A diversidade e estrutura populacional possível de ser acessada com os marcadores polimórficos demonstraram que a maior diversidade genética está presente entre os indivíduos, sem aparentes divergências na composição genética entre as populações.

Estudos futuros, visando acessar a diversidade genética em *Guadua chacoensis* necessitam coletar populações com maior distância geográfica, assim como utilizar outros locos microssatélites visando acessar um possível maior polimorfismo existente para a espécie.

## 5.8. Referências

- ABREU, A. G.; GROMBONE-GARATINI, M. T.; VAL, T. M.; ZUCCHI, M. I. Genetic diversity and age class structure of seedlings and saplings after a mast flowering of bamboo in the Brazilian Atlantic Forest. **Internal Journal of Plant Sciences**, v. 175, n. 3, p. 319-327, 2014. DOI: 10.1086/674448.
- BHANDAWAT, A.; SINGH, G.; RAINA, A. S.; KAUR, J.; SHARMA, R. K. Development of genic SSR marker resource from RNA-Seq data in *Dendrocalamus latiflorus*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 2015. DOI:10.1007/s13562-015-0323-9.
- BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v. 99, p. 580-591, 2007.
- BROWN, A. H. D.; WEIR, B. A. 1983. Measuring genetic variability in plant populations. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (eds) *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*, Elsevier, Amsterdam, p. 219-239.
- ELLSTRAND, N. C. Is gene flow the most important evolutionary force in Plants? **American Journal of Botany**, v. 101, n. 5, p. 737-753, 2014. DOI:10.3732/ajb.1400024.
- FAN, Z.; JIANG, G. F.; LIU, Y. X.; HE, Q. X.; BLANCHARD, B. Population explosion in the yellow-spined bamboo locust *ceracris kiangsu* and inferences for the impact of human activity. **PLoS One**, v. 9, n. 3, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0089873.
- GUERREIRO, C. Flowering cycles of woody bamboos native to southern south America. **Journal of Plant Research**, v. 127, p. 307-3013, 2014. DOI 10.1007/s10265-013-0593-z.

- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 4-9, 2001.
- JIANG, W. X.; ZHANG, W. J.; DING, Y. L. Development of polymorphic microsatellite markers for *Phyllostachys edulis* (Poaceae), an important bamboo species in China. **Applications in Plant Sciences**, v. 1, n. 7. DOI: doi:10.3732/apps.1200012.
- KANEKO, S.; FRANKLIN, D. C.; YAMASAKI, N.; ISAGI, Y. Development of microsatellite markers for *Bambusa arnhemica* (Poaceae: Bambuseae), a bamboo endemic to northern Australia. **Conservation Genetics Journal**, v. 9, p. 1311-1313, 2008. DOI 10.1007/s10592-007-9467-z.
- KITAMURA, K.; KAWAHARA, T. Clonal identification by microsatellite loci in sporadic flowering of a dwarf bamboo species, *Sasa cernua*. **Journal of Plant Research**, v. 122, p. 229-304, 2009. DOI:10.1007/s10265-009-0220-1.
- LIAN, C.; MIWA, M.; HOGETSU, T. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. **Heredity**, v. 87, p. 88-98, 2001.
- LOH, J. P.; KIEW, R.; SET, O.; GAN, L. H.; GAN, Y. Y. A study of genetic variation and relationships within the bamboo subtribe Bambusinae using Amplified Fragment Length Polymorphism. **Annals of Botany**, v. 85, p. 607-612, 2000. DOI:10.1006/anbo.2000.1109.
- MA, Q. Q.; SONG, H. X.; ZHOU, S. Q.; YANG, W. Q.; LI, D. S.; CHEN, J. S. Genetic structure in dwarf bamboo (*Bambusa fangiana*) clonal populations with different genet ages. **Plos One**, v. 8, n. 11, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0078784.
- MATSUO, A.; TOMIMATSUO, H.; SUZUKI, J. I.; SAITOH, T.; SHIBATA, S.; MAKITA, A.; SUYAMA, Y. Female and male fitness consequences of clonal growth in a dwarf bamboo population with a high degree of clonal intermingling. **Annals of Botany**, v. 114, p. 1-7, 2014. DOI: 10.1093/aob/mcu176.

