

PRODUÇÃO TÉCNICA ITV DS
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA
***BRASILIANTHUS CARAJENSIS*, UMA ESPÉCIE ANUAL E ENDÊMICA DAS**
CANGAS DA SERRA DOS CARAJÁS, PARÁ, BRASIL
Relatório Final

Amanda Reis da Silva

Pedro Lage Viana

Rodolfo Jaffé Ribbi

Novembro/2017

Título: Desenvolvimento de marcadores microssatélites para <i>Brasilianthus carajensis</i> , uma espécie anual e endêmica das Cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil	
PROD. TEC. ITV DS - N008/2017	Revisão
Classificação: ☐ Confidencial ☐ Restrita ☐ Uso Interno ☒ Pública	00

Informações Confidenciais - Informações estratégicas para o Instituto e sua Mantenedora. Seu manuseio é restrito a usuários previamente autorizados pelo Gestor da Informação.

Informações Restritas - Informação cujo conhecimento, manuseio e controle de acesso devem estar limitados a um grupo restrito de empregados que necessitam utilizá-la para exercer suas atividades profissionais.

Informações de Uso Interno - São informações destinadas à utilização interna por empregados e prestadores de serviço

Informações Públicas - Informações que podem ser distribuídas ao público externo, o que, usualmente, é feito através dos canais corporativos apropriados

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586d	Silva, Amanda Reis da Desenvolvimento de marcadores microssatélites para <i>Brasilianthus carajensis</i>, uma espécie anual e endêmica das Cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil / Amanda Reis da Silva; Pedro Lage Viana; Rodolfo Jaffé Ribbi – Belém, 2017. 39 p. : il. 1. Genética de população. 2. Melastomataceae. 3. SSR. I. Título. CDD 23 ed.333.71409811
-------	--

RESUMO

Embora a mineração seja uma atividade essencial, ela causa grandes modificações na paisagem natural afetando a fauna e flora locais. Na Serra dos Carajás é evidente o impacto na vegetação causado pela mineração, que é preocupante devido a presença de várias espécies endêmicas na região. *Brasilianthus carajensis* é uma das espécies endêmicas do local que tem o ciclo de vida anual e é facilmente encontrada ao redor das minas. Estabelecer estratégias para conservação da espécie considerando a variabilidade genética de suas populações é importante para criação de planos de conservação e manejo da espécie. Marcadores microssatélites são comumente usados em estudos deste tipo, pois permitem o monitoramento da diversidade e migração de alelos das populações. O trabalho teve como objetivo desenvolver marcadores microssatélites (SSR) para *Brasilianthus carajensis* que poderão subsidiar futuros projetos de monitoramento do fluxo gênico e diversidade das populações da espécie, verificando a influência das atividades de mineração nesses organismos. Foram coletados 438 amostras para extração de DNA, seguindo o protocolo CTAB 2% com posterior purificação. Os marcadores microssatélites foram identificados por meio de Sequenciamento de Nova Geração, utilizando a plataforma Illumina MiSeq, filtrados de acordo as diretrizes do programa QDD e testados para amplificação. O sequenciamento identificou 30.573 marcadores microssatélites, dos quais 31 foram selecionados para amplificação. No total, 23 marcadores foram polimórficos e mostraram boa amplificação, sendo um número elevado em comparação com outros trabalhos. Os resultados gerados auxiliarão o posterior desenvolvimento de estudos da variação e diversidade genética da espécie, que trarão informações sobre a influência da mineração nas populações da espécie.

ABSTRACT

Although mining is an essential activity, it causes major changes in the natural landscape, affecting local fauna and flora. The impact on the vegetation of the In Serra dos Carajás caused by mining is evident, and it is worrisome due to the presence of several endemic species in the region. *Brasilianthus carajensis* is one endemic species with an annual life cycle which is easily found around the mines. Establishing a strategy for the conservation of this species considering the genetic variability of its populations is important to safeguard this species. Microsatellite markers are commonly used to monitor genetic diversity and gene flow. Thus, the aim of this project was to develop microsatellite markers (SSR) for *Brasilianthus carajensis*, that can be used in future monitoring studies, assessing the influence of mining activities. A total of 438 samples were collected for DNA extraction, following the 2% CTAB protocol with subsequent purification. Microsatellite markers were identified through Next Generation Sequencing using the Illumina MiSeq platform, filtered according to QDD program guidelines and tested for amplification. Sequencing identified 30,573 microsatellite markers, of which 31 were selected for amplification. In total, 23 markers were polymorphic and showed good amplification, representing a high number in comparison with other works. The results generated will help future studies assessing genetic diversity, gene flow, and the influence of mining activities on the populations of this species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa da área de estudo com os pontos de coleta de indivíduos da espécie *Brasilianthus carajensis*. À esquerda amostras coletadas em São Félix do Xingu e Ourilândia, e a direita as demais localidades.....8

Figura 2 – Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR de um dos marcadores microssatélites selecionados. Ele apresenta elevado polimorfismo (cerca de 11 alelos) e houve amplificação em todas temperaturas de anelamento testadas. No entanto, a temperatura escolhida como ideal foi 57 C° devido maior intensidade de fluorescência que forma os picos, indicando maior amplificação dos fragmentos.....12

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Marcadores microssatélites selecionados com boa amplificação e polimorfismo. Pb – Pares de bases; Qualidade: B – boa (picos que indicam os tamanhos dos fragmentos bem definidos, fácil identificação dos alelos), R – regular (picos com menor definição, porém os alelos são identificáveis).....	13
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVO.....	8
2.1. Objetivos Específicos.....	8
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	8
3.1. Amostragem e extração do DNA genômico.....	8
3.2. Identificação e seleção dos marcadores microssatélites.....	9
3.3. Amplificação dos marcadores e identificação de polimorfismos.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
5. CONCLUSÕES.....	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
ANEXOS.....	17

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a mineração é uma atividade indispensável, pois gera matéria prima para a fabricação de itens essenciais na sociedade moderna (RIBEIRO et al., 2006) e é considerada em muitos países setor fundamental no desenvolvimento econômico e social (FARIAS; COELHO, 2002). No Brasil esse setor é de grande importância na economia nacional devido a existência de diversas áreas de depósitos minerais em seu território (BARRETO, 2001). Dentre as jazidas de minério exploradas, a localizada na Serra dos Carajás no sudeste do Pará é uma das principais minas do país, que atendem parte substancial das exportações de ferro (QUARESMA, 2009). Apesar desse tipo de atividade ser indispensável, a mineração gera grandes impactos ambientais (erosão do solo, mudança do relevo, remoção da flora e fauna local, etc.) (CÂMARA, 2002) que devem ser minimizados.

Para garantir menores prejuízos ao ambiente, a mineração é submetida a um conjunto de regulamentações que visam a conservação e manejo da área impactado (FARIAS; COELHO, 2002), gerando a necessidade de inúmeros estudos nessas áreas. Em Carajás, a mineração causa evidente supressão vegetal em áreas de campos rupestres e florestas (MARTINS, 2015), alterando a riqueza e a abundância das espécies ali estabelecidas (MOTA et al., 2015). Estudos direcionados a essas espécies são de grande importância, pois permitirão a realização de planos de conservação e manejo das mesmas.

Uma ferramenta eficiente para avaliar tais impactos antrópicos são os estudos genéticos. Eles geram informações da composição genética de uma espécie (variação e estrutura populacional) que para planos de manejo e conservação são fundamentais (GALETTI JR et al., 2008). Visto isso o projeto propôs desenvolver marcadores genéticos (chamados microssátélites) que permitam o monitoramento da diversidade e migração de genes das populações de *Brasilianthus carajensis*, uma espécie endêmica da Serra de Carajás muito comum em áreas ao redor das minas (ALMEDA; MICHELANGELI; VIANA, 2016). Esses marcadores podem auxiliar futuros trabalhos de monitoramento genético de indivíduos da espécie sob a influência das atividades de mineração e trarão informações sobre a influência das fragmentações antrópicas nos padrões de variação genética neutra em plantas anuais da região. Estas informações contribuirão no planejamento de conservação e manejo das espécies que vivem nesse ambiente.

2. OBJETIVO

Desenvolver marcadores microssatélites (SSR) para *Brasilianthus carajensis*, visando auxiliar futuros trabalhos de monitoramento do fluxo gênico e diversidade das populações da espécie sob a influência das atividades de mineração em áreas de jazidas minerais de ferro na Serra dos Carajás.

2.1. Objetivos Específicos

(i) Identificar por meio de sequenciamento de nova geração marcadores microssatélites em *Brasilianthus carajensis*.

(ii) Testar um grupo de microssatélites promissores em um gradiente de temperaturas.

