

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Geral  
Programa de Pós-Graduação em Genética

Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para *Baccharis dracunculifolia*  
(Asteraceae) utilizando *Next-Generation Sequencing***

Autora: Heloiza Navarro de Novaes

Orientador: Dr. Geraldo Wilson Afonso Fernandes

Coorientadoras: Dra. Patricia de Abreu Moreira  
Dra. Renata Santiago de Oliveira Buzatti

Belo Horizonte  
2017

Heloiza Navarro de Novaes

**Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para *Baccharis dracunculifolia*  
(Asteraceae) utilizando *Next-Generation Sequencing***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Geraldo Wilson Fernandes

Coorientadoras: Dra. Patrícia de Abreu Moreira  
Dra. Renata Santiago de Oliveira Buzatti

Belo Horizonte  
2017

043

Novaes, Heloiza Navarro de.

Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) utilizando Next-Generation Sequencing [manuscrito] / Heloiza Navarro de Novaes. – 2017.

35 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Geraldo Wilson Fernandes. Coorientadoras: Dra. Patrícia de Abreu Moreira; Dra. Renata Santiago de Oliveira Buzatti.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Microssatélites (Genética). 2. *Baccharis*. 3. Sequência de Bases. I. Fernandes, Geraldo Wilson. II. Moreira, Patrícia de Abreu. III. Buzatti, Renata Santiago de Oliveira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título

CDU: 575

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG



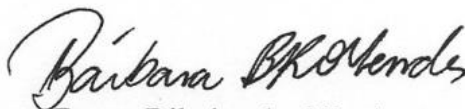
**"Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para  
Baccharis dracunculifolia (Asteraceae) utilizando Next-Generation  
Sequencing"**

**Heloiza Navarro de Novaes**

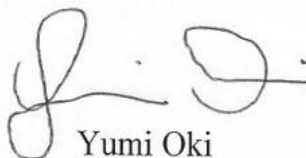
Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Geraldo Wilson Fernandes  
UFMG



Bárbara Bruna Ribeiro de Oliveira Mendes  
UFMG



Yumi Oki  
UFMG

Belo Horizonte, 30 de outubro de 2017.

Dedico esse trabalho a meus pais,  
Iracema e Hércules (*in memoriam*)  
que tanto fizeram por mim e  
pela minha formação.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, me auxiliaram no desenvolvimento deste projeto.

Ao meu orientador Dr. Geraldo Wilson, pela confiança no meu trabalho e pelo crescimento profissional e pessoal que conquistei sob seus ensinamentos.

A minha coorientadora Patrícia, pelo exemplo de simplicidade, pela amizade, compreensão e disponibilidade.

A minha coorientadora Renata, pelos ensinamentos e contribuições no desenvolvimento desse trabalho.

A todos do Laboratório de Ecologia Evolutiva e Biodiversidade – UFMG pela amizade, paciência, colaboração e incentivo. Especialmente a Jessica, Letícia e Bárbara pelo apoio e coletas. A Thaíse Bahia pela força e comentários na redação e a Wallace Beiroz pela ajuda com o mapa das coletas.

Aos colegas do Laboratório de Genética Evolutiva e de Populações – UFOP, onde realizei os experimentos deste trabalho, pela amizade e troca de conhecimentos.

A Renata e Elisangela do Centro de Pesquisa Renné Rachou (Fiocruz Minas) que tanto me auxiliaram na genotipagem das amostras.

A minha mãe Iracema, fonte inesgotável de amor e força e aos meus irmãos Eliza e Henrique, exemplos de dedicação à nossa família, por ser meu apoio em todas as horas.

A Leandro e sua família, pelo amor, proteção, escuta e olhar compreensivo.

A minha família, tios (as), primos(as) e amigos, às vezes de perto, outras de longe, mas sempre conectados, fizeram parte da minha jornada e torceram pelo meu sucesso compreendendo minhas ausências em tantos momentos.

A Stephanie, minha prima, e a todas as meninas da Republica Bico Doce pelo carinho, alegria e acolhida em Ouro Preto.

A direção e colegas da Escola Estadual Prof.<sup>a</sup> Nair de Oliveira Santana pela compreensão em minhas ausências, carinho e força dada.

Ao PGGENÉTICA pelo conhecimento profissional e acadêmico adquirido

A secretaria do PGGENÉTICA, pelo profissionalismo e simpatia.

Às agências de fomento CNPq, Capes e Fapemig pelo financiamento do projeto.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	I
LISTA DE FIGURAS .....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	IX
RESUMO.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Marcadores Moleculares Microssatélites .....	3
1.2 Os campos rupestres .....	8
1.3 <i>Baccharis dracunculifolia</i> : a espécie de estudo .....	9
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo Geral .....	12
2.2 Objetivos específicos .....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Local de estudo e amostragem .....	13
3.2 Extração de DNA e sequenciamento .....	14
3.3 Análise das sequências e desenho dos <i>primers</i> .....	15
3.4 Otimização dos <i>loci</i> microssatélites.....	15
3.5 Caracterização dos <i>loci</i> microssatélites.....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
4.1 Sequenciamento e desenho dos oligonucleotídeos .....	17
4.2 Amplificação dos <i>loci</i> microssatélite em <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	19
4.3 Caracterização dos <i>loci</i> microssatélites.....	23
4.4 Teste de amplificação para espécies congênicas .....	25
5 CONCLUSÕES.....	27
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Baccharis dracunculifolia* (Fernandes, G. W., acervo pessoal)..... 10
- Figura 2.** (a) *Baccharis concinna* (Heiden, G.) e (b) *Baccharis aphylla* (Fernandes, G. W., acervo pessoal)..... 13
- Figura 3.** Localização dos indivíduos de *Baccharis dracunculifolia* amostrados na Serra do Cipó. .... 14
- Figura 4.** Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata para verificação de polimorfismos no locus microssatélites Bdr6 de *Baccharis dracunculifolia*, em 16 indivíduos amostrados e numerados nas canaletas (de 10 a 69). .... 20
- Figura 5.** Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata para verificação de polimorfismos no locus microssatélites Bdr25 de *Baccharis dracunculifolia*, em 16 indivíduos amostrados e numerados nas canaletas (de 10 a 69). .... 20
- Figura 6.** Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata para verificação de polimorfismos no locus microssatélites Bdr22 de *Baccharis dracunculifolia*, em 16 indivíduos amostrados e numerados nas canaletas (de 10 a 69). .... 21
- Figura 7.** Análise da genotipagem de três indivíduos com o primer Bdr31 de *Baccharis dracunculifolia* no software Geneious®..... 23
- Figura 8.** Amplicons produzidos por PCR em oito indivíduos de *Baccharis concinna*, numerados nas canaletas (de 1 a 8) utilizando o primer Bdr6 desenvolvidos para *Baccharis dracunculifolia*, visualizados em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. \*Presença de bandas nos indivíduos. .... 25
- Figura 9.** Amplicons produzidos por PCR em nove indivíduos de *Baccharis aphylla* numerados nas canaletas (de 1 a 9) utilizando o primer Bdr31 desenvolvido para

*Baccharis dracunculifolia*, visualizados em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. \*Presença de bandas nos indivíduos. ....26

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Estatísticas dos microssatélites desenvolvidos a partir de dados obtidos por NGS de <i>Baccharis dracunculifolia</i> . .....	18
<b>Tabela 2.</b> Tipos de SSRs encontrados nos <i>loci</i> potencialmente amplificáveis após filtragem das <i>reads</i> produzidas por NGS de <i>Baccharis dracunculifolia</i> . .....	18
<b>Tabela 3.</b> Características dos seis <i>loci</i> microssatélites desenvolvidos para <i>Baccharis dracunculifolia</i> . .....	22
<b>Tabela 4.</b> Resultado da caracterização dos <i>primers</i> de microssatélites desenvolvidos para <i>Baccharis dracunculifolia</i> . .....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau(s) Celsius
A	Adenina
C	Citosina
cpSSRs	Microssatélites cloroplastidiais
CTAB	Detergente <i>cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxi (nucleotídeo) 5' -trifosfato
F	<i>Primer</i> tipo <i>forward</i>
<i>F<sub>is</sub></i>	Índice de fixação
GB	Gigabytes
G	Guanina
He	Heterozigosidade esperada
Ho	Heterozigosidade observada
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
<i>I</i>	Probabilidade de identidade genética
<i>IC</i>	Probabilidade de identidade genética combinada
IAM	<i>Infinite-allele mutation model</i>
KAM	<i>K-allele mutation model</i>
m	Metros
MG	Estado de Minas Gerais, Brasil
mL	Mililitros
mM	Mili-molar
mtSSRs	Microssatélites mitocondriais
Na	Número de alelos
ng	Nanograma
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
nuSSRs	Microssatélites nucleares
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Q	Probabilidade de exclusão de paternidade
QC	Probabilidade de exclusão de paternidade combinada
R	<i>Primer</i> tipo <i>reverse</i>

SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SMM	<i>Stepwise mutation model</i>
SSRs	<i>Simple sequence repeats</i> ou microssatélites
T	Timina
Ta	Temperatura de anelamento do <i>primer</i>
Taq DNA polimerase	DNA polimerase termoestável de <i>Thermus aquaticus</i>
TPM	<i>Two-phase mutation model</i>
µg	Micrograma
µl	Microlitro

## RESUMO

Os marcadores microssatélites são altamente mutáveis e, em decorrência disso, demonstram a hipervariabilidade existente em espécies e populações. O desenvolvimento de marcadores microssatélites, que sempre foi considerado uma tarefa laboriosa e dispendiosa, vem sendo transformado pela tecnologia de sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing* – NGS) que permite uma identificação mais rápida e menos onerosa de um grande número de *loci* em organismos não-modelo para estudos ecológicos e evolutivos. Em populações de plantas naturais, identificar variações genéticas ecologicamente importantes ligadas ao clima ou a outras pressões de seleção é possível com uma análise genômica da população. A manutenção da diversidade genética intrapopulacional pode maximizar o potencial de uma espécie para resistir e se adaptar às mudanças ambientais. *Baccharis dracunculifolia* é um arbusto amplamente difundido no Sul e Sudeste do Brasil, bastante estudado do ponto de vista ecológico e com reconhecida importância farmacológica. Diante da relevância de *B. dracunculifolia* como espécie chave na sucessão natural de ecossistemas ameaçados como os campos rupestres, sua ampla distribuição na América do Sul e por suas propriedades medicinais e industriais, esse trabalho teve como objetivo ampliar o número de marcadores microssatélites atualmente disponíveis, constituindo uma ferramenta molecular capaz de gerar conhecimento sobre os padrões de distribuição da diversidade genética dessa espécie com informações úteis para sua conservação. Foi avaliada também a amplificação dos marcadores desenvolvidos no DNA genômico das espécies congêneras *Baccharis concinna* e *Baccharis aphylla*. As sequências geradas na plataforma *Illumina MiSeq* foram utilizadas para identificar *loci* potencialmente amplificáveis que, após filtrados e analisados, foram utilizados para o desenho de 36 *primers* com *motifs* de repetição perfeitos. Destes, 17 *primers* de regiões microssatélites com *motifs* repetições de tri- tetra- ou penta- nucleotídeos tiveram sua amplificação testada em uma etapa de otimização. Desenvolvemos com sucesso seis *primers* de *loci* microssatélites, três *primers* tetranucleotídeos, dois trinucleotídeos e um pentanucleotídeo, todos classificados como perfeitos. Essa seleção buscou acurácia e estabilidade na genotipagem dos indivíduos estabelecendo um conjunto de marcadores robustos para estudos de genética populacional.

