

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA NORMAL SUPERIOR- ENS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



JULIANA NASCIMENTO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA ENRIQUECIDA COM
REGIÕES DE MICROSSATÉLITES DE *Duroia macrophylla* HUBER
(RUBIACEAE)**

MANAUS- AM

2018

JULIANA NASCIMENTO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA ENRIQUECIDA COM
REGIÕES DE MICROSSATÉLITES DE *Duroia macrophylla* HUBER
(RUBIACEAE)**

**Monografia apresentada como pré-
requisito para conclusão do Curso
de Licenciatura em Ciências
Biológicas da Universidade do
Estado do Amazonas – UEA.**

**Orientadora: Prof^a Dra. Ieda Hortêncio Batista
Co-orientadora: Prof^a Dra. Jacqueline da Silva Batista**

MANAUS- AM

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

S586c	<p>Silva, Juliana Nascimento da Caracterização de biblioteca genômica enriquecida com regiões de microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i> huber (Rubiaceae) / Juliana Nascimento da Silva. Manaus : [s.n], 2018. 36 f.: color.; 30 cm.</p> <p>TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018. Inclui bibliografia Orientador: Batista, Ieda Hortêncio Coorientador: Batista, Jacqueline da Silva</p> <p>1. marcador molecular. 2. SSR. 3. apurú. I. Batista, Ieda Hortêncio (Orient.). II. Batista, Jacqueline da Silva (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Caracterização de biblioteca genômica enriquecida com regiões de microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i> huber (Rubiaceae)</p>
-------	---



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FINAL DO TCC IV (NOTA DA API)

ALUNO: <i>Juliana Nascimento da Silva</i>
TÍTULO DO TCC: <i>Caracterização de biblioteca genômica enriquecida com regiões de microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i> Huber (Rubiaceae)</i>

AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador:	<i>10,0</i>
b) 1º avaliador(a):	<i>10,0</i>
c) 2º avaliador(a):	<i>9,7</i>
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	

MÉDIA DA NOTA: *9,9*

Manaus, *29* de *novembro* de 2018

ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA

Jeda Hortencio Batista
Orientador(a)

[Assinatura]
1º Avaliador(a)

[Assinatura]
2º Avaliador(a)

Dedico este trabalho a minha filha
e a minha mãe, com todo o meu
amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder a dádiva de viver e me abençoar em todos os momentos de minha vida e permitir que eu concluísse este projeto.

À minha orientadora, Dra. Ieda Batista, pelo desafio de me orientar, por todo apoio e todas as sugestões para a melhoria do trabalho ao longo destes dois anos.

À minha co-orientadora, Dra. Jacqueline Batista, pelas ideias para a construção deste projeto, por todos os ensinamentos e compreensão nos momentos difíceis.

Aos colegas de laboratório, Giselle Moura, Kyara Formiga e Antônio Saulo por toda a paciência e solidariedade que tiveram comigo desde o início do projeto.

À Universidade do Estado do Amazonas pela contribuição na minha formação acadêmica e profissional.

Ao laboratório de Biologia Molecular do INPA pela concessão do espaço para execução das atividades.

À minha mãe, Mirineia, que sempre me incentivou nos estudos e sempre investiu para que eu tivesse educação de boa qualidade, além de sempre me apoiar e me encorajar para que eu alcançasse meus objetivos, atuando como mãe e pai.

Ao meu amor, Carlos, pela sua paciência nos momentos de estresse e muito cansaço, pelo incentivo e por todo o amor e carinho.

À minha filha, Sofia, que mesmo sem entender, me deu força para seguir e não parar no meio do caminho.

À minha vó, que é uma segunda mãe, pela criação e educação desde o início da minha vida.

Às amigas, Laynah, Xaiane e Ana por me ajudarem sempre e estarem comigo desde o início da faculdade enfrentando todos os obstáculos.

E a todos que me apoiaram ou de alguma forma me ajudaram, oraram e torceram por mim, aos que, apesar da distância sempre transmitiam energia positiva, muito obrigada!

“O sábio conquista a cidade dos valentes e derruba a fortaleza em que eles confiam”

Provérbios 21:22

RESUMO

O apurú, cujo nome científico é *Duroia macrophylla*, pertence à família Rubiaceae que se destaca pela produção de substâncias bioativas. Nesse sentido, estudos verificaram atividades biológicas apresentadas pelas substâncias isoladas da espécie. Verificou-se ação tóxica contra *Artemia salina*, atividade antitumoral e atividade contra o agente causador da tuberculose. Apesar das atividades biológicas apresentadas, a espécie não apresenta estudos genéticos, por isso torna-se importante a construção de uma biblioteca genômica enriquecida com regiões de microssatélites, que são regiões encontradas ao longo do DNA que consistem de pequenas sequências de DNA com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem polimórficas e abundantes. Esse marcador pode ser classificado em sequências perfeitas, imperfeitas e compostas, e quanto ao número de nucleotídeos encontrados em cada repetição, podem ser classificados como: mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos. Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar uma biblioteca genômica enriquecida com regiões de microssatélites para *D. macrophylla*. Inicialmente, foi realizada a extração do DNA genômico e a partir disso, a construção da biblioteca genômica com 192 clones, e destes, foi realizada a extração do DNA plasmidial. O sequenciamento nucleotídico dos clones recombinantes foi realizado em analisador automático *ABI 3130 xl*, e a partir das sequências nucleotídicas obtidas foi possível realizar a caracterização da biblioteca genômica. Após a obtenção dos microssatélites, bem como sua caracterização, foi realizada o desenho de *primers* flangeadores à essas regiões. A partir do sequenciamento do DNA plasmidial de 192 clones recombinantes, obteve-se um total de 104 clones com sequência de boa qualidade, destes 13 apresentaram microssatélites até o momento. Estes foram caracterizados como dinucleotídeos (30,77%), trinucleotídeos (38,46%), tetranucleotídeos (15,39%), pentanucleotídeos (7,69%) e hexanucleotídeos (7,69%) e quanto à natureza de repetição, todos os microssatélites (100%) foram caracterizados como perfeitos. Em diversos estudos já foram desenvolvidos marcadores moleculares microssatélites, com objetivo de alcançar diferentes respostas, através da ampla aplicabilidade deste marcador, estes estudos foram direcionados a diferentes espécies vegetais, como: palmito, maracujazeiro, bananeira, entre outras.

