

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**RODRIGO MONTE LORENZONI**

**EVIDÊNCIAS CARIOTÍPICAS E MOLECULARES DA HEXOPLÓIDIA EM *Annona mucosa***

**ALEGRE, ES  
2016**

RODRIGO MONTE LORENZONI

**EVIDÊNCIAS CARIOTÍPICAS E MOLECULARES DA HEXOPLOIDIA EM *Annona mucosa***

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Taís Cristina Bastos Soares.

Coorientadores: Prof. Dr. Wellington Ronildo Clarindo,  
Prof. Dr. Ruimário Inácio Coelho.

**ALEGRE, ES**  
**FEVEREIRO - 2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Lorenzoni, Rodrigo Monte, 1990-

L869e Evidências cariotípicas e moleculares da hexoploidia em *Annona mucosa* / Rodrigo Monte Lorenzoni. – 2016.

51 f. : il.

Orientador: Taís Cristina Bastos Soares.

Coorientador: Wellington Ronildo Clarindo ; Ruimário Inácio Coelho.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Biribá. 2. Diversidade genética. 3. Marcadores moleculares. 4. Poliploidia. 5. Microssatélites (Genética). I. Soares, Taís Cristina Bastos. II. Clarindo, Wellington Ronildo. III. Coelho, Ruimário Inácio. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. V. Título.

CDU: 63

---

**RODRIGO MONTE LORENZONI**

**EVIDÊNCIAS CARIOTÍPICAS E MOLECULARES DA HEXOPLÓIDIA EM**

*Annona mucosa*

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2016.


**COMISSÃO EXAMINADORA**



Profª. Drª. Taís Cristina Bastos Soares

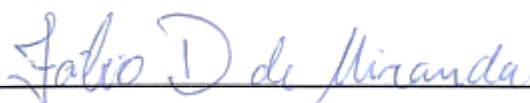
Universidade Federal do Espírito Santo

Orientadora



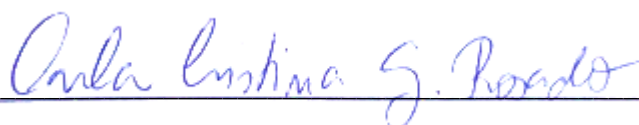
Prof. Dr. Wellington Ronildo Clarindo

Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda

Universidade Federal do Espírito Santo



Drª. Carla Cristina Gonçalves Rosado

Universidade Federal do Espírito Santo

Aos meus pais, Osmar e Marilene,  
pelo exemplo, apoio e amor,

**Dedico.**

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”*

George Bernard Shaw

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida e por me guiar e proteger em todos os momentos;

A Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização do Curso;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

À professora Taís Cristina Bastos Soares, por tantos ensinamentos, confiança, profissionalismo, conselhos e amizade;

Aos coorientadores, professor Wellington Ronildo Clarindo e professor Ruimário Inácio Coelho, pela colaboração, auxílios e aconselhamento ao longo do desenvolvimento do trabalho;

A Carla Cristina Gonçalves Rosado pelo apoio, suporte e companheirismo;

Ao prof. Fábio Demolinari de Miranda, por suas contribuições e ensinamentos;

Ao Prof. Carlos Roberto de Carvalho pela assistência nas análises de citometria de fluxo;

A toda equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia molecular, Ludymila, José Dias, Liliana, Franciele, Ronald, Cássio, Thammyres, Aléxia, Adelson, Lucimara e Kelmer, pelas trocas de experiências, convivência, amizade, pelos momentos de descontração;

Ao Edilson Marques, pela parceria e por toda ajuda durante a elaboração do trabalho;

A secretaria de Pós-graduação pelo suporte da Madalena e Alessandra durante todo o tempo;

Àqueles que são a base dessa conquista e não hesitaram em medir esforços para que eu pudesse alcançar essa etapa, meus pais: Osmar e Marilene. Pelo amor incondicional, dedicação, apoio constante e por todo carinho;

À minha irmã Rafaela, pelo carinho e apoio ao longo desses anos;

A Kati, pelo amor, dedicação, compreensão, apoio, incentivo, respeito e por ser tão companheira em bons e maus momentos dividindo tristezas e multiplicando as alegrias.

**Muito Obrigado!**

## **BIOGRAFIA**

Rodrigo Monte Lorenzoni, filho de Osmar Lorenzoni e Marilene Monte Lorenzoni, nasceu em Venda Nova do Imigrantes-ES em 18 de dezembro de 1990.

Em 2009, entrou para a Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre-ES onde obteve o título de Bacharel em Agronomia em março de 2014. Durante o período de graduação foi bolsista de iniciação científica, onde desenvolveu atividades de pesquisa em biotecnologia e biologia molecular.

Em agosto de 2014, ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal com ênfase em Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas, submetendo-se à defesa da dissertação, em fevereiro de 2016.



## 1. RESUMO

O biribá (*Annona mucosa*) é uma espécie que tem como centro de origem a Floresta Amazônica, seu fruto possui grande aceitação para consumo in natura, além de ser uma fonte promissora de compostos bioativos com propriedades farmacológicas. Entretanto, apesar da importância, pouco se sabe sobre a variabilidade e diversidade genética desta espécie. O conhecimento da variabilidade genética de espécies pouco explorado possibilita a utilização das mesmas em programas de melhoramento genético e/ou de conservação, sendo os microssatélites (SSR) uma ferramenta interessante para esse tipo de estudo, contudo para realizar estudos com essa classe de marcadores é necessário o conhecimento da ploidia da espécie. Porém, dados referentes ao conteúdo de DNA nuclear e número cromossômico, ainda não foram descritos para a espécie. Portanto, objetivou-se mensurar o valor 2C nuclear, determinar o número cromossômico, avaliar a transposição de marcadores microssatélites desenvolvidos para *Phaseolus vulgaris* e *Coffea* sp. e estimar a diversidade genética entre acessos de *A. mucosa*. O conteúdo de DNA nuclear foi estimado por meio da citometria de fluxo onde foi verificado que a espécie apresenta valor 2C= 5,42 pg e que não existe variação intraespecífica. A técnica de citogenética clássica gerou metáfases onde foi possível determinar que a espécie possui 42 cromossomos e, portanto, é uma espécie hexaploide. Com base na ploidia encontrada foi possível avaliar a transferibilidade dos marcadores, onde foram transferidos e validados 42,25% dos *primers*. A partir dos 157 fragmentos gerados com 82% de polimorfismo foi possível estimar a diversidade genética entre os acessos estudados, onde os indivíduos foram separados em três grupos distintos pelo método UPGMA e em dois grupos pela análise bayesiana. Com este estudo foi possível verificar que após o conhecimento da ploidia, onde  $2n = 6x = 42$  cromossomos, os marcadores puderam ser avaliados e mostraram-se eficientes para amplificação heteróloga de amostras de DNA de *A. mucosa* e os *primers* que apresentaram polimorfismo poderão ser utilizados em estudos moleculares desta espécie, sem o gasto de recursos financeiros e tempo no desenvolvimento de novos marcadores.

**Palavras-chave:** Valor 2C; Poliploidia; Amplificação heteróloga; SSR; Biribá.

## 2. ABSTRACT

Biribá (*Annona mucosa*) is a species whose origin comes from the Amazon Forest. Its fruits are largely accepted for *in natura* consumption and can be a source of bioactive compounds with pharmacological properties. However, despite their importance, there is little available information about genetic variability and diversity for species. The knowledge about the genetic variability of unexplored species allows their application on genetic enhancement and/or conservation programs, such as microsatellites analysis (or SSR), an interesting tool for this kind of study. However, performing it with such markers demands the species ploidy knowledge, which was not possible before since its nuclear DNA data and chromosomic number were not described yet. Thus, the present study aimed to measure the 2C nuclear value, determine the chromosomic number, evaluate the transposition of microsatellite markers developed for *Phaseolus vulgaris* and *Coffea* sp., and estimate the genetic diversity among *A. mucosa* accesses. The nuclear DNA content was estimated through flow cytometry, in which it was verified that this species have 2C value of 5,42 pg and that intraspecific variation is inexistent. The classic cytogenetic technique generated metaphasis that determined that it has 42 chromosomes and, therefore, it is hexaploid. Based on its ploidy, it was possible to evaluate the markers transferability with 42,25% of primers being transferred and validated. From 157 fragments generated with 80% of polymorphism, the genetic diversity among the studied accesses was estimated, and three distinct groups of individuals were formed by UPGMA method and two groups by Bayesian analysis. This studied allowed verifying that, knowing the ploidy ( $2n=6x=42$  chromosomes), the markers could be evaluated and the results showed their efficiency for heterologous amplification of DNA samples of *A. mucosa*. The primers that presented polymorphism can be used in this type of molecular study, without the financial expenses and time consumption required to develop new markers.

**Keywords:** 2C value; Polyploidy; Heterologous amplification; SSR; Biribá.

## SUMÁRIO

1.	RESUMO .....	ix
2.	ABSTRACT .....	ix
3.	INTRODUÇÃO .....	1
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
4.1	Origem, distribuição e caracterização da espécie <i>Annona mucosa</i> Jacq. ....	3
4.2	Importância econômica de <i>A. mucosa</i> .....	4
4.3	Análises moleculares e citogenéticas em <i>Annona</i> .....	5
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	7
5.1	Área de coleta e material genético .....	7
5.2	Mensuramento do conteúdo de DNA e caracterização do cariótipo .....	7
5.2.1	Citometria de fluxo.....	7
5.2.2	Preparação do material citogenético.....	8
5.3	Extração do DNA e análise de SSR.....	9
5.4	Análises estatísticas.....	13
6	RESULTADOS.....	14
6.1	Mensuramento do conteúdo de DNA nuclear .....	14
6.2	Análises citogenéticas .....	14
6.3	Análises de transferibilidade de SSR e de diversidade genética .....	16
7.	DISCUSSÃO .....	21
7.1	Conteúdo de DNA nuclear.....	21
7.2	Determinação do número cromossômico.....	23
7.3	SSR apresentam amplificação heteróloga e permitem a análise de diversidade .....	24
8.	CONCLUSÕES.....	27
9.	REFERÊNCIAS.....	28

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Descrição dos *primers* utilizados com suas sequências e motivos amplificados.....11

**Tabela 2:** Marcadores SSR utilizados na amplificação de *A. mucosa*, com respectivos número de alelos, nº de bandas polimórficas e % de polimorfismo.....18

**Tabela 3:** Matriz de dissimilaridade genética entre 15 acessos de *A. mucosa* calculada com base no complemento aritmético do índice de Jaccard, utilizando 157 fragmentos amplificados.....19

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cariótipo de <i>A. mucosa</i> com 42 cromossomos em diferentes graus de compactação (a - b).....	16
<b>Figura 2:</b> Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre 15 acessos de <i>A. mucosa</i> , obtido pelo método UPGMA, utilizando o complemento do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade. Os valores encontrados em cada bifurcação são os valores da análise de bootstrap.....	21
<b>Figura 3:</b> Gráfico de barras obtido pelo software STRUCTURE onde são mostrados os dois grupos identificados pela análise (k= 2). Os números na horizontal correspondem aos acessos estudados.....	22

### 3. INTRODUÇÃO

*Annona mucosa* Jacquin. (biribazeiro) destaca-se por estar entre as espécies da família *Annonaceae* que apresentam tanto importância econômica quanto para manutenção da biodiversidade. A espécie tem o Brasil como centro de diversidade e ocorre nos biomas da Floresta Atlântica e Amazônica (Santos et al. 2005; Ferreira et al. 2010).