**Palavras-chave:** microssatélites, NGS, *Baccharis*

## ABSTRACT

Microsatellite markers are highly mutable and, as a result, demonstrate hypervariability in species and populations. The development of microsatellite markers, which has always been considered a laborious and expensive task, has been transformed by the Next Generation Sequencing (NGS) technology that allows a faster and less costly identification of a large number of *loci* in non-model organisms for ecological and evolutionary studies. In natural plant populations, identifying ecologically important genetic variants linked to climate, or other selection pressures, is possible with genomic population analysis and maintaining intrapopulation genetic diversity can maximize the potential of a species to resist and adapt to environmental change. *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) is a shrub distributed across southeastern and southern South America, is relatively well studied from an ecological perspective and has pharmacological importance. Therefore, given the role of *B. dracunculifolia* as a key species in the natural succession of endangered ecosystems such as the rupestrian grasslands, its wide distribution in South America and its medicinal and industrial properties, this work aimed to increase the number of microsatellite markers currently available for *B. dracunculifolia*, representing a molecular tool capable of generating knowledge about the patterns of genetic diversity of this species, potentially providing information of relevance for conservation strategies. Amplification of the markers developed in the genomic DNA of the congeneric species *Baccharis concinna* and *Baccharis aphylla* was also evaluated. The sequences generated on the *Illumina MiSeq* platform were used to identify potentially amplifiable *loci* that, after being filtered and analyzed, were used to design 36 primers with perfect repeat motifs. Of these, 17 primers from microsatellite regions with tri-, tetra- or pentanucleotide repeats had their amplification tested in an optimization step. We successfully developed six *primers* of microsatellite *loci*, three tetranucleotide *primers*, two trinucleotides and one pentanucleotide, all classified as perfect. This selection sought accuracy and stability in genotyping by establishing a set of robust markers for population genetics studies.

**Keywords:** Microsatellites, NGS, *Baccharis*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Marcadores Moleculares Microsatélites

Uma importante ferramenta genética são os marcadores moleculares microsatélites (Litt e Luty, 1989), também conhecidos como curtas repetições em *tandem* (*Short tandem repeats* – STRs, de acordo com Edwards *et al.*, 1991), simples sequências repetidas (*Simple sequence repeats* - SSRs, segundo Jacob *et al.* 1991) ou polimorfismo no comprimento de sequências simples (*Simple sequence length polymorphism* – SSLP, em Tautz, 1989). Esses marcadores são repetições em *tandem* com *motifs* de 1-6 pares de bases (pb) que têm uma ocorrência frequente, presentes em todos os genomas, desde procarióticos a eucarióticos analisados até o momento (Zane *et al.*, 2002). Os microsatélites estão presentes mesmo nos menores genomas bacterianos (Gur-Arie *et al.*, 2000). A distribuição e a frequência de regiões microsatélites nos genomas são extremamente variáveis entre os organismos, em plantas, as repetições microsatélites mais frequentes são formadas pelo dinucleotídeo AT, enquanto que em animais as repetições AC são as mais comuns, sendo esta, possivelmente, uma característica geral distintiva para os genomas de plantas e de animais (Powell *et al.*, 2014). Os SSRs estão presentes tanto em regiões codificadoras como em regiões não codificadoras e são distribuídos ao longo do genoma nuclear ( $_{nu}$ SSRs), de cloroplasto ( $_{cp}$ SSRs) (Chung *et al.*, 2006; Provan *et al.*, 2001) e de mitocôndrias ( $_{mt}$ SSRs) (Rajendrakumar *et al.*, 2007; Soranzo *et al.*, 1999).

A localização no genoma é umas das maneiras de classificar os microsatélites, mas pode se considerar ainda o tamanho e tipo de unidade de repetição como critério para identificar os microsatélites. De acordo com o número de nucleotídeos por unidade de repetição, o SSR pode ser classificado como mono-, di-, tri-, tetra-, penta- ou hexanucleotídeos (Goldstein e Schlötterer, 1999). Considerando o arranjo dos nucleotídeos nos *motifs* (sequências ou motivos) de repetição, os microsatélites podem ser classificados como simples perfeitos, simples imperfeitos, compostos perfeitos e compostos imperfeitos (Goldstein e Schlötterer, 1999; Roy *et al.*, 2004). Repetições simples perfeitas são arranjos em *tandem* de uma única sequência de repetição (como exemplo  $[AGG]_n$ ). Considera-se repetições imperfeitas aquelas repetições perfeitas de uma ou mais unidades repetitivas que por vezes são interrompidos por sequências não repetidas (como exemplo:  $AAC_n[ACT][AAC]_{n+1}$ ), enquanto os arranjos compostos perfeitos são compostos por dois ou mais



diferentes *motifs* repetidos com o mesmo comprimento ou não (por exemplo  $[AGG]_n[AATC]_n$ ) e os arranjos compostos imperfeitos são interrompidos por uma ou mais repetições de comprimentos diferentes (por exemplo,  $[GGAT]_n[ACT][GTAA]_{n+1}$ ) (Miah *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2009).

O mecanismo mutacional dessas regiões no genoma pode ser explicado pelo modelo da derrapagem (*slippage*) da polimerase ou pela recombinação desigual durante a replicação do DNA. A correção de erros de replicação nas regiões microssatélites é controlada através do sistema de reparo de incompatibilidade de DNA (*mismatch repair* - MMR) (Chistiakov *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2003). No mecanismo de *slippage* durante a replicação do DNA, um erro não corrigido pela revisão exonucleolítica e pelo sistema de reparo MMR surge causando uma mutação que pode perder ou ganhar repetições com a mesma probabilidade, independentemente do tamanho, ou pode, em uma segunda possibilidade, passar por seleção natural, que atuaria contra alelos longos, apresentando uma forma de “teto” de comprimento de um microssatélite (Li *et al.*, 2003).

Considerando o modelo que propõe as mutações surgidas nos microssatélites pelo mecanismo recombinação desigual ou conversão de genes, temos contrações e expansões na série de repetições em larga escala. Isso se deve a uma desestabilização nas repetições dispostas *in tandem* e consequente alteração do comprimento dos SSRs, tornando os microssatélites *hotspots* de recombinação que atuam “interruptores” evolutivos capazes de modular a taxa de mutação em condições de rápida evolução e permitindo que as populações respondam rapidamente às condições ambientais em constante mudança (Bhargava e Fuentes, 2010).

O modelo de mutação *stepwise* (*stepwise mutation model* - SMM) assume que uma mutação altera o comprimento de uma matriz de repetição, adicionando ou removendo uma unidade de repetição, a uma taxa fixa, simétrica e aleatória, independente do comprimento da repetição (Ellegren, 2004). No modelo de duas fases (*two-phase model* - TPM) representa uma proporção maior eventos de mutações com mudanças maiores do que as repetições individuais do SMM, assim, eventos mutacionais resultam adições ou remoções de uma unidade repetida, havendo a possibilidade de alterações infrequentes de um grande número de repetições (Bhargava e Fuentes, 2010; Chistiakov *et al.*, 2006). Já o modelo de alelos infinitos (*infinite-allele model* - IAM) assume que cada mutação gera um novo alelo, sempre resultando em um estado alélico ainda não encontrado anteriormente na população, sem considerar homoplasias (Bhargava e Fuentes, 2010). O modelo considerado mais realista é o modelo de K-alelos (*K-allele model* - KAM), por considerar todos os alelos como equivalentes e com a mesma probabilidade de mutação de um alelo para qualquer outro alelo e permitindo homoplasias (Bhargava e Fuentes, 2010).

As regiões flaqueadoras de *loci* microssatélites não sofrem mutações com frequência durante a replicação do DNA e são utilizadas para o desenho dos iniciadores ou *primers* que irão diferir os alelos em comprimento permitindo sua distinção por eletroforese em gel de alta resolução, com uma rápida genotipagem de muitos indivíduos em vários *loci* por uma fração do preço do sequenciamento do DNA (Selkoe e Toonen, 2006).

Os microssatélites são altamente mutáveis e, em decorrência disso, demonstram a hipervariabilidade existente em espécies e populações. Quando se fala em elevadas taxas de mutação para microssatélites estamos considerando uma variação de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}$  eventos por *locus* a cada geração, o que é expressivamente maior do que as taxas de substituição pontual de nucleotídeos nos *loci* de genes codificantes (Bhargava e Fuentes, 2010).

Assim, uma das características mais importantes dos marcadores SSR é a detecção de vários alelos por *locus*. Trata-se de uma hipervariabilidade que os torna mais informativos por *locus* do que os marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorfismo*, SNP), geralmente bialélico. Estima-se que seja necessário aproximadamente  $(k - 1)$  vezes mais marcadores bialélicos para obter o mesmo conteúdo de informação genética fornecido por um microssatélite com  $k$  alelos (Zalapa *et al.*, 2012).

Dentre as vantagens dos marcadores SSR, quando comparados a outros marcadores moleculares, pode-se elencar ainda o fato de serem abundantes e relativamente distribuídos de maneira uniforme nos genomas; serem codominante em um único *locus*; detectarem a variabilidade genética facilmente por PCR; possuírem alta repetibilidade; serem transferíveis entre espécies estreitamente relacionadas; requererem pouco DNA (~1 ng) por reação e serem passíveis de análise de alto rendimento, incluindo genotipagem fluorescente automatizada e multiplexação (Zalapa *et al.*, 2012).

A transferibilidade dos marcadores microssatélites para espécies ou gêneros relacionados foram demonstrados em vários estudos. O potencial de transferibilidade de um marcador microssatélite em plantas depende do sucesso de sua amplificação, principalmente, dentro do gênero (Barbará *et al.* 2007).

O desenvolvimento dos marcadores microssatélites sempre foi considerado uma tarefa laboriosa e dispendiosa devido às etapas de clonagem e sequenciamento necessárias para busca de microssatélites (Rico *et al.*, 2013). O método de construção de bibliotecas enriquecidas de microssatélites é demorado, requerendo uma média de 12 dias para obtenção de 8 a 20 *loci* microssatélites polimórficos de um total de 30-60 iniciadores testados (Hodel *et al.*, 2016; Zalapa *et al.*, 2012).

A tecnologia de sequenciamento de nova geração (*Next-Generation Sequencing* – NGS) vem acelerando o desenvolvimento de marcadores microssatélites, tradicionalmente baseados em bibliotecas genômicas, por permitir uma identificação mais rápida e menos

onerosa de um grande número de *loci* em organismos não-modelo para estudos ecológicos e evolutivos (Hodel *et al.*, 2016; Zalapa *et al.*, 2012).

A tecnologia NGS é utilizada para a descoberta de microssatélites com uma economia significativa no custo e tempo (Miah *et al.*, 2013). O sequenciamento produz milhões de *reads* de DNA com comprimento variáveis (25 a 700 pb) de acordo com as plataformas de sequenciamento, o protocolo de obtenção, a quantidade de dados produzidos e ainda pela análise desses dados (Unamba *et al.*, 2015; Zalapa *et al.*, 2012).

O NGS fornece milhares de *reads* contendo *loci* microssatélites, sem que haja a necessidade prévia de montar uma biblioteca enriquecida de DNA e, ao permitir o acesso direto às regiões que flanqueiam os SSRs, é possível analisar e projetar iniciadores que amplifiquem apenas marcadores microssatélites classificados como perfeitos, estes apresentam maior variabilidade alélica que os considerados compostos e são mais indicados para análises que assumem o modelo de mutação *stepwise* (Bonatelli *et al.*, 2015).

Os dados de sequências resultantes de um sequenciamento de nova geração podem ser aplicados ao desenvolvimento de marcadores microssatélites em espécies que não têm ou têm muito poucos SSRs disponíveis (Gilmore *et al.*, 2013; Zalapa *et al.*, 2012). O acesso direto à sequência permite ainda a identificação de regiões flanqueadoras de microssatélites conservadas entre espécies geneticamente relacionadas, com isso, é possível desenhar iniciadores conservados entre as espécies facilitando os testes de amplificação (Bonatelli *et al.*, 2015).

De maneira geral o processo de obtenção segue as seguintes etapas:

- I. Preparação da biblioteca, que segundo Head *et al.* (2014) envolve:
  - i. Seleção do material vegetal para o desenvolvimento do marcador SSR;
  - ii. Extração do DNA;
  - iii. Quantificação da amostra;
  - iv. Construção de bibliotecas com a fragmentação do DNA;
  - v. Ligação de adaptadores oligonucleotídicos específicos da plataforma de sequenciamento nas extremidades dos fragmentos e a reparação das pontas utilizando uma mistura de enzimas;
  - vi. Amplificação dos fragmentos com adaptadores por PCR;
  - vii. Seleção e leitura dos fragmentos.
- II. Uma vez que os dados foram gerados por NGS, os próximos passos, segundo Hodel *et al.* (2016) são:
  - i. Análise das *reads* geradas em programas específicos para dados de cada uma das plataformas e busca de sequências repetitivas com *softwares*

especializados em microssatélites como Geneious, GMATo, HighSSR, MISA, Msatcommander, PAL\_finder, QDD3, SSR Locator, SSR\_pipeline e STAMP;

- ii. Desenho e síntese dos *primers*;
- iii. Otimização e caracterização dos *primers* desenhados.