Palavras Chave: marcador molecular, SSR, apurú

ABSTRACT

Apuruí, whose scientific name is *Duroia macrophylla*, belongs to the family Rubiaceae that stands out for the production of bioactive substances. In this sense, studies have verified biological activities presented by substances isolated from the specie. Action against *Artemia salina*, antitumor activity and activity against the causative agent of tuberculosis was verified. Although the biological activities presented, a species does not present genetic studies, so it becomes important to construct a genomic library enriched with regions of microsatellites, which are regions along the DNA consisting of small DNA sequences with 1 to 6 nucleotides in length, polymorphic and abundant tandem repeats. This marker can be classified into perfect, imperfect and composite sequences, and the number of nucleotides found in each replicate can be classified as: mono, di, tri, tetra, penta and hexanucleotides. Thus, the general objective of this work was to characterize a genomic library enriched with microsatellite regions for *D. macrophylla*. Initially, extraction of the genomic DNA was performed and, from this, the construction of the genomic library with 192 clones, from which, the plasmidial DNA extraction was performed. The nucleotide sequencing of the recombinant clones was performed on ABI 3130 xl automatic analyzer, and from the obtained nucleotide sequences it was possible to characterize the genomic library. After obtaining the microsatellites, as well as their characterization, the design of flanking primers was carried out to these regions. From the sequencing of the plasmid DNA of 192 recombinant clones, a total of 104 clones were obtained with good sequence quality, of these 13 had microsatellites to date. These were characterized as dinucleotides (30.77%), trinucleotides (38.46%), tetranucleotides (15.39%), pentanucleotides (7.69%) and hexanucleotides (7.69%) and as to the nature of repetition, all microsatellites (100%) were characterized as perfect. Microsatellite molecular markers have been developed in several studies, aiming to reach different responses, through the wide applicability of this marker, these studies were directed to different plant species, such as: palmetto, passion fruit, banana, among others.

Keywords: molecular marker, SSR, apuruí

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Duroia macrophylla</i>	14
Figura 2- Eletroferograma de sequência nucleotídica obtida a partir de DNA plasmidial contendo região microssatélite de <i>Duroia macrophylla</i> , com motivo de repetição do tipo tetranucleotídeo (TCAA) ₃	25
Figura 3- Parâmetros utilizados para verificar a presença de microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i> no programa WEBSAT (Martins et al., 2009).....	25
Figura 4- Parâmetros utilizados para o desenho dos <i>primers</i> para <i>Duroia macrophylla</i> no programa WEBSAT (Martins et al., 2009).	26
Figura 5- Perfil de rendimento de extração de DNA genômico de indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> em gel de agarose 1% usando 9 diferentes métodos. Legenda: m1 e m2, concentração de 50 e 100 ng/μL, respectivamente.....	27
Figura 6- Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão do DNA genômico de <i>Duroia macrophylla</i> . Legenda: m- marcador 1 kb <i>plus</i> ; 1- DNA digerido.	27
Figura 7- Eletroforese em gel de agarose 1% da pré- amplificação via PCR de <i>Duroia macrophylla</i> . Legenda: 1- Produto da pré- amplificação; m- marcador 1 kb <i>plus</i>	28
Figura 8- Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação dos fragmentos selecionados de <i>D. macrophylla</i> Legenda: 1- Produto da amplificação dos fragmentos selecionados; m- marcador 1 kb <i>plus</i>	28
Figura 9- Caracterização da biblioteca genômica enriquecida em regiões de microssatélites desenvolvida para <i>Duroia macrophylla</i> quanto ao motivo de repetição dos microssatélites.....	29
Figura 10- Caracterização da biblioteca genômica enriquecida em regiões de microssatélites desenvolvida para <i>Duroia macrophylla</i> quanto ao motivo de repetição dos microssatélites a partir dos quais foram desenhados <i>primers</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Condições utilizadas para as nove diferentes extrações de DNA genômico de <i>Duroia macrophylla</i>	18
Tabela 2- Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na digestão do DNA genômico durante a construção de biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i>	19
Tabela 3- Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na ligação de adaptadores durante a construção de biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i>	20
Tabela 4- Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na pré-amplificação durante a construção de biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i>	20
Tabela 5- Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na amplificação dos fragmentos selecionados durante a construção de biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i>	22
Tabela 6- Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na clonagem em um vetor durante a construção de biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i>	22
Tabela 7- Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na reação de sequenciamento de DNA durante a construção de biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i>	24
Tabela 8- Locos microssatélites de <i>Duroia macrophylla</i> , com o motivo de repetição e tamanho do fragmento	30

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1.	Família Rubiaceae	12
1.2.	Gênero <i>Duroia</i>	12
1.3.	Espécie <i>Duroia macrophylla</i>	12
1.4.	Marcadores moleculares microssatélites	13
2.	OBJETIVOS	16
2.1.	Objetivo geral	16
2.2.	Objetivos específicos	16
3.	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1.	Extração do DNA genômico	17
3.2.	Construção da biblioteca genômica	18
3.3.	Caracterização da biblioteca genômica	23
3.4.	Desenho de <i>primers</i>	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1.	Extração do DNA genômico	26
4.2.	Construção da biblioteca genômica	26
4.3.	Caracterização da biblioteca genômica	28
4.4.	Desenho de <i>primers</i>	29
5.	CONCLUSÃO	31
6.	REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1. Família Rubiaceae

A família Rubiaceae é composta por aproximadamente 630 gêneros e 10.700 espécies e está dividida em quatro subfamílias Rubioideae, Antirheoideae, Ixorideae e Cinchonoideae (JOLY, 1983), sendo que no Brasil há cerca de 130 gêneros e 1500 espécies (SOUZA e LORENZI, 2008). Esta família se destaca pela produção de substâncias bioativas e as três principais são provenientes da classe dos alcaloides: a quinina, a emetina e a cafeína (HOEHNE, 1939).

Segundo Cordell et al., (2001), essas substâncias podem ser utilizadas no tratamento contra diversas enfermidades, como por exemplo: a cafeína e a emetina com atividade anti- emética e amebicida, a quinidina, anti- arritmico e a quinina, anti-malárica. Além destes, os metabólitos também podem apresentar potencial anti-inflamatório, tóxico, antiviral, efeitos em doenças vasculares e do sistema nervoso central e atividade antibacteriana (HEITZMAN et al., 2005).

1.2. Gênero *Duroia*

Duroia apresenta 30 espécies neotropicais (TAYLOR et al., 2004) e características exclusivas, como: flores pistiladas e frutos solitários (TAYLOR e CAMPOS, 2007). O hábito pode variar entre árvores, arvoretas ou arbustos.

A associação com formigas é comum, que utilizam ramos ociosos como abrigo, além disso, as formigas constroem ninhos em varias partes externas das plantas. Na simbiose entre *Mymelachista schumanni* e *Duroia hirsuta*, a formiga se beneficia do abrigo enquanto a planta é beneficiada pelo ácido fórmico sintetizado pelo inseto, atuando como um herbicida natural (FREDERICKSON, 2005).

Com relação aos estudos químicos e biológicos realizados com espécies pertencentes a este gênero, pode-se destacar o estudo com a *D. hirsuta* que apresentou a atividade antibacteriana *in vitro* (LOPEZ et al., 2001) e atividade antivirótica contra HSV (KHAN et al., 2005).

1.3. Espécie *Duroia macrophylla*

Duroia macrophylla (Figura 1) é uma árvore terrícola, nativa, porém não endêmica do Brasil, onde sua distribuição ocorre nos seguintes Estados: Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Mato Grosso. É conhecida popularmente como cabeça-de-urubu, apuruí ou puruí-grande-da-mata (FLORA DO BRASIL, 2018).