- NAYAK, S.; ROUT, G. R.; DAS, P. Evaluation of the genetic variability in bamboo using RAPD markers. **Plant Soil and Environment**, v. 43, n. 1, p. 24-28, 2003.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **The American Naturalist**, v. 106, n. 949, p. 283-292, 1972.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 512 p.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GeneAlex 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006. DOI:10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 225-238, 1996.
- RAMMANAYAKE, S. M. S. D.; MEEMADUMA, V. N.; WEERAWARDENE, T. E. Genetic diversity and relationships between nine species of bamboo in Sri Lanka, using Random Amplified Polymorphic DNA. **Plant Systematics and Evolution**, v. 269, p. 55-61, 2007. DOI:10.1007/s00606-007-0587-1.
- SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, p. 615-629, 2006. DOI:10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x.
- SHAHRIAR, M. H.; ROBIN, A. H. K.; BEGUM, S. N.; HOQUE, A. Diversity analysis of some selected rice genotypes through SSR-based molecular markers. **Journal of Bangladesh Agricultural University**, v. 12, n. 2, p. 307-311, 2014.
- SHARMA, R. K.; GUPTA, P.; SHARMA, V.; SOOD, A.; MOHAPATRA, T.; AHUDA, P. S. Evaluation of rice and sugarcane SSR markers for phylogenetic and genetic diversity analyses in bamboo. **Genome**, v. 51, p. 91-103, 2008. DOI:10.1139/G07-101.

- SHARMA, V.; BHARDWAJ, P.; KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; SOOD, A.; AHUJA, P. S. Identification and cross-species amplification of EST derived SSR markers in different bamboo species. **Conservation Genetics Journal**, v. 10, p. 721-724, 2009. DOI 10.1007/s10592-008-9630-1.
- SUYAMA, Y.; OBAYASHI, K.; HAYASHI, I. Clonal structure in a dwarf bamboo (*Sasa senanensis*) population inferred from amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprints. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 901-906, 2000.
- TIAN, B.; YANG, H-Q.; WONG, K-M.; LIU, A-Z.; RUAN, Z-Y. ISSR: analysis shows low genetic diversity versus high genetic differentiation for gigant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* (Poaceae: Bambusoideae), in China populations. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, p. 901-908, 2012. DOI:10.1007/s10722-011-9732-3.
- WANG, X. Q.; ZHAO, L.; EATON, D. A. R.; LI, D. Z.; GUO, Z. H. Identification of SNP markers for inferring phylogeny in temperate bamboos (Poaceae: Bambusoideae) using RAD sequencing. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, p. 938-945, 2013. DOI:10.1111/1755-0998.12136.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 395-420, 1951.
- YANG, H. Q.; AN, M. Y.; GU, Z. J.; TIAN, B. Genetic Diversity and Differentiation of *Dendrocalamus membranaceus* (Poaceae: Bambusoideae), a Declining Bamboo Species in Yunnan, China, as Based on Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 4446-4457, 2012. DOI: 10.3390/ijms13044446.
- YEASMIN, L.; ALI, M. N.; GANTAIT, S.; CHAKRABORTY, S. Bamboo: an overview on its genetic diversity and characterization. **Biotech**, v. 5, p. 1-11, 2015. DOI:10.1007/s13205-014-0201-5.

## 6. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Durante o desenvolvimento deste estudo foram encontrados, validados e caracterizados, em fragmentos do genoma nuclear de *Guadua chacoensis*, 12 locos microssatélites, dos quais, em sete locos foram encontrados mais de um alelo. Porém, todos os locos estudados apresentaram reduzido polimorfismo, comportamento este aparentemente intrínseco à espécie.

Novos estudos devem ser realizados para confirmar este comportamento genético de baixa diversidade em *G. Chacoensis*. Além disso, novos estudos, podem ainda caracterizar outros locos microssatélites com marcadores já desenhados neste estudo, a fim de incrementar as abordagens possíveis para o estudo populacional desta espécie.