Uma vez desenvolvidos, os marcadores microssatélites são passíveis de genotipagem de alto rendimento, constituindo uma ferramenta extremamente valiosa para a análise de paternidade, construção de mapas genômicos, mapeamento de genes úteis, seleção assistida por marcadores e para o estabelecimento de relações genéticas e evolutivas (Kalia *et al.*, 2011).

Os microssatélites vêm desempenhando um papel importante nas estimativas iniciais de heterozigosidade, diferenciação genética entre populações, endogamia e eventos demográficos (Kirk e Freeland, 2011). O conhecimento sobre a diversidade genética dentro das populações é um importante parâmetro para o monitoramento de sua biodiversidade. A variação genética mantida por taxas moderadas e altas de fluxo gênico previnem consequências genéticas negativas como a depressão endogâmica e a deriva genética acarretadas pelo processo de fragmentação de habitats (Storfer, 1999).

Assim, o entendimento de como a paisagem influencia o fluxo gênico e a estrutura genética populacional é bastante relevante devido às crescentes mudanças climáticas que vem ocorrendo em todo o planeta. Nas regiões que têm sido afetadas mais intensamente, como as áreas montanhosas, este conhecimento é de crucial relevância. As áreas montanhosas representam verdadeiros berçários ou refúgios para muitas espécies de plantas e animais (Barbosa *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2014). As áreas altas proporcionam abrigos diante de um encolhimento progressivo dos habitats de baixa temperatura e alta elevação (Gottfried *et al.*, 2012), neste ambiente prediz-se que a flora e fauna endêmica possam desaparecer rapidamente face ao aquecimento global (Bitencourt *et al.*, 2016; Dirnböck *et al.*, 2011; Kelly e Goulden, 2008). Em um território geralmente adverso como este, as interações entre fluxo gênico e estrutura populacional devem estar intrinsecamente ligados e serem os responsáveis tanto pela distribuição das espécies na paisagem como pelas chances delas sobreviverem aos crescentes impactos das mudanças globais (Ashley *et al.*, 2015; Byars *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2015; Sork, 2016).

Em populações de plantas naturais, a identificação de variações genéticas ecologicamente importantes ligadas ao clima, ou a outras pressões de seleção, é possível com uma análise genômica da população, uma vez que a manutenção da diversidade

genética intrapopulacional pode maximizar o potencial as espécies para resistir e se adaptar às mudanças ambientais bióticas e abióticas (Jump *et al.*, 2009).

A associação entre  $n_{u}SSR$  e  $c_{p}SSR$  em populações naturais de *Nothotsuga longibracteata* (Pinaceae), distribuída atualmente em várias áreas de montanhas fragmentadas e isoladas no sul da China, foi capaz de identificar um *bottleneck* recente e significativa diferenciação genética populacional em toda sua faixa geográfica (Qiu *et al.*, 2013). A combinação de marcadores de  $n_{u}SSR$  e  $c_{p}SSR$  também foi utilizada em *Castanea mollissima* para estimar a variação genética, a diferenciação populacional e identificar barreiras de dispersão entre as populações distribuídas em uma grande variedade de altitudes de 50 - 2.800 m (Liu *et al.*, 2013).

## 1.2 Os campos rupestres

Um importante centro de biodiversidade e endemismo na vegetação e fauna é aquele das montanhas do leste do Brasil conhecido como Serra do Espinhaço, assim denominada por Eschwege Baron (Gontijo, 2008), por se assemelhar a uma espinha dorsal (back-bone mountains). Nela, prevalece a vegetação dos campos rupestres (*Old Growth Grassland*), uma vegetação savânica com um altíssimo número de espécies herbáceas (Veldman *et al.* 2015, Silveira *et al.* 2016, revisão em Fernandes 2016a). Este ecossistema ocorre em altitudes que variam entre 800 a 2.000 m ao longo da Cadeia do Espinhaço, no sudeste do Brasil, e está incluído no domínio do bioma do Cerrado (*Savanna*) (Fernandes, 2016; Le Stradic *et al.*, 2015). Neste território altimontano adverso desenvolveu-se uma das vegetações mais luxuriantes, onde algumas famílias chegam a atingir até 80-90% de endemismo (Barbosa *et al.*, 2015).

Apesar da sua importância como repositório da biodiversidade e altíssimo valor na produção de bens ecossistêmicos (Neves *et al.*, 2016; Resende *et al.*, 2013), a vegetação dos campos rupestres tem sido profundamente impactada pelas mudanças globais (Fernandes, 2016; Fernandes *et al.*, 2014). Além dos impactos diretos da supressão da vegetação e conseqüente fragmentação de habitats, tem ocorrido ainda a chegada, nas áreas antropizadas, de espécies nativas que as colonizam rapidamente (e.g., Fernandes *et al.* 2015), e a introdução intencional de espécies exóticas de alta agressividade, como gramíneas africanas (Barbosa *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2015).

### 1.3 *Baccharis dracunculifolia*: a espécie de estudo

Uma espécie que ocorre naturalmente nos campos rupestres com ampla distribuição ao longo de gradientes altitudinais e bastante estudada do ponto vista ecológico é *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae).

*Baccharis* é o maior gênero da subtribo Baccharidinae, pertencente à família Asteraceae que compreende cerca de 1.110 gêneros e 25.000 espécies. Baccharidinae provavelmente apareceu durante Mioceno Médio, período no qual houve a separação completa dos continentes africanos e sul-americanos pelo Oceano Atlântico, o que justifica a ocorrência natural de Baccharidinae apenas no continente americano (Fagundes e Fernandes, 2011). Assim, *Baccharis* é considerado um gênero do novo mundo, com aproximadamente 433 espécies (Heiden, 2014), distribuídas do sul do Canadá até o sul da América do Sul, e compreende 158 espécies no Brasil (Santos *et al.*, 2010), a maioria destas encontradas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, sugerindo que esta região representa o centro de origem do gênero (Fagundes e Fernandes, 2011).

*Baccharis dracunculifolia* (Figura 1) é um arbusto com 2-3 m de altura, dioico, perene, o qual floresce duas vezes ao ano, a partir de março a junho e de novembro a dezembro, estando amplamente difundido no Sudeste e Sul do Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia (Espírito-Santo, 2002; Espírito-Santo, 2012). Este arbusto cresce em habitats abertos e perturbados, especialmente ao longo de estradas e em pastagens abandonadas (Fagundes e Fernandes, 2011). Esta espécie, conhecida também como "alecrim do campo" e "vassoura", produz uma substância resinosa nos ápices vegetativos coletados por abelhas (*Apis mellifera*) para produzir um tipo importante de própolis verde (*Brazilian green propolis*) no estado de Minas Gerais (Oliveira e Bastos, 1998; Santos *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2003). Trata-se de uma variedade de compostos fenólicos de interesse (Paula *et al.*, 2016) com reconhecida importância farmacológica e propriedades antígenotóxica e antimutagênica (Rodrigues *et al.*, 2009), anticancerígena, atividade leishmanicida (Ramos *et al.*, 2016; Roberto *et al.*, 2016), efeito gastroprotetor (Lemos *et al.*, 2007), e anti-inflamatória (Bachiega *et al.*, 2013).



**Figura 1.** *Baccharis dracunculifolia* (Fernandes, G. W., acervo pessoal).

As folhas e ramos de *B. dracunculifolia* são um importante recurso alimentar para uma variedade de insetos herbívoros, especialmente coleópteros, heterópteros, hemípteros e ortópteros (Fagundes e Fernandes, 2011; Fagundes *et al.*, 2005) além de suportar a maior fauna conhecida de insetos galhadores da região neotropical (Barbosa e Fernandes, 2014; Fernandes *et al.*, 1996) e hospedarem um grande número de fungos endofíticos em seus tecidos (Oki *et al.*, 2016; Oki *et al.*, 2009).

Galíndez *et al.* (2008) estudaram as estratégias e a variação espacial das respostas a incêndio de três espécies arbustivas, sendo uma delas *B. dracunculifolia*. Nestas circunstâncias, todos os indivíduos de *B. dracunculifolia* morreram após o incêndio e nenhum deles foi capaz de germinar durante o período estudado. No entanto, a emergência e sobrevivência das plântulas dessa espécie eram altas, particularmente nos locais recentemente queimados, respondendo como uma espécie semeadora obrigatória.

*Baccharis dracunculifolia* é também capaz de explorar nutrientes adicionais em ambientes extremos como os campos rupestres. Uma característica singular desta planta é a capacidade de realizar um *trade-off* crescimento-sobrevivência de acordo com a disponibilidade de nutrientes demonstrando taxas mais elevadas de crescimento em solos férteis e taxas de sobrevivência mais altas em solos pobres em nutrientes (Negreiros *et al.*, 2014).

A alta capacidade de crescimento natural de *Baccharis dracunculifolia* faz com que essa espécie ocorra frequentemente em áreas perturbadas, especialmente ao longo das rodovias e pastagens abandonadas (Fagundes e Fernandes, 2011; Gomes e Fernandes, 2002), apresentando a alta capacidade de colonização na recuperação de áreas degradadas (Galíndez *et al.*, 2008). Por produzir um grande número de aquênios, *Baccharis dracunculifolia* apresenta características distintas de plantas invasoras e colonizadoras possuindo uma alta capacidade de crescimento natural (Gomes e Fernandes, 2002).

Considerando um cenário futuro de mudanças climáticas e aumento da concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> alterando a distribuição das espécies na paisagem e suas chances de

sobrevivência (Ashley *et al.*, 2015; Byars *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2015; Sork, 2016), *B. dracunculifolia* pode ter seu desenvolvimento e performance ampliados dramaticamente e vir a se comportar como uma espécie invasora tendo em vista sua grande plasticidade fenotípica (Mendes De Sá *et al.*, 2014; Negreiros *et al.*, 2014).

O estudo genético-populacional de *B. dracunculifolia* pode identificar como as mudanças climáticas vem influenciando em sua estrutura populacional. Atualmente *B. dracunculifolia* conta com 17 marcadores microssatélites desenvolvidos utilizando a técnica de bibliotecas genômicas, destes, 11 *loci* são polimórficos e seis monomórficos, sendo 12 *loci* classificados como dinucleotídeos e cinco *loci* com repetições do tipo compostos perfeitos (Belini *et al.*, 2016). Sobre a genética dessa planta, sabe-se também que *B. dracunculifolia* possui contagem gametofítica de  $n=9$  cromossomos (Coleman, 1982; Wulff *et al.*, 1996).

Diante da relevância de *B. dracunculifolia* como espécie chave na sucessão natural de ecossistemas ameaçados como os campos rupestres, sua ampla distribuição na América do Sul e por suas propriedades medicinais e industriais, esse trabalho tem como objetivo ampliar o número de marcadores microssatélites já disponíveis, constituindo uma ferramenta molecular capaz de gerar conhecimento sobre os padrões de distribuição da diversidade genética dessa espécie com informações úteis para sua conservação. Com novos e eficientes marcadores desenvolvidos é possível gerar conhecimentos que auxiliem na compreensão dos processos que acarretam mudanças na alta biodiversidade encontrada nos campos rupestres. Um conjunto de marcadores microssatélites para *B. dracunculifolia* pode ainda fornecer novos *insights* sobre a influência das mudanças climáticas no padrão de distribuição de espécies comuns em áreas alteradas.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar regiões microssatélites do genoma de *Baccharis dracunculifolia* utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração a fim de disponibilizar marcadores eficientes para estudos em genética de populações, conservação e manejo dessa espécie e de espécies congêneras.