Figura 1: *Duroia macrophylla*



Estudos prévios realizados pelo Grupo de Pesquisas “Sociedade-Natureza: bioprospecção, biotecnologia e dinâmicas econômicas e sociais” do INPA descrevem os relatos de substâncias isoladas de *D. macrophylla* que apresentaram atividades biológicas. Entre estas, os alcaloides indólicos que apresentaram ação tóxica contra o microcrustáceo marinho *Artemia salina* (NUNEZ et al., 2009), com atividade antitumoral (NUNEZ e VASCONCELOS, 2012; NUNEZ et al., 2014) e ainda, atividade contra o agente causador da tuberculose, a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (MARTINS, 2014).

A partir das propriedades biológicas que estas substâncias apresentaram e em razão de não ter estudos genéticos até o momento sobre essa espécie, torna-se importante a construção de uma biblioteca genômica enriquecida com regiões de microssatélites, que são um dos marcadores moleculares mais utilizados em análise de genética populacional.

1.4. Marcadores moleculares microssatélites

Os microssatélites, também conhecidos como SSRs (*Simple Sequence Repeats*), são regiões encontradas ao longo do DNA que consistem de pequenas sequências com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* polimórficas e abundantes (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). São os marcadores moleculares mais polimórficos conhecidos atualmente, por apresentarem expressão codominante, taxa de mutação elevada e por serem seletivamente neutros (ESTOUP et al., 1995; LANZARO et al., 1995), permitindo analisar desde indivíduos da mesma espécie até espécies proximamente relacionadas (MOXON, 1999).

Além disso, podem ser encontrados tanto em regiões codificadoras como não codificadoras e são geralmente muito polimórficos devido ao alto nível de variação no número de repetições (ATHERLY et al., 1999). E, pode ser empregado em genética de populações de plantas, apresentando uma grande contribuição na melhoria das

estimativas de parâmetros genéticos, especialmente em populações com diversidade baixa ou não detectada por outros marcadores (PAETKAU et al., 1995)

Os marcadores microssatélites podem ser classificados quanto a natureza de repetição como perfeitos, imperfeitos, compostos e interrompidos (WEBER, 1990). E, quanto ao número de nucleotídeos encontrados em cada repetição, podem ser classificados como: mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos (QUELLER e GOODNIGHT, 1989). Possui diversas aplicações, como: no mapeamento genético, análise populacional, estudos ecológicos e biologia da conservação. São definidas em função do desenvolvimento de locos espécie-específicos a serem amplificadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

As sequências de DNA que flanqueiam os SSR são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de iniciadores (“*primers*”) específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (CAIXETA et al., 2006).

Marcadores moleculares microssatélites já foram desenvolvidos para diferentes espécies de plantas com objetivo de alcançar diferentes respostas, através da ampla aplicabilidade deste marcador.

Para *Euterpe edulis* (palmitreiro), foi utilizado o SSR a fim de avaliar o impacto do processo de exploração sobre alguns parâmetros da espécie, e a partir de oito locos microssatélites verificou-se que o processo de exploração não havia causado alterações no nível de diversidade e na estrutura genética das populações da espécie (CONTE, 2004).

Diversos estudos para *Carapa guianensis* (andiroba) foram desenvolvidos utilizando marcadores microssatélites, um destes foi realizado por Dayanandan e colaboradores (1999) para avaliar a estrutura populacional em áreas onde ocorre manejo florestal da espécie, Kageyama e colaboradores (2004) avaliaram a estrutura genética de duas populações divididas por classe de tamanho no Estado do Acre, Vinson e colaboradores (2005) desenvolveram mecanismos para usar o conhecimento científico, para promover o manejo florestal sustentável e a conservação das espécies. Outro estudo teve como objetivo avaliar a estrutura e a diversidade genética, bem como a ocorrência de deriva genética, de duas populações localizadas em área de Floresta Tropical Úmida no Estado do Acre, Brasil. Foram avaliados 39 indivíduos

adultos no município de Porto Acre e 38 em Rio Branco, utilizando sete locos de microssatélites (RAPOSO, 2007).

O desenvolvimento de marcadores microssatélites de *Passiflora alata* (maracujá), a partir de análises de transferibilidade de *primers* desenhados para a espécie permitiu a construção de uma biblioteca enriquecida em microssatélites de *P. alata*, o desenho de *primers* para tais sequências e a validação de uma amostra desses pares de *primers* (PENHA, 2007).

Desta forma, a construção de uma biblioteca genômica a ser usada para o isolamento de regiões microssatélites para *D. macrophylla* permitirá uma série de possibilidades e perspectivas de estudos genéticos para a espécie, sendo uma destas, o estudo populacional da espécie na Amazônia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar uma biblioteca genômica enriquecida com regiões de microssatélites para *Duroia macrophylla*.

2.2. Objetivos específicos

- Gerar a sequência nucleotídica dos insertos dos clones recombinantes da biblioteca genômica;
- Classificar a biblioteca genômica pelo motivo e pela natureza da repetição;
- Obter *primers* a partir das sequências nucleotídicas dos clones que possuem regiões com microssatélites.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Extração do DNA genômico

Foram selecionados quatro indivíduos de *D. macrophylla* coletados na Reserva Ducke, Manaus, AM, para extração de DNA genômico seguindo a metodologia de Doyle e Doyle (1990) com as modificações destacadas abaixo. Foi realizada extração de DNA com nove ajustes e condições, a fim de verificar qual apresentava maior eficiência (Tabela 1).

Tabela 1: Condições utilizadas para as nove diferentes extrações de DNA genômico de *Duroia macrophylla*

Extração De DNA	Indivíduo/ Amostra	Método de fragmentação	Tempo de digestão	Condições de tempo de exposição ao isopropanol	RNase
1	1	TissueLyser	30 minutos	1 hora a -80 °C	Não
2	1	Bead Beater	<i>overnight</i>	<i>overnight</i> a -20 °C	Não
3	2	Bead Beater	30 minutos	1 hora a -80 °C	Sim
4	2	Cadinho	<i>overnight</i>	<i>overnight</i> a -20 °C	Não
5	3	Bead Beater	30 minutos	1 hora a -80 °C	Não
6	3	BeadBeater	30 minutos	1 hora a -80 °C	Sim
7	3	BeadBeater	60 minutos	<i>overnight</i> a -20 °C	Não
8	4	BeadBeater	30 minutos	1 hora a -80 °C	Sim
9	4	Cadinho	60 minutos	<i>overnight</i> a -20 °C	Não

As folhas foram lavadas com água destilada e secas com papel toalha, foram recortadas em pequenos pedaços e maceradas com auxílio de cadinho. O produto foi transferido para um microtubo de 2 mL, onde foram adicionados 800 µL de tampão brometo de cetrimônio 2% (CTAB) previamente aquecido (55 °C) e 2 µL de β-mercaptoetanol, em seguida, o tubo foi incubado a uma temperatura de 60 °C *overnight* em uma incubadora com agitação (*Icubator Shaker*) (New Brunswick Scientific).

Em seguida, foram adicionados 600 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (CIA) na proporção 24:1. Centrifugou-se em velocidade de 14000 rpm por 12 minutos, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e a fase orgânica foi descartada. Adicionou-se novamente o mesmo volume de CIA e repetiram-se as etapas

posteriores por mais uma vez. No microtubo contendo a fase aquosa, foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado (-20 °C, aproximadamente), misturou-se devagar para permitir a precipitação do DNA e incubou-se o material a -20 °C *overnight*.