A espécie tem ampla dispersão geográfica e o fruto é conhecido como biribá, biribá do Pará, fruta da condessa, biribá de Pernambuco, anona, pinha ou jaca de pobre. Essa frutífera é indicada para formação de pomares, por seus frutos terem grande aceitação para o consumo, principalmente, *in natura* e o retorno econômico ocorre em no máximo cinco anos após a implantação (Teixeira e Macedo, 2011).

O interesse científico para a identificação das propriedades medicinais do biribazeiro e na sua utilização como porta-enxerto vem crescendo (Estrada-Reyes et al. 2010). O aprimoramento das características de interesse acontece principalmente através de programas de melhoramento. Uma das primeiras etapas desses programas é conhecer a dissimilaridade genética e fenotípica entre os genótipos, a fim de proceder com os cruzamentos e assim aumentar a taxa de sucesso na busca dos caracteres de interesse.

Estudos de diversidade genética têm sido importantes para fins de melhoramento genético, avaliação de impactos na biodiversidade, elucidação dos mecanismos evolutivos atuantes na diversificação das espécies, gerenciamento de bancos de germoplasma e para a conservação de recursos genéticos, uma vez que a análise de diversidade visa o entendimento das relações genéticas. Com isso, é possível quantificar ou prever o nível de variabilidade total e sua distribuição dentro ou entre unidades taxonômicas como indivíduos, acessos de banco de germoplasma, linhagens, cultivares, populações e espécies (Perssoni 2007; Soares 2010; Borém e Fritsche-Neto 2013). Uma das técnicas mais utilizadas para verificar a dissimilaridade são os marcadores moleculares, entre eles os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*).

Marcadores codominantes, como os SSR, permitem o enriquecimento das análises de diversidade, pois diferenciam os indivíduos homo e heterozigotos (Ferrão et al. 2013). Esses marcadores são tidos como específicos para determinada espécie, mas é possível ampliar seu uso em outras espécies, desde que as regiões

flanqueadoras sejam conservadas e apresentem número de repetições variável (Hendre, Aggarwal 2007; Wang et al. 2009). Hendre et al. (2008) ao utilizar *primers* de *Coffea canephora*, avaliaram a diversidade genética em treze espécies do gênero *Coffea* e duas do gênero *Psilanthus*. Os mesmos autores observaram também que quanto mais distantes filogeneticamente as espécies são, menor é a taxa de amplificação. Em outro estudo Carvalho et al. (2015) fizeram uso da amplificação heteróloga entre espécies de pimentas para caracterização de espécies de um banco de germoplasma. Essa característica permite a implementação desses marcadores em espécies as quais não existem *primers* desenvolvidos, minimizando o tempo e os custos de aquisição de marcadores específicos.

Para avaliar os SSR é necessário o conhecimento da ploidia da espécie, o que permite analisar as marcas em nível de alelos e assim verificar se o indivíduo é homo ou heterozigoto (Serang et al. 2012). A ploidia pode ser obtida por meio da citometria de fluxo, a qual permite estimar o conteúdo de DNA nuclear, e principalmente, pela aplicação da citogenética clássica, que possibilita determinar o número cromossômico (Clarindo et al. 2008). No entanto, esse tipo de estudo para espécies do gênero *Annona* é escasso. O valor 2C foi estabelecido para poucos representantes, *A. cacans* (2C= 2,00 pg); *A. glabra* (2C= 2,70 pg); *A. lutescens* (2C= 2,00 pg); *A. reticulata* (2C= 2,66 pg); *A. sericea* (2C= 1,36 pg), *A. squamosa* (2C= 2,46 pg) (Morawetz e Samuel 1998) e *A. crassiflora* (2C= 1,70 pg) (Ribeiro 2013). Assim como o número cromossômico *A. cacans*, *A. cherimola*, *A. reticulata*, *A. squamosa* e *A. muricata*, com 14 cromossomos; *A. glabra* e *A. lutescens* com 28 cromossomos e *A. coriaceae* com 42 cromossomos (Bennett e Leitch, 2012; Folorunso e Olorode 2007; Sauer e Ehrendorfer 1984).

Apesar do elevado nível de espécies poliploides, ferramentas de análises mais robustas para processamento de dados provenientes dos marcadores codominantes são necessárias. Pois, mesmo conhecendo a ploidia do organismo, ao avaliar indivíduos poliploides a análise de diversidade, é comprometida, devido aos diferentes padrões de herança e também, não é possível, pela análise visual, fazer a identificação de quantos números de cópias do alelo estão presentes em determinado heterozigoto (Kosman e Leonard 2005; Serang et al. 2012). O que acarreta em perdas de informações de relevante importância como a estimativa de heterose e heterozigosidade. Entretanto, o que se tem feito para possibilitar as análises de poliploides por meio de marcadores codominantes é a codificação dos dados de forma

binária (Ferrão et al. 2013), mesmo em culturas de grande importância econômica como a cana (Pan et al. 2014), café (Motta et al. 2014) e trigo (Salem et al. 2015) essa técnica é bastante utilizada.

Diante do exposto, visando conhecer melhor alguns aspectos genético-moleculares dessa *Annonaceae*, objetivou-se mensurar o valor 2C nuclear, determinar o número cromossômico, avaliar a transposição de marcadores microssatélites desenvolvidos para *Phaseolus vulgaris* e *Coffea* sp. e estimar a diversidade genética entre acessos de *A. mucosa*.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Origem, distribuição e caracterização da espécie *Annona mucosa* Jacq.

*Annona mucosa* (biribazeiro) pertence à família *Annonaceae*. Essa família possui cerca de 2.440 espécies distribuídas dentro de 112 gêneros (Couvreur et al. 2011), com distribuição predominante nas regiões tropicais (Chatrou et al. 2004). A dispersão das florestas tropicais se dá na faixa equatorial do globo e se concentra principalmente nas regiões do sudeste da Ásia, norte da Austrália, África, América do Sul e Central, Índia, Sri Lanka e algumas Ilhas do Pacífico (Couvreur et al. 2011).

No Brasil ocorrem 29 gêneros desta família e cerca de 386 espécies (Maas et al. 2016). Esses encontram-se distribuídos principalmente na Amazônia, e secundariamente em áreas de Mata atlântica (Lobão et al. 2005). Apesar da família apresentar 2.440 espécies, ela não possui grande diversificação quando comparada com outras famílias de angiospermas. Ainda assim, as anonáceas contribuem significativamente para a diversidade de árvores em florestas tropicais de todo o mundo (Tchouto et al. 2006; Punyasena et al. 2008).

O gênero *Annona* possui cerca de 200 espécies neotropicais (Maas 2010) e quatro africanas (Chatrou et al. 2004). No território brasileiro podem ser encontradas cerca de 80 espécies (Maas et al. 2016). Dentre essas, as cultivadas nas regiões tropicais que representam maior importância são a pinha ou ata (*Annona squamosa* L.), a graviola (*Annona muricata* L.), a cherimoia (*Annona cherimola* Mill.), a atemoia (*Annona reticulata* L.) e o biribá (*Annona mucosa* Jacq.) (São José et al. 1997).

*Annona mucosa* é uma espécie alógama (Costa e Muller 1995) e pode chegar a uma altura de 7 metros, com ramos jovens esparsamente seríceos, os ramos adultos se apresentam glabros, lenticelados e suas gemas são cobertas densamente por



tricomas. As folhas possuem pecíolo glabro medindo de 9 a 12 mm de comprimento; a lâmina foliar é elíptica com dimensão de 10 a 12 cm x 3 a 6 cm de coloração verde clara, possui textura membranácea com face adaxial esparsamente serícea, face abaxial glabra, nervação camptódrama com 15 a 20 pares de nervuras secundárias, o retículo é impresso na face adaxial e proeminente na face abaxial, base aguda, margem plana e ápice acuminado. As flores podem ser ramificadas de 1 a 3, opositifólias, pedicelo com 20 a 30 mm de comprimento, seríceo; brácteas persistentes ca. com 1,5 mm de comprimento, seríceas; sépalas triangulares, ca. 3 x 3 mm, esverdeadas, *in sicco* amareladas, face abaxial tomentosa, convexa, quilhada, face adaxial glabra; pétalas externas aladas, conatas na base, oblongas 10 a 20 x 5 a 10 mm, de cor creme, *in sicco* amareladas a cinza claro, tomentosas, internas ca. 7 x 4 mm, glabras; tubo da corola ca. 5 mm de comprimento; estames ca. 1 mm de comprimento, amarelo claro, *in sicco* castanhos, carpelos ca. 2 mm de comprimento e seríceos. O fruto é sincárpico, arredondado a ovoide medindo 5,5 a 10 x 5,7 a 8 cm, carpídicos ca. 70, oblongos na base, tendendo a quadrangular no ápice, apiculados; sementes trapezoides tendendo a triangulares no ápice 9 a 10 x 14 a 16 mm. (Jacquin 1764; Dutra *et al.* 2012).

#### **4.2 Importância econômica de *A. mucosa***

O biribá é um fruto com sabor adocicado e agradável, sendo consumido principalmente *in natura*, podendo ser utilizado em sucos e quando fermentados na fabricação de vinho. É indicado tanto para pomares solteiros quanto consorciados, possibilitando retorno econômico em no máximo cinco anos após sua implantação, isso ocorre devido ao rápido crescimento e à alta produtividade, em bons cultivos, consegue-se cerca de 18 t/ha/ano (Costa e Muller 1995).

A maioria das anonáceas é suscetível a diversas doenças e ataque de insetos praga, sendo as principais podridões de colo e raiz e ataque de coleobrocas (Kavati 1992, Tokunaga 2000). Esse fato sugere a utilização de porta-enxertos resistentes afim de minimizar os problemas decorrentes dos ataques. Entre as espécies de anonáceas, a que apresenta maior tolerância aos ataques de pragas e doenças é o biribazeiro (Manica 2000; Junqueira *et al.* 2000). O uso do biribazeiro como porta-enxerto tem crescido bastante principalmente, pelo uso como cavalo na produção de mudas de gravioleira, a qual apresenta compatibilidade comprovada (Junqueira *et al.* 1996).

A espécie apresenta ainda importância nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, sendo utilizada na forma *in natura* ou produção de geleias, sucos, sorvetes, bolos e *drinks*, apresenta enorme potencial de uso por indústrias farmacêuticas e químicas, pois contém substâncias naturais bioativas, conhecidas como, acetogeninas de anonáceas, que apresentam importantes atividades biológicas, tais como: antitumoral, citotóxica, vermífida, pesticida, antimicrobiana, abortiva, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite e antimalárica (Nascimento et al. 2003).

#### **4.3 Análises moleculares e citogenéticas em *Annona***

Estudos de diversidade genética têm sido de fundamental importância para fins de melhoramento genético, avaliação de impactos na biodiversidade, elucidação dos mecanismos evolutivos atuantes na diversificação das espécies, gerenciamento de bancos de germoplasma e para a conservação de recursos genéticos, uma vez que a análise de diversidade visa o entendimento das relações genéticas. Com isso, é possível quantificar ou prever o nível de variabilidade total e sua distribuição dentro ou entre unidades taxonômicas como indivíduos, acessos de banco de germoplasma, linhagens, cultivares, populações e espécies (Perssoni 2007; Soares 2010; Borém e Fritsche-Neto 2013).