### 2.2 Objetivos específicos

- I. Isolar e sequenciar o DNA de um indivíduo de *Baccharis dracunculifolia* utilizando sequenciamento de nova geração na plataforma *Illumina MiSeq*.
- II. Realizar a busca de regiões microssatélites nas *reads* geradas pela *MiSeq*.
- III. Desenhar pares de iniciadores que flanqueiam as regiões microssatélites nucleares do genoma de *B. dracunculifolia*.
- IV. Padronizar as condições de amplificação dos pares de iniciadores desenvolvidos para cada uma das regiões microssatélites.
- V. Caracterizar o polimorfismo dos marcadores que apresentarem os melhores padrões de amplificação.
- VI. Caracterizar os marcadores microssatélites desenvolvidos quanto ao número de alelos por *locus*, a heterozigosidade observada e esperada sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação, o coeficiente de endocruzamento, as probabilidades de identidade genética e de exclusão de paternidade por *locus* e para todos os *loci* combinados.
- VII. Avaliar a amplificação dos marcadores desenvolvidos no DNA genômico das espécies congêneras *Baccharis concinna* e *Baccharis aphylla*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

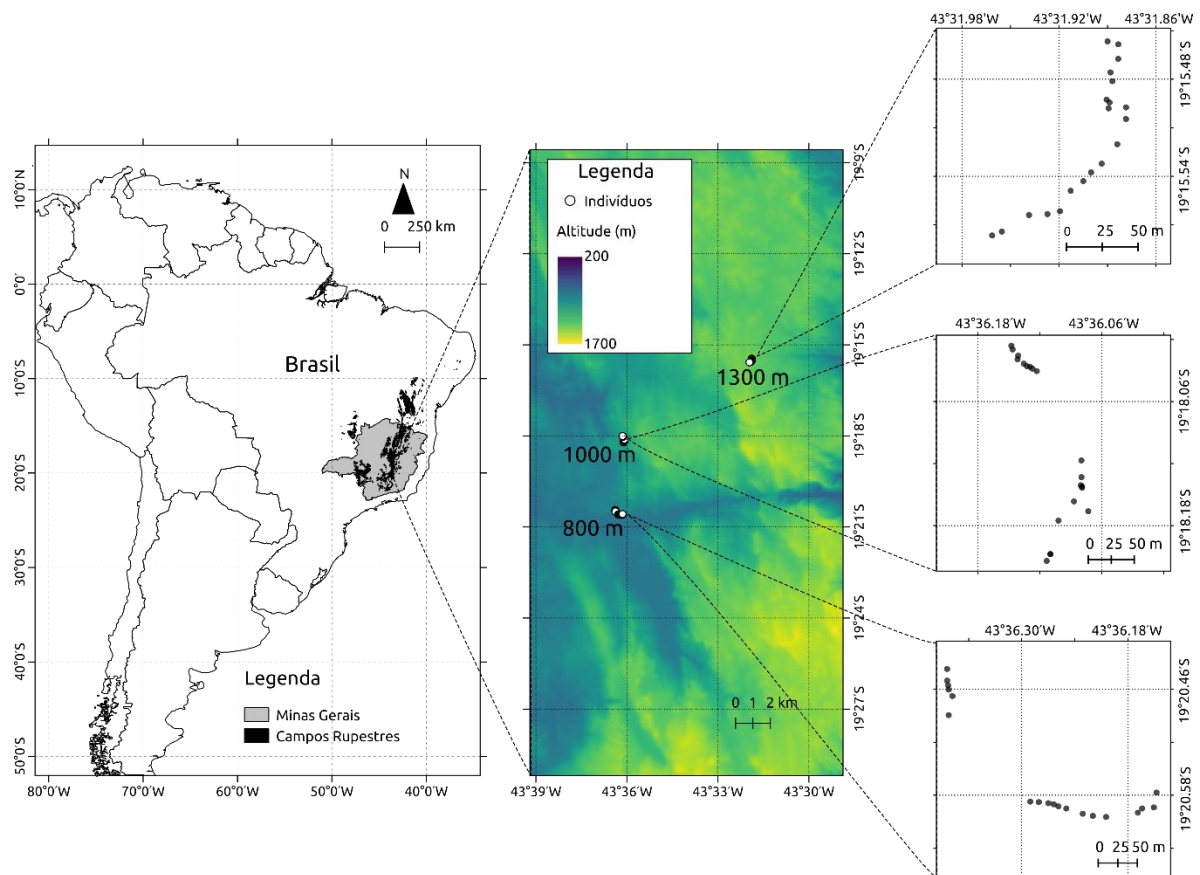
#### 3.1 Local de estudo e amostragem

Sessenta indivíduos de *Baccharis dracunculifolia* foram amostrados nos campos rupestres da Serra do Cipó, porção sul da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil. Vinte indivíduos foram coletados entre 760 e 839 m, bem como entre 1026 e 1040 m e de 1348 a 1356 m de altitude (Figura 2). A região da Serra do Cipó/MG, especificamente, é uma zona de transição entre os biomas Cerrado e Mata Atlântica que incorpora influências múltiplas na formação de seu alto nível de diversidade biológica (Ribeiro *et al.*, 2009). Ao longo dos anos, é possível observar um acréscimo substancial no número de espécies de plantas descritas nesta região (Rapini, 2008).

Outras duas espécies do gênero, *Baccharis concinna* e *Baccharis aphylla* (Figura 2), foram amostradas para avaliar a possibilidade de transferibilidade dos marcadores desenvolvidos. A espécie *Baccharis concinna* (Barroso, 1976) é arbustiva, dioica, endêmica e ameaçada dos campos rupestres (Gomes *et al.*, 2004) e a espécie *Baccharis aphylla* (Vellozo, 1927) também é encontrada nos campos rupestres, campos de altitude e cerrado (Borges e Forzza, 2008). Todas as espécies ocorrem em simpatria na Serra do Cipó. Amostras de folhas de indivíduos, das três espécies, foram coletadas em sílica e armazenada em freezer a -20°C até o momento da extração do material genético utilizado nas etapas descritas a seguir.



**Figura 2.** (a) *Baccharis concinna* (Heiden, G.) e (b) *Baccharis aphylla* (Fernandes, G. W., acervo pessoal).



**Figura 3.** Localização dos indivíduos de *Baccharis dracunculifolia* amostrados na Serra do Cipó.

### 3.2 Extração de DNA e sequenciamento

O protocolo padrão do CTAB 2% (Doyle e Doyle, 1990) foi empregado na extração de DNA das folhas de todos os indivíduos amostrados, no Laboratório de Genética Evolutiva e de Populações, do Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente da Universidade Federal de Ouro Preto. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose a 2% e por espectrofotometria no *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) foram determinadas as concentrações das amostras de DNA. Aproximadamente 100µg de DNA de um indivíduo foi submetido ao sequenciamento de nova geração em uma plataforma *MiSeq*, utilizando o *MiSeq Reagent Kit v3* (Illumina, California, USA) seguindo recomendações do fabricante para o sequenciamento *paired-end* (comprimento da *read* = 2 × 300 bp).

### 3.3 Análise das sequências e desenho dos *primers*

As *reads* produzidas foram filtradas e utilizadas como referência na busca por regiões de possíveis marcadores moleculares. A identificação dos microssatélites foi realizada utilizando o *script* Perl chamado PAL\_finder v.0.02.03 que identifica os *loci* potencialmente amplificáveis. Esse procedimento já foi utilizado com sucesso em sequências geradas na plataforma *Illumina* para desenvolvimento de microssatélites em espécies selvagens (Castoe, 2012).

Em seguida, as sequências foram transferidas para o programa PRIMER3 (Rozen e Skaletsky, 2000) para o desenho dos *primers* ou oligonucleotídeos utilizados como iniciadores para amplificação da região desejada. Em seguida, foram analisadas a qualidade das sequências e os parâmetros fornecidos pelo programa, para isso considerou-se a o tamanho, as temperaturas de anelamento do *primer*, sua auto-complementaridade e o conteúdo de GC da sequência.

### 3.4 Otimização dos *loci* microssatélites

Os *primers* desenhados foram submetidos a uma etapa de otimização para o estabelecimento das condições de PCRs e para verificar a reprodutibilidade e especificidade da amplificação. Para isso, utilizou-se 15 indivíduos de *B. dracunculifolia*, cinco amostras de cada intervalo de altitude, com boa pureza e concentração de DNA segundo resultados na quantificação realizada no Nanodrop.

As PCRs foram realizadas separadamente para cada *primer* de microssatélite em volumes totais de 13µl contendo 10-20 ng de DNA, 5X PCR *buffer* tampão especial IVB (Phoneutria, Brasil), 0.215 – 2.15 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM de cada dNTP, 0.10 µM de cada *primer* e 1U Taq DNA polimerase (Phoneutria, Brasil). O programa de amplificações das PCRs utilizado seguiu as seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de anelamento [94°C por 1 minuto, de 52 a 62°C por 1 minuto (de acordo com a temperatura de anelamento de cada oligonucleotídeo - Tabela 1) e 72°C por 1 minuto] e a extensão final a 72°C por 50 minutos. Os fragmentos amplificados foram, então, visualizados em gel de poliacrilamida 6% corados com prata (Sambrook, 2001). Utilizamos

em todos os géis o *Ladder* DNA de 100 pb (Ludwig Biotecnologia) como um marcador de tamanho molecular.

### 3.5 Caracterização dos *loci* microssatélites

Os oligonucleotídeos polimórficos que apresentaram uma amplificação de clara interpretação e especificidade foram marcados com fluorescência 6-FAM (azul), NED (amarelo), VIC (verde) e PET (vermelho) e genotipados por eletroforese capilar em um 3730 *DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) no Centro de Pesquisa Renné Rachou (Fiocruz Minas).

O DNA de indivíduos extraídos anteriormente foi utilizado para caracterização dos marcadores microssatélites. Para genotipagem foi utilizado 1  $\mu$ L de produto de PCR diluídos 1:5, quando necessário, e adicionados 0.3  $\mu$ L do padrão interno *GeneScan 500 LIZ dye Size Standard* (Applied Biosystems) e 8.7  $\mu$ L formamida deionizada. Os produtos das amplificações foram então desnaturados a 95°C por cinco minutos e mantidos em gelo até à eletroforese capilar. Os fragmentos foram analisados automaticamente para atribuição de tamanho usando o programa Geneious 10.2.3 (Kearse *et al.*, 2012).

Para caracterização dos marcadores estimou-se o número de alelos por *locus*, a heterozigosidade observada e esperada sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o índice de fixação (*Fis*). Os desvios para as expectativas de Hardy-Weinberg e para o desequilíbrio de ligação foram verificados (valor nominal ajustado para 5%). Para realizar tais análises utilizou-se o programa GenAlex (Peakall e Smouse, 2012).

Dois parâmetros importantes para estudos de parentesco e paternidade foram estimados também no programa GenAlex com uso das frequências alélicas observadas para todos os *loci*: a probabilidade de identidade genética (*I*) (Chakravarti e Li, 1983; Paetkau *et al.* 1995), e a probabilidade de exclusão de paternidade (*Q*) (Weir 1996). A probabilidade de identidade genética indica a probabilidade de que dois indivíduos amostrados aleatoriamente em uma população tenham o mesmo genótipo em vários *loci*, o valor obtido deve ser suficientemente baixo para que os marcadores indiquem confiança estatística na identificação individual estando, portanto, indicados para quantificar os níveis de diversidade genética em populações naturais (Waits *et al.*, 2001).

A probabilidade de exclusão de paternidade, por sua vez, é utilizada para avaliar o poder estatístico de uma análise de parentesco e caracterizar a informatividade dos marcadores. Ao calcular a probabilidade de exclusão de paternidade pode-se definir a

capacidade média de um marcador excluir um indivíduo erroneamente designado como pai, por isto um alto valor de  $Q$  para indica que os marcadores são altamente informativos para análise de parentesco e que esta análise é confiável (Wang, 2007). Adicionalmente, também estimou-se a probabilidade de identidade genética combinada,  $IC = \prod I_i$  e a probabilidade de exclusão de paternidade combinada,  $QC = 1 - [\prod (1 - Q_i)]$ , para todos os *loci* caracterizados.