Posteriormente, centrifugou-se a 7000 rpm por 15 minutos a 20 °C. Após a centrifugação, o *pellet* (DNA precipitado) foi identificado e retirou-se o sobrenadante. Adicionou-se 1 mL de etanol 70%, centrifugou-se por 2 minutos e retirou-se o sobrenadante. Essa etapa foi repetida por mais uma vez. Foi realizado o mesmo procedimento com etanol 100%, em seguida, a amostra foi colocada em estufa a 37 °C por 30 minutos. O *pellet* foi ressuspensionado com 40 µL de água ultrapura, incubou-se por 1 hora a 37 °C para a completa eluição e armazenou-se a 4 °C. Foi realizada uma eletroforese horizontal em gel de agarose 1% com o DNA genômico extraído e o DNA do *fago lambda* e o resultado foi observado no Transilluminator 2020 (Stratagene). Para a construção da biblioteca genômica, foi selecionada a extração de DNA número 2, na qual as folhas foram maceradas com auxílio do Bead Beater, o tempo de digestão foi *overnight*, a exposição ao isopropanol também foi *overnight* a -20 °C e não foi adicionada RNase.

3.2. Construção da biblioteca genômica

A biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites foi construída de acordo com a metodologia descrita por Billotte et al., (1999) a partir do DNA genômico extraído das folhas de um indivíduo de *D. macrophylla*. Esta metodologia é constituída por 11 etapas: digestão do DNA genômico, ligação de adaptadores, pré-amplificação via PCR, purificação do DNA, seleção dos fragmentos contendo microssatélites, amplificação dos fragmentos selecionados, clonagem em um vetor, eletroporação em bactérias eletrocompetentes *E. coli*, manutenção dos clones, extração do DNA plasmidial e sequenciamento de DNA.

Na digestão do DNA genômico (1ª. Etapa), foram adicionados alguns reagentes em um tubo de 0,2 mL, conforme a tabela abaixo (tabela 2). A amostra foi incubada em estufa a 37 °C *overnight* e em seguida foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%.

Tabela 2: Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na digestão do DNA genômico durante a construção de biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites de *Duroia macrophylla*

Reagentes	Volume (μL)
Água ultrapura	65
Tampão 10X	10
Espermidina (40 mM)	10
Enzima <i>RSA I</i> (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$)	5
DNA genômico extraído	10
Volume final	100

A ligação de adaptadores (2^a. Etapa) consiste em adicionar alguns reagentes em um tubo de 0,2 mL (tabela 3), e incubar o tubo em termociclador por 2 h com uma temperatura de 20 °C.

Tabela 3: Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na ligação de adaptadores durante a construção de biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites de *Duroia macrophylla*

Reagentes	Volume (μL)
Água ultrapura	20
Tampão 10X	5
<i>RSA 21</i> (10 μM)	2
<i>RSA 25</i> (10 μM)	2
T4 DNA ligase	1
DNA digerido	20
Volume final	50

Na pré-amplificação (3^a. Etapa), foram adicionados alguns reagentes em um tubo de 0,2 mL (tabela 4) e em seguida, o tubo foi colocado em termociclador com a seguinte programação: um ciclo de 95 °C por 4 minutos, 20 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e um ciclo de 72 °C por 8 minutos. Após a pré-amplificação, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, e conseqüentemente a purificação do DNA genômico (4^a. Etapa) com o kit de purificação GFX (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante.

Tabela 4: Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na pré-amplificação durante a construção de biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites de *Duroia macrophylla*

Reagentes	Volume (μL)
-----------	--------------------------

Água ultrapura	32,1
Tampão 10X	5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
dNTP (2,5 mM)	4
RSA 21 (10 µM)	2
Taq DNA polimerase (5U/µL)	0,4
Produto da ligação	5
Volume final	50

A seleção dos fragmentos contendo microssatélites (5^a. Etapa) foi feita por hibridização com o produto digerido purificado. Foram adicionados 460 µL de água ultrapura aos 40 µL de produto purificado, incubou-se o tubo contendo essa mistura a 95 °C em termomixer sem agitação por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 7 µL de SSC 20X e 12 µL de quatro sondas marcadas com biotina, (CT)₈ e (GT)₈ (50 µM). A mistura ficou em temperatura ambiente por 20 minutos, agitando-se lentamente a cada 2 minutos, e depois as esferas magnéticas (100 µL) foram misturadas com 519 µL de mistura da hibridização.

Incubou-se a mistura por 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação suave, magnetizou-se e após 30 segundos, retirou-se o sobrenadante e transferiu-se para um tubo novo, após isso, ressuspendeu-se a fase inferior com 300 µL de SSC 0,1X e magnetizou-se novamente, repetindo as etapas posteriores por três vezes. Posteriormente, a fase inferior foi ressuspensa em 100 µL de água ultrapura, magnetizando e reservando o sobrenadante em um microtubo, ressuspendeu-se com mais 150 µL de água ultrapura, magnetizou-se, retirou-se o sobrenadante e colocou-se no tubo contendo os 100 µL transferidos anteriormente (juntaram-se as duas partes). Desta forma, o produto resultante da seleção dos fragmentos totalizou em 250 µL, que foi conservado a -20°C.

Os fragmentos selecionados foram amplificados (6^a. Etapa), adicionando alguns reagentes em um tubo de 0,2 mL (tabela 5) e o colocando em termociclador com a seguinte programação: um ciclo de 95 °C por 1 minuto, 25 ciclos de 94 °C por 40 segundos, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e um ciclo de 72 °C por 5 minutos. Após a amplificação dos fragmentos selecionados, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%.

Tabela 5: Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na amplificação dos fragmentos selecionados durante a construção de biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites de *Duroia macrophylla*

Reagentes	Volume (μL)
Água ultrapura	15,6
Tampão 10X	5
MgCl ₂ (25 mM)	3
dNTP (2,5 mM)	4
RSA 21 (10 μM)	2
Taq DNA polimerase	0,4
Fragmentos selecionados	20
Volume final	50

A clonagem em um vetor pGEM-T *Easy Vector System I* (Promega) (7^a. Etapa) consistiu em adicionar alguns reagentes em um microtubo de 0,2 mL (tabela 6). Em seguida, o tubo foi colocado em termociclador a 4 °C *overnight*.

Tabela 6: Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na clonagem em um vetor durante a construção de biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites de *Duroia macrophylla*

Reagentes	Volume (μL)
Água ultrapura	6,5
Tampão 2X	5
Plasmídeo	1
T4 DNA ligase	1,5
Produto da PCR	6
Volume final	20

A transformação bacteriana foi realizada por eletroporação (8^a. Etapa), utilizando a bactéria eletrocompetente *One Shot Top 10 Eletctrocomp E. coli* (Invitrogen). a voltagem do eletroporador foi ajustada para 2500 volts. Foram adicionados 25 μL de água ultrapura em cerca de 25 μL de células eletrocompetentes, nesta mistura, foram adicionados 4 μL da reação de ligação (produto da clonagem) que posteriormente foi levada ao eletroporador. Posteriormente adicionaram-se 950 μL de meio de cultura SOC.