Aspectos genético-moleculares tomam como partida, na maioria das vezes, que grande parte das espécies sejam diploides. Porém, diversos trabalhos sugerem que cerca de 100% das angiospermas sofreram eventos de poliploidização (Soltis e Soltis 1999; Ramsey e Schemske 1998; Adam e Wendel 2005; Madlung e Wendel 2013). Isso acarreta em análises que possam negligenciar a compreensão do genoma de muitas espécies. Qu e Hancock (2001) fazem diversas considerações no que diz respeito à análise de marcadores moleculares em organismos poliploides, onde mostram classes de marcadores que sejam eficientes nas análises moleculares.

Portanto, uma das primeiras preocupações ao trabalhar com espécies que carecem de informações sobre o genoma é a determinação da ploidia da espécie. A determinação do número cromossômico para o gênero *Annona* foi possível a partir de estudos cariotípicos em *Annona muricata* realizados por Folorunso e Olorode (2007), onde determinaram  $x=7$  como número básico do gênero. Entre as espécies pertencentes ao gênero existem representantes diploides com  $2n= 2x= 14$  cromossomos; tetraploides com  $2n= 4x= 28$  cromossomos e hexaploides com  $2n= 6x=$

42 cromossomos (Bennett e Leitch 2012; Folorunso e Olorode 2007; Sauer e Ehrendorfer 1984). Associada a citogenética, a citometria de fluxo permite, em casos onde já se tem o conhecimento prévio do número cromossômico, inferir sobre a ploidia da espécie através do conteúdo de DNA nuclear. Morawets e Samuel (1998) verificaram que o valor 1C médio para o gênero *Annona* é aproximadamente 1,00 pg ao avaliar espécies diploides e poliploides.

A caracterização da diversidade genética em espécies de *Annona* ainda é incipiente ao considerar o número de representantes do gênero, uma vez que na literatura a maioria dos trabalhos em que foi estimada a diversidade por meio de marcadores moleculares concentra-se uma restrita gama de espécies, sendo elas *A. cherimola* (González-Aguero et al. 2011), *A. squamosa* (Guimarães et al. 2013), *A. muricata* (Suratman et al. 2015) e *A. mucosa* (Lorenzoni et al. 2014). Além destes, existem estudos filogenéticos, por meio de *primers* específicos, para 24 espécies do gênero (Chatrou et al. 2009). Larranaga e Hormanza (2015) realizaram estudos de DNA barcoding para 14 espécies e afirmam que marcadores específicos são eficientes na determinação de genótipos promissores em inicial estado de domesticação.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Área de coleta e material genético**

Os 15 acessos de *A. mucosa* utilizados foram provenientes da Coleção de Trabalho do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/ UFES).

### **5.2 Mensuramento do conteúdo de DNA e caracterização do cariótipo**

As análises citogenéticas foram realizadas no Laboratório de Citogenética do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA/UFES). Os experimentos envolvendo a citometria de fluxo foram realizados no Laboratório de Citogenética e Citometria da Universidade Federal de Viçosa (UFV – MG).

#### **5.2.1 Citometria de fluxo**

As folhas dos acessos foram submetidas às análises, juntamente com a planta padrão de citometria de fluxo *Solanum lycopersicum* (2C = 2,00 pg, Praça-Fontes et al. 2011).

Para o estabelecimento das suspensões nucleares, fragmentos foliares de 2 cm<sup>2</sup> foram extraídos de folhas jovens da planta padrão *S. lycopersicum* e das amostras dos acessos de *A. mucosa*. Os núcleos foram obtidos de acordo com o método de Galbraith et al. (1983), retalhando as amostras foliares com lâmina de barbear em uma placa de Petri contendo 0,5 mL de tampão de lise OTTO I (Otto 1990; Doležel e Göhde 1995), suplementado com 2 mM de ditioneitol e 50 µg/mL de RNase. A suspensão de núcleos foi ajustada para 1 mL com o mesmo tampão, filtrada através de filtro de nylon 30 µm de diâmetro de poro e centrifugado em microtubos a 100 xg, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material restante incubado em 100 mL de solução tampão de lise OTTO I durante 10 min.

Em seguida, as suspensões foram coradas em 1,5 mL de solução OTTO I: OTTO II (OTTO 1990) na proporção 1:2, e filtradas através de filtro de nylon 20 µm de diâmetro de poro. Para a determinação do tamanho do genoma nuclear, o tampão OTTO I: OTTO II foi suplementado com 2,0 mM de ditioneitol (Sigma®), 75 µM de iodeto de propídio (IP, excitação/emissão nos comprimentos de onda: 480-575/550-740 nm) e 50 µg/mL RNase. A suspensão nuclear foi corada durante 10 – 40 min no escuro.

As suspensões nucleares foram analisadas em um citômetro de fluxo Partec PAS<sup>®</sup> equipado com fonte de luz a laser (488 nm). A fluorescência do iodeto de propídeo emitida pelos núcleos foi coletada por um filtro RG 610 nm. O equipamento foi calibrado e alinhado usando microesferas e soluções padrão de acordo com recomendações do fabricante (Partec<sup>®</sup>). O software FlowMax<sup>®</sup> (Partec<sup>®</sup>) foi usado para análise de dados. Foram feitas seis repetições independentes por planta analisando mais de 10.000 núcleos. Picos cujos coeficientes de variação (CV) foram maiores que 5% não foram considerados. O tamanho do genoma de cada planta foi estabelecido relativamente ao pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de *S. lycopersicum*.

### **5.2.2 Preparação do material citogenético**

Para obtenção de cromossomos mitóticos, meristemas radiculares provenientes da germinação de sementes em areia foram submetidos ao protocolo de Clarindo e Carvalho (2009) com modificações.

As raízes que mediam entre 1,0 – 2,0 cm foram tratadas com amiprofos-metil (agente antitubulínico) na concentração final de 5 µmol por um período de 5 h em temperatura de 30 °C ou por 15 h a 4 °C. Em seguida, as raízes passaram por 3 lavagens em água destilada por 5 min cada lavagem e então, as raízes foram fixadas em solução de metanol: ácido acético (3:1). O fixador foi trocado três vezes e a amostra foi estocada a -20 °C. Após um período, de no mínimo, 24 h na solução fixadora, as raízes foram lavadas em água destilada e maceradas enzimaticamente, para isso elas foram incubadas a 34 °C em um período de 2 h em solução de pool enzimático (4% celulase, 1% macerozime e 0,4% hemicelulase) nas concentrações de 1:20; 1:30; 1:50; 1:70 e 1:90 (pool : água). Posteriormente, as raízes foram lavadas em água destilada por 10 min, fixadas novamente e armazenadas a -20 °C.

As lâminas foram preparadas por meio da técnica de dissociação celular e secagem ao ar, onde as raízes são colocadas em uma lâmina de vidro, maceradas com auxílio de um bisturi, subsequentemente secas ao ar e colocadas em uma placa aquecedora a 50°C por 5 min. As lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 20 min, lavadas duas vezes em água destilada e secas em placa aquecedora. A captura de células em metafase foi realizada utilizando objetiva 100x e uma câmara CCD (Nikon EvolutionTM) acoplada a um microscópio Nikon 80i (Nikon).

### 5.3 Extração do DNA e análise de SSR

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo.

Folhas jovens sadias completamente expandidas foram coletadas e a extração de DNA foi feita de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações.

Inicialmente foram transferidos para tubos eppendorf de 2,0 mL aproximadamente 300 mg de tecido vegetal macerado em nitrogênio líquido, em seguida foi adicionado 800 µL de tampão de extração (NaCl a 1,4 mol/L; Tris-HCl pH 8,0 a 100mmol/L; EDTA pH 8,0 a 20 mmol/L; PVP 1%; CTAB 2%; β-mercaptoetanol 0,2%) e a amostra foi agitada em vortex. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 30 min a 65°C em banho-maria e homogeneizadas a cada 10 min. Após a incubação foram adicionados 650µL de clorofórmio : álcool isoamílico (CIA) (24:1) e os tubos foram homogeneizados até formar uma emulsão, onde em seguida foram centrifugados a 12000 rpm por 10 min. Logo depois a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 2,0mL e adicionado 200µL de tampão de extração e 650µL de CIA e então novamente homogeneizados, centrifugados a 12000 rpm por 10 min. Em seguida o sobrenadante foi novamente transferido para um novo tubo e procedeu com a adição de 650 µL de CIA e centrifugação a 12000 rpm por 10 min. Posteriormente a fase aquosa foi transferida para novo tubo onde o DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol gelado + 230 µL de Acetato de amônio e então homogeneizados e centrifugados a 12000 rpm por 10 min. Após a formação do precipitado a parte aquosa foi eliminada e lavado com 250 µL de etanol 70% por 3 vezes. Após retirada do álcool e secagem do pellet foi feita a ressuspensão do mesmo em 40 µL de água com RNase (40 µg/mL) e incubados em banho-maria a 37 °C por 30 min.

Por fim, as amostras foram quantificadas em Nanodrop® (Thermo Scientific) a fim de verificar a quantidade e qualidade do DNA obtido.

Para a avaliação de transferibilidade, foram utilizados 53 pares de *primers* desenvolvidos para o cafeeiro (1 a 53) e 18 pares de SSR desenvolvidos para o feijoeiro (54 a 71) (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição dos *primers* utilizados com suas sequências e motivos amplificados.