### **3.6 Teste de amplificação dos *loci* microssatélites em outras espécies do gênero *Baccharis***

Um teste de amplificação foi realizado com os iniciadores otimizados para *B. dracunculifolia* em outras espécies do gênero. Foram selecionados oito indivíduos de *B. concinna* e nove indivíduos de *B. aphylla* para esse procedimento. O DNA das amostras de ambas as espécies foi extraído da mesma maneira descrita para *B. dracunculifolia*. O material genético foi amplificado por PCR nas mesmas condições descritas na etapa de otimização dos marcadores. Em seguida, os produtos de amplificação produzidos foram visualizados em gel de poliacrilamida 6%.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Sequenciamento e desenho dos *primers***

Uma das vantagens do desenvolvimento de marcadores microssatélites utilizando NGS é o grande volume de dados obtidos, isto permite uma seleção rigorosa dos marcadores e uma economia de tempo na etapa seguinte de otimização (Guichoux *et al.*, 2011). A acurácia e os parâmetros de pesquisa utilizados para a detecção de SSRs nos dados de NGS irão impactar tanto nas frequências, quanto nas distribuições dos SSRs descobertos (Zalapa *et al.*, 2012).

O sequenciamento *paired-end* de *Baccharis dracunculifolia* na plataforma *Illumina* produziu 21,4 milhões de *reads* com um total de 7,2 Gb acima do índice de qualidade (Q-score) Q30. A busca por *loci* microssatélites nas *reads* com controle de qualidade confirmado identificou 11.296 possíveis marcadores (Tabela 1). Nestes *loci*, o *motif* de repetição trinucleotídeos (37,7%) foi o predominante, seguido de microssatélites

considerados interrompidos (28,7%) e dinucleotídeos (15,5%), de acordo com a classificação de Goldstein e Schlötterer (1999) (Tabela 2). A alta frequência de repetições trinucleotídicas pode indicar processos de evolução molecular dos SSRs, já que quando há dominância de um *motif* de repetição específico, de uma determinada sequência e comprimento no genoma de plantas, temos uma resposta às pressões de seleção aplicadas nesse *motif* específico ao longo da evolução (Sonah, 2011).

O número de candidatos a *primers* de *loci* microssatélites gerados por um NGS *Illumina MiSeq* são variáveis. Hoffberg *et al* (2015), por exemplo, encontraram 3.643 possíveis *primers* utilizando PAL\_finder na espécie invasiva *Pueraria montana* var. *lobata*, Duwe *et al* (2016) localizaram 1.532 *loci* de microssatélites em 11 milhões de *reads* do genoma da espécie ameaçada *Crepis mollis* e Monthe *et al* (2017) identificaram 112 e 67 *loci* para as espécies vulneráveis *Entandrophragma candollei* e *E. utile*, respectivamente.

**Tabela 1.** Estatísticas dos microssatélites desenvolvidos a partir de dados obtidos por NGS de *Baccharis dracunculifolia*.

Total de <i>reads</i> brutas	21,4 milhões
Número de <i>reads</i> filtradas contendo microssatélites	11.296
Pares de <i>primers</i> desenhados	36
Pares de <i>primers</i> selecionados para otimização	17
<i>Loci</i> microssatélites selecionados para caracterização	12
<i>Loci</i> microssatélites caracterizados neste trabalho	6

**Tabela 2.** Tipos de SSRs encontrados nos *loci* potencialmente amplificáveis após filtragem das *reads* produzidas por NGS de *Baccharis dracunculifolia*.

<b><i>Motif</i> de repetição</b>	<b>Número de SSRs</b>	<b>Frequência (%)</b>
Mononucleotídeos	523	4,6%
Dinucleotídeos	1.753	15,5%
Trinucleotídeos	4.261	37,7%
Tetranucleotídeos	506	4,5%
Pentanucleotídeos	390	3,5%
Hexanucleotídeos	367	3,2%
Interrompidos	3.240	28,7%
Compostos	256	2,3%

Entre os mononucleotídeos a repetição mais comum foi (T)<sub>n</sub> representando 96,9% dos possíveis marcadores encontrados nesta classe. O *motif* de repetição dinucleotídeo mais abundante foi AT/TA, representando 76,3% dos microssatélites dinucleotídeos. Para os trinucleotídeos o *motif* de repetição mais abundante foi AAT/ATT, presente em 27,2% dos SSRs compostos por três nucleotídeos. O *motif* AAAT/TTTA foi o mais comum nos microssatélites tetranucleotídeos, representando 14,0%, mais que dobro do segundo tipo de *motif* mais abundante, AAAC/TTTG, que representaram 6,7% nos SSRs de quatro

nucleotídeos. A alta frequência do dinucleotídeo AT, neste resultado vai de encontro ao que se espera como característica distintiva dos genomas de espécies vegetais (Powell *et al.*, 2014).

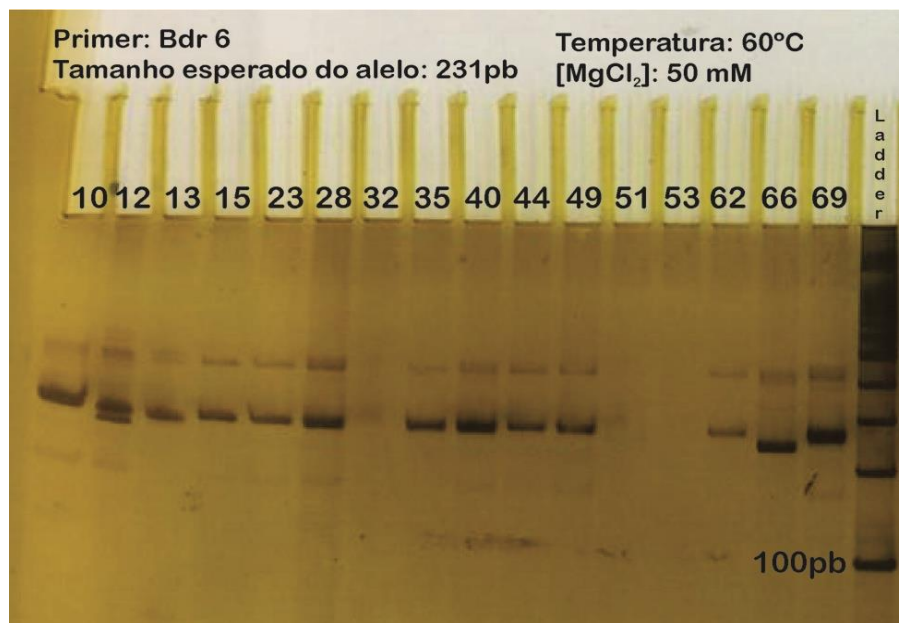
Após uma etapa de filtragem manual na qual foram selecionados exclusivamente os *loci* que continham *motifs* de repetição longos e perfeitos, os quais tendem a ser mais polimórficos (Zalapa *et al.*, 2012). Assim, optamos por repetições tri, tetra, penta ou hexanucleotídeos presentes em *reads* longas, maiores que 274 pb, e obtivemos 1.356 *loci* microssatélites candidatos a marcadores microssatélites. A escolha de *motifs* de repetição classificados como perfeitos é a mais indicada para assegurar que os *loci* dos microssatélites desenvolvidos estejam o mais próximo possível do modelo de mutação *stepwise*, utilizado na inferência de eventos demográficos (Guichoux *et al.*, 2011; Zalapa *et al.*, 2012)

Uma vez identificados os possíveis iniciadores, na etapa de desenho dos *primers*, foram desenhados 36 pares de *primers* no programa PRIMER3 (Rozen e Skaletsky, 2000). Destes, 17 iniciadores foram escolhidos e sintetizados para etapa de testes de amplificação das regiões microssatélites.

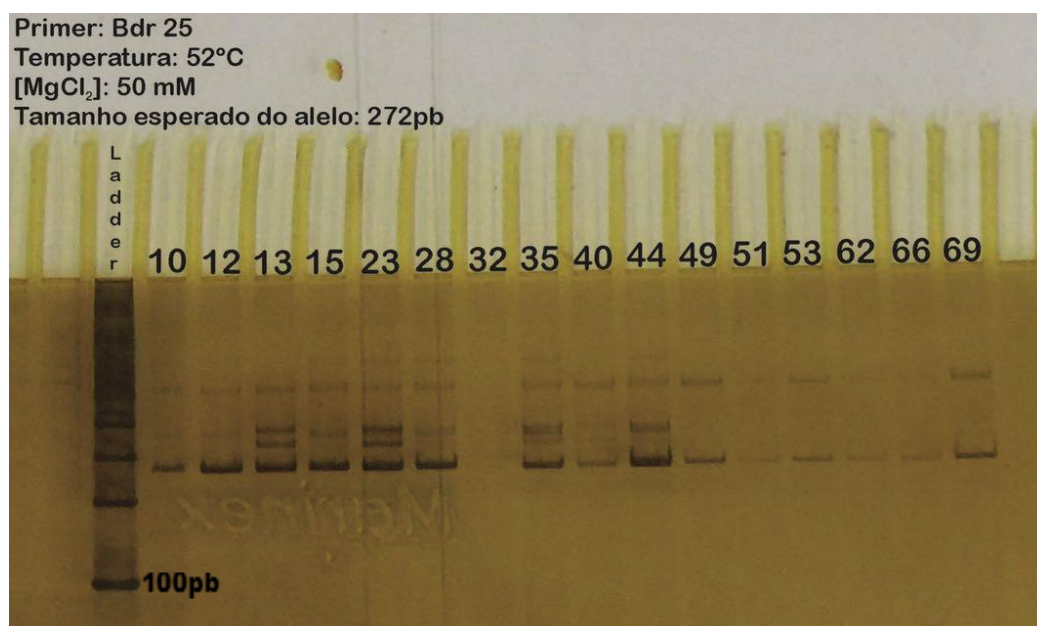
#### **4.2 Amplificação dos *loci* microssatélite em *Baccharis dracunculifolia***

Dos 17 pares de *primers* de *loci* microssatélites testados, 12 amplificaram, com clara interpretação e tamanho de *amplicons* esperados no gel de poliacrilamida 6% corados com prata (Figura 3). Ajustes na temperatura de anelamento e concentração de cloreto de magnésio nas PCRs desses 12 iniciadores foram realizados a fim de eliminar bandas inespecíficas. Dos 12 *loci* microssatélites que amplificaram, seis foram genotipados (Tabela 3) e outros seis *loci* estão em fase de genotipagem. Cinco pares de iniciadores não apresentaram *amplicons* consistentes com o tamanho do alelo esperado ou não apresentavam alelos facilmente distinguíveis em muitas amostras de DNA e foram descartados.

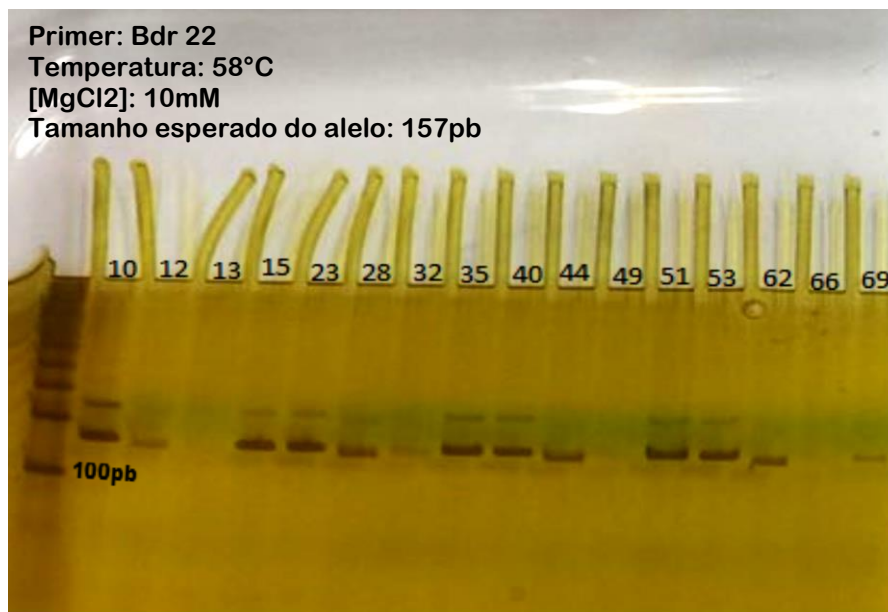




**Figura 4.** Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata para verificação de polimorfismos no *locus* microssatélites Bdr6 de *Baccharis dracunculifolia*, em 16 indivíduos amostrados e numerados nas canaletas (de 10 a 69).