As células foram incubadas por 1 hora a 37 °C, enquanto isso, distribuíram-se 80 mL de meio LB sólido misturados com 320 µL de ampicilina (100 mg/mL) em cada uma das 3 placas de Petri da biblioteca. Após solidificação do meio, foram colocados 30 µL de IPTG e 30 µL de X-Gal em cada placa e 60 e 90 µL de células, respectivamente. Espalhou-se com uma alça de *Drigalsky* e incubou-se *overnight* a 37 °C, em seguida, colocou-se em geladeira por 1 hora para que as colônias ficassem azuis. Após isso, foi realizada a manutenção dos clones (9ª. Etapa), onde foi utilizada placa ELISA com fundo em U, contendo 200 µL de meio líquido e ampicilina (100 µg/mL) por poço. Com auxílio de um palito de madeira as colônias foram capturadas e colocadas em cada poço, separadamente, sendo que no penúltimo poço foi capturada uma colônia azul e no último poço foi colocado palito sem colônia para servir como controle negativo da biblioteca. As bactérias permaneceram em crescimento *overnight* (22 horas) a 37 °C, depois, guardou-se em freezer a -20 °C.

A extração do DNA plasmidial (10ª. etapa) foi realizada pelo método miniprep, que consistiu em colocar 1 mL de meio *Circle Grow* contendo ampicilina em cada pocinho de uma placa *Deep Well*. Inoculou-se 2 µL dos clones individuais com o auxílio de uma pipeta multicanal e selou-se com adesivo. Incubou-se a 37 °C *overnight*, a 300 rpm, centrifugou-se por 9 minutos a 400 rpm e descartou-se o sobrenadante. Manteve-se a placa invertida sobre o papel absorvente por 1 minuto. Adicionou-se a cada pocinho 240 µL de GTE (*Glicose*, *Tris-HCl*, *EDTA*) + 1,5µL de RNase 10mg/mL, selou-se a placa com adesivo e agitou-se no vortex por 2 minutos. Por fim, adicionou-se a cada pocinho 60 µL de NaOH 0,2 M-SDS 1%, selou-se a placa com adesivo e misturou-se 30x por inversão. Incubou-se 10 minutos a temperatura ambiente. Após rápida centrifugação a 4000 rpm, adicionou-se 100 µL de KOAc 3 M a cada pocinho, selou-se a placa com adesivo e misturou-se 10x por inversão, e posteriormente centrifugado rapidamente a 1000 rpm. Transferiu-se o volume para uma placa filtro e centrifugou-se por 4 minutos a 4000 rpm a 20 °C. Removeu-se a placa filtro e adicionou-se 100 µL de isopropanol, selou-se a placa com adesivo e misturou-se 30x por inversão, centrifugou-se por 45 minutos a 4000 rpm, 20 °C. Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de etanol 70% gelado, centrifugou-se por 5 minutos a 4000 rpm, 20 °C e descartou-se o sobrenadante. Inverteu-se a placa e preservou-se o *pellet*. Deixou-se secar por 15 minutos à temperatura ambiente e ressuspendeu-se em 30 µL de água ultrapura.

O sequenciamento do DNA (11^a. etapa) é dividido em duas etapas: reação de sequenciamento e precipitação. Na reação de sequenciamento de DNA, foram adicionados alguns reagentes em uma placa (tabela 7) e em seguida, a placa foi colocada em termociclador com a seguinte programação: um ciclo de 95 °C por 1 minuto, 25 ciclos de 94 °C por 40 segundos, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e um ciclo de 72 °C por 5 minutos.

Tabela 7: Reagentes e seus respectivos volumes utilizados na reação de sequenciamento de DNA durante a construção de biblioteca genômica enriquecida em DNA microssatélites de *Duroia macrophylla*

Reagentes	Volume (µL)
Água ultrapura	4,8
Tampão 5X	2
BigDye	0,7
Primer T7 [5uM]	1
DNA	1,5
Volume final	10

Posteriormente foi realizada a reação de precipitação, e na placa foram adicionados 32,5 µL de EtOH/EDTA (2,5 µL de EDTA e 30 µL de EtOH 100 %), agitou-se em vortex e incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente, centrifugou-se por 30 minutos a 2000 rcf a 4 °C, descartou-se o líquido e centrifugou-se a placa invertida por 1 minuto a 100 rcf, em seguida, adicionou-se 30 µL de EtOH 70% centrifugou-se por 15 minutos a 1450 rcf a 4 °C, descartou-se o líquido e centrifugou-se a placa invertida por 1 minuto a 100 rcf. Incubou-se a 37 °C por 45 minutos no termociclador e ressuspendeu-se em 10 µL de formamida Hi-Di, agitou-se em vortex por 15 minutos em velocidade 4 e colocou-se em termociclador por 3 minutos a 95 °C, e em seguida a placa foi injetada no *ABI 3130 xl* para a eletroforese de sequenciamento nucleotídico.

3.3. Caracterização da biblioteca genômica

As sequências nucleotídicas foram analisadas com o auxílio do programa *CHROMAS 2.6.5* (Technelysium Pty Ltd, 2018), através de eletroferograma (Figura 2), e a partir da análise foram selecionadas as sequências nucleotídicas de boa

qualidade para verificação da presença de microssatélites através do programa *WEBSAT* (Martins et al., 2009), com os parâmetros: dinucleotídeos repetidos no mínimo 5 vezes, trinucleotídeos 4 vezes, tetranucleotídeo, pentanucleotídeo e hexanucleotídeo 3 vezes (Figura 3).

Figura 2: Eletroferograma de sequência nucleotídica obtida a partir de DNA plasmidial contendo região microssatélite de *Duroia macrophylla*, com motivo de repetição do tipo tetranucleotídeo (TCAA)₃.

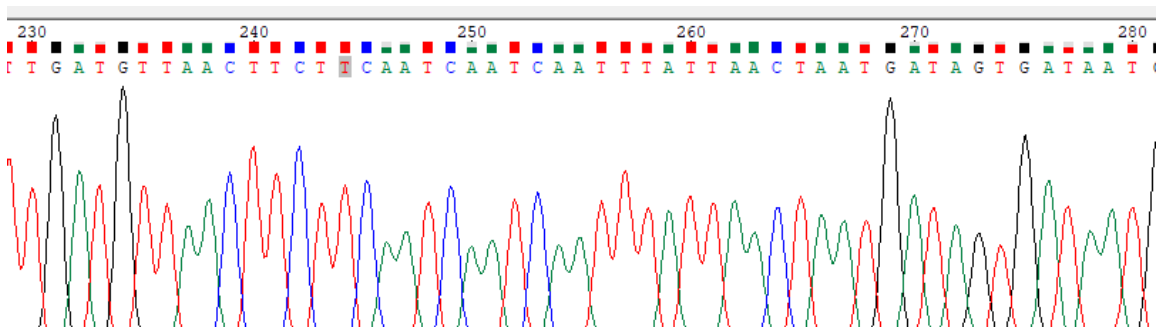


Figura 3: Parâmetros utilizados para verificar a presença de microssatélites de *Duroia macrophylla* no programa *WEBSAT* (Martins et al., 2009).