	<i>Primer</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	<i>Motivo</i>	<i>Tº anelamento</i>	<i>Referência</i>
1	SSRCa002	CTGTCCCACCAACCAAAA	CTTCAACCCCCAACACAC	(TTCC)3(GT)17	58	Missio et al. (2009)
2	SSRCa018*	GTCTCGTTTCACGCTCTCTC	ATTTTTGGCACGGTATGTTC	(GT)18(GA)10	58	Missio et al. (2009)
3	SSRCa021*	GCTGAGAGTTTTGAGGGAAA	CCGACGTAGTTGATGATTGA	(GGA)3N4(AAG)2	58	Missio et al. (2009)
4	SSRCa033	GTTTTTACGCGCACGATTA	TTCAAAAGTCAACTCATTCTCC	(AAT)3/(GA)4N5(CA)2 N3(CG)3N3(GC)3	56	Missio et al. (2009)
5	SSRCa040	AGGGATGTAGAACCAGCAA	CCAATAGCTCACAAACAAGG	(GAG)3A(AG)3	58	Missio et al. (2009)
6	SSRCa045	GACTTGTTGCATTCCCCTA	GCGCATGTGAAGAGAAAGT	(TTTAC)3/(AC)3T(CA)3	56	Missio et al. (2009)
7	SSRCa052*	GATGAAAACCCAGAAAGTTG	TAGAAGGGCTTTGACTGGAC	(TTG)7	56	Missio et al. (2009)
8	SSRCa054*	CCGAACCCAACTAACATCTC	GCAGGTCTTCCATTGTCTGT	(AAAG)3	56	Missio et al. (2009)
9	SSRCa080	GTTCTTTCCGCCGTCAAT	GAGAAGAGAGAGGAAGGGAAA	(CA)9N8(CT)30	58	Missio et al. (2009)
10	SSRCa091*	CGTCTCGTATCACGCTCTC	TGTTCTCGTTCCTCTCTCT	(GT)8(GA)10	54	Missio et al. (2009)
11	SSRCa006*	CTTGCTCAGTGAACCATCC	TGCCTCTTATGCCACTACTAAA	(CT)6	54	Missio et al. (2009)
12	SSRCa016	AGCAGATTCCATCCTTATCCT	CCACTAATCCATTCCATTCC	(GAA)3/(GGAAAG)3	58	Missio et al. (2009)
13	SSRCa055*	AAGGAAAACAACCCCAAGA	CGAGACAAGAGAGGGGAAA	(ATC)3/(AAGG)2N9 (CT)4N6(CT)3	58	Missio et al. (2009)
14	SSRCa061	GCAGGTGCAAGTGATAAAAG	CGTCTTGTGATGTGTTAGGG	(CAA)2(CT)5	58	Missio et al. (2009)
15	SSRCa065	ATCTAACAAAATCCCGTCA	ATCGGTCGCCCTTCTAAT	(AG)2(AAG)3	58	Missio et al. (2009)
16	SSRCa084*	ATCGGAAAGATGTCAACCAT	CAAATTGAAGCCAGTGGTG	(CCA)4/(CAC)7	56	Missio et al. (2009)
17	SSRCa085	ATGTGAAAATGGGAAGGATG	CACAGGAAAGTGACACGAAG	(TC)24	56	Missio et al. (2009)
18	SSRCa087	TCACTCTCGCAGACACACTAC	GCAGAGATGATCACAAGTCC	(TC)22	56	Missio et al. (2009)
19	SSRCa088*	TACCTCTCCTCCTCTTCT	ATTTCTATGGACCGCAAC	(TTTTCT)3	58	Missio et al. (2009)
20	SSRCa095	GAGAGAGCCGAGTGAAGAGA	GAGAGAGAAGCCATGATTTGA	(TG)11	56	Missio et al. (2009)
21	SSRCa096	GAAATGGTGAACCTCTCTTGG	ATTTGCATGGCTTTGGTG	(CT)18	56	Missio et al. (2009)
22	M11	ACCCGAAAGAAAGAACCAAG	CCACACAACCTCCTCATTCC	(GT)4/(GA)4/(GT)4/(GT)6	58	Combes et al. (2000)
23	M24*	GGCTCGAGATATCTGTTTAG	TTTAATGGGCATAGGGTCC	(CA)15 (CG)4CA	56	Combes et al. (2000)
24	M29	GACCATTACATTTACACAC	GCATTTTGTGCACACTGTA	(CTCACA)4/(CA)9	56	Combes et al. (2000)

Continua...

Tabela 1 (cont.). Descrição dos *primers* utilizados com suas sequências e motivos amplificados.

<i>Primer</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	<i>Motivo</i>	<i>Tº anelamento</i>	<i>Referência</i>	
25	SSRM20	CTTGTTTGAGTCTGTGCTG	TTCCCTCCCAATGTCTGTA	(GA)5(GT)8TT(GT)4TT(GT)7(GA)11(TC)2(CT)3GT	56	Combes et al. (2000)
26	GENCOF21	GCGGGACACCTGAATAATAG	TAAATCGTCAGTGGTGATCG	(CCT)6	56	Silva (2013)
27	GENCOF22	GCTACGAAGAAACCAAGGAA	CGTCATCATCATCAAGG	(TGA)6	58	Silva (2013)
28	GENCOF23	GGTTCATCCTCATCCGTAAG	GTAGGGGGAAAAGGAAAAAC	(AG)10	58	Silva (2013)
29	GENCOF24*	CCTCGCTATCTGGTTCATTT	CACAACCTGGGTAATTGCTG	(CT)9	56	Silva (2013)
30	GENCOF25	AGCACTAACAAAGCACGATG	GATCGTCGGAGGCTATTCTA	(TG)10	56	Silva (2013)
31	GENCOF26*	GCTGGAGATGAGACATTTGA	TGAACCGCTTGATCTGACTA	(TAT)9	58	Silva (2013)
32	GENCOF 27	CCATTTCTGAAGGTCCAAAC	AGGCTTCAATGGAGTTGTTC	(CA)8	60	Silva (2013)
33	GENCOF 28	CTAGGGCTATGAACGGGATA	AGGCTTGACGGACATAGAAG	(TA)22	60	Silva (2013)
34	GENCOF 29	CCGGAATCACAGTGACAATA	TTCCCTCTTAAACCCCTCT	(GAC)7	60	Silva (2013)
35	GENCOF 30	CGCCAGCTAAATAGAGGATG	CTAGCGTCATTTAGTCCCG	(AT)8	60	Silva (2013)
36	GENCOF31*	AAGAGTGGCGAGGAAATAGA	CCTTCATGACTCTGGCTTTT	(AAG)6	60	Silva (2013)
37	GENCOF32*	CTAACCACCCCACTTTTAC	AGGAGCTGGTCTTGTGTTGTC	(TCT)7	60	Silva (2013)
38	GENCOF 33	AAGTGTCGTCTTCAAGGAGG	CAGCCTGTCACAAGAAATTG	(CT)12/(ATC)6/(ATC)6	60	Silva (2013)
39	GENCOF34*	CAAATTTTCGTCTGCCTCAG	AATAGGCTCCGTCAAGTGT	(AT)11/(TC)9	60	Silva (2013)
40	GENCOF 35	CAATCTGCACTTCTACCCT	CAGCCATTCAAGTAGAAAGC	(AT)8	60	Silva (2013)
41	GENCOF 36	CTGTGCTAGAGCAGAGCAGA	AAGAAACCACAAAGTGAGGC	(TTC)8	60	Silva (2013)
42	GENCOF 37	TCATTGTCTTCCGTTACGTG	AAGCTCGCGTAATTATCCTG	(CT)12	60	Silva (2013)
43	GENCOF38*	ATCTGAACCACAAGTCGGAT	CTTCCAGAGCTCCAATTGTT	(AAG)8	60	Silva (2013)
44	GENCOF39*	AGCGTGAAAATGGAAGTGTC	TGCCTGCCTCTAAAAGTTG	(AT)12	60	Silva (2013)
45	SSR119897	GTTACCCATCGGGAGGTTTT	GACATCGATGAAAAGCAGCA	(GA)10	56	Teressa et al. (2010)
46	SSR121511	CGCTTAAACGTTCCACCACT	TAGTTGCTGTTGTTGCTGGC	(GA)6	56	Teressa et al. (2010)
47	SSR121541	ACCACGTTCAACGACCAAAT	CCTGAACCTTGCAAAGCCATT	(AT)5	56	Teressa et al. (2010)
48	SSR119559*	GCGAGCCAGATAATCTCCAA	TCCAAGGAAAGAGAGAAACG	(CAG)5	56	Teressa et al. (2010)

Continua...



Tabela 1 (cont.). Descrição dos *primers* utilizados com suas sequências e motivos amplificados.

<i>Primer</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	<i>Motivo</i>	<i>Tº anelamento</i>	<i>Referência</i>	
49	SSR124003	CCTCCTCCATTGCTTTCATC	GCCGCCATTATTGCTACTGT	(AT)6	56	Teressa et al. (2010)
50	SSR120656*	AGGCAGCAGCAATTTGAAGT	ACCATTCGCCACCACATTAT	(AAC)6	56	Teressa et al. (2010)
51	R257	GAAAAGGCTTGAGGAATAAG	CCAATTTGTCAAGAACTCAA	(GA)34	56	Rovelli et al. (2000)
52	SSR120263	TCCAAGACTGCACTTTCTGC	TGCTGGTAACATTTGGTGA	(AT)5	58	Teressa et al. (2010)
53	SSR121994*	GCTGCTGAAAAAGAGATACC	ACGAAGCTCAACAATTCGGT	(GA)10	56	Teressa et al. (2010)
54	Pv-ctt001*	GAGGGTGTTCCTACTATTGTCACTGC	TTCATGGATGGTGGAGGAACAG	(CTT) <sub>3</sub> (T) <sub>3</sub> (CTT) <sub>6</sub>	58	Checa e Blair (2008)
55	Pv-gccacc001*	CGTTAGATCCCGCCCAATAGT	CCGTCCAGGAAGAGCGAGC	(GCCACC)5	56	Yu et al. (2000)
56	Pv-ag004*	TTGATGACGTGGATGCATTGC	AAAGGGCTAGGGAGAGTAAGTTGG	(AG)4A(AG)(GA)3/(AG)5	56	Yu et al. (2000)
57	Pv-gat001*	AAGGATGGGTTCCGTGCTTG	CACGGTACACGAAACCATGCTATC	(GAAT)5	56	Yu et al. (2000)
58	Pv-at006	CCGTTGCCTGTATTTCCCAT	CGTGTGAAGTCATCTGGAGTGGTC	(AT)5	56	Yu et al. (2000)
59	BM 141	TGAGAGGAACAATGGTGGC	CTCACAACCACAACGCACC	(GA)29	56	Gaitan-Solis et al. (2002)
60	BM 139	TTAGCAATACCGCATGAGAG	ACTGTAGCTCAAACAGGGCAC	(CT)25	58	Gaitan-Solis et al. (2002)
61	BMd10	GCTCACGTACGAGTTGAATCTCAG	ATCTGAGAGCAGCGACATGGTAG	(GA)8	58	Blair et al. (2003)
62	BM 142*	TTCCGCTGATTGGATATTAGAG	AGCCCGTTCCTTTTCGTTTAG	(GA)10	56	Gaitan-Solis et al. (2002)
63	BM 181*	ATGCTGCGAGGTAATGATCG	TGAGGAGCAAACAGATGAGG	(AT)5	56	Gaitan-Solis et al. (2002)
64	BM 199*	AAGGAGAATCAGAGAAGCCAAAAG	TGAGGAATGGATGTAGCTCAGG	(GA)10	58	Gaitan-Solis et al. (2002)
65	BMd53*	TGCTGACCAAGGAAATTCAG	GGAGGAGGCTTAAGCACAAA	(GTA)5	54	Blair et al. (2003)
66	BM 187	TTTCTCCAACCTCACTCCTTTCC	TGTGTTTGTGTTCCGAATTATGA	(CT)10	54	Gaitan-Solis et al. (2002)
67	BM 185	AAGGAGGTTTCTACCTAATTCC	AAAGCAGGGATGTAGTTGC	(CT)12	54	Gaitan-Solis et al. (2002)
68	BM 189*	CTCCAACCTCACCCCTCACT	GCGCCAAGTGAACTAAGTAGA	(CT)13	54	Gaitan-Solis et al. (2002)
69	BMd54	GGCTCCACCATCGACTACTG	GAATGAGGGCGCTAAGATCA	(CCT)6	54	Blair et al. (2003)
70	BM 212	AGGAAGGGATCCAAAGTCACTC	TGAACTTTCAGGTATTGATGAATGAAG	(CA)13	54	Gaitan-Solis et al. (2002)
71	Pv-ag001*	CAATCCTCTCTCTCATTTCCATC	GACCTTGAAGTCGGTGTGTTTT	(GGC)2(AG)3	58	Yu et al. (2000)

As condições para as reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram ajustadas com base na temperatura de anelamento dos *primers*. O mix da PCR foi composto de 30 ng de DNA, tampão (10 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de cada dNTP, 0,2 µM de *primer*, 0,5 µg/µL de BSA, 1U de Taq e água de osmose autoclavada para completar o total de 15 µL.

As reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação: 94 °C por 5 minutos; 35 ciclos com desnaturação 94 °C por 45 segundos, anelamento por 45 segundos, a temperatura de anelamento variou de acordo com o *primer* (Tabela 1) e extensão 72 °C por 30 segundos; extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e fotografados em fotodocumentador *ChemiDoc MP Imaging System* (Biorad)<sup>®</sup>.