**Figura 5.** Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata para verificação de polimorfismos no *locus* microssatélites Bdr25 de *Baccharis dracunculifolia*, em 16 indivíduos amostrados e numerados nas canaletas (de 10 a 69).



**Figura 6.** Gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata para verificação de polimorfismos no *locus* microssatélites Bdr22 de *Baccharis dracunculifolia*, em 16 indivíduos amostrados e numerados nas canaletas (de 10 a 69).

Belini *et al* (2016) desenvolveram 11 marcadores microssatélites polimórficos e seis monomórficos para *B. dracunculifolia*. Dos *loci* polimórficos, seis são compostos por *motifs* de repetições dinucleotídicas. No entanto, microssatélites dinucleotídicos tendem ao deslizamento da polimerase durante a amplificação, isso pode comprometer a precisão da genotipagem dos indivíduos levando a erros ainda mais acentuados quando se tem baixa qualidade/concentração do DNA (Cao *et al.*, 2016). Apesar dos SSRs com repetições de dinucleotídicos serem mais utilizados, eles apresentam bandas “*stutter*” que dificultam a definição do alelo, principalmente nos heterozigotos com alelos próximos, situação menos propensa de acontecer com as repetições de tri, tetra ou pentanucleotídicos (Guichoux *et al.*, 2011).

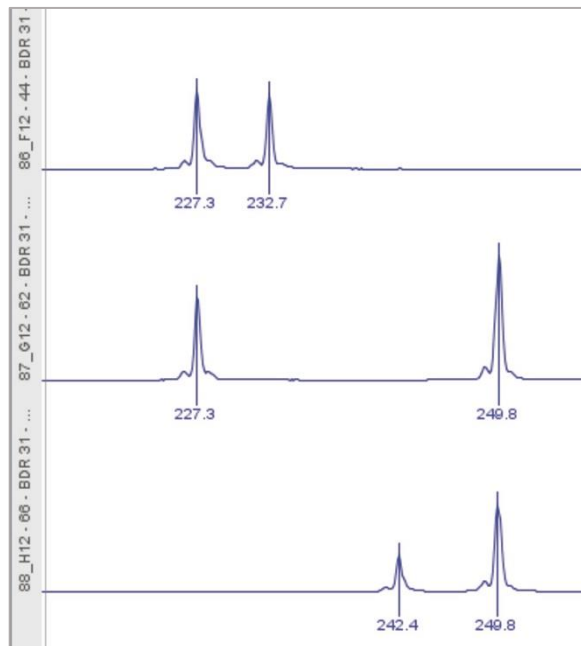
Desenvolvemos três *primers* de *loci* microssatélites tetranucleotídicos, dois trinucleotídicos e um pentanucleotídico, todos classificados como perfeitos. Essa seleção prévia de *loci* teve por objetivo uma genotipagem de clara interpretação, com acurácia na definição dos alelos nos indivíduos amostrados para estabelecer um conjunto de marcadores microssatélites robusto a serem utilizados em estudos de genética populacional.

**Tabela 3.** Características dos seis *loci* microssatélites desenvolvidos para *Baccharis dracunculifolia*.

<i>Locus</i>	Sequência do <i>primer</i> (5' - 3')	<i>Motif</i> de repetição	Tamanho esperado do alelo (bp)	T <sub>a</sub> (°C)	Concentração de MgCl <sub>2</sub> na reação	Teste de amplificação <i>B. conccina</i>	Teste de amplificação <i>B. aphylla</i>
Bdr6	F: ACAGGCGGGAATACTTACCA R: CCCTAATGAAACCAGGACCA	(AATT) <sub>6</sub>	231	60	2,15 mM	Amplificou	Amplificou
Bdr7	F: GAGAAGGGGGAGAGGCTTTA R: CCCATTTTAAGGCTGTTTGA	(AGAA) <sub>6</sub>	245	52	2,15 mM	Amplificou	Amplificou
Bdr22	F: CCAATTTGAAACGACATGACTC R: CGGCTACGTCAACGACTATG	(ATTT) <sub>6</sub>	157	58	0,43 mM	Não amplificou	Amplificou
Bdr25	F: GGAGCCGAAAGTGAAAAACA R: TGTTCAAGCGGGTGTGTTGAAA	(TGA) <sub>7</sub>	272	52	2,15 mM	Amplificou	Amplificou
Bdr26	F: AGCTGTTGTTGTGCCTGAGA R: GGATCGTCATCTCGTGTCTCCT	(ATG) <sub>8</sub>	171	60	0,215 mM	Amplificou	Não amplificou
Bdr31	F: CCTGCATATTGAAAGCTCGTC R: GCTTGAATGACCCACGAAC	(GCTCG) <sub>5</sub>	246	60	2,15 mM	Amplificou	Amplificou

### 4.3 Caracterização dos *loci* microssatélites

Após a etapa de otimização da PCR, os *primers* foram marcados com fluorescência (6-FAM em Bdr6 e Bdr31, NED em Bdr26, VIC em Bdr7 e Bdr22 e PET em Bdr25) para genotipagem em sequenciador automático de DNA (Figura 4).



**Figura 7.** Análise da genotipagem de três indivíduos com o *primer* Bdr31 de *Baccharis dracunculifolia* no software Geneious®.

Para caracterização dos marcadores desenvolvidos foram genotipados, em média, 22 indivíduos de *Baccharis dracunculifolia* incluindo amostras dos três intervalos de altitude coletados. O número de alelos por *locus* variou de dois a oito, com uma média de 5,33 alelos em uma população amostrada. Os *primers* desenvolvidos por Belini *et al* (2016) tiveram número médio de 3,33 alelos por *locus* utilizando indivíduos de três populações coletadas em Campos do Jordão, Campinas e Ubatuba, estado de São Paulo, Brasil.

As heterozigosidades observadas variaram de 0,231 a 0,789 com média de 0,461, e as heterozigosidades esperadas ficaram entre 0,408 e 0,807 com média de 0,603 (Tabela 4). Cinco *loci* desviaram significativamente do HWE ( $p < 0,05$ ) e um *locus*, BDR 25, apresentou resultado não significativo nesta análise. Uma possível causa desse desvio de HWE pode ser a existência de alelos nulos (que não amplificaram por falhas de PCR ou mutações nos sítios de anelamento dos *primers* desenvolvidos) ou ainda devido ao número reduzido de amostras analisadas, o qual pode ser insuficiente para revelar todas as combinações genotípicas possíveis, levando a uma subestimação das frequências

aleatórias e heteroziguidade (López-Márquez *et al*, 2016). Isso deve ser esclarecido testando esses *loci* em mais populações. Os valores para o índice de fixação altos nos marcadores Bdr6, Bdr22 e Bdr31, em que a  $H_o$  é menor que a  $H_e$ , pode ser devido, provavelmente ao grande número de homozigotos na população, uma vez que todos apenas uma população foi avaliada e o acasalamento entre indivíduos geneticamente aparentados pode ocorrer nessa população em uma frequência considerável.

**Tabela 4.** Resultado da caracterização dos *primers* de microssatélites desenvolvidos para *Baccharis dracunculifolia*.

<i>Locus</i>	<i>Alleles range</i> (bp)	NA	$H_o$	$H_e$	<i>Fis</i>	Q	<i>I</i>
Bdr6	131 – 234	8	0,231	0,808	0,714***	0,743	0,061
Bdr7	225 – 253	8	0,545	0,594	0,082***	0,743	0,187
Bdr22	152 – 168	5	0,333	0,605	0,449***	0,595	0,210
Bdr25	270 – 273	2	0,286	0,408	0,300 <sup>ns</sup>	0,187	0,433
Bdr26	164 – 170	3	0,789	0,547	-0,443*	0,370	0,270
Bdr31	225 – 249	6	0,583	0,659	0,115**	0,659	0,178
Média para todos os <i>loci</i>	194 – 224	5,33	0,461	0,603	0,202	QC = 0,995	IC = $5,1 \times 10^{-05}$

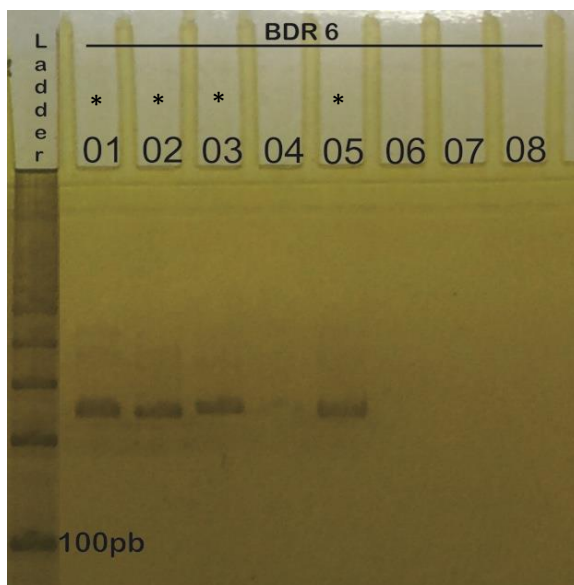
Número de alelos (NA), heteroziguidade observada ( $H_o$ ), heteroziguidade esperada ( $H_e$ ), probabilidade de exclusão de paternidade (Q) e de exclusão de paternidade combinada (QC) probabilidade de identidade genética (*I*) e de identidade genética combinada (IC).

\**Loci* desviando do equilíbrio HWE após correções de Bonferroni (<sup>ns</sup>=não significativo, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

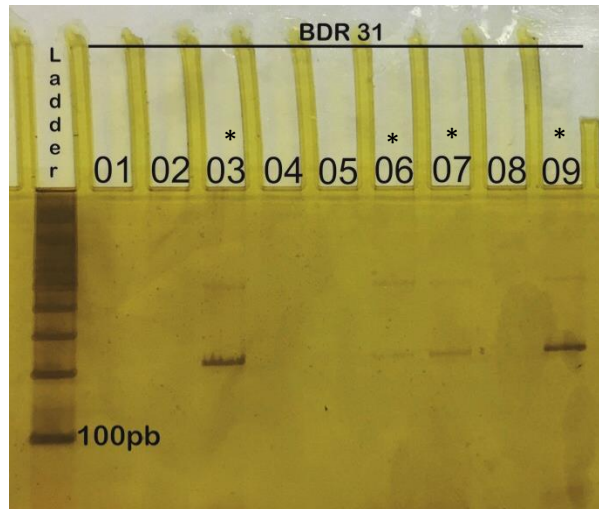
A probabilidade de exclusão de paternidade combinada (QC) foi 74,3% com o primeiro *locus* e chegou a 99,5% quando os seis *loci* foram incluídos na análise, indicando que o conjunto de marcadores é eficiente nas análises parentais e de fluxo gênico. A probabilidade de identidade genética (*I*) variou de 0,187 a 0,934 e a probabilidade de identidade genética combinada (IC) atingiu  $5,1 \times 10^{-05}$  quando os seis *loci* foram incluídos na análise (Tabela 4). A probabilidade de identidade quando indivíduos relacionados são incluídos nas amostras (IC-Sibs) também é baixa, atingindo a probabilidade mínima com a combinação dos seis *loci* de  $1,51 \times 10^{-02}$ . Os resultados de exclusão de paternidade e identidade genética demonstram que os *loci* microssatélites, quando combinados, são marcadores muito eficientes em discriminar os indivíduos, sendo adequados para análises de estrutura populacional e fluxo gênico.