3.4. Desenho de *primers*

Para o desenho de *primers* também foi utilizado o programa *WEBSAT* (Martins et al., 2009), com os seguintes parâmetros: tamanho mínimo do *primer* de 17 pb e máximo 23 pb, a temperatura de anelamento mínima 55° e máxima 65°, a quantidade mínima de guanina 50% e máxima 80% e o tamanho do fragmento entre 100 e 350pb (Figura 4).

Figura 4: Parâmetros utilizados para o desenho dos *primers* para *Duroia macrophylla* no programa *WEBSAT* (Martins et al., 2009).



The image shows the WebSat software interface with the following parameters:

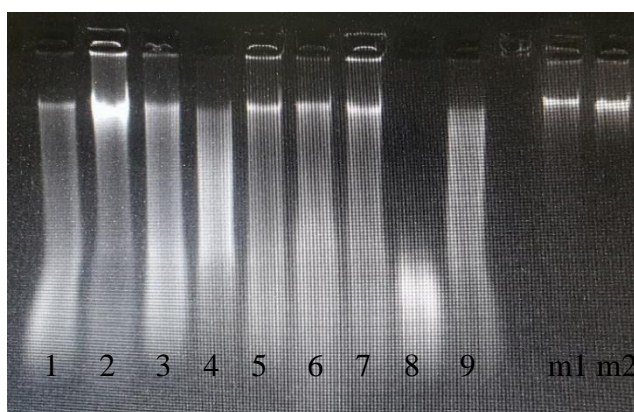
Parameter	Value	Label	Value	Label	Value
Primer Size Min:	17	Opt:	18	Max:	23
Primer Tm Min:	55.0	Opt:	60.0	Max:	65.0
Primer GC% Min:	50.0			Max:	80.0
Product Size:	100-350				

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração do DNA genômico

As diferentes condições de extrações de DNA mostraram resultados de graus de eficiência diversificados (figura 5), sendo a extração 2 com uma maior integridade e concentração de DNA genômico. A concentração do DNA do fago lambda (fermentas) foi ajustada para 50 ng/μL e 100 ng/μL (m1 e m2, respectivamente).

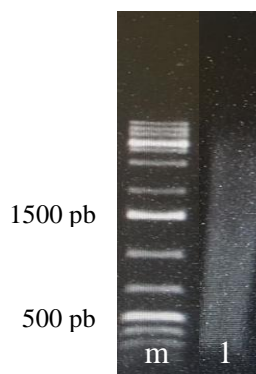
Figura 5: Perfil de rendimento de extração de DNA genômico de indivíduos de *Duroia macrophylla* em gel de agarose 1% usando 9 diferentes métodos. Legenda: m1 e m2, concentração de 50 e 100 ng/μL, respectivamente.



4.2. Construção da biblioteca genômica

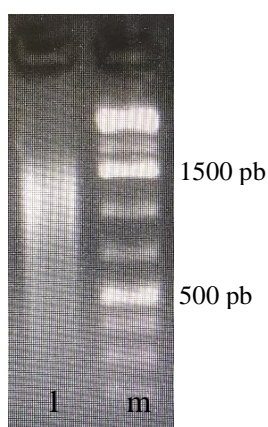
Devido a observação da concentração de DNA genômico em eletroforese em gel de agarose 1%, selecionou-se a amostra da extração 2 para a construção da biblioteca genômica. Foi realizada a digestão com enzima de restrição RSA I, e em seguida, o DNA digerido foi analisado em eletroforese e gel de agarose 1% (figura 6).

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose 1% da digestão do DNA genômico de *Duroia macrophylla*. Legenda: m- marcador 1 kb *plus*; 1- DNA digerido.



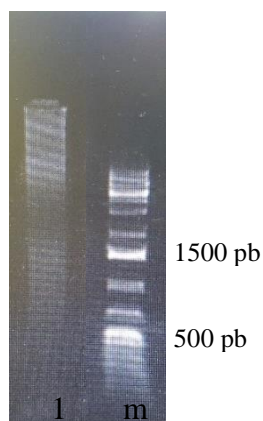
Foram utilizados 20 μ L do produto da digestão na ligação de adaptadores, que tem como objetivo garantir que todos os fragmentos digeridos tenham uma terminação comum e conhecida. Após esta ligação, foi realizada uma pré-amplificação via PCR, a fim de aumentar a quantidade de fragmentos e garantir que a ligação tenha ocorrido, o resultado dessa PCR pode ser observado em eletroforese em gel de agarose 1% (figura 7).

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1% da pré- amplificação via PCR de *Duroia macrophylla*.
Legenda: 1- Produto da pré- amplificação; m- marcador 1 kb *plus*



O produto da pré-amplificação foi purificado e utilizado na seleção dos fragmentos contendo microssatélites pelo método de hibridização. Após esta seleção, foi realizada a amplificação dos fragmentos selecionados para gerar fragmentos de fita dupla em maior quantidade. Esta PCR foi analisada em eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 8).

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação dos fragmentos selecionados de *D. macrophylla* Legenda: 1- Produto da amplificação dos fragmentos selecionados; m- marcador 1 kb *plus*.



Verificou-se que os fragmentos selecionados foram amplificados, e a partir disso, foi possível realizar a clonagem, que tem o objetivo de ligar os fragmentos amplificados via PCR a um vetor de clonagem. Em seguida, foi realizada a transformação bacteriana por eletroporação em *One Shot TOP10 Electrocomp E. coli*, transformando células da bactéria com o produto de clonagem, a fim de proporcionar a amplificação do inserto. Nesta etapa, foram obtidos os valores de *Actual volts* que foi igual a 2330 volts e *Time volts* igual 2,2 ms.

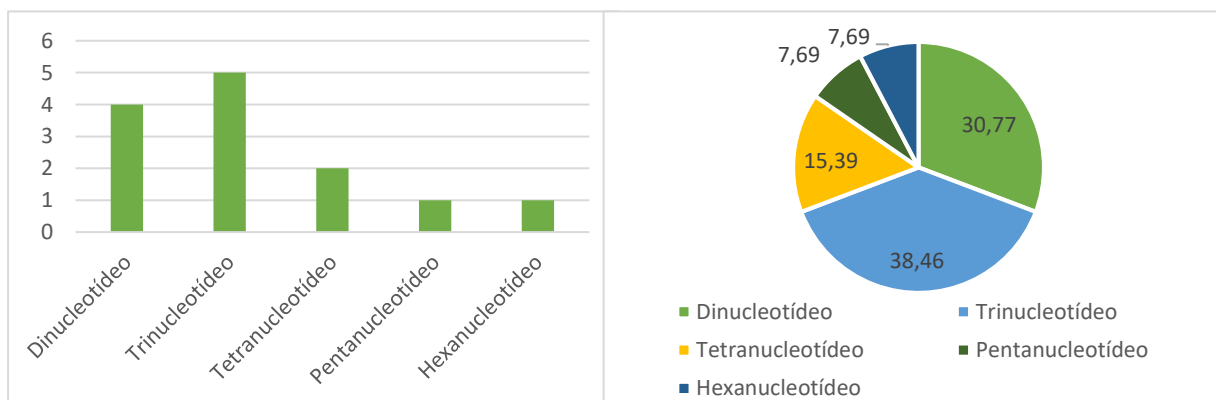
4.3. Caracterização da biblioteca genômica

A biblioteca genômica de *D. macrophylla* foi construída a partir de duas placas, cada uma com 96 clones, totalizando assim 192 clones. Destes, foi realizada a extração do DNA plasmidial e posteriormente o sequenciamento com o *primer forward* T7, sendo obtidos 104 clones com sequência de DNA de boa qualidade, dos quais 13 clones apresentaram um total de 13 microssatélites.