Mesmo os locos não polimórficos durante a caracterização, foram empregados em estudo de genética de populações pertencentes ao Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu/PR, BR. Com a genotipagem dos 575 indivíduos, estes locos mantiveram o monomorfismo. Não obstante, novos testes ainda podem ser adotados, utilizando indivíduos provenientes de diferentes regiões, a fim de exaurir as possibilidades de polimorfismo dos mesmos.

As populações amostradas apresentam reduzida variabilidade genética para os locos estudados. As análises de diversidade e estrutura genética demonstraram que a maior diferenciação genética é encontrada entre os indivíduos dentro das populações, existindo baixa divergência genética entre as populações. Ainda assim, foi possível verificar a presença de alelos exclusivos ou raros em algumas populações. Devido a isto, estudos futuros, visando acessar maior amplitude da diversidade genética em *G. chacoensis* devem realizar a coleta em populações com maior distância geográfica.

Os subsídios gerados neste trabalho consistem de informações básicas a serem empregadas e aprimoradas em estudos futuros visando a caracterização mais detalhada da diversidade genética em *Guadua chacoensis*. Assim como empregar os marcadores microssatélites desenvolvidos para outras espécies de bambu, via transferibilidade. Possibilitando realizar novas pesquisas buscando detalhar a estrutura de populações, acessos para bancos de melhoramentos genéticos, caracterização da diversidade genética, dentre outras aplicabilidades.





## 7. REFERÊNCIAS

- AGRASAR, Z. E. R.; RODRÍGUEZ, M. F. Culm anatomy of native woody bamboos in Argentina and neighboring areas: Cross section. **The Journal of the American Bamboo Society**, v. 17, n. 1, p. 28-43, 2003.
- ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 333-342, 2005.
- APARICIO, A.; HAMPE, A.; FERNÁNDEZ-CARRILLO, L.; ALBALADEJO, R. G. Fragmentation and comparative genetic structure of four mediterranean woody species: complex interactions between life history traits and the landscape context. **Diversity and Distributions**, v. 18, p. 226-235, 2012. DOI: 10.1111/j.1472-4642.2011.00823.x.
- BELAJ, A.; DOMINGUEZ-GARCÍA, M. C.; ATIENZA, S. G.; URDÍROZ, N. M.; DE LA ROSA, R.; SATOVIC, Z.; MARTÍN, A.; KILIAN, A.; TRUJILLO, I.; VALPUESTA, V.; DEL RÍO, C. Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DArTs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, p. 365-378, 2012. DOI: 10.1007/s11295-011-0447-6.
- BERALDO, A. L.; RIVERO, L. A. Bambu laminado colado (BLC). **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 36-46, 2003.
- BOLSON, M.; SMIDT, E. C.; BROTTTO, M. L.; SILVA-PEREIRA, V. ITS and trnH-psbA as efficient DNA Barcodes to identify threatened commercial woody Angiosperms from Southern Brazilian Atlantic rainforests. **Plos One**, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0143049.
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores microssatélites em

Espécies Vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p.46-50, 2003.

DAL RI, Leandro. **Taxonomia das espécies sul-brasileiras de *Calydorea* Herbert (Iridaceae) e caracterização por DNA “barcode”**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS, 2012.

DAVIES, S. J.; CAVERS, S.; FINEGAN, B.; WHITE, A.; BREED, M. F.; LOWE, A. J. Pollen flow in fragmented landscapes maintains genetic diversity following stand-replacing disturbance in a neotropical pioneer tree, *Vochysia ferruginea* Mart. **Nature Heredity**, v. 115, p. 125-129, 2015. DOI: 10.1038/hdy.2013.95.

DELGADO, Patrícia Santos. **O bambu como material eco-eficiente: caracterização e estudos exploratórios de aplicações**. Dissertação de mestrado - Rede Temática em Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Minas Gerais. Ouro Preto, 2011.