#### **5.4 Análises estatísticas**

As informações obtidas com os marcadores SSR foram utilizadas para avaliar o grau de similaridade genética entre os genótipos avaliados. Os produtos amplificados foram avaliados como presença (1) ou ausência (0) de bandas e então gerada uma matriz binária. Os valores de dissimilaridade genética foram estimados através do complemento aritmético do índice de Jaccard, gerando uma matriz de dissimilaridade.

As médias das dissimilaridades genéticas foram utilizadas para a análise de agrupamento dos indivíduos, pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Average*), o que permitiu gerar um dendrograma para análises de proximidade entre os acessos. A consistência dos nós do dendrograma foi feita por meio da análise de *bootstrap* com 1000 simulações. O ponto de corte foi estimado pelo método de Mojema (1997), com valor de  $k= 1,25$ .

Foi calculado também o coeficiente de correlação cofenética (CCC) entre a matriz de dissimilaridades genéticas e a matriz dos valores cofenéticos a fim de verificar a consistência do agrupamento.

As análises de divergência genética e de agrupamento foram realizadas com o auxílio do programa Genes (Cruz 2013).

O agrupamento por análise bayesiana foi realizado utilizando o software STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). O programa foi executado de forma a realizar 10.000 interações de k=1 a k=5 para testar a subdivisão dos acessos. Vinte corridas foram realizadas para cada valor de k. O número de grupos genéticos foi estimado pelo valor DK (Evanno et al., 2005) usando o software STRUCTURE HARVESTER (Earl e vonHoldt 2012).

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 Mensuramento do conteúdo de DNA nuclear**

A análise de suspensões nucleares por meio da citometria de fluxo gerou histogramas com picos  $G_0/G_1$  de *A. mucosa* e do padrão *S. lycopersicum* com coeficiente de variação inferior a 5%.

O valor 2C médio encontrado para os 15 acessos utilizados foi de  $5,42 \pm 0,12$  pg. Ao verificar o desvio padrão e o coeficiente de variação obtido, pode-se afirmar que a análise citométrica realizada foi eficiente e sugere que os acessos apresentam o mesmo conteúdo de DNA nuclear e não existe variação intraespecífica do tamanho genômico nuclear.

### **6.2 Análises citogenéticas**

O tratamento com *pool* enzimático na concentração de 1:90 (pool enzimático:água destilada) por 2h propiciou maior obtenção de lâminas que apresentavam cromossomos metafásicos e prometafásicos com diferentes níveis de compactação, poucas sobreposições e com constrições primárias bem definidas. Estes aspectos garantiram a contagem precisa do número cromossômico, permitindo afirmar que *A. mucosa* possui 42 cromossomos (Figura 1 a-b).

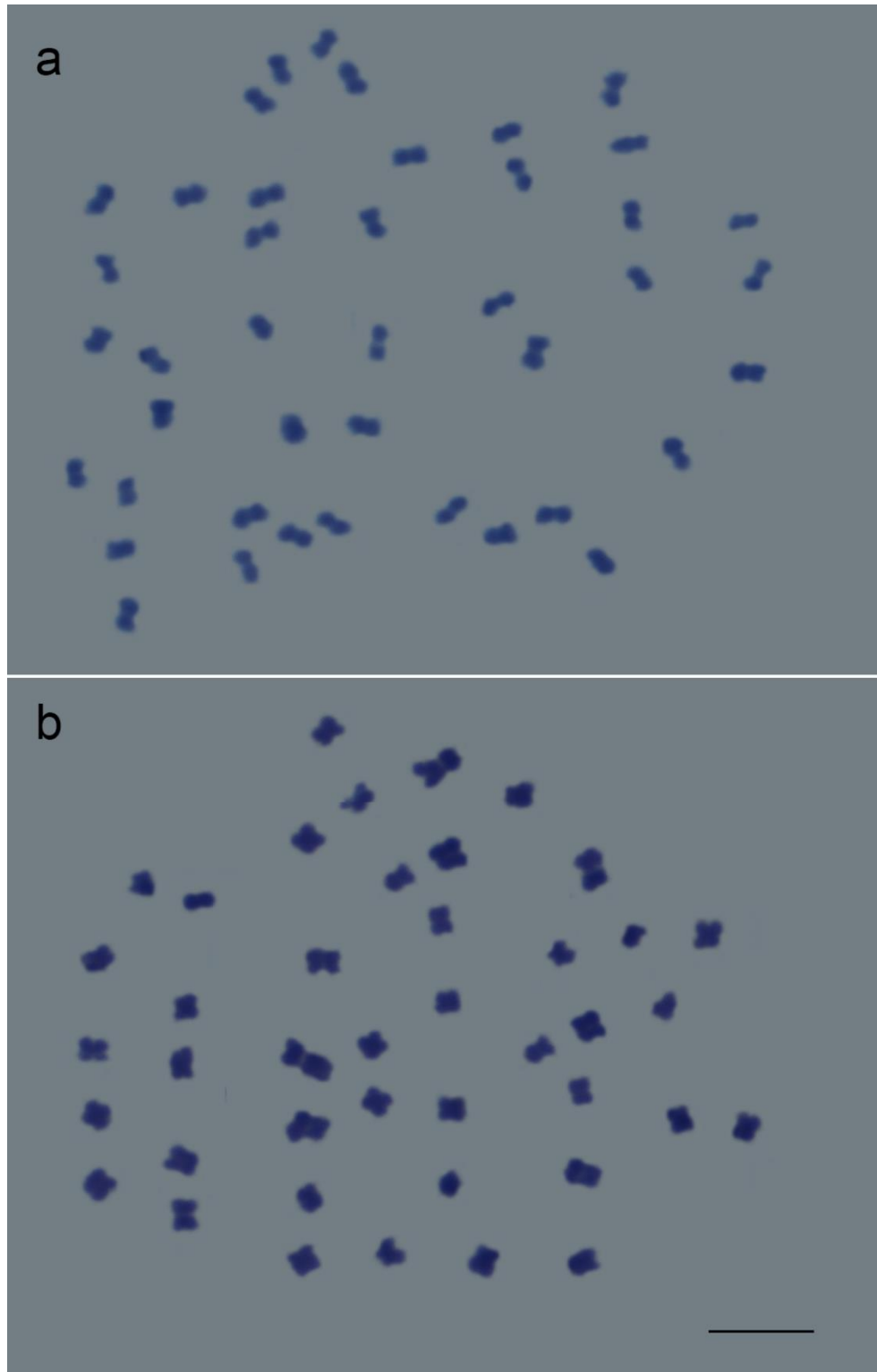


Figura 1: Cariótipo de *Annona mucosa* com 42 cromossomos em diferentes graus de compactação (a - b). Barra= 5  $\mu$ m.

### 6.3 Análises de transferibilidade de SSR e de diversidade genética

Dos 71 pares de *primers* avaliados quanto ao potencial de amplificação nos 15 indivíduos de *A. mucosa*, 30 apresentaram bandas nítidas e bem definidas que puderam ser avaliadas, os demais *primers* não amplificaram ou apresentaram amplificação inespecífica, o que foi verificado pelo elevado número de bandas. Com isso, tem-se que a taxa de sucesso na transferibilidade entre os *primers* foi de 42%.

Os marcadores amplificados geraram um total de 157 amplicons, e a quantidade de alelos por *primer* variou de 2 (Pv-gaat001, SSRCa021 e SSRCa054) a 9 (Pv-ag004, SSRCa006 e 119559) (Tabela 2). Dos 157 fragmentos obtidos, 82,7% geraram polimorfismo.

De acordo com as informações das amplificações tabuladas na matriz binária foi possível estimar os valores de dissimilaridade entre os acessos de biribazeiro. Por meio do coeficiente de Jaccard, a menor dissimilaridade foi observada entre os indivíduos 11 e 12 (0,2143) e a maior foi entre os indivíduos 9 e 14 (0,5455) (Tabela 3).

Tabela 2. Marcadores SSR utilizados na amplificação de *Annona mucosa*, com respectivos número de bandas, nº de bandas polimórficas e % de polimorfismo.

<i>Primer</i>	Nº total de alelos	Nº de alelos polimórficos	% de polimorfismo
SSRCa018	5	4	80,0
SSRCa021	2	2	100,0
SSRCa052	5	3	60,0
SSRCa054	2	2	100,0
SSRCa091	5	4	80,0
SSRCa006	9	9	100,0
SSRCa055	6	5	83,3
SSRCa084	6	6	100,0
SSRCa088	6	1	16,7
SSRM24	6	5	83,3
GENCOF 24	6	2	33,3
GENCOF 26	6	6	100,0
GENCOF 31	6	4	66,7
GENCOF 32	3	3	100,0
GENCOF 34	6	5	83,3
GENCOF 38	6	5	83,3
GENCOF 39	4	3	75,0
119559	9	9	100,0
120656	6	6	100,0
121994	6	5	83,3
Pv-ctt001	3	2	66,7
Pv-gccacc001	4	3	75,0
Pv-ag004	9	8	88,9
Pv-gaat001	2	2	100,0
BM 142	4	3	75,0
BM 181	3	3	100,0
BM 199	3	3	100,0
BM 189	6	4	66,7
Pv-ag001	7	7	100,0
BMd53	5	4	80,0
Média total	5,2	4,2	82,7

Tabela 3: Matriz de dissimilaridade genética entre 15 acessos de *Annona mucosa* calculada com base no complemento aritmético do índice de Jaccard, utilizando 157 fragmentos amplificados.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
0	0,4696	0,3814	0,4175	0,4059	0,39	0,4231	0,4425	0,4766	0,4771	0,4808	0,5047	0,4526	0,4773	0,5048	<b>1</b>
	0	0,375	0,3361	0,3388	0,322	0,3607	0,3881	0,4095	0,352	0,3884	0,3884	0,4628	0,4911	0,3833	<b>2</b>
		0	0,3636	0,4831	0,3426	0,4123	0,4524	0,4492	0,4188	0,3889	0,4336	0,3981	0,4375	0,4375	<b>3</b>
			0	0,3125	0,2909	0,2727	0,371	0,4017	0,359	0,3148	0,3273	0,4019	0,514	0,3211	<b>4</b>
				0	0,2778	0,3363	0,3607	0,4068	0,2636	0,3571	0,3578	0,422	0,466	0,3395	<b>5</b>
					0	0,2385	0,2735	0,3421	0,2385	0,2427	0,2667	0,3925	0,4369	0,2936	<b>6</b>
						0	0,3141	0,3761	0,2832	0,3056	0,2736	0,4737	0,4766	0,2593	<b>7</b>
							0	0,3306	0,3115	0,2983	0,3333	0,437	0,5339	0,3771	<b>8</b>
								0	0,3276	0,3805	0,354	0,4554	0,5455	0,4237	<b>9</b>
									0	0,271	0,287	0,4286	0,4175	0,2909	<b>10</b>
										0	0,2143	0,3884	0,4063	0,2745	<b>11</b>
											0	0,4151	0,45	0,2647	<b>12</b>
												0	0,3177	0,4299	<b>13</b>
													0	0,4141	<b>14</b>
														0	<b>15</b>

A matriz binária de dados obtidos permitiu a construção do dendrograma (Figura 2) no qual as relações entre os indivíduos puderam ser verificadas a partir das ramificações da árvore obtida. No dendrograma é possível observar a formação de três grupos, com a distância média de 0,43 entre eles. O grupo G1 é composto por 10 acessos (2; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12 e 15), o grupo G2 com dois acessos (1 e 3) e o grupo G3 é formado também por dois acessos (13 e 14). A análise de *bootstrap* realizada a fim de dar suporte aos nós do dendrograma apresentou valores medianos altos (36,2 a 100%).