Na construção de uma biblioteca enriquecida com sequências simples repetitivas para *Bactris gasipaes* foram desenvolvidos 18 marcadores microssatélites (BILLOTTE et al., 2004).

Quanto ao motivo de repetição, os microssatélites foram caracterizados como: dinucleotídeos (30,77%), trinucleotídeos (38,46%), tetranucleotídeos (15,39%), pentanucleotídeos (7,69%) e hexanucleotídeos (7,69%) (Figura 9). Quanto à natureza de repetição, todos os microssatélites foram caracterizados como perfeitos.

Figura 9: Caracterização da biblioteca genômica enriquecida em regiões de microssatélites desenvolvida para *Duroia macrophylla* quanto ao motivo de repetição dos microssatélites.



Em plantas, os sítios de microssatélites estão distribuídos com uma frequência de um a cada 50 mil pares de bases, esta informação pôde ser comprovada a partir do estudo realizado com 34 espécies vegetais. Onde, afirma-se ainda que o dinucleotídeo AT é o elemento mais repetido e mais comum entres as espécies (MORGANTE e OLIVERI, 1993). Enquanto que neste trabalho o motivo mais numeroso foi do tipo trinucleotídeo.

4.4. Desenho de *primers*

Foi possível desenhar *primers* para 11 locos microssatélites, a partir das 13 sequências de boa qualidade que apresentavam o marcador molecular (Tabela 8). Os *primers* desenhados flanqueiam regiões que apresentaram tamanho médio de 271 pares de bases (pb), sendo a maior com 350 pb e o menor com 150 pb.

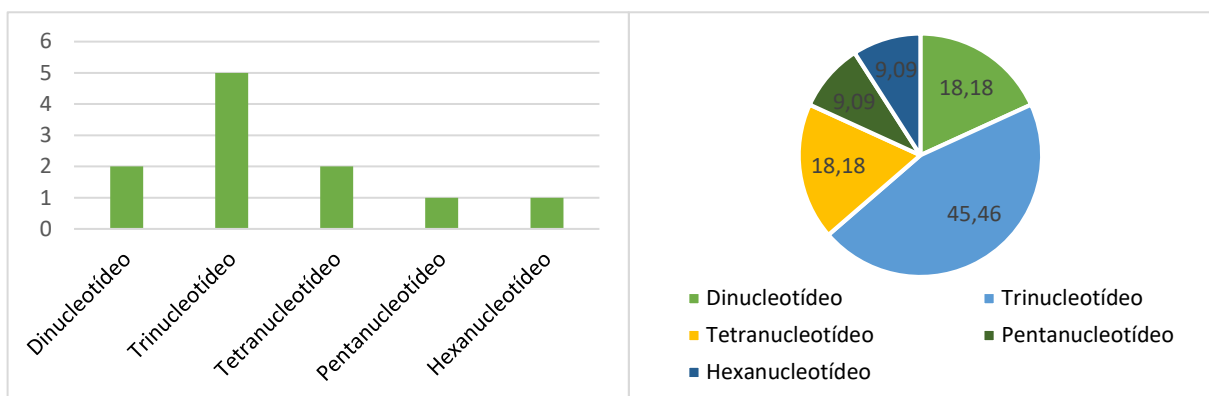
De acordo com Penha (2007), todos os fragmentos contendo microssatélites desenvolvidos para o maracujá possuíam entre 300 a 700 pb, tamanhos que se apresentavam ideais para se obter sucesso no sequenciamento.

Tabela 8: Locos microssatélites de *Duroia macrophylla*, com o motivo de repetição e tamanho do fragmento.

Locos SSR	Motivo de repetição	Tamanho (pb)
DM1	(ATATAC) ₃	264
DM2	(AC) ₅	150
DM3	(GT) ₅	295
DM4	(TTCT) ₃	203
DM5	(GGA) ₄	278
DM6	(ATG) ₄	350
DM7	(TCAA) ₃	336
DM8	(TCT) ₄	280
DM9	(TCC) ₄	255
DM10	(AGA) ₅	238
DM11	(GCAAT) ₃	338

Dos 13 microssatélites foram desenhados *primers* para 11 locos, dos quais a maioria é do tipo trinucleotídeo (45,46%), seguida de dinucleotídeo e tetranucleotídeo (18,18 %) e pentanucleotídeo e hexanucleotídeo (9,09%).

Figura 10: Caracterização da biblioteca genômica enriquecida em regiões de microssatélites desenvolvida para *Duroia macrophylla* quanto ao motivo de repetição dos microssatélites a partir dos quais foram desenhados *primers*.



No desenvolvimento da biblioteca enriquecida com locos microssatélites para *Acrocomia aculeata*, 88,78% dos insertos sequenciados apresentaram pelo menos um loco microssatélite, dos quais 39,29% foram utilizados para desenho dos *primers* e, destes 6,75% foram sintetizados. Os motivos mais frequentes encontrados na análise foram os pentanucleotídeos, poucas sequências repetitivas de motivos trinucleotídeos e tetranucleotídeos (NUCCI, 2007).

A partir da biblioteca genômica enriquecida de *Byrsonima cydoniifolia* foi possível isolar e sequenciar 60 clones recombinantes, dos quais 39 apresentaram sequências de boa qualidade e destes foi possível identificar 22 clones com regiões microssatélites, o que equivale a 36,6% do total de clones recombinantes obtidos e a 56,4% das sequências que estavam com boa qualidade para buscar regiões microssatélites (BERNARDES, 2014)

No desenvolvimento de marcadores microssatélites em *Passiflora alata*, foram analisadas 529 sequências, das quais 221 continham microssatélites (com 246 microssatélites, no total). Isto representa um enriquecimento da biblioteca de 41,77% (PENHA, 2007).

5. CONCLUSÃO

A partir da construção da biblioteca genômica enriquecida com microssatélites desenvolvida para o *D. macrophylla*, foi possível realizar o desenho de *primers* para 11 locos microssatélites, a partir das 13 sequências contendo o marcador.

Foi verificado que o rendimento até o momento, com relação a quantidade de microssatélites, foi de 6,77% do total de clones sequenciados (192) e 12,5% do total de clones que apresentaram sequências de boa qualidade (104). Sendo que o motivo de repetição mais comum foi do tipo trinucleotídeo.