EMANUELLI, F.; LORENZI, S.; GRZESKOWIAK, L.; CATALANO, V.; STEFANINI, M.; TROGGIO, M.; MYLES, S.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M.; ZYPRIAN, E.; MOREIRA, F. M.; GRANDO, M. S. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. **Plant Biology**, v. 13, n. 39, 2013. DOI: 10.1186/1471-2229-13-39.

GHAVAMI, K.; MARINHO, A. B. Propriedades físicas e mecânicas do colmo inteiro do bambu da espécie *Guadua angustifolia*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 1, p. 107-114, 2005.

GOH, W. L.; CHANDRAN, S.; FRANKLIN, D. C.; YSAGI, Y.; KOSHY, K. C.; SUNGKAEW, S.; YANG, H. Q.; XIA, N. H.; WONG, K. M. Multi-gene region phylogenetic analyses suggest reticulate evolution and a clade of Australian origin among paleotropical woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, p. 239-257, 2013. DOI: 10.1007/s00606-012-0718-1.

- GONÇALVES, Paulo Henrique Pereira. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio da análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas.** Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 2010.
- GRECO, Thiago Machado. **Diversidade de bambus (Poaceae: Bambusoideae) na Ilha de Santa Catarina, Brasil.** Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC, 2013.
- GROSSER, D.; LIESE, W. On the anatomy of Asian bamboos, with special reference to their vascular bundles. **Wood Science and Technology**, v. 5, p. 290-312, 1971. DOI: 10.1007/BF00365061.
- GUADAGNIN, Paula Mirela Almeida. **Caracterização e mapeamento da vegetação florestal e sua relação com os componentes do relevo na bacia hidrográfica do arroio Caverá - Oeste do RS/ Brasil.** Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria-RS, 2015.
- GUERREIRO, C. Flowering cycles of woody bamboos native to southern South America. **Journal of Plant Research**, v. 127, p. 307-313, 2014.
- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D. et al. (Eds.) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland: Sinauer, MA. p.43-63, 1989.
- KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Florestalis**, n. 64, p. 93-107, 2003.
- MANEL, S.; HOLDEREGGER, R. Ten years of landscape genetics. **Cell**, v. 28, n. 10, p. 614-621, 2013. DOI: 10.1016/j.tree.2013.05.012.

- MARINHO, N. P.; NISGOSKI, S.; MUÑIZ, G. I. B. Avaliação das dimensões das fibras de colmos de bambu, *Dendrocalamus giganteus* (Wall) Munro, em diferentes idades. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, p. 251-256, 2014.
- MENDONÇA, Eurivan, Alves. **Disposição de efluente de tratamento de esgoto industrial em solo vegetado com bambu**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2010.
- MENEZES, M. P. C.; MARTINEZ, A. M.; RIBEIRO, M. N.; PIMENTA-FILHO, E. C.; BERMEJO, J. V. D. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1336-1341, 2006.
- MOIZÉS, Fábio Alexandre. **Painéis de bambu, uso e aplicações: uma experiência didática nos cursos de design em Bauru, São Paulo**. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista. Bauru, 2007.
- MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, J. V.; SOUZA, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores moleculares microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 521-526, 2007.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microssatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, n. 1, p. 175-182, 1993.
- NIRMALA, C.; BISHT, M. S.; PREMILATA, T. Germoplasm evaluation in bamboos: from chromossomes to molecular markers. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, v. 13, n. 3&4, p. 99-104, 2014.
- NOIA, Paula Regina da Cruz. **Sustentabilidade Sócio ambiental: Desenvolvimento de sistemas construtivos em bambu do Vale do Ribeira, SP**. Dissertação de mestrado - Faculdade de Arquitetura e Urbanismo, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