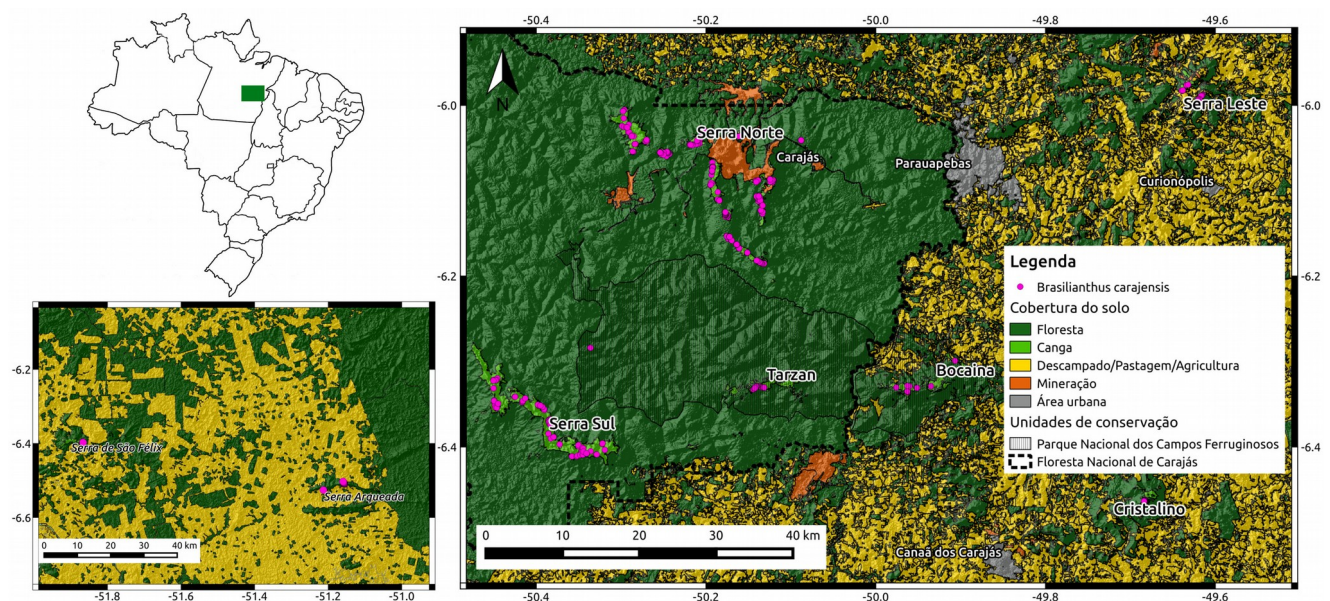
(iii) Selecionar os marcadores com alta qualidade de amplificação e polimorfismo.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. Amostragem e extração do DNA genômico

As coletas das amostras foram realizadas nas áreas de cangas da Serra dos Carajás, nos municípios de Parauapebas e Canaã dos Carajás, além de cangas situadas em Ourilândia e São Felix do Xingú, na região sudoeste da Amazônia, Pará. Foram coletados indivíduos jovens com maiores quantidades de folhas verdes, excluindo as raízes, flores e frutos. O material foi acondicionado em envelopes de papel toalha fechados com fita crepe e preservados por meio de desidratação em sílica gel à temperatura ambiente. No total foram coletadas 438 amostras, abrangendo toda a distribuição conhecida da espécie.

Figura 1 – Mapa da área de estudo com os pontos de coleta de indivíduos da espécie *Brasilianthus carajensis*. À esquerda amostras coletadas em São Félix do Xingu e Ourilândia, e a direita as demais localidades.



A extração do DNA foi realizada no Laboratório Geral do Instituto Tecnológico Vale de Desenvolvimento Sustentável - ITVDS, em Belém-PA, seguindo o protocolo CTAB 2% (mini prep, modificado) (DOYLE, 1987) sem fenol e com posterior purificação do DNA por meio de precipitação de polissacarídeos (MICHAELS; JOHN; AMASINO, 1994). A maceração do tecido para extração foi feita com o auxílio de *Tissuelyser* II (Quiagen) para obtenção de maior quantidade de tecido, priorizando as folhas verdes.

3.2. Identificação e seleção dos marcadores microsatélites

O DNA genômico total de três amostras foram enviados para a empresa BPI – Biotecnologia Pesquisa e Inovação (www.bpibiotecnologia.com.br) para sequenciamento em plataforma Illumina MiSeq com utilização do kit *Nextera DNA Sample preparation* e processamento bioinformático para a identificação dos microsatélites e desenho de primers específicos.

Os microsatélites foram identificados e seus respectivos primers gerados usando QDD v 3.1.1. Os marcadores selecionados para teste de amplificação seguiram as diretrizes do programa QDD (<http://net.imbe.fr/~emeglecz/qdd.html#choice>). Essas diretrizes têm como objetivo escolher marcadores da tabela de primers gerada pelo programa com maior probabilidade de gerarem boas amplificações. Os critérios de escolha dos marcadores consistem: selecionar aqueles com apenas um par de primers por loco (*ONE_PRIMER_FOR_EACH_SEQ* igual a 1); primers com baixo valor de alinhamento com o amplicon (menor ou igual a 5 para o parâmetro *PCR_PRIMER_ALIGNSCORE*); apenas microsatélites puros (*NUMBER_OF_MS* igual a 1); microsatélites com no mínimo 9 repetições em tandem (*TARGET_MS_LENGTH_IN_REPEAT_NUMBER* igual ou maior que 9); excluir as sequências de microsatélites que podem formar hairpins (e. g. (AT)_n, (GC)_n; verificar no parâmetro *MOT_TRANS*); para realizar PCRs em multiplex, escolher marcadores com produto amplificado de diferentes comprimentos (*PCR_PRODUCT_SIZE*); excluir primers muito próximos à sequência do microsatélite de interesse (selecionar valores maiores ou iguais a 20 em *MIN_PRIMER_TARGET_DIST*); selecionar temperaturas de anelamento compatíveis para realizar PCRs em multiplex (podem variar entre 57 e 63 °C, parâmetros *PRIMER_LEFT_TM* e

PRIMER_RIGHT_TM); evitar marcadores que são localizados próximos no mesmo contig, preferencialmente escolher marcadores localizados em diferentes contigs (*FIRST_POS_ON_CONTIG* informa a posição do marcador no contig, e *CONTIG_CODE* é a identificação do contig); e finalmente escolher regiões que não possuem múltiplos microssatélites, nanosatélites e homopolímeros (*DESIGN*, selecionar apenas A e B).

3.3. Amplificação dos marcadores e identificação de polimorfismos

Os microssatélites selecionados após a filtragem (critérios recomendados pelo programa QDD) foram testados para a qualidade de amplificação e polimorfismo. Para analisar o tamanho dos fragmentos amplificados foi empregado a técnica de marcação fluorescente dos fragmentos com cauda M13 (SCHUELKE, 2000). Nessa metodologia o componente fluorescente ligado a uma sequência M13 é incluído na reação, gerando fragmentos de DNA marcados com fluorescência que permitem analisar o tamanho dos fragmentos de DNA resultantes da PCR por meio da detecção da sua posição.

Cada primer foi testado em um gradiente de temperaturas de anelamento que variaram entre 57 e 62 °C, onde foi usado um *pool* de DNA equimolar de 20 indivíduos distribuídos na área de estudo para verificar se o marcador era polimórfico. As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 15 µL, contendo 0,375 µL de primer *reverse* (5 µM), 0,375 µL de primer *forward* com cauda M13 (0,5 µM), 0,375 µL de cauda M13 com fluoróforo (5 µM), 0,1 µL de Taq polimerase (5 U/µL), 1 µL de BSA (25 µg/mL), 1 µL de DNTPs (2 mM), 1,5 µL de Tampão com MgCl (10X), 1 µL de *pool* de DNA (1 ng/µL) e 9,6 µL de H₂O milli-Q. As PCRs iniciaram com o passo de 3 min de desnaturação à 94 °C, seguido por 35 ciclos de 30s à 94 °C, 1 min à 57-62°C (gradiente de temperaturas de anelamento) e 1 min à 72 °C, seguido pela extensão final de 10 min à 72 °C.