Os resultados da análise Bayesiana de acordo com a metodologia  $\Delta k$  proposta por Evanno et al (2005) indicaram a presença de dois grupos diferentes ( $K = 2$ ) (Figura 3). No primeiro grupo, estão inseridos os acessos 1, 2, 3, 4, 5, 8,9, 13 e 14 e o grupo dois é formado pelos acessos 6, 7, 10, 11, 12 e 15.



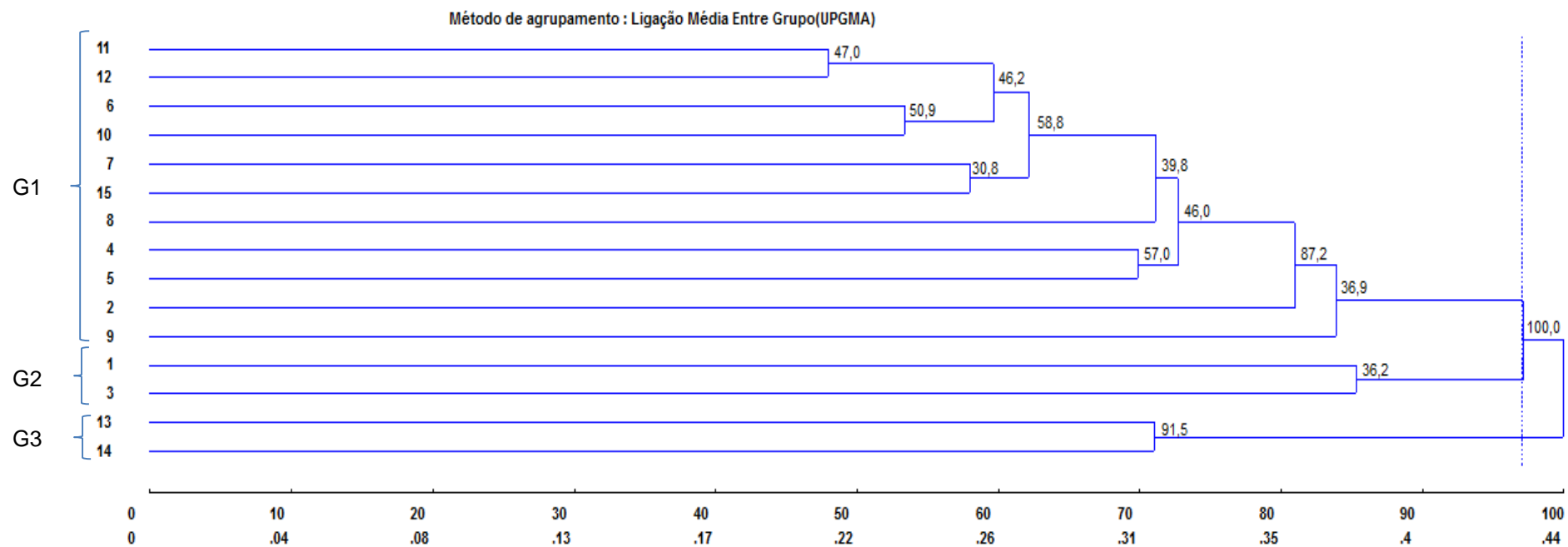


Figura 2. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre 15 acessos de *A. mucosa*, obtido pelo método UPGMA, utilizando o complemento do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade. Os valores encontrados em cada bifurcação são os valores da análise de *bootstrap*.

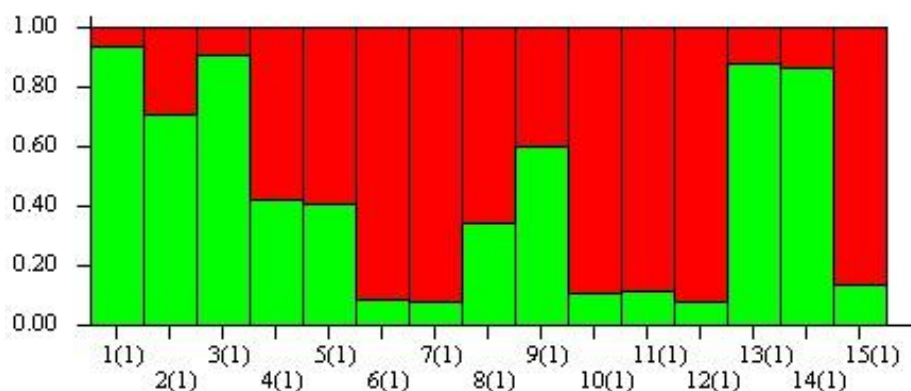


Figura 3. Gráfico de barras obtido pelo software STRUCTURE onde são mostrados os dois grupos identificados pela análise (k= 2). Os números na horizontal correspondem aos acessos estudados.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Conteúdo de DNA nuclear

O coeficiente de variação é um importante parâmetro para indicar a qualidade das suspensões nucleares e, então, garantir a confiabilidade dos resultados, pois valores inferiores a 5% indicam suspensões com núcleos isolados, íntegros e estequiometricamente corados (Doležel e Bartoš 2005; Praça-Fontes et al. 2011). O valor 2C ( $5,42 \pm 0,12$  pg) obtido neste trabalho apresentou um coeficiente de variação inferior a 5%, assim, pode-se afirmar que a análise citométrica realizada foi eficiente e sugere que os acessos estudados apresentam o mesmo conteúdo de DNA nuclear, comprovando assim a falta de variação intraespecífica do tamanho genômico nuclear. O coeficiente de variação menor que 5% é considerado adequado para procedimentos de citometria de fluxo em plantas (Praça-Fontes et al. 2011).

Por meio da citometria de fluxo Praça-Fontes et al. (2011) avaliaram o conteúdo de DNA de diferentes espécies utilizadas como padrão e demonstraram que *S. lycopersicum* e *P. sativum* são dois padrões primários de referência ideais para mensuramento via citometria, porém para as análises em *A. mucosa*, *S. lycopersicum* é mais indicado, pois satisfaz os critérios de linearidade para citometria de fluxo. O valor de 5,42 pg encontrado é mais próximo do valor desse padrão do que o utilizado

por Soares et al (2014), os quais utilizaram *Pisum sativum* ( $2C= 9,16$  pg) e encontraram valor de 4,77 pg para a mesma espécie utilizada neste estudo.

A diferença entre os valores encontrados pode estar relacionada com a distância geográfica entre os acessos utilizados nos dois trabalhos, pois os mesmos são de diferentes biomas, Soares (2014) estudou acessos da Floresta Amazônica enquanto que neste trabalho foram utilizados acessos pertencentes à Mata Atlântica. As diferenças dos fatores ambientais, como temperatura, disponibilidade hídrica e nutricional e intensidade luminosa encontradas nos diferentes biomas influenciam a quantidade e composição dos metabólitos secundários presentes nas folhas (Ramakrishna e Ravishankar 2011). E estes, por sua vez, podem influenciar as análises de citometria de fluxo, devido à interação destes metabólitos com os reagentes presentes nos tampões de extração. Vale ressaltar que representantes do gênero *Annona* possuem grande quantidade de metabólitos secundários (Liaw et al. 2010). Além dos fatores descritos acima, a utilização de diferentes tampões de extração no presente estudo (Otto 1990) e no estudo realizado por Soares et al. (2014) que utilizaram tampão Marie (Doležel et al., 1989) pode justificar essa diferença dos valores  $2C$  encontrada, pois um tampão com maior quantidade de agentes antioxidantes, pode garantir uma análise mais apurada do valor  $2C$ , uma vez que a interação dos fluoró cromos com a molécula de DNA durante a coloração do núcleo pode ser inibida na presença de compostos citosólicos (Noirot et al. 2003).

A variação intraespecífica encontrada no gênero *Annona*, ao comparar aos resultados deste trabalho com dados encontrados na literatura, sugere mudanças cariotípicas numéricas e estruturais entre as espécies deste gênero. Ao confrontar o valor encontrado para *A. mucosa* com os demais representantes do gênero, pode-se verificar que o valor  $2C$  para *A. mucosa* é maior do que o encontrado para outras espécies diploides como *A. cacans* ( $2C= 2,00$  pg) e *A. glabra* ( $2C= 2,70$  pg) e também poliploides, *A. squamosa* ( $2C= 2,46$  pg) (Morawetz e Samuel 1998). O aumento do valor  $2C$  pode estar relacionado com o nível de ploidia. Porém, estudos iniciais para *Annona* utilizando o método de densitometria de Feulgen para estimar o conteúdo de DNA nuclear mostraram que o fato de ser poliploide nem sempre vem acompanhado do aumento do valor de conteúdo de DNA nuclear, uma vez que *A. lutescens* ( $2C=$

2,00 pg) é uma espécie tetraploide e apresenta valor 2C igual ao de espécies diploides, como por exemplo *A. cacans* (2C= 2,00 pg) (Morawetz e Samuel 1998).

## 7.2 Determinação do número cromossômico

Na família *Annonaceae* existem gêneros com diferentes números básicos de cromossomos, podendo ser encontrados  $x= 7$ ,  $x= 8$ ,  $x= 9$  e  $x= 13$  (Folorunso e Olorode, 2007). O número cromossômico encontrado para *A. mucosa* ( $2n= 42$ ) corrobora com outros trabalhos que afirmam que o número básico do gênero *Annona* é de  $x=7$  (Folorunso e Olorode, 2007; Bennett e Leitch, 2012). Entre as espécies pertencentes ao gênero existem representantes diploides com  $2n= 2x= 14$  cromossomos (*A. cacans*, *A. cherimola*, *A. reticulata*, *A. squamosa* e *A. muricata*); tetraploides com  $2n= 4x= 28$  cromossomos (*A. glabra* e *A. lutescens*) e hexaploides com  $2n= 6x= 42$  cromossomos (*A. coriacea*) (Bennett e Leitch, 2012; Folorunso e Olorode, 2007; Sauer e Ehrendorfer, 1984). Com isso, foi possível inferir que *A. mucosa* é uma espécie hexaploide, com  $2n= 6x= 42$  cromossomos (FIGURA 1).

Diante da importância da utilização de *A. mucosa* como porta-enxerto para diferentes espécies de anonáceas, a resistência a estresses bióticos e abióticos é uma característica muito interessante para a seleção de plantas em programas de melhoramento. Eventos de poliploidização geram características adaptativas de tolerância a estresses de origem bióticas e abióticas por meio de alterações fisiológicas proporcionadas por rearranjos cromossômicos e processos de hibridação (Otto 2007). Chao et al. (2013) verificaram o efeito da poliploidia na tolerância ao estresse salino, comparando plantas tetraploides e diploides de *Arabidopsis* e observaram que as poliploides são mais tolerantes ao estresse do que os representantes diploides. Ao trabalharem com trigo, Yang et al. 2014 mostraram que a tolerância a salinidade em trigo é proveniente da aloploidização, onde em suas observações a maioria das características morfofisiológicas avaliadas para tolerância à salinidade, incluindo sobrevivência e taxa fotossintética é melhor nos hexaploides sintéticos e naturais, do que o observado nas espécies progenitoras. Algumas características adaptativas como tolerância a estresses bióticos observadas por Estrada-Reyes (2010) em *A. mucosa* podem estar relacionadas com características de adaptação adquiridas por meio do processo de poliploidização da espécie. O

contrário acontece em espécies diploides, como *A. muricata*, a gravioleira, que é suscetível ao ataque de nematoides e coleobrocas, principais fontes de resistência observada em *A. mucosa* (Estrada-Reyes et al. 2010).