- OLIVEIRA, Thaisa Francis César Sampaio. **Sustentabilidade e Arquitetura: Uma reflexão sobre o uso do bambu na construção civil**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2006.
- OLIVEIRA, E. J.; DANTAS, J. L. L.; CASTELLEN, M. S.; MACHADO, M. D. Identificação de microssatélites para o mamoeiro por meio da exploração do bancos de dados de DNA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 841-845, 2008.
- PEREIRA NETO, J. S.; MINÁ, A. J. S.; FURTADO, D. A.; NASCIMENTO, J. W. D. Aplicação do bambu nas construções rurais. **Revista Educação Agrícola Superior**, v. 24, n. 2, p. 67-77, 2009.
- POCZAI, P.; VARGA, I.; LAOS, M.; CSEH, A.; BELL, N.; VALKONEN, J. P. T.; HYVÖNEN, J. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. **Plant Methods**, v. 9, n. 6, 2013. DOI: 10.1186/1746-4811-9-6.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 225-238, 1996.
- PRIORI, D.; BARBIERI, R. L.; CASTRO, C. M.; OLIVEIRA, A. C.; VILELA, J. C. B.; MISTURA, C. C. Diversidade genética de *Cucurbita pepo*, *C. argyrosperma* e *C. ficifolia* empregando marcadores microssatélites. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 361-368, 2013.
- REIS, R. V.; OLIVEIRA, E. J.; VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SILVA, M. G. M. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 1, p. 51-57, 2011.
- RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The brazilian atlantic forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for

conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

RIPPERGER, S. P.; TSCHAPKA, M.; KALKO, E. K. V.; RODRIGUEZ-HERRERA, B.; MAYER, F. Life in a mosaic landscape: anthropogenic habitat fragmentation affects genetic population structure in a frugivorous bat species. **Conservation Genetics**, v. 14, p. 925-934, 2013. DOI: 10.1007/s10592-012-0434-y.

SINGH, S. R.; SINGH, R.; KALIA, S.; DALAL, S.; DHAWAN, A. K.; KALIA, R. K. Limitations, progress, and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo – a plant with extraordinary qualities. **Physiology Molecular and Biology Plants**, v. 19, n. 1, p. 21-41, 2012. DOI: 10.1007/s12298-012-0147-1.

SUNGKAEW, S.; STAPLETON, C. M. A.; SALAMIN, N.; HODKINSON, T. R. Non-monophyly of the wood bamboos (Bambuseae; Poaceae): a multi-gene region phylogenetic analysis of bambusoideaes. **Journal Plant Research**, v. 122, p. 95-108, 2009. DOI: 10.1007/s10265-008-0192-6.

TORGA, P. P.; SANTOS, J. B.; PEREIRA, H. S.; FERREIRA, D. F.; LEITE, M. E. Seleção de famílias de feijoeiro baseada na produtividade, no tipo de grãos e informações de QTLs. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 95-100, 2010.

VIEIRA, Elisa Serra Negra. **Marcadores morfológicos, bioquímicos e moleculares na caracterização de cultivares de soja e café**. Tese de doutorado - Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG, 2004.

VIEIRA, E. S. N.; SCHUSTER, I.; SILVA, R. B.; OLIVEIRA, M. A. R. Variabilidade genética em cultivares de soja determinada com marcadores microsátélites em gel de agarose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1460-1466, 2009.

WANG, Q.; MA, F.; YI, Y.; DONG, J.; WANG, H.; LI, R.; XU, X.; SUN, B. Bamboo leaf and pollen fossils from the late Miocene of

Eastern Zhejiang, China, and their Phythogeological Significance.  
**Acta Geologica Sinica**, v. 88, n. 4, p. 1066-1083, 2014.

WEBER, J. L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats.  
**Human Molecular Genetics**, v. 2, p. 1123-1128, 1993.

XU, X.; LIU, X.; GE, S.; JENSEN, J. D.; HU, F.; LI, X.; DONG, Y.;  
GUTENKUNST, R, N.; FANG, L.; HUANG, L.; LI, J.; HE, W.;  
ZHANG, G.; ZHENG, X.; ZHANG, F.; LI, Y.; YU, C.;  
KRISTIENSEN, K.; ZHANG, X.; WANG, J.; WRIGHT, M.;  
McCOUCH, S.; NIELSEN, R.; WANG, J.; WANG, W.  
Resequencing 50 accessions of cultivated and wild rice yields  
markers for identifying agronomically important genes. **Nature  
Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 105-114, 2012. DOI:  
10.1038/nbt.2050.