6. REFERÊNCIAS

- ATHERLY, A.G.; GIRTON, J.R.; MCDONALD, J.F. *The Science of Genetics*. FortWorh: Harcourt College Publishers, 704p, 1999.
- BERNARDES, V. *Isolamento, Caracterização e Transferibilidade de Marcadores Microsatélites de *Byrsonima cydoniifolia* A. JUSS. (MALPIGHIACEAE)*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 95p, 2014.
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. *Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops*. *Fruits*, 54: 277-288, 1999.
- BILLOTTE, N.; COUVERUR, T.; MAESEILAC, N.; BROTTIER, P.; PERTHUIS, B.; VALLEJO, M.; NOYER, J. L.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P.; RISTERUCCI, A. M.; PINTAUD, J. C. *A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth); characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae*. *Molecular Ecology*, 4: 580-582, 2004.
- CAIXETA, T.E.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYANA, N.S. *Tipos de marcadores moleculares*. In: Borém, A. Caixeta, T.E. (Eds). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, p. 9-78, 2006.
- CONTE, R. *Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* MART. Submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microsatélites*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 135p, 2004.
- CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. *The potential of alkaloids in drug discovery*. *Phytother Res* 15:183–205, 2001.
- DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELE, R. *Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae)*. *Molecular Ecology*, 8: 1585-1592, 1999.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. *Isolation of plants DNA from fresh tissue*. *Focus*, 12: 13-15, 1990.
- ESTOUP, A.; GARNERY, I.; SOLIGNAC, M.; CORNUET, J.M. *Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models*. *Genetics*, 140: 679-695, 1995.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília: Embrapa, 220 p, 1998.

- FLORA DO BRASIL, 2018. *Rubiaceae*. (<http://reflora.jbrj.gov.br/relora/floradobrasil/FB38761>). Acesso em 05/04/2018.
- FREDERICKSON, M.E.; GREENE, M.J.; GORDON, D.M. Ecology: "Devil's gardens" bedevilled by ants. *Nature*, 437: 495-496, 2005.
- HEITZMAN, M.E., C.C. NETO, E. WINIARZ, A.J. VAISBERG, and G.B. HAMMOND. *Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Uncaria (Rubiaceae)*. 2005.
- HOEHNE, F.C. *Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais*. São Paulo: Graphicars, 355 p, 1939.
- JOLY, A.B. *Botânica- Introdução à taxonomia vegetal*. 6. Ed. São Paulo: Nacional, 777p, 1983.
- KAGEYAMA, P.Y.; CARON, D.; GANDARA, F.B.; MARTINS, K.; WADT, L.H.O.; LACERDA, C.M.B.; BOUFLEUER, N.T.; RIBAS, L.A.; MORENO, M.A.; FERRAZ, E.M. *Genetic and ecological aspects of nonwood forest product exploitation in two western Amazonian settlements*. IPGRI, Roma, 149-217, 2004.
- KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; THOMPSON, K.D.; GAMBARI, R. *Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viroses*. *Antiviral research*, 67: 107-119, 2005.
- LANZARO, G.C.; ZHENG, L.; TOURE, Y.T.; TRAORE, S.F.; KAFATOS, F.C.; VERNICK, K.D. *Microsatellite DNA and isozyme variability in a west African population of Anopheles gambiae*. *Insc. Mol. Bio.*, 4: 105-112, 1995.
- LOPEZ, A.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. *Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77: 189-196, 2001.
- MARTINS, W.S.; LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F.D.S.; BERTIOLI, D.J. *WebSat - A web software for microsatellite marker development*. *Bioinformatics*, 3: 282-283. 2009.
- MARTINS, D. *Estudo químico de Duroia macrophylla Huber (Rubiaceae)*. 231 p. Tese de Doutorado (Doutorado em biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus [Orientadora: Prof^a. Dra. Cecilia Veronica Nunez]. 2014.
- MARTINS, D.; FACHIN-ESPINAR, M.T.; OLIVEIRA, T.A.; LIMA, K.C.S.; CAVALCANTI, R.M.; TELES, B.R.; NUNEZ, C.V. *Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de Duroia macrophylla (Rubiaceae)*. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 2:158-171, 2014.

MORGANTE, M.; OLIVEIRI, A.M. *PCR- amplified microsatellites as markers in plant genetics*. The Plant Journal, 3: 175-182, 1993.

MOXON, E. R., WILLS, C. *DNA microsatellites: agents of evolution? Scientific American*, 280: 94-99, 1999.

NUCCI, S.M. *Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de população de macaúba*. Dissertação de mestrado, Instituto agrônomo, Campinas, São Paulo. 168p. 2007.

NUNEZ, C.V.; SANTOS, P. A.; ROUMY, V.; HENNEBELLE, T.; MESQUITA, A.S.S.; BAILLEUL, F. *Indole alkaloids from Duroia macrophylla (Rubiaceae)*. Planta Medica, 75: 1037-1037, 2009.

NUNEZ, C.V.; VASCONCELOS, M.C. *Novo Alcaloide Antitumoral de Duroia macrophylla*. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI10201203380 data de depósito: 31/12/2012. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2012a.

NUNEZ, C.V.; VASCONCELLOS, M.C. *Composição farmacêutica antitumoral compreendendo alcaloide, processo para sua obtenção, e seu uso*. Patente: Privilégio de Inovação. Brasil. Número do registro: PI10201203380, data de depósito: 28/12/2012. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2012b.

NUNEZ, C.V.; MARTINS, D.; RAMOS, D.F.; SILVA, P.E.A. *Uso de composto, método ex-vivo, processo e extrato purificado*. Patente: Privilégio de Inovação. Brasil. Número do registro: BR1020140308636, data de depósito: 09/12/2014. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. 2014.

PAETKAU, D. CALVERT, W. STIRLING, I. STROBERCK, C. *Microssatellite analysis of population structure in Canadian polar bears*. Molecular Ecology, 4: 347- 354, 1995.

PENHA, H. A. *Desenvolvimento de marcadores microssatélites em Passiflora alata Curtis*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 93p, 2007.

QUELLER, D.C.; GOODNIGHT, K.F. *Estimating relatedness using genetic markers*. Evolution, 43: 258-275, 1989.

RAPOSO, A. 2007. *Estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de andiroba (Carapa guianensis Aubl., Meliaceae) visando o manejo e a conservação da espécie*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 152p.

- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 704 p, 2008.
- TAYLOR, C.M.; CAMPOS, M.T.V.A. *Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae*. Zappi Rodriguesia, 58: 549-616, 2007.
- TAYLOR, C.M.J.A.; STEYERMARK, P.G.; DELPRETE, A.; VINVENTINI, R.; CORTÊS, D. ZAPPI, C.; PERSSON, C.B.; COSTA, E.J.A.; STEYERMARK, J.S.; STEYERMARK, P.E.; BERRY, B.K. *Rubiaceae, Flora of the Venezuelan Guayana. Annals of the Missouri Botanical Garden*. 2004.
- VINSON, C.C.; AZEVEDO, V.C.R.; SAMPAIO, I; CIAMPI, A.Y. *Development of microsattelite markers for Carapa guianensis (Aublet), a tree species from the Amazon forest*. Molecular Ecology Notes, 5: 33-34, 2005.
- WEBER, J.L. *Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms*. Genomics, 7: 524-530, 1990.