Com o elevado nível de ploidia (hexaploide) encontrado e ampla distribuição geográfica descrita para *A. mucosa* pode-se supor que a mesma seja um aloploiploide. Os aloploiploides podem ser formados a partir de hibridação entre espécies distantes ou por meio da hibridação entre espécies estreitamente relacionadas (Stebbins 1950).

Uma característica que é favorecida pela poliploidia é a heterozigosidade. Em organismos aloploiploides, pelo fato de existir a combinação de diferentes genomas, ocorre o aumento da heterozigosidade devido à herança dissômica de cada genoma (Osborn et al. 2003). Outro fator que sofre influência no caso de aloploiploides é a heterose, o que leva a alterações do fenótipo, como por exemplo, aumento da altura, taxa de crescimento, tolerância a estresses e essa característica tem sido considerada um dos aspectos mais relevantes no melhoramento genético de plantas (Chen 2010).

### **7.3 SSR apresentam amplificação heteróloga e permitem a análise de diversidade**

Ao verificar a transferibilidade para estimativa da diversidade, a taxa de sucesso na transferência dos *primers* (42%) foi semelhante à encontrada por Nascimento et al., (2013), que ao trabalhar com espécies da família *Fabaceae*, encontraram 41,6% de transferibilidade. A eficiência da transferibilidade é muito variável, indo de valores extremamente baixos, como 2,8% (Zucchi et al. 2002) a altos, 86% (Soares et al. 2013).

O valor de polimorfismo médio encontrado (Tabela 3) é considerado alto, e esse resultado demonstra uma significativa contribuição para o agrupamento dos acessos de acordo com a dissimilaridade, e conseqüentemente um aumento da confiabilidade dos resultados.

Fan et al. (2013) ao avaliar a transposição de SSR entre 96 acessos de 7 espécies da família *Rosaceae*, incluindo espécies poliploides, como o morango, observaram número de alelos variando de 2 a 6 e polimorfismo de 61,2%, esse valor é menor do que o reportado pelo presente estudo, onde foi verificado 82,7% de

polimorfismo. Os *primers* de feijoeiro apresentaram maior porcentagem de amplificação (55,5%) quando comparado com os de cafeeiro (38,46%), esses valores podem estar relacionados ao fato de que os *primers* desenvolvidos para feijoeiro, que foram utilizados nesse estudo, apresentam funções biológicas descritas e encontram-se na sua maioria em regiões gênicas associadas a proteínas muito conservadas entre as diferentes espécies vegetais, o que corrobora com os resultados encontrados por Fan et al. (2013), onde 75% dos marcadores transferidos eram de regiões transcritas. Os *primers* de cafeeiro foram obtidos a partir de sequências genômicas não transcritas, desenvolvidos de uma biblioteca genômica enriquecida. Regiões gênicas codificadoras possuem maior nível de transferibilidade do que regiões não codificadoras, pois essas regiões são mais conservadas ao longo da evolução (Varshney et al. 2005).

O aumento do número de microssatélites está intimamente relacionado com o aumento no tamanho do genoma (Schlötterer e Harr, 2000). Como indivíduos poliploides, geralmente apresentam maior conteúdo de DNA, e conseqüentemente um aumento do número de regiões microssatélites, a amplificação de *primers* microssatélites entre espécies não correlatas pode ser facilitada.

O fato de alguns marcadores utilizados serem de regiões gênicas conservadas nos vegetais e associados com genes que codificam proteínas, como por exemplo, subunidade menor da ribulose 1,5-bifosfato (Pv-gaat001), também é um fator determinante na taxa de amplificação.

Outra justificativa para a maior transferência de *primers* de feijoeiro do que cafeeiro, pode estar relacionada com a classificação filogenética. De acordo com APG III (2009), *Annonaceae* que é pertencente à ordem Magnoliales é mais próxima da ordem Fabales, onde se encontra *Fabaceae*, que é a família do feijoeiro e mais distante da ordem Gentianales, onde está inserida a família *Rubiaceae*, que tem o cafeeiro como representante.

Dayanandan et al. (1997) ao avaliarem a conservação de microssatélites entre espécies arbóreas de diferentes famílias, utilizando *primers* desenvolvidos para uma única espécie, afirmaram que existe um elevado potencial para a transferibilidade de SSR entre táxons não correlatos. Esse resultado foi confirmado pelo fato de terem

encontrado alta variabilidade dentro das espécies e o agrupamento das espécies corroborou com a análise filogenética das espécies. Os autores concluíram que, com o potencial de amplificação heteróloga encontrado essa técnica pode variar entre grandes grupos, sendo, portanto uma ferramenta útil, quando não se tem *primers* descritos para a espécie e assim reduzir tempo e custo para desenvolvimento de novos marcadores.

Os valores de dissimilaridade encontrados foram maiores do que os encontrados por Lorenzoni et al. (2014) onde os autores avaliaram a diversidade entre acessos de *A. mucosa* por meio de marcadores ISSR. As maiores distâncias encontradas por marcadores SSR podem ser justificadas pela ampla cobertura do genoma que essa classe de marcador fornece. Almanza-Pinzon et al. (2003) também encontraram maior valor de distâncias ao trabalhar com marcadores microssatélites, quando comparado com trabalhos anteriores que utilizaram os mesmos acessos, porém marcadores dominantes.

Valores de *bootstrap* acima de 60% representam nós consistentes e esses valores representam quantas vezes o mesmo agrupamento foi gerado nas amostragens das réplicas do dendrograma (Ramos 2003). A ramificação próxima ao ponto de corte, onde se divide os 3 grupos apresentou valor de 100%, com isso é possível afirmar que apesar do valores inferiores encontrados para os nós dentro dos grupos, esses indivíduos foram agrupados nos três grupos em todas as vezes nas reamostragens.

Os resultados obtidos com o STRUCTURE estão em conformidade com o método UPGMA, diferindo apenas do número de grupos formados, três pelo método UPGMA e dois pela análise bayesiana. Os acessos 1 e 3, bem como os 13 e 14 foram agrupados separadamente no dendrograma, os mesmos também foram mais próximos pela análise bayesiana, porém não formaram grupos isolados e ficaram dentro de um mesmo grupo, possivelmente porque o Structure utiliza parâmetros mais rigorosos em relação à formação de novos grupos, em comparação com o programa Genes.

Em relação à estrutura genética da população, foi verificado  $k=2$  a partir da estimativa de Evanno et al. (2005), o que indica presença de dois grupos. Como o

gráfico de barras do STRUCTURE também mostrou a formação de dois grupos, pode-se afirmar que a população está estruturada.

## 8. CONCLUSÕES

*Annona mucosa* é uma espécie hexaploide, com  $2n= 6x= 42$  cromossomos e valor  $2C$  de 5,42 pg.

Por meio dos padrões cromossômicos, onde é evidenciado um par de cromossomos, com morfometria diferente dos demais e o alto nível de polimorfismo gerado pela amplificação dos *primers*, é possível inferir que a espécie *A. mucosa* é um neopoliploide.

Os marcadores SSR apresentam potencial para transferibilidade, e permitiram avaliar a diversidade genética entre os acessos, os quais foram divididos em três grupos pelo método UPGMA e em dois grupos pela análise Bayesiana. Esse resultado mostra que apesar dos microssatélites serem descritos como espécie-específicos é possível ampliar seu uso em espécies não correlatas.



## 9. REFERÊNCIAS

- Adams KL, Wendel JF (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8:135–141.
- Almanza-Pinzón MI, Khairallah M, Fox PN, Warburton NL (2003) Comparison of molecular markers and coefficients of parentage for the analysis of genetic diversity among spring bread wheat accessions. *Euphytica* 130:77-86.
- APG III – Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc* 161:105-121.
- Bennett MD, Leitch IJ (2012) Angiosperm DNA C-values database (release 8.0, Dec. 2012). Disponível em: <http://www.kew.org/cvalues/>. Acesso em: 18 dez. 2015.
- Borém A, Fritsch-Neto R (2013) *Biotechnologia aplicada ao melhoramento de plantas*, Visconde do Rio Branco, Suprema, 336p.
- Carvalho SIC, Ragassi CF, Oliveira I.B, Amaral ZPS, Reifschneider FJB, Faleiro FG, Buso GSC (2015) Transferability of microsatellite markers of *Capsicum annuum* L. to *C. frutescens* L. and *C. chinense* Jacq. *Genet Mol Res* 14(3):7937-7946.
- Chao DY, Dilkes B, Luo H, Douglas A, Yakubova E, Lahner B, Salt DE (2013) Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Science* 341(6146):658–659.
- Chatrou LW, Escribano MP, Viruel MA, Maas JW, Richardson JE, Hormaza JI (2009) Flanking regions of monomorphic microsatellite loci provide a new source of data for plant species-level phylogenetics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 53:726–733.
- Chatrou LW, Rainer H, Maas PJM (2004) Annonaceae (Soursop Family). In: Smith N, Mori SA, Henderson A, Stevenson DW, Heald, SV (eds.). *Flowering plants of the Neotropics*. New York Botanical Garden, New York, pp. 594.
- Checa OE, Blair MW (2008) Mapping QTL for climbing ability and component traits in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Mol Breed* 22(2):201-221.

Chen ZJ (2007) Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu Rev Plant Biol* 58:377-406.

Chen ZJ (2010) Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends Plant Sci* 15:57–72.

Clarindo WR, Carvalho CR (2009) Comparison of the *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. *Plant Cell Rep* 28:73–81.

Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature* 6:836–846.

Combes MC, Andrzejewski S, Anthony F, Bertrand B, Rovelli P, Graziosi G, Lashermes P (2000) Characterization of microsatellites loci in *Coffea arabica* and related coffee species. *Mol Ecol* 9:1171-1193.

Costa JPC, Müller CH (1995) *Fruticultura Tropical: o biribazeiro (Rollinia mucosa (Jacq.) Baill.* Belém, EMBRAPA-CPATU, 35p.

Couvreur TLP, Pirie MD, Chatrou LW, Saunders RMK, SU YCF, Richardson JE, Erkens RHJ (2011) Early evolutionary history of the flowering plant family *Annonaceae*: steady diversification and boreotropical geodispersal. *J. biogeogr* 38:664-680.

Cruz CD (2013) GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Sci* 35(3):271-276.

Dayanandan S, Bawa Ks, Kesseli R (1997) Conservation of microsatellites among tropical trees (leguminosae). *Am J Bot* 84(12):1658–1663.

Doležel J, Bartos J (2005) Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann Bot* 95:99–110.

Doležel J, Binarová P, Lucretti S (1989) Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biol Plantarum* 31(2):113-120.

Doležel J, Göhde W (1995). Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19(2):103-106.

- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *12*:13-15.
- Dutra SM, Salimena FRG, Neto L (2012) *Annonaceae* na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 63(4):785-793.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4: 359-361.
- Estrada-Reyes R, López-Rubalcava C, Rocha L (2010) Heinze G Lignans from leaves of *Rollinia mucosa*. *Z Naturforsch* 57:29-32.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- Fan L, Zhang MY, Liu QZ (2013) Transferability of newly developed pear ssr markers to other *Rosaceae* species. *Plant Mol Biol Rep* 31(6):1271-1282.
- Ferrão LFV, Caixeta ET, Souza FD, Zambolim EM, Cruz CD, Zambolim L, Sakiyama NS (2013). Comparative study of different molecular markers for classifying and establishing genetic relationship in *Coffea canephora*. *Pl Syst and Evol* 299:225-238.
- Ferreira MGR, Santos MRA, Silva EO, Gonçalves EP, Alves EU, Bruno RLA (2010) Emergência e crescimento inicial de plântulas de biribá (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill) (*Annonaceae*) em diferentes substratos. *Semina: Cienc Agr* 31(2):373-380.
- Folorunso AE, Olorode O (2007) Karyotype studies in some species of the Family *Annonaceae*. *Ife Journ of Sci* 9(2)161-166.
- Gaitán-solís, Duque MC, Edwards KJ, Tohme J (2002) Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp. *Crop Science* 42: 2128-2136.
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM, Ayres NM, Sharma DP, Firoozabady E (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220(4601):1049-1051.

González-Aguero M, Cifuentes-Esquivel N, Ibañez-Carrasco F, Gudenschwager O, Campos-Vargas R, Defilippi BG (2011) Identification and characterization of genes differentially expressed in cherimoya (*Annona cherimola* Mill) after exposure to chilling injury conditions. J. Agric. Food Chem. 59: 13295–13299.

Guimarães JFR, Nietsche S, Costa MR, Moreira GBR, Pereira MCT, Vendrame W (2013) Genetic diversity in sugar apple (*Annona squamosa* L.) by using RAPD markers. Rev. Ceres 60(3): 428-431.

Hendre PS, Aggarwal RK (2007) Dna markers: Development and application for genetic improvement of coffee In: Varshney, RK, Tuberosa R (eds.) Genomics assisted Crop Improvement: Genomics Applications in Crops, Springer, Netherlands 2:399-434.

Hendre PS, Phanindranath R, Annapurna V, Lalremruata A, Aggarwal RK (2008) Development of new genomic microsatellite markers from robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) showing broad cross-species transferability and utility in genetic studies. BMC Plant Biol 8(51):1-19.

Jacquin NJ von (1764) Observ. bot. (Jacquin). *Rollinia mucosa*. (Jacq.) Baill. Adansonia 8:268.

Junqueira NTV, Oliveira MAS, Icuma IM, Vargas Ramos VH (1996) Graviola para exportação: aspectos fitossanitários. Brasília: MAARA – SDR EMBRAPA – SPI, 67p.

Junqueira NTV, Oliveira MAS, Ramos VHV, Pinto ACQ, Icuma IM (2000) Controle de doenças da gravioleira no cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados.

Kavati RO (1992) Cultivo da atemóia. In: Donadio LC, Martins ABG, Valente JP (Eds.) Fruticultura tropical. Jaboticabal: FUNEP, p.39-70.

Kosman E, Leonard KJ (2005) Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid na polyploid species. Mol Ecol 14:415-424.

Larranaga N, Hormaza JI (2015) DNA barcoding of perennial fruit tree species of agronomic interest in the genus *Annona* (Annonaceae). Front Plant Sci. 6:1-8.

Liaw CC, Wu TY, Chang FR, Wu YC (2010) Historic Perspectives on Annonaceous Acetogenins from the Chemical Bench to Preclinical Trials. *Planta Med* 76:1390–1404.

Lobão AQ, Araujo DSD, Kurtz BC (2005) Annonaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia* 56:85-96.

Lorenzoni RM, Soares TCB, Santiago VF, Silva JA, Coelho RI (2014) Utilização de marcadores ISSR na avaliação da divergência genética entre acessos de biribazeiro. *Rev Bras Frutic* 36:251-257.

Maas PJM (2010) Neotropical *Annonaceae*. Disponível em: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Annonaceae.htm>. Acesso em 23 Jan 2016.

Maas, PJM, Lobão A, Rainer H (2016) *Annonaceae*. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110294>. Acesso em: 24 de Jan 2016.

Madlung A, Wendel JF (2013) Genetic and epigenetic aspects of polyploid evolution in plants. *Cytogenet Genome Res* 140:270-285.

Manica I (2000) Frutas nativas, silvestres e exóticas 1: técnicas de produção e mercado: abiu, amora-preta, araçá, bacuri, biribá, carambola, cereja-do-rio-grande, jabuticaba. Porto Alegre: Cinco Continentes, 327p.

Missio RF, Caixeta ET, Maciel-Zambolim E, Zambolim L, Sakiyama NS (2009) Development and validation of SSR markers for *Coffea arabica* L. *Crop Breed Appl Biotechnol* 9:361-371.

Morawetz W, Samuel R. (pers. comm. 1998).

Motta LB, Soares TCB, Ferrão MAG, Caixeta ET, Lorenzoni RM, Souza Neto JD (2014) Molecular characterization of arabica and Conilon coffee plants genotypes by SSR and ISSR markers. *Braz Arch Biol Technol* 57(5):728-735.

Nascimento ATB, Silva CB, Costa MMR, Silva RLO, Kido EA (2013) Transferibilidade de marcadores moleculares de soja para aplicação no melhoramento de feijão caupi. In: XII Jornada de ensino, JEPEX, 2013. Recife. Anais... Recife: UFPE.

Nascimento FC, Boaventura MAD, Assunção ACS, Pimenta LPS (2003) Annonaceous acetogenins from leaves of *Rollinia laurifolia*. *Química Nova* 26(3):319-322.

Noirot M, Barre P, Duperray C, Louarn J, Hamon S (2003). Effects of caffeine and chlorogenic acid on propidium iodide accessibility to DNA: consequences on genome size evaluation in coffee tree. *Ann Bot* 92(2):259-264.

Osborn TC, Butrulle DV, Sharpe AG, Pickering KJ, Parkin IAP, Parker JS, Lydiate DJ (2003) Detection and effects of a homeologous reciprocal transposition in *Brassica napus*. *Genetics* 165(3):1569–1577.

Otto F (1990) DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods Cell Biol* 33:105-110.

Otto SP (2007) The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131(3):452-62.

Pan YB, Liu, Que Y (2014) Independently segregating simple sequence repeats (SSR) alleles in polyploid sugarcane. *Sugar Tech*. Published online, 2014.

Perssoni, LA Estratégias de análise da diversidade genética em germoplasma de cajueiro (*Anacardium spp* L). 2007. 159f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Praça-Fontes MM, Carvalho CR, Clarindo WR, Cruz CD (2011). Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards”. *Plant cell rep* 30(7):1183-1191.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Punyasena SW, Eshel G, Mcelwain JC (2008) The influence of climate on the spatial patterning of Neotropical plant families. *J biogeogr* 35:117–130.

Qu L, Hancock JF (2001) Detecting and mapping repulsion phase linkage in polyploids with polysomic inheritance. *Theor Appl Genet* 103: 136-143.

Ramakrishna A, Ravishankar GA (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav* 6:11:1720-1731.

Ramos SRR (2003) Divergência genética baseada em marcadores moleculares AFLP e indicação de coleção nuclear de *Curcubita moschata* para o nordeste do Brasil. 123p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ.

Ramsey J, Schemske DW (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev Ecol Syst* 29:467–501.

Rovelli P, Metullio L, Anthony F, Anzueto F, Lashermes P, Graziosi G (2000) Microsatellites in *Coffea arabica* L. In: International Seminar On Biotechnology In The Coffee Agroindustry. Coffee biotechnology and quality; proceedings Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp123-133.

Salem KFM, Röder MS, Börner A (2015) Assessing genetic diversity of Egyptian hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) using microsatellite markers. *Genet. resour. crop evol.* 62(3):377-385.

Santos CE, Roberto SR, Martins ABG (2005) Propagação do biribá (*Rollinia mucosa*) e sua utilização como porta-enxerto de pinha (*Annona squamosa*). *Acta Sci Agron* 27(3):433-436.

São José AR, Souza IVB, Moraes OM, Rebouças TNH (1997) Anonáceas: produção e mercado (pinha, graviola, atemóia e cherimóia). Vitória da Conquista, BA: DFZ/UESB, 310p.

Sauer W, Ehrendorfer F (1984) Notes on the Karyosystematics of *Annonaceae*. *Pl Syst Evol* 146: 47-55.

Sauer W, Ehrendorfer F (1984) Notes on the Karyosystematics of *Annonaceae*. *Pl Syst Evol* 146:47-55.

Schlötterer C, Harr B (2000) *Drosophyla virilis* has long ad highly polymorphic microsatellites. Mol Biol Evol 17:1641-1646.

Serang O, Mollinari M, Garcia AAF (2012) Efficient exact maximum a posteriori computation for bayesian SNP genotyping in polyploids. PLoS ONE 7:e30906.

SILVA, JA (2013) Estratégias de desenvolvimento e validação de marcadores SSR em cafeeiro. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre-ES.

Soares BO (2010) Diversidade genética de pinhão manso por meio de RAPD e ISSR. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros, 54 p.

Soares JDR, Dias GMG, Rodrigues FA, PasquaL M, Chagas EA (2014) caracterização anatômica e citométrica em biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.]). Rev Bras Frut 36:272-280.

Soares TN, Santana L, Oliveira LK, Telles MPC, Collevatti RG (2013) Transferability and characterization of microsatellite loci to in *Anacardium humile* A. St. Hil. (*Anacardiaceae*). Genet Mol Res 12(3):3146-3149.

Soltis DE, Soltis PS (1999) Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. Trends Ecol Evol 14:348–352.

Stebbins GL (1950) Variation and evolution in plants. Columbia University Press, New York.

Suratman AP, Sry Mulyani S (2015) Assesment of genetic diversity among soursop (*Annona muricata*) populations from Java, Indonesia using RAPD markers. Biodiversitas 16 (2): 247-253.

Tchouto MGP, De Boer WF, De Wilde JJFE, Van Der Maesen LJG (2006) Diversity patterns in the flora of the Campo-Ma'an rain forest, Cameroon: do tree species tell it all. Biodivers Conserv 15:1353–1374.



Teixeira PC, Macedo ST (2011) Calagem e fosforo para a formação de mudas de biribazeiro. *Rev Ciências Agrárias* 54(3):259-266.

Teressa A, Crouzillat D, Petiard V, Brouhan P (2010) Genetic diversity of Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) collections. *EJAST* 1(1): 63-79.

Tokunaga T (2000) A cultura da atemóia. Campinas: CATI, Boletim Técnico 233, 80p.

Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* 23(1):48–55.

Wang JL, Barkley NA, Jenkins TM (2009) Microsatellite markers in plants and insects Part I: Applications of biotechnology. *Genes Genomes Genomics* 3(1):54-67.

Yang C, Zhao L, Zhang H, Yang Z, Wang H, Wen S, Zhang C, Rustgi S, von Wettstein D, Liu B (2014) Evolution of physiological responses to salt stress in hexaploid wheat *PNAS* 111(32):11882–11887.

Yu K, Park SJ, Poysa V, Gepts P (2000) Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *J Hered* 91(6):429-434.

Zucchi MI, Brondani RPV, Pinheiro JB, Brondani C (2002). Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp to *Eugenia dysenterica* (*Myrtaceae* family). *Mol Ecol Notes* 2:512-513.