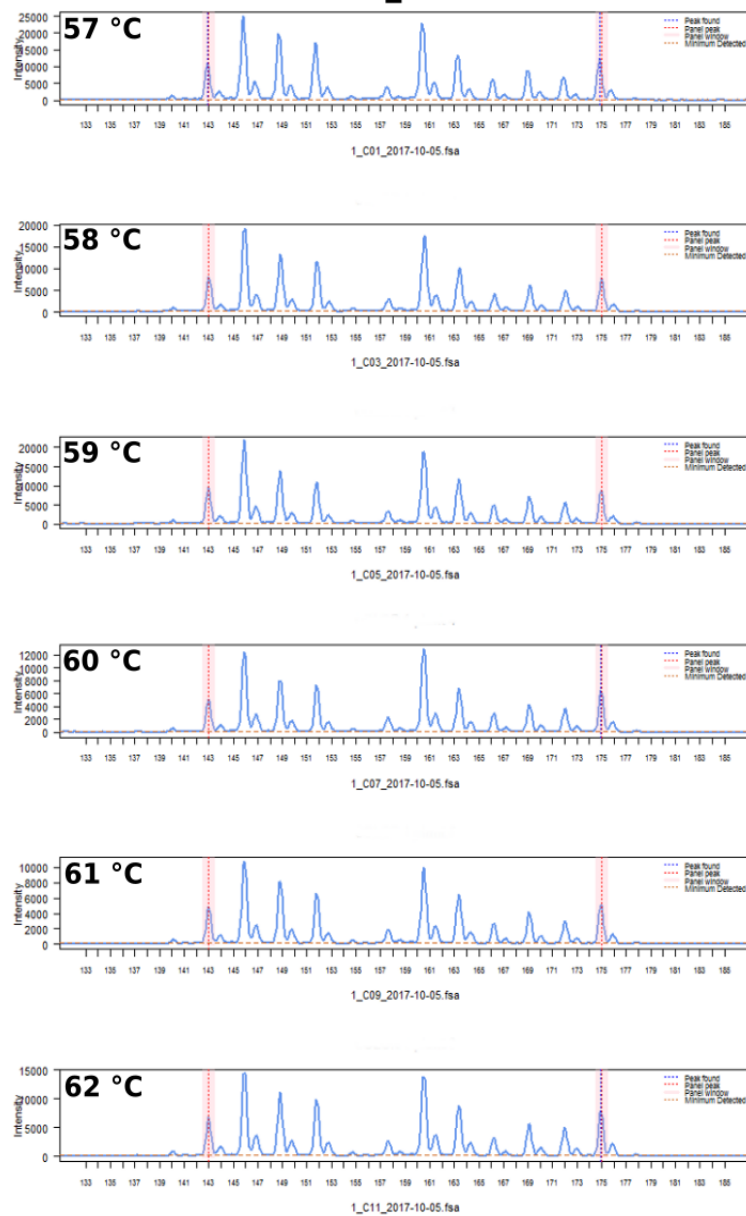
Os produtos das PCRs foram sequenciados na plataforma ABI 3730 (Applied Biosystems) com adição de formamida e padrão 600LIZ (Applied Biosystems). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados com auxílio do pacote *Fragman* (COVARRUBIAS-PAZARAN et al., 2016) no programa R 3.4.2 (TEAM, 2017). Foram selecionados marcadores que apresentaram boa amplificação, por meio de visualização em gel de agarose 1.5 % e intensidade de fluorescência (selecionados os acima de

1000 de intensidade) dos picos nos gráficos gerados após o sequenciamento. Para verificar a presença de polimorfismos, foram usados os gráficos gerados pelo pacote de R *Fragman* (REF), avaliando visualmente a quantidade de picos gerados pela amplificação do marcador. A presença de dois ou mais picos duplos indica a presença de mais de uma única forma do marcador amplificado (diferentes tamanhos do fragmento alvo, polimorfismos) entre os indivíduos cujo o material genético foi adicionado no *pool* de DNA usado nas PCRs.

Para os marcadores que obtiveram boa amplificação em diferentes temperaturas de anelamento, foram selecionados somente aqueles com picos de intensidade de fluorescência mais elevados e de melhor resolução (Figura 2).

Figura 2– Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR de um dos marcadores microssatélites selecionados. Ele apresenta elevado polimorfismo (cerca de 11 alelos) e houve amplificação em todas temperaturas de anelamento testadas. No entanto, a temperatura escolhida como ideal foi 57 C° devido maior intensidade de fluorescência que forma os picos, indicando maior amplificação dos fragmentos.

b_19



Fonte: Pacote *Fragman* no programa R

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento Illumina MiSeq permitiu a identificação de 30.573 marcadores microssatélites. Dentre esses, 31 foram selecionados para posterior amplificação após a filtragem da tabela de primers. Destes, um total de 23 marcadores foram polimórficos e mostraram boa amplificação (Tabela 1, Anexo 1 - 23). A quantidade de marcadores obtidos nesse trabalho foi mais elevada do que é visto na maioria dos artigos que desenvolveram microssatélites para espécies da família, que alcançaram no máximo 13 marcadores (BRITO; VIGNA; SOUZA, 2010; TELLES et al., 2011; LIU et al., 2013; MAIA et al., 2016).

Tabela 1: Marcadores microssatélites selecionados com boa amplificação e polimorfismo. Pb – Pares de bases; Qualidade: B – boa (picos que indicam os tamanhos dos fragmentos bem definidos, fácil identificação dos alelos), R – regular (picos com menor definição, *porém os alelos são identificáveis*)

Tabela 1 – Lista de marcadores SSR para *Brasilianthus carajensis*

Marcador	Primer forward	Primer reverse	Temp. de anelamento (C°)	Tamanho min. (pb)	Tamanho max. (pb)	Número de alelos	Qualidade
b_1	5'AAACCAGCCAAGCTCCGTC 3'	5'TTATTGTCCAGGTTTCGCGGC 3'	59	129	143	7	B
b_2	5'ATGATCGGAGTCCGGTGGAT 3'	5'TTGAGCCAAGAAGCCATCCC 3'	61	117	125	2	R
b_3	5'AGAGTGGTGTCAAGAGTTGAGA 3'	5'TGAGGTTAGACTTGAAGGCTTT 3'	62	128	165	7	B
b_4	5'ACACAGTGTTCGAGTTGGCT 3'	5'ACCTACTTCCATATAGACTCATCGA 3'	61	128	136	3	B
b_7	5'TGGGCTTAGAACAAAGACAGC 3'	5'CTGGCGTTGGCAACTTCATC 3'	58	111	121	2	R
b_8	5'AGATTGGCTGATTATCCACCTGA 3'	5'TGCTGCTACGAGTAATGATGATCT 3'	58	120	128	2	B
b_10	5'GGCTTGAGGAGTCCGATGAC 3'	5'GCGTTCTGGGCGACTGAAAT 3'	61	120	145	4	B
b_11	5'GACTCCTGTCCCTCTTGTGA 3'	5'GGCCTTCCCATCTTCTCTTCT 3'	60	125	139	4	B
b_12	5'GCTAATCACGCAACGAGGTT 3'	5'GGACAGCGTAACCCAGGAC 3'	61	119	127	3	R
b_14	5'TTTCCACGTCAAGAGCCAT 3'	5'TCATGCTTCGATACATCTGAACA 3'	61	131	178	8	B
b_16	5'CATGGCCAAAGAGAACCAAGG 3'	5'GATATCAGCCGAAGTCTTTGA 3'	61	148	162	5	R
b_17	5'CCTGCTACCACTACAT 3'	5'TAGGGTGGGAAGCTAGGGTT 3'	60	114	147	7	B
b_18	5'GCCGCTACCCAGAAATCAGA 3'	5'ATTGACGACCTTCGCCGTG 3'	58	119	123	2	R
b_19	5'AGTAGGCGCCAATATCCTGC 3'	5'TACAAGGAGGACTGGGTCGG 3'	57	143	176	11	B
b_21	5'GGACAACTGTAATAACACGCCC 3'	5'CGACATGGGTCAAAGTGGACT 3'	60	159	170	4	B
b_23	5'CTCTATCAAACCTGCATAACATTACA 3'	5'TCCAGGGTGAGGAAGATGATCT 3'	57	133	137	2	B
b_24	5'ACAACATGGGATGGTCAGGG 3'	5'ATCCTGTGTCTGTGGGTGGA 3'	58	125	151	4	B
b_25	5'ATGGGATGAGTCGGAGTTGG 3'	5'TCAGGTTGTAGTCGGGAGTTG 3'	57	126	134	3	B
b_26	5'GATCAGCGCAAACCGAAACA 3'	5'CCCAAGATGAACTCACTTGCC 3'	58	125	131	2	R
b_27	5'CCGATTAGACTGACAGCAAGC 3'	5'GAGCAAATCAAAGGGAAAGCGT 3'	59	134	154	2	R
b_29	5'CGTTTCCGAGTCTTCTCTCTCA 3'	5'GAGACCGCACATGTTTCGACG 3'	62	125	173	9	B
b_30	5'CGTGATCGTCTGATTGAAGCG 3'	5'TGAGCGATCTCGACAAGCTG 3'	62	124	135	2	R
b_31	5'ACATGAACAGAAGCAGAGTCA 3'	5'CATTCTCGGGTCATAGGCG 3'	61	120	127	3	B

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram desenvolvidos primers para 23 marcadores microsatélites polimórficos, específicos para a espécie *Brasilianthus carajensis*. Esses marcadores poderão ser utilizados em contribuir com posteriores estudos genéticos que avaliem variação e estruturação genética das populações desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEDA, F.; MICHELANGELI, F. A.; VIANA, P. L. *Brasilianthus* (Melastomataceae), a new monotypic genus endemic to ironstone outcrops in the Brazilian Amazon. **Phytotaxa**, v. 273, n. 4, p. 269-282, 2016.
- BARRETO, M. L. **Mineração e Desenvolvimento Sustentável: Desafios para o Brasil**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2001.
- BRITO, V. L. G.; VIGNA, B. B. Z.; DE SOUZA, A. P. Characterization of 12 microsatellite loci from an enriched genomic library in polyploid *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae). **Conservation Genetics Resources**, v. 2, n. 1, p. 193–196, 2010.
- CÂMARA, J. B. D. **GEO BRASIL 2002: Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil** Edições IBAMA. Disponível em:
<https://www.academia.edu/318161/GEO_Brasil_2002_Perspectivas_Do_Meio_Ambiente_No_Brasil>. Acesso em: 28 nov. 2017
- COVARRUBIAS-PAZARAN, G. et al. Fragman: an R package for fragment analysis. **BMC genetics**, v. 17, n. 1, p. 62, 2016.
- DOYLE, J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.**, v. 19, p. 11–15, 1987.
- FARIAS, C. E. G.; COELHO, J. M. **Mineração e Meio Ambiente no Brasil Relatório Preparado para o CGEE**. Disponível em:
<http://www.em.ufop.br/ceamb/petamb/cariboost_files/miner_c3_a7_c3_a3o_20e_20meio_20ambiente.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2017
- GALETTI JR, P. M. et al. Genética da conservação na biodiversidade brasileira. In: FRANKHAM, R., BALLOU, J.D., BRISCOE, D. . (Ed.). **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SP: Editora SBG, 2008. p. 244–274.
- LIU, T. et al. Development and Characterization of Microsatellite Markers for *Melastoma dodecandrum* (Melastomataceae). **Applications in Plant Sciences**, v. 1, n. 3, p. 1200294, 2013.

MAIA, F. R. et al. Development and characterization of microsatellite markers for *Tibouchina hatschbachii* (Melastomataceae), an endemic and habitat- restricted shrub from Brazil. **Acta Scientiarum**, v. 38, n. 3, p. 327–332, 2016.

MARTINS, F. D. **O Conflito de Carajás: Cenários para a conservação da savana metalófila**. 2015. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

MICHAELS, S. D.; JOHN, M. C.; AMASINO, R. M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. **Biotechniques**, v. 17, n. 2, p. 274–276, 1994.

MOTA, N. F. de O. et al. Vegetação sobre sistemas ferruginosos da serra dos Carajás. In: CARMO, F. F. DO; KAMINO, L. H. Y. (Ed.). **Geossistemas Ferruginosos do Brasil: áreas prioritárias para conservação da diversidade geológica e biológica, patrimônio cultural e serviços ambientais**. Belo Horizonte - MG: 3i Editora, 2015. p. 289–313.

QUARESMA, L. F. Projeto de assistência técnica ao setor de energia - Perfil da Mineração de Ferro. **Ministério de Minas - MME**, p. 4–56, 2009.

RIBEIRO, A. Í. et al. Diagnóstico de uma área compactada por atividade minerária, na floresta amazônica, empregando métodos geoestatísticos à variável resistência mecânica à penetração do solo. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 1, p. 83–89, 2006.

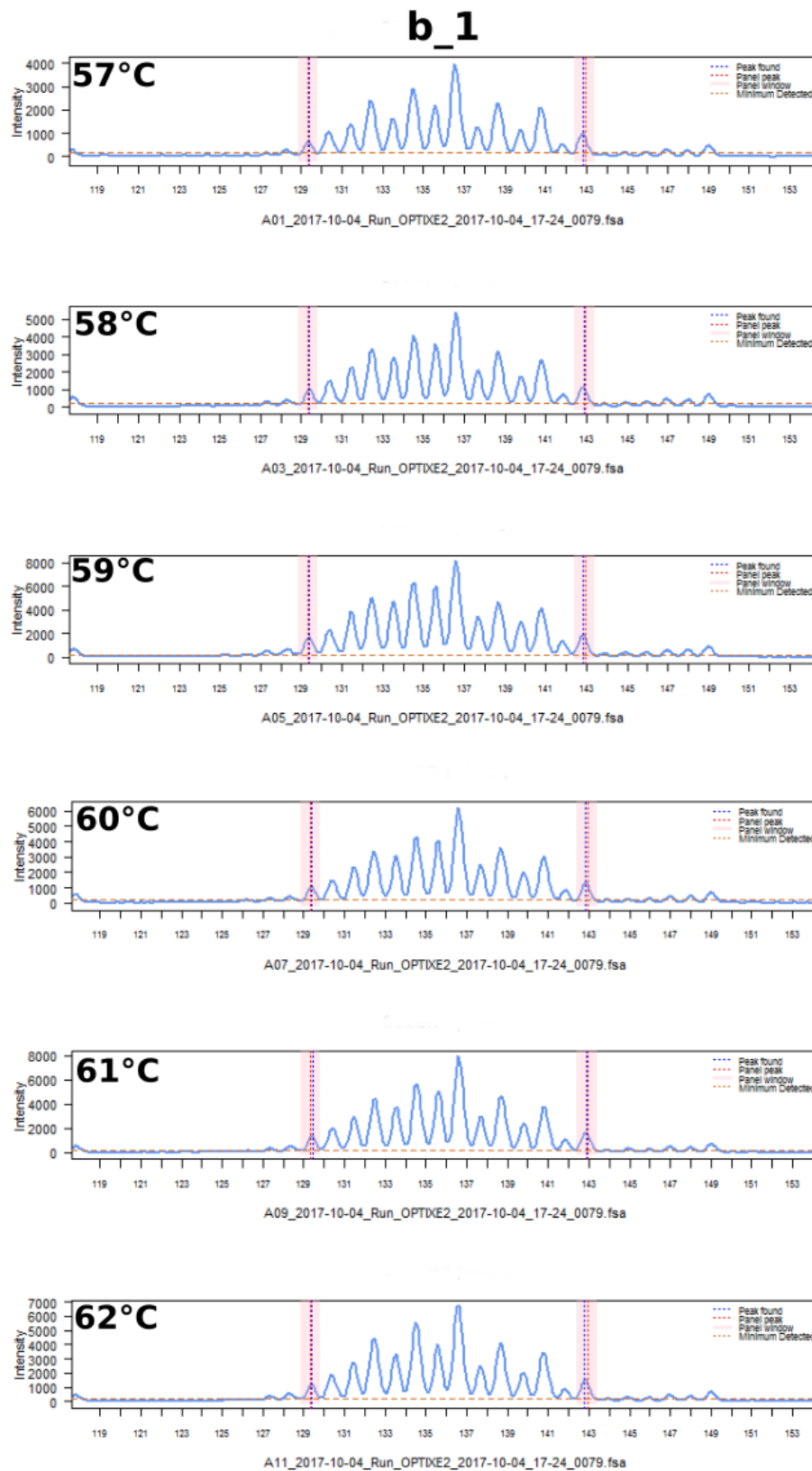
SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233–234, 2000.

TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computing**, 2017.

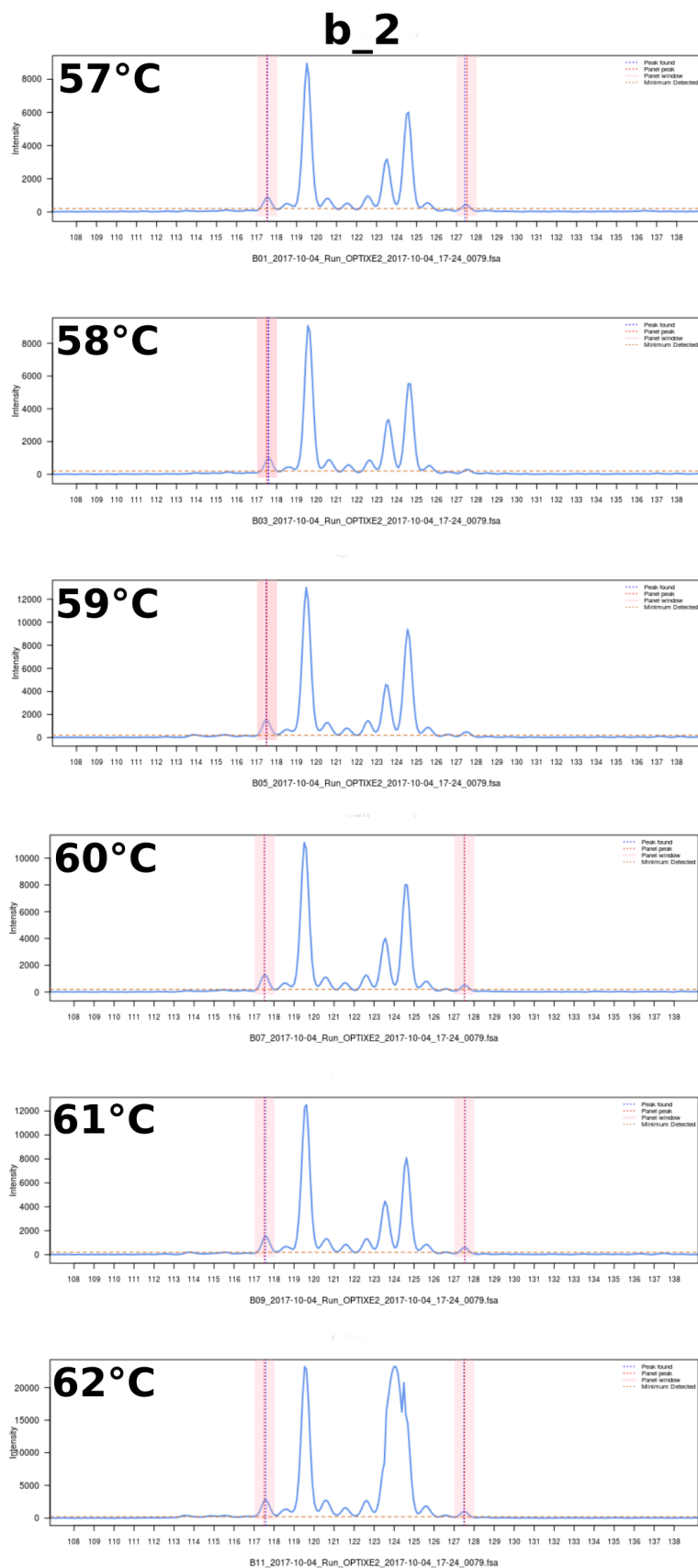
TELLES, M. P. et al. Development of microsatellite markers for the endangered Neotropical tree species *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae). **Genetics and molecular research : GMR**, v. 10, n. 1, p. 321–325, 2011.

ANEXOS

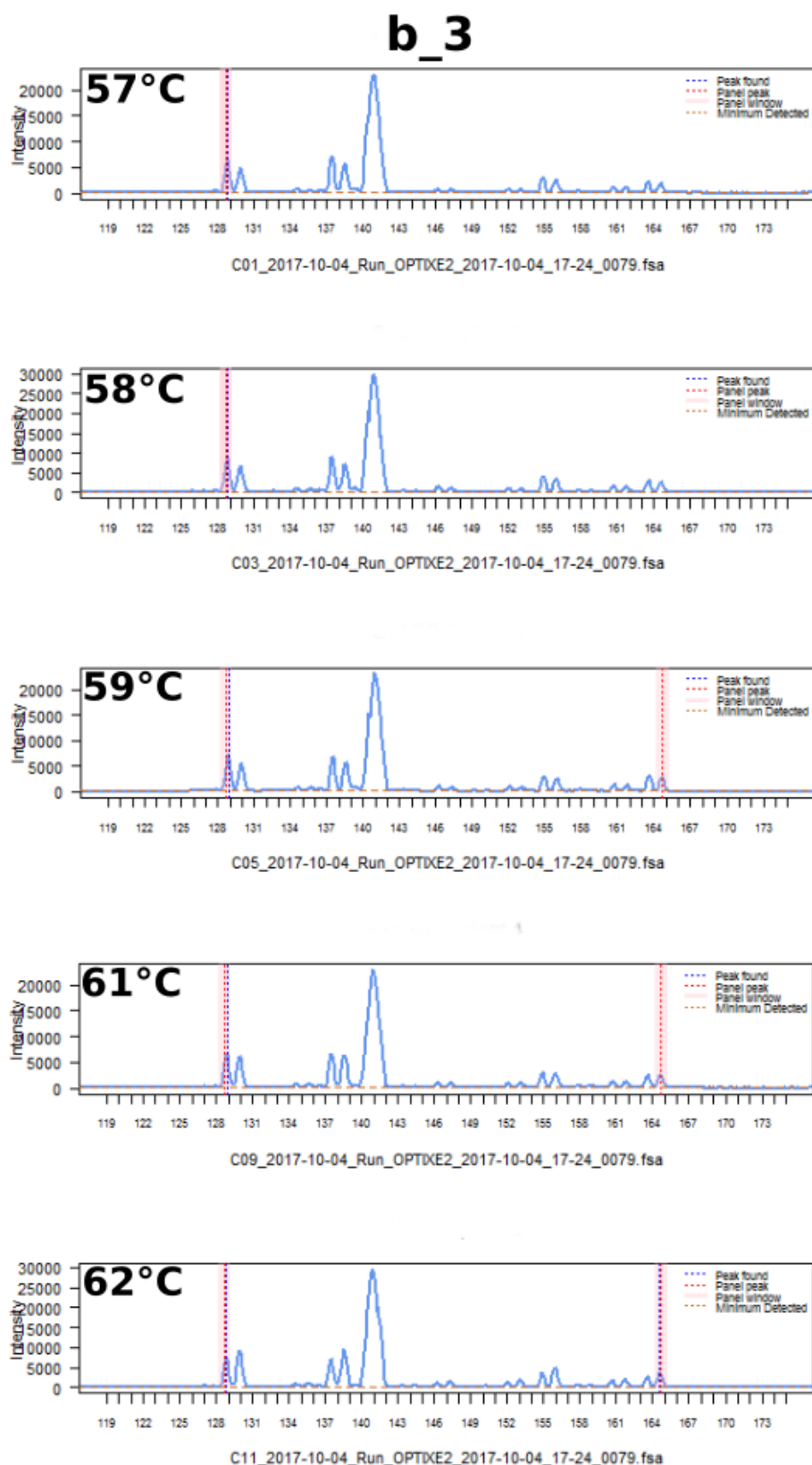
Anexo 1 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR de um dos marcador b_1



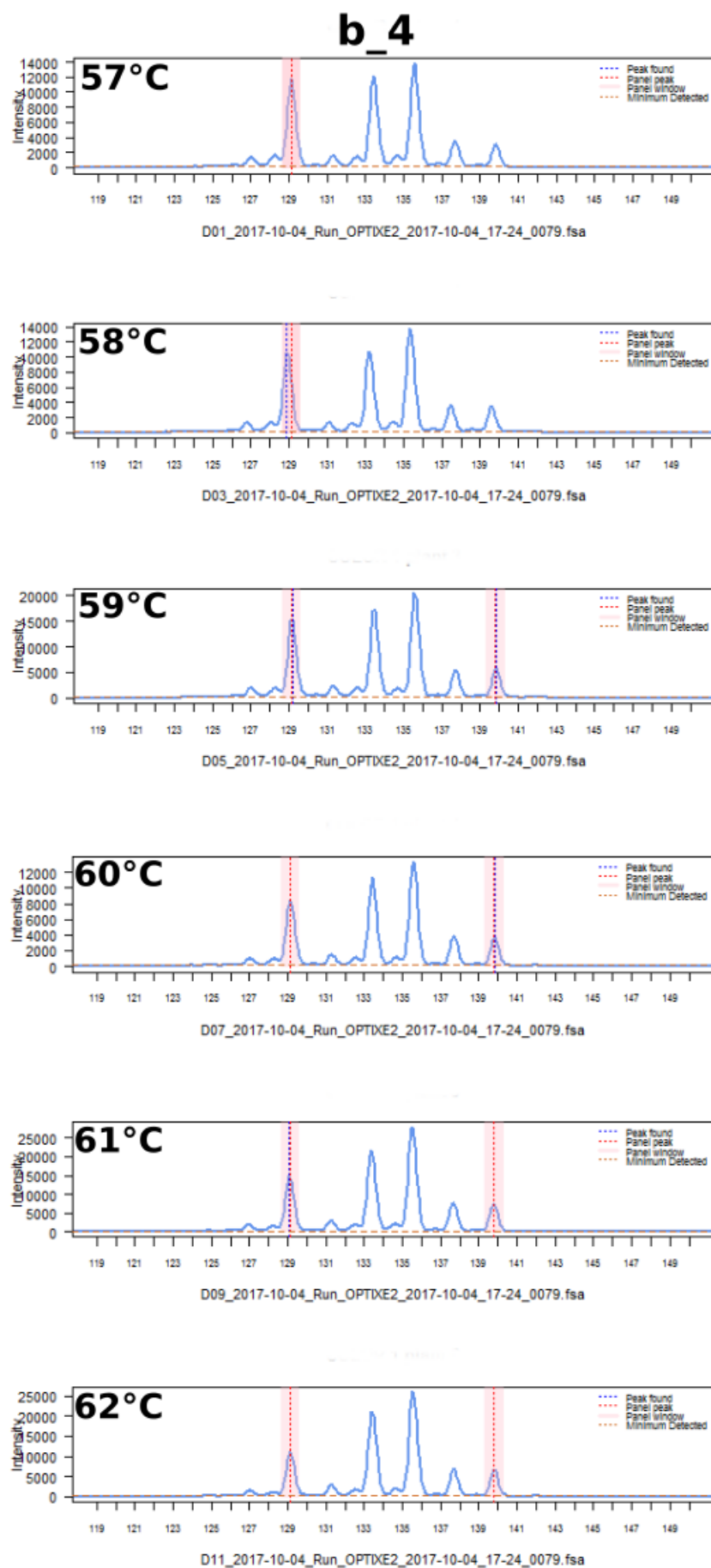
Anexo 2 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR de um dos marcador b_2



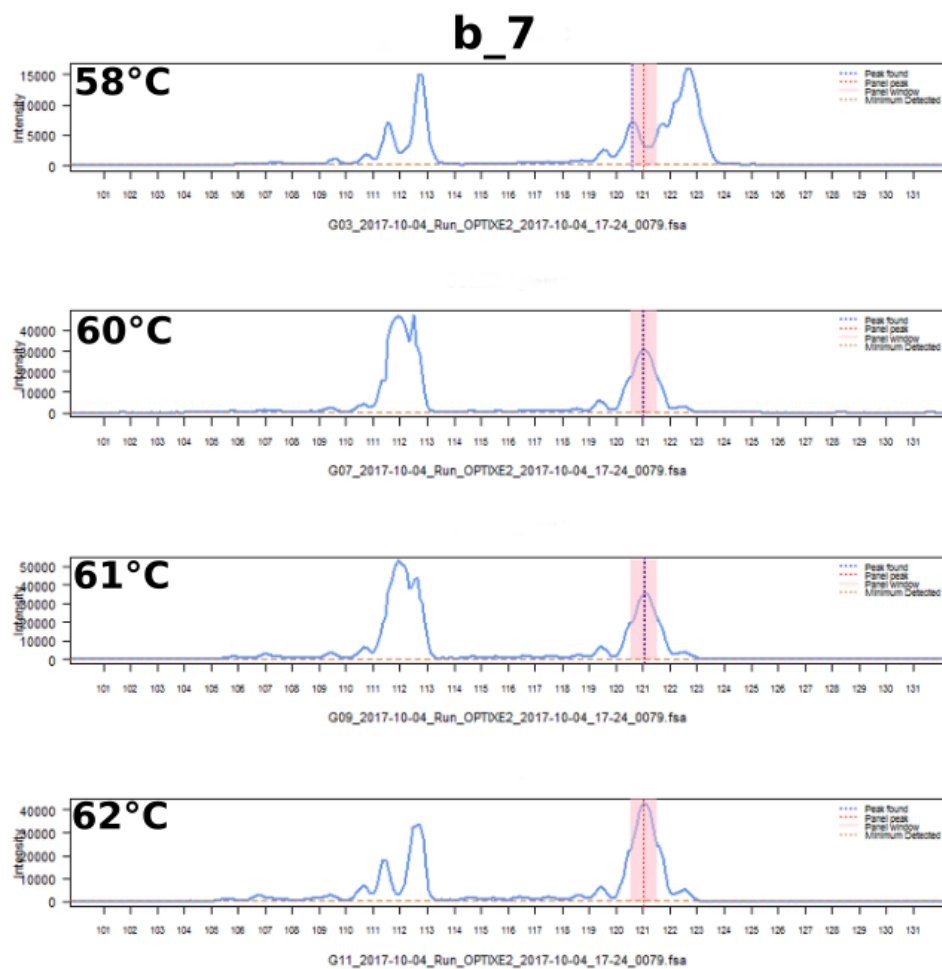
Anexo 3 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b₃



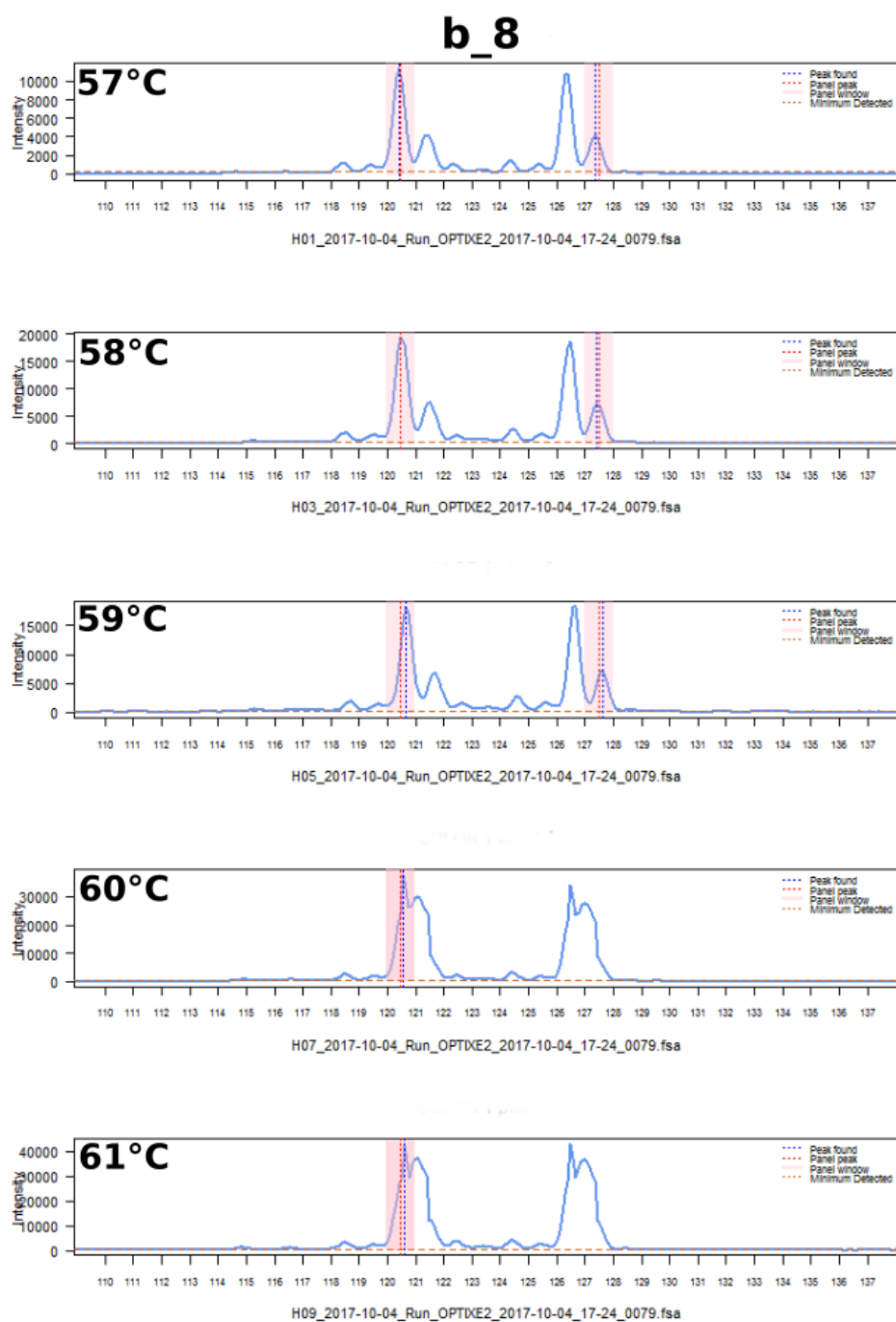
Anexo 4 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_4



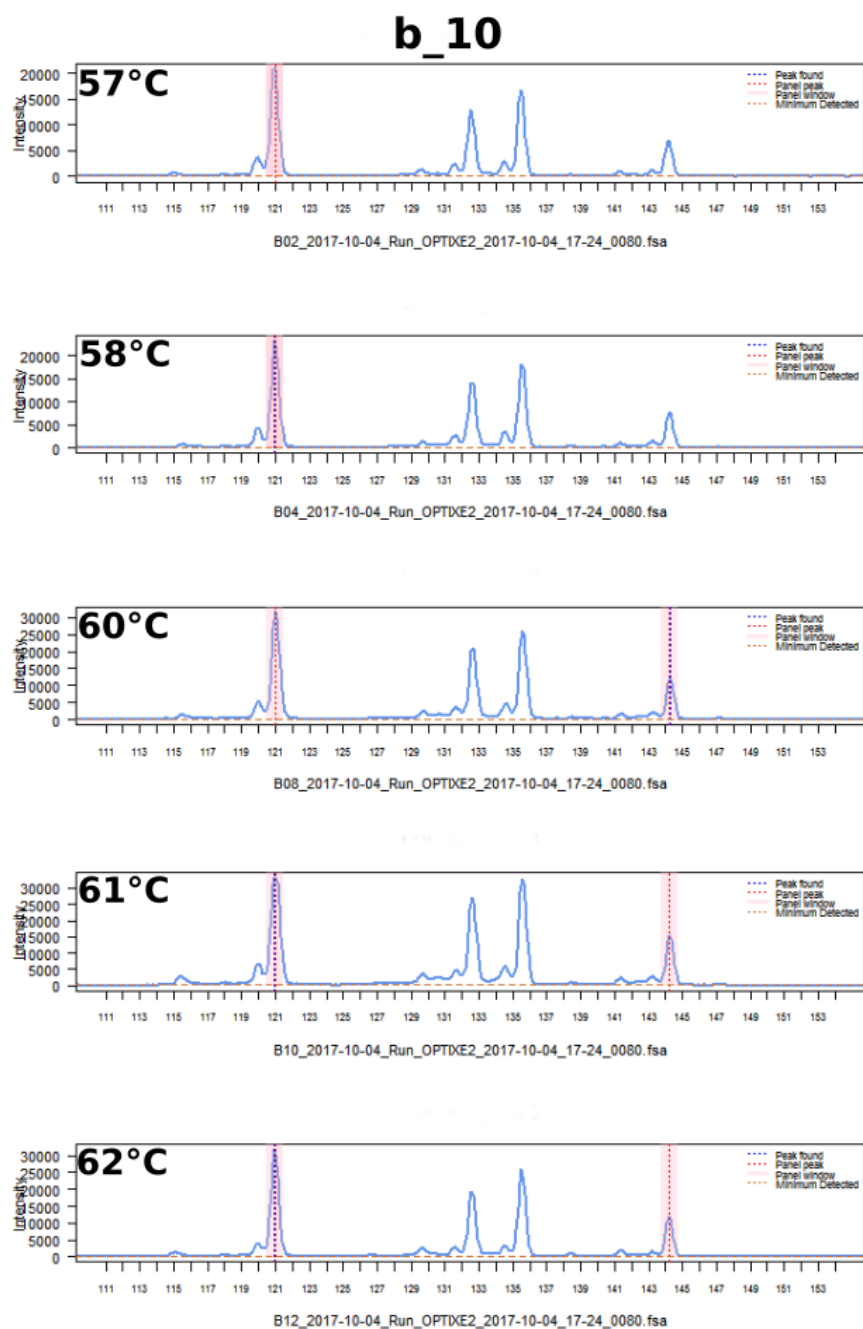
Anexo 5 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_7



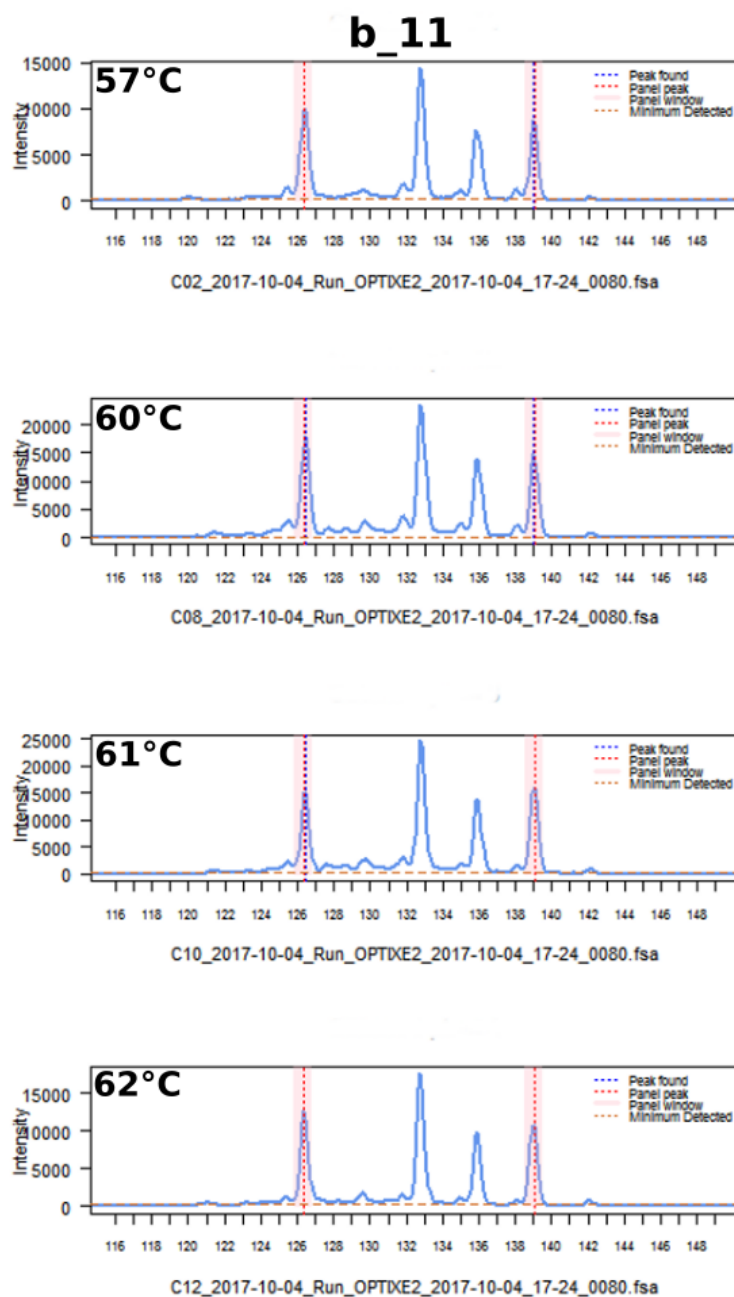
Anexo 6 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_8



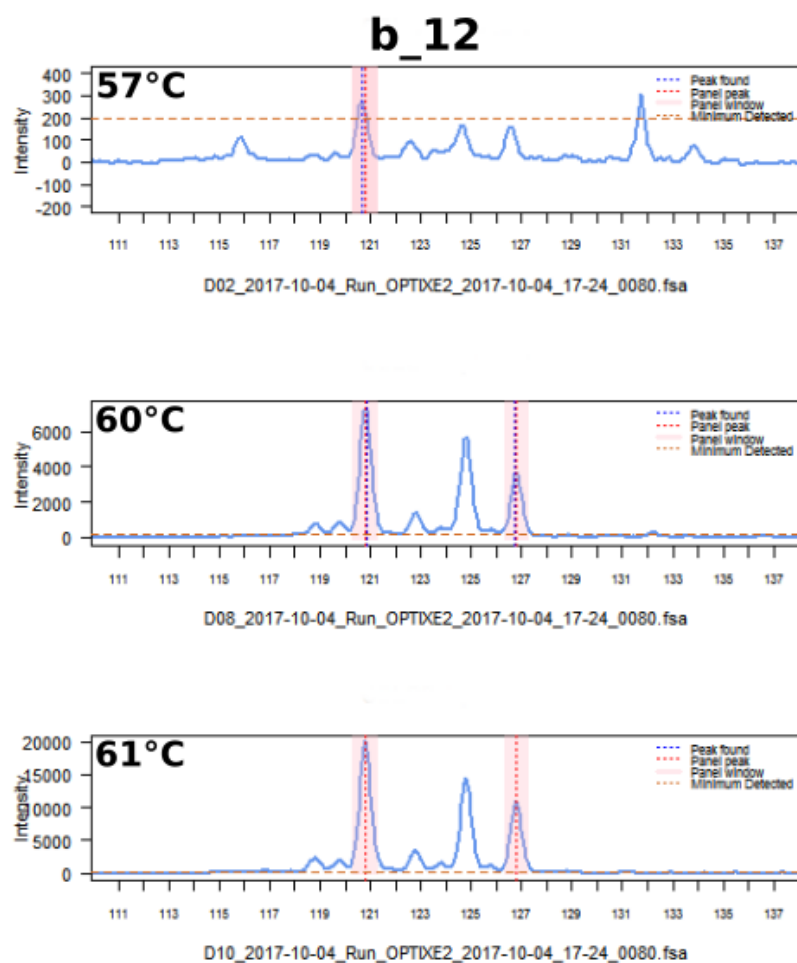
Anexo 7 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b₁₀



Anexo 8 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b₁₁

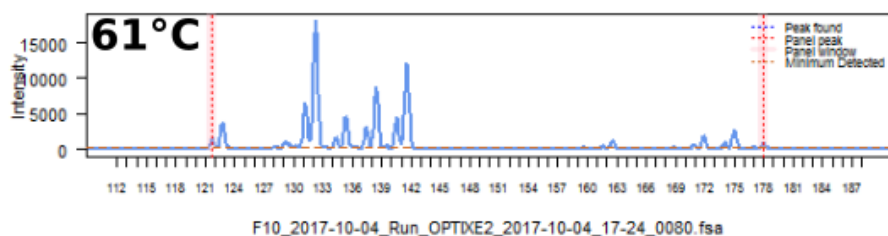
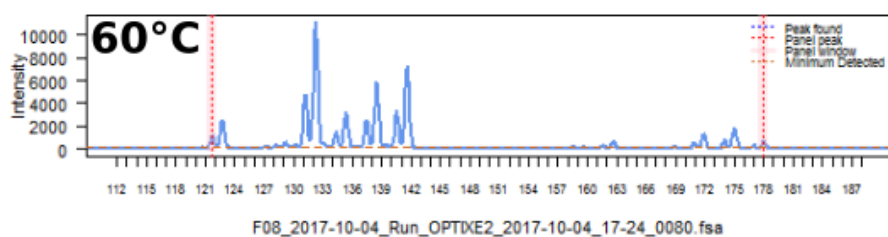
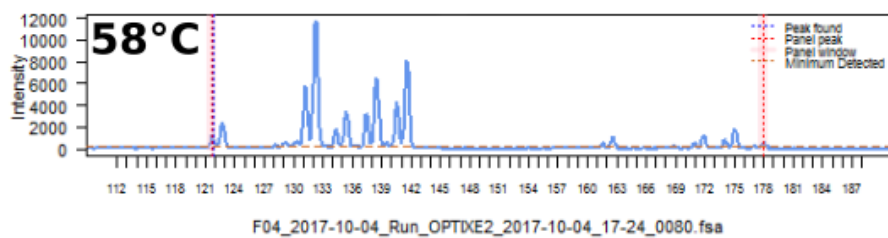
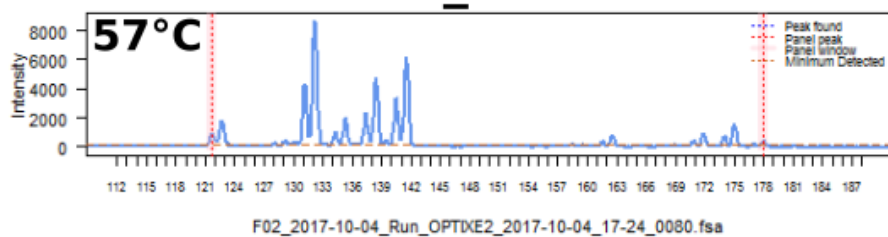


Anexo 9 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b₁₂

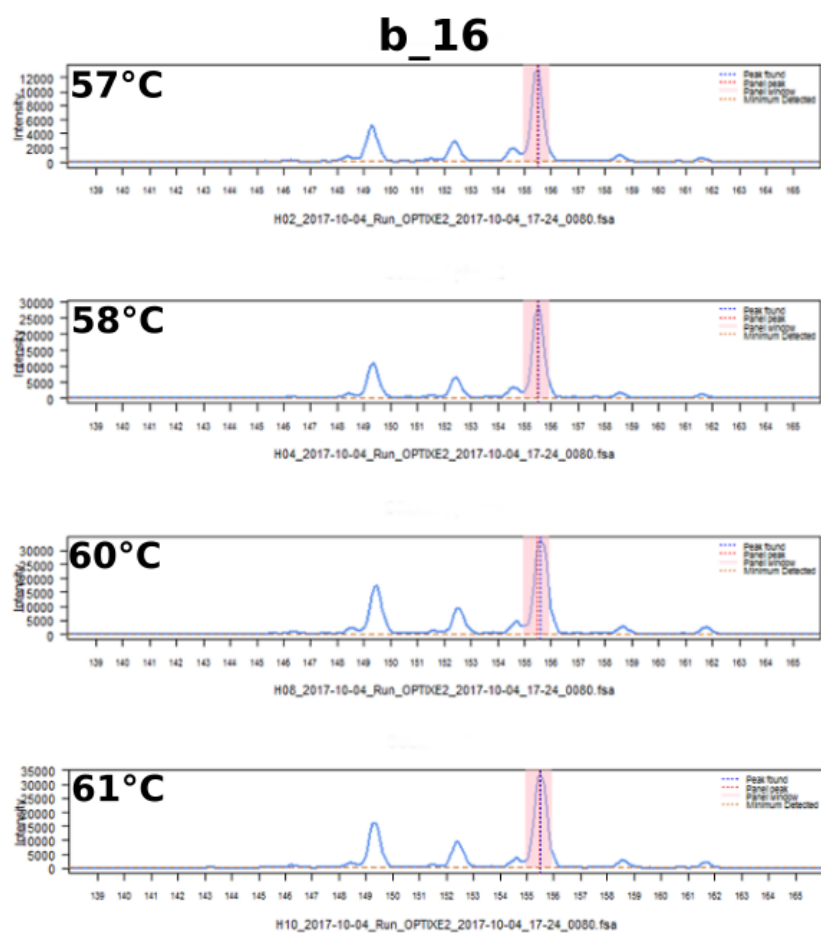


Anexo 10 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b₁₄

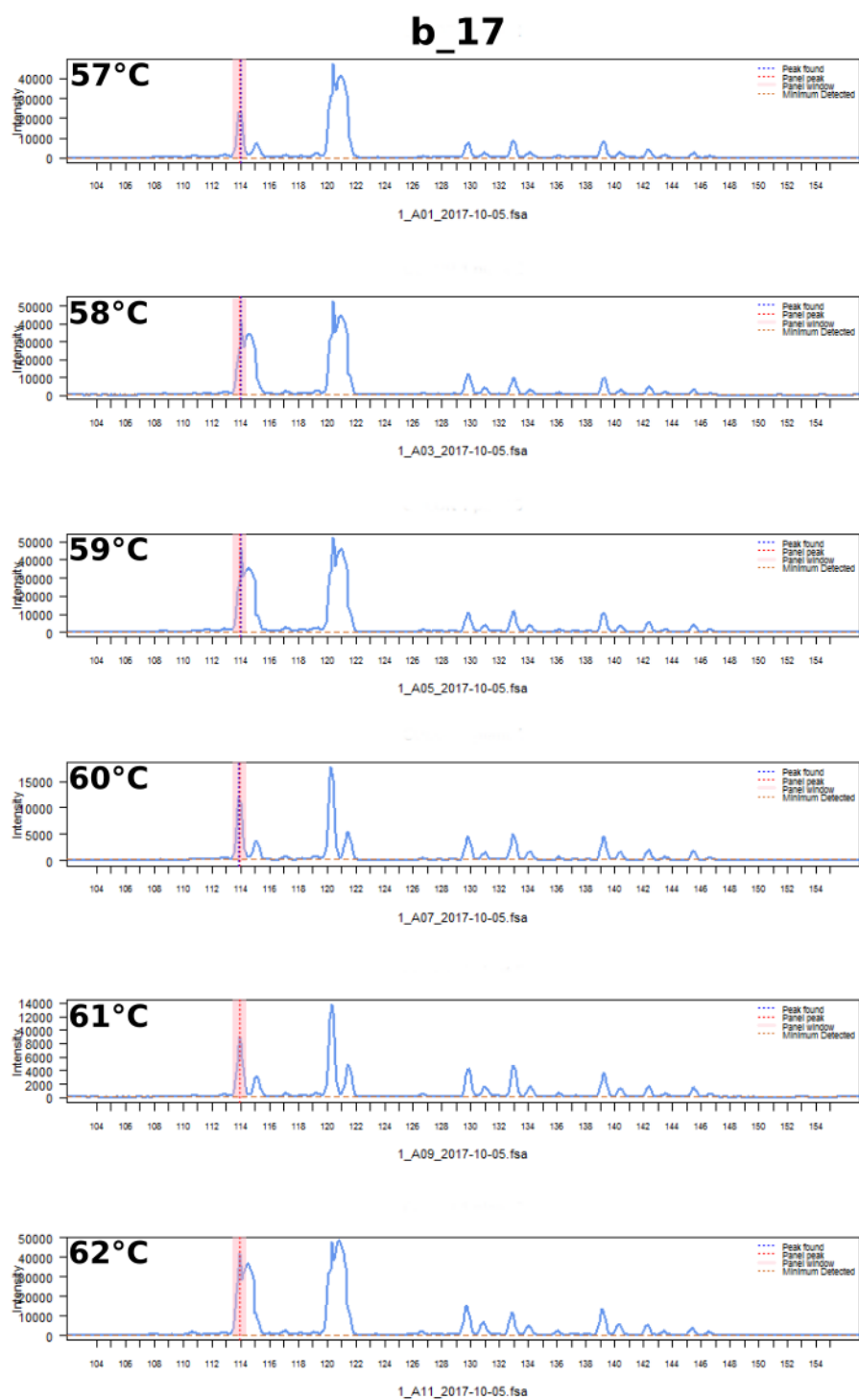
b₁₄