#### 4.4 Teste de amplificação para espécies congênicas

Dos seis *primers* desenvolvidos para *Baccharis dracunculifolia*, cinco produziram *amplicons* de DNA em *Baccharis concinna* (Bdr6, Bdr7, Bdr25, Bdr26 e Bdr31) (Tabela 3), quando verificado em gel de poliacrilamida 6% (Figura 5). Para *Baccharis aphylla*, cinco *primers* apresentaram produtos de amplificação (Bdr6, Bdr7, Bdr22, Bdr25 e Bdr31) interpretáveis (Figura 6). O teste de amplificação foi realizado utilizando o mesmo protocolo de PCR e temperaturas de anelamento dos *primers* otimizados em *B. dracunculifolia* (Tabela 3). A qualidade obtida na análise em gel de poliacrilamida indica a possibilidade de transferibilidade dos marcadores microssatélites desenvolvidos para espécies geneticamente relacionadas, sendo necessário a avaliação e caracterização de polimorfismos nestas espécies.



**Figura 8.** *Amplicons* produzidos por PCR em oito indivíduos de *Baccharis concinna*, numerados nas canaletas (de 1 a 8) utilizando o *primer* Bdr6 desenvolvidos para *Baccharis dracunculifolia*, visualizados em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. \*Presença de bandas nos indivíduos.



**Figura 9.** *Amplicons* produzidos por PCR em nove indivíduos de *Baccharis aphylla* numerados nas canaletas (de 1 a 9) utilizando o *primer* Bdr31 desenvolvido para *Baccharis dracunculifolia*, visualizados em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. \*Presença de bandas nos indivíduos.

## 5 CONCLUSÕES

O presente estudo isolou, identificou e a caracterizou de seis novos marcadores microssatélites para *Baccharis dracunculifolia* a partir de dados obtidos por NGS, plataforma *Illumina MiSeq*. Esse conjunto de marcadores de microssatélites é informativo, robusto e será útil para geração de conhecimentos genéticos, ecológicos e evolutivos de *B. dracunculifolia*. Com essa ferramenta molecular poderemos avaliar a diversidade e estrutura genética dessa espécie nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço.

Demonstramos a utilidade do sequenciamento de alto rendimento para isolar *loci* de microssatélites em espécies não-modelo de plantas. O número *primers* que podem ser desenvolvidos pelos dados gerados no sequenciamento realizado neste trabalho é muito maior e com resultados mais informativos do que o esperado pelo protocolo tradicional de bibliotecas enriquecidas para o desenvolvimento de marcadores microssatélites.

Temos ainda a possibilidade de transferibilidade destes marcadores para espécies congênicas. Com número de possíveis marcadores microssatélites gerados nesse trabalho e ainda disponíveis para etapa de otimização e caracterização é possível desenvolver marcadores que se apliquem ao gênero *Baccharis* com perspectivas para trabalhos de estruturação populacional ou filogenia de muitas espécies geneticamente próximas.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashley, M. V.; Abraham, S. T.; Backs, J. R.; Koenig, W. D. Landscape genetics and population structure in Valley Oak (*Quercus lobata* Née). **Am. J. Bot.**, v. 102, n. 12, p. 2124 – 2131, 2015.
- Bachiega, T. F.; De Sousa, J. P. B.; Bastos, J. K.; Sforcin, J. M. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. **Nat Prod Res**, v. 27, n. 18, p. 1646-1650, 2013.
- Barbará, T.; Palma-Silva, C.; Paggi, G. M.; Bered, F.; Fay, M. F.; Lexer, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Mol Ecol**, v. 16, p.3759–3767, 2007.
- Barbosa, M.; Fernandes, G. W. Bottom-Up Effects on Gall Distribution. In: Fernandes, G. e Santos, J. (Ed.). **Neotropical Insect Galls**. 1. Dordrecht: Springer, 2014. p.99-113. ISBN 978-94-017-8783-3.
- Barbosa, N. P. U.; Fernandes, G. W.; Carneiro, M. a. A.; Júnior, L. a. C. Distribution of non-native invasive species and soil properties in proximity to paved roads and unpaved roads in a quartzitic mountainous grassland of southeastern Brazil (rupestrian fields). **Biol Invasions**, v. 12, n. 11, p. 3745-3755, 2010.
- Barbosa, N. P. U.; Fernandes, G. W.; Sanches-Azofeifa, A. A relict species restricted to a quartzitic mountain in tropical America: an example of microrefugium? **Acta Bot Bras**, v. 29, n. 3, p. 299-309, 2015.
- Barroso, G. M. Compositae-subtribo Baccharidinae Hoffman: estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguesia**, v. 40, p. 3–273, 1976.
- Belini, C. M. B.; Marques, M. O. M.; Figueira, G. M.; Bajay, M. M.; Campos, J. B.; Viana, J. P. G.; Pinheiro, J. B.; Zucchi, M. I. Characterization of microsatellite markers for *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Appl Plant Sci**, v. 4, n. 3, p. apps.1500093, 2016.
- Bhargava, A.; Fuentes, F. F. Mutational dynamics of microsatellites. **Mol Biotechnol**, v. 44, n. 3, p. 250-66, Mar 2010.
- Bitencourt, C.; Rapini, A.; Santos Damascena, L.; De Marco Junior, P. The worrying future of the endemic flora of a tropical mountain range under climate change. **Flora**, v. 218, n. Supplement C, p. 1-10, 2016.
- Bonatelli, I. A.; Carstens, B. C.; Moraes, E. M. Using Next Generation RAD Sequencing to Isolate Multispecies Microsatellites for *Pilosocereus* (Cactaceae). **Plos One**, v. 10, n. 11, p. e0142602, 2015.
- Borges, R. a. X.; Forzza, R. C. A tribo Astereae (Asteraceae) no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 26, n. 2, p. 24, 2008.
- Byars, S. G.; Parsons, Y.; Hoffmann, A. A. Effect of altitude on the genetic structure of an Alpine grass, *Poa hiemata*. **Ann Bot-London**, v. 103, n. 6, p. 885-899, 2009.

Cao, L.-J.; Li, Z.-M.; Wang, Z.-H.; Zhu, L.; Gong, Y.-J.; Chen, M.; Wei, S.-J. Bulk development and stringent selection of microsatellite markers in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. **Sci Rep**, v. 6, n. 20, p. 26512, 2016.

Castoe, T. a. P., Alexander W.; Jason De Koning, A. P.; Jones, Kenneth L.; Tomback, Diana F.; Oyler-Mccance, Sara J.; Fike, Jennifer A.; Lance, Stacey L.; Streicher, Jeffrey W.; Smith, Eric N.; Pollock, David D. . Rapid microsatellite identification from Illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. e30953, 2012.

Chakravarat, I. L., C. C. The effect of linkage on paternity calculations. . In: Walkera, R. H. (Ed.). **Inclusion Probabilities in Parentage Testing**. Arlington: American Association of Blood Banks, 1983. p.41 1-420.

Chistiakov, D. A.; Hellemans, B.; Volckaert, F. a. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p. 1-29, 2006.

Chung, A. M.; Staub, J. E.; Chen, J. F. Molecular phylogeny of Cucumis species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation. **Genome** v. 49, n. 3, p. 219-229, 2006.

Coleman, J. R. Chromosome numbers of Angiosperms collected in the state of São Paulo. **Rev Bras Genet**, v. 5, n. 3, p. 533-549, 1982.

Dirnböck, T.; Essl, F.; Rabitsch, W. Disproportional risk for habitat loss of high-altitude endemic species under climate change. **Global Change Biology**, v. 17, n. 2, p. 990-996, 2011.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

Edwards, A. C., A.; Hammond, H. A.; Caskey, C. T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **Am J Hum Genet**, v. 49, n. 4, p. 746–756., 1991.

Ellegren, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 6, p. 435-45, 2004.

Espírito-Santo, M. M. F., G. W. Host plant effects on the development and survivorship of the galling insect *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae). **Austral Ecol**, v. 27, p. 249–257, 2002.

Espírito-Santo, M. M. N., F. S.; Fernandes, G. W.; Silva, J. O. Plant Phenology and Absence of Sex-Biased Gall Attack on Three Species of *Baccharis* **Plos One**, v. 7, n. 10, p. e46896, 2012.

Fagundes, M.; Fernandes, G. W. Insect herbivores associated with *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae): responses of gall-forming and free-feeding insects to latitudinal variation. **Rev Biol Trop**, v. 59, n. 3, p. 1419-32, 2011.

Fagundes, M.; Neves, F. S.; Fernandes, G. W. Direct and indirect interactions involving ants, insect herbivores, parasitoids, and the host plant *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Ecol Entomol**, v. 30, p. 28–35, 2005.

Fernandes, G. W. **Ecology and conservation of moutaintop grasslands in Brazil**. 1. Springer International Publishing, 2016.

Fernandes, G. W.; Barbosa, N. P. U.; Negreiros, D.; Paglia, A. P. Challenges for the conservation of vanishing megadiverse rupestrian grasslands. **Nat Conservacao**, v. 12, n. 2, p. 162-165, 2014.

Fernandes, G. W.; Carneiro, M. a. A.; Lara, A. C. F.; Allain, L. R.; Andrade, G. I.; Julião, G. R.; Reis, T. R.; Silva, I. M. Gallig insects on neotropical species of *Baccharis* (Asteraceae). **Trop Zool**, v. 9, n. 2, p. 315-332, 1996.

Fernandes, G. W.; Santos, R.; Barbosa, N. P. U.; Almeida, H. A.; Carvalho, V.; Angrisano, P. Ocorrência de plantas não nativas e exóticas em áreas restauradas de campos rupestres. **Planta Daninha**, v. 33, p. 463-482, 2015.

Galíndez, G. B., F.; Ortega-Baes, P.; Scopel, A. L. Fire responses of three co-occurring Asteraceae shrubs in a temperate savanna in South America. **Plant Ecol**, v. 202, n. 1, p. 149-158, 2008.

Gilmore, B.; Bassil, N.; April, N.; Brian, K.; Smith, D.; Barney, D. L.; Hummer, K. Microsatellite Marker Development in Peony using NGS. **Am Soc Hortic Sci**, v. 138, n. 1, p. 64-74, 2013.

Goldstein, D. B.; Schlötterer, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. New York: Oxford University Press, 1999. 368

Gomes, V.; Collevatti, R. G.; Silveira, F. A.; Fernandes, G. W. The distribution of genetic variability in *Baccharis concinna* (Asteraceae), an endemic, dioecious and threatened shrub of rupestrian fields of Brazil. **Conserv Genet**, v. 5, n. 2, p. 157–165, 2004.

Gomes, V.; Fernandes, G. W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* D.C.(Asteraceae). **Acta Bot Bras**, v. 16, n. 4, p. 421-427, 2002.

Gontijo, B. M. Uma geografia para a Cadeia do Espinhaço. **Megadiv** v. 4, n. 4, p. 7-15, 2008.

Gottfried, M.; Pauli, H.; Futschik, A.; Akhalkatsi, M.; Barancok, P.; Benito Alonso, J. L.; Coldea, G.; Dick, J. *et al.* Continent-wide response of mountain vegetation to climate change. **Nature Clim. Change**, v. 2, n. 2, p. 111-115, 2012.

Guichoux, E.; Lagache, L.; Wagner, S.; Chaumeil, P.; Léger, P.; Lepais, O.; Lepoittevin, C.; Malausa, T. *et al.* Current trends in microsatellite genotyping. **Mol Ecol Resour**, v. 11, n. 4, p. 591-611, 2011.

Gur-Arie, R. C.; J., C.; Eitan, Y.; Shelef, L.; Hallerman, E. M.; Kashi, Y. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. **Genome Res**, v. 10, n. 1, p. 62-71, 2000.

Hamada, H.; Petrino, M. G.; Kakunaga, T. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 79, n. 21, p. 6465-6469, 1982.

Heiden, G. **Systematics of *Baccharis* (Asteraceae: Astereae)**. 2014. p. 372 (Tese de Doutorado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Hodel, R. G. J.; Segovia-Salcedo, M. C.; Landis, J. B.; Crowl, A. A.; Sun, M.; Liu, X.; Gitzendanner, M. A.; Douglas, N. A. *et al.* The Report of My Death was an Exaggeration: A Review for Researchers Using Microsatellites in the 21st Century. **Appl Plant Sci**, v. 4, n. 6, p. 1600025, 2016.

Hoffberg, S. L.; Bentley, K. E.; Lee, J. B.; Myhre, K. E.; Iwao, K.; Glenn, T. C.; Mauricio, R. Characterization of 15 microsatellite loci in kudzu (*Pueraria montana* var. *lobata*) from the native and introduced ranges. **Conserv Genet Resour**, v. 7, n. 2, p. 403–405, 2015.

Hoffmann, A.; Griffin, P.; Dillon, S.; Catullo, R.; Rane, R.; Byrne, M.; Jordan, R.; Oakeshott, J. *et al.* A framework for incorporating evolutionary genomics into biodiversity conservation and management. **Climate Change Responses**, v. 2, n. 1, p. 1, 2015.

Jacob, H. J. L., Klaus.; Lincoln, Stephen E.; Kusumi, Kenro; Bunker, Ruth K.; Mao, Yi-Pei; Ganten, Detlev; Dzau, Victor J.; Lander, Eric S.. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, v. 67, n. 1, p. 213-224, 1991.

Jump, A. S.; Marchant, R.; Peñuelas, J. Environmental change and the option value of genetic diversity. **Trends Plant Sci**, v. 14, n. 1, p. 51-58.

Kalia, R. K.; Rai, M. K.; Kalia, S.; Singh, R.; Dhawan, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011.

Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

Kelly, A. E.; Goulden, M. L. Rapid shifts in plant distribution with recent climate change. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 33, p. 11823-11826, 2008.

Kirk, H.; Freeland, J. R. Applications and Implications of Neutral versus Non-neutral Markers in Molecular Ecology. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 6, p. 3966-3988, 2011.

Le Stradic, S.; Buisson, E.; Fernandes, G. W. Vegetation composition and structure of some Neotropical mountain grasslands in Brazil. **J Mt Sci**, v. 12, n. 4, p. 864-877, 2015.

Lemos, M.; De Barros, M. P.; Sousa, J. P. B.; Filho, A. a. D. S.; Bastos, J. K.; De Andrade, S. F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **J Pharm Pharmacol**, v. 59, n. 4, p. 603-608, 2007.

López-Márquez, V.; García-Jiménez, R.; Templado, J.; Machordom, A.. Development and characterization of 26 novel microsatellite loci for the trochid gastropod *Gibbula divaricata* (Linnaeus, 1758), using Illumina MiSeq next generation sequencing technology. **PeerJ**, 4, e1789.

Li, Y.-C.; Korol, A. B.; Fahima, T.; Nevo, E. N. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. **Mol Ecol**, v. 11, p. 2453 - 2465, 2003.

Litt, M.; Luty, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am J Hum Genet**, v. 44, p. 397–401, 1989.

Liu, W.; Kang, M.; Tian, H.; Huang, H. A range wide geographic pattern of genetic diversity and population structure of *Castanea mollissima* populations inferred from nuclear and chloroplast microsatellites. **Tree Genet Genomes**, v. 9, n. 4, p. 975–987, 2013.

Mendes De Sá, C. E.; Negreiros, D.; Fernandes, G. W.; Dias, M. C.; Franco, A. C. Carbon dioxide-enriched atmosphere enhances biomass accumulation and meristem production in the pioneer shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Acta Bot Bras**, v. 28, p. 646-650, 2014.

Miah, G.; Rafii, M. Y.; Ismail, M. R.; Puteh, A. B.; Rahim, H. A.; Islam Kh, N.; Latif, M. A. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 11, p. 22499-528, 2013.

Monthe, F. S.; Duminil, J.; Tosso, F.; Migliore, J.; Hardy, O. J. Characterization of microsatellite markers in two exploited African trees, *Entandrophragma candollei* and *E. utile* (Meliaceae). **Appl Plant Sci**, v. 5, n. 2, p. 1600130, 2017.

Negreiros, D.; Esteves, D.; Fernandes, G. W.; Barbara, R. L. L.; Oki, Y.; Vichiato, M.; Chalub, C. Growth-survival tradeoff in the widespread tropical shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) in response to a nutrient gradient. **Trop Ecol**, v. 55, n. 2, p. 167, 2014.

Nei, M. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

Neves, F. S.; Lana, T. C.; Anjos, M. C.; Reis, A. C.; Fernandes, G. W. Ants in burned and unburned areas in campos rupestres ecosystem. **Sociobiology**, v. 63, n. 1, p. 628-636, 2016.

Oki, Y.; Goto, B. T.; Jobim, K.; Rosa, L. H.; Ferreira, M. C.; Coutinho, E. S.; De Azevedo Xavier, J. H.; Carvalho, F. *et al.* Arbuscular Mycorrhiza and Endophytic Fungi in Ruspestrian Grasslands. In: Fernandes, W. G. (Ed.). **Ecology and Conservation of Mountaintop grasslands in Brazil**. Cham: Springer International Publishing. p.157-179, 2016.

Oki, Y.; Soares, N. R.; Belmiro, M. S.; Correa-Junior, A.; Fernandes, G. W. The influence of the endophytic fungi on the herbivores from *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Neotrop Biol**, v. 4, n. 2, p. 83-88, 2009.

Oliveira, V. C.; Bastos, E. M. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) visando a identificação da origem botânica da própolis. **Acta Bot Bras**, v. 12, p. 431-439, 1998.

Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I.; Strobeck, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Mol Ecol**, v. 4, n. 3, p. 347-54, 1995.

Paula, J. T.; Aguiar, A. C.; Sousa, I. M. O.; Magalhães, P. M.; Foglio, M. A.; Cabral, F. A. Scale-up study of supercritical fluid extraction process for *Baccharis dracunculifolia*. **J Supercrit Fluids**, v. 107, p. 219-225, 2016.

Peakall, R.; Smouse, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. **Bioinformatics** v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.

Powell, T.; Forbes, A.; Hood, G.; Feder, J. Ecological adaptation and reproductive isolation in sympatry: genetic and phenotypic evidence for native host races of *Rhagoletis pomonella*. **Mol Ecol**, v. 23, 2014.

Provan, J.; Powell, W.; Hollingsworth, P. M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends Ecol Evol.** , v. 16, n. 3, p. 142–147, 2001.

Qiu, Y.; Liu, Y.; Kang, M.; Yi, G.; Huang, H. Spatial and temporal population genetic variation and structure of *Nothotsuga longibracteata* (Pinaceae), a relic conifer species endemic to subtropical China. **Genet Mol Biol**, v. 36, p. 598-607, 2013.

Rajendrakumar, P.; Biswal, A. K.; Balachandran, S. M.; Srinivasarao, K.; Sundaram, R. M. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. **Bioinformatics**, v. 23, n. 1, p. 1-4, 2007.

Ramos, F. C.; Bressan, J.; Godoy, V. C. J.; Zuccolotto, T.; Silva, L. E.; Bonancio, L. C. *Baccharis* (Asteraceae): chemical constituents and biological activities. **Chem Biodivers**, v. 13, n. 1, p. 1-17, 2016.

Rapini, A. R., P. L.; Lambert, S.; Pirani, J. R. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. . **Megadiv**, v. 4, n. 1-2, p. 16–24, 2008.

Resende, F. M.; Fernandes, G. W.; Coelho, M. S. Economic valuation of plant diversity storage service provided by Brazilian rupestrian grassland ecosystems. **Braz J Biol**, v. 73, p. 709-716, 2013.

Ribeiro, L. C.; Nascimento, J. S.; Madeira, J. A. Aferição dos limites da Mata Atlântica na Serra do Cipó, MG, Brasil, visando maior compreensão e proteção de um mosaico vegetacional fortemente ameaçado. **Nat Conservacao**, v. 7, n. 1, p. 30-49, 2009.

Rico, C.; Normandeau, E.; Dion-Cote, A. M.; Rico, M. I.; Cote, G.; Bernatchez, L. Combining next-generation sequencing and online databases for microsatellite development in non-model organisms. **Sci Rep**, v. 3, p. 3376, 2013.

Roberto, M. M.; Jamal, C. M.; Malaspina, O.; Marin-Morales, M. A. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by the *Allium cepa* test system. **Genet Mol Biol**, v. 39, p. 257-269, 2016.

Rodrigues, C. R. F.; Dias, J. H.; Smedo, J. G.; Da Silva, J.; Ferraz, A. B. F.; Picada, J. N. Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (D.C.). **J Ethnopharmacol**, v. 124, n. 2, p. 321-324, 2009.

Roy, C. B.; Nazeer, M. A.; Saha, T. Identification of simple sequence repeats in rubber (*Hevea brasiliensis*). **Curr Sci**, v. 87, n. 6, p. 807-811, 2004.

Rozen, S.; Skaletsky, H. Primer3 on the World Wide Web for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. e Misener, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000. p.365-386.

Sambrook, J. R., D. W.; Sambrook, J. . **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: CHSL Press, 2001.

Santos, D. A.; Fukui Mde, J.; Dhammika Nanayakkara, N. P.; Khan, S. I.; Sousa, J. P.; Bastos, J. K.; Andrade, S. F.; Silva Filho, A. A. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive

effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **J Ethnopharmacol**, v. 127, n. 2, p. 543-50, 2010.

Santos, F. A.; Bastos, E. M. a. F.; Maia, A. B. R. A.; Uzeda, M.; Carvalho, M. a. R.; Farias, L. M.; Moreira, E. S. A. Brazilian Propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. **Phytother Res**, v. 17, n. 3, p. 285-289, 2003.

Selkoe, K. A.; Toonen, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecol Lett**, v. 9, n. 5, p. 615-29, 2006.

Silveira, F. a. O.; Negreiros, D.; Barbosa, N. P. U.; Buisson, E.; Carmo, F. F.; Carstensen, D. W.; Conceição, A. A.; Cornelissen, T. G. *et al.* Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre. **Plant soil**, v. 403, n. 1-2, p. 129-152, 2015.

Sonah, H. D., R. K.; Sharma, A.; Singh, V. P.; Gupta, D. K.; Gacche, R. N.; Rana, J. C.; Singh, N. K.; Sharma, T. R.; . Genome-wide distribution and organization of microsatellites in plants: an insight into marker development in *Brachypodium*. **Plos One**, v. 6, n. 6, p. e21298, 2011.

Soranzo, N.; Provan, J.; Powell, W. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. **Genome**, v. 42, n. 1, p. 158-161, 1999.

Sork, V. L. Gene flow and natural selection shape spatial patterns of genes in tree populations: implications for evolutionary processes and applications. **Evol Appl**, v. 9, n. 1, p. 291-310, 2016.

Storfer, A. Gene flow and endangered species translocations: a topic revisited. **Biol Conserv**, v. 87, n. 2, p. 173-180, 1999.

Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res**, v. 17, n. 16, p. 6463–6471, 1989.

Unamba, C. I.; Nag, A.; Sharma, R. K. Next Generation Sequencing Technologies: the doorway to the unexplored genomics of non-model plants. **Front Plant Sci**, v. 6, p. 1074, 2015.

Veldman, J. W.; Buisson, E.; Durigan, G.; Fernandes, G. W.; Le Stradic, S.; Mahy, G.; Negreiros, D.; Overbeck, G. E. *et al.* Toward an old-growth concept for grasslands, savannas, and woodlands. **Front Ecol Environ**, v. 13, n. 3, p. 154--162, 2015.

Waits, L. P.; Luikart, G.; Taberlet, P.. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. **Mol ecol**, v. 10, n. 1, p. 249-256, 2001.

Wang, J. Parentage and sibship exclusions: higher statistical power with more family members. **Heredity**, v. 99, n. 2, p. 205-217, 2007.

Wang, M. L.; Barkley, N. A.; Jenkins, T. M. Microsatellite Markers in Plants and Insects. Part I: Applications of Biotechnology **G3 (Bethesda)**, v. 3, n. 1, 2009.

Weir, B. **Genetic Data Analysis II**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates 1996.

Wulff, A.; Hunziker, J. H.; Escobar, A. Estudios cariológicos en Compositae. **Darwiniana**, v. 34, p. 213-231, 1996.

Zalapa, J. E.; Cuevas, H.; Zhu, H.; Steffan, S.; Senalik, D.; Zeldin, E.; Mccown, B.; Harbut, R. *et al.* Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. **Am J Bot**, v. 99, n. 2, p. 193-208, 2012.

Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T. Strategies for microsatellite isolation: A review. **Mol Ecol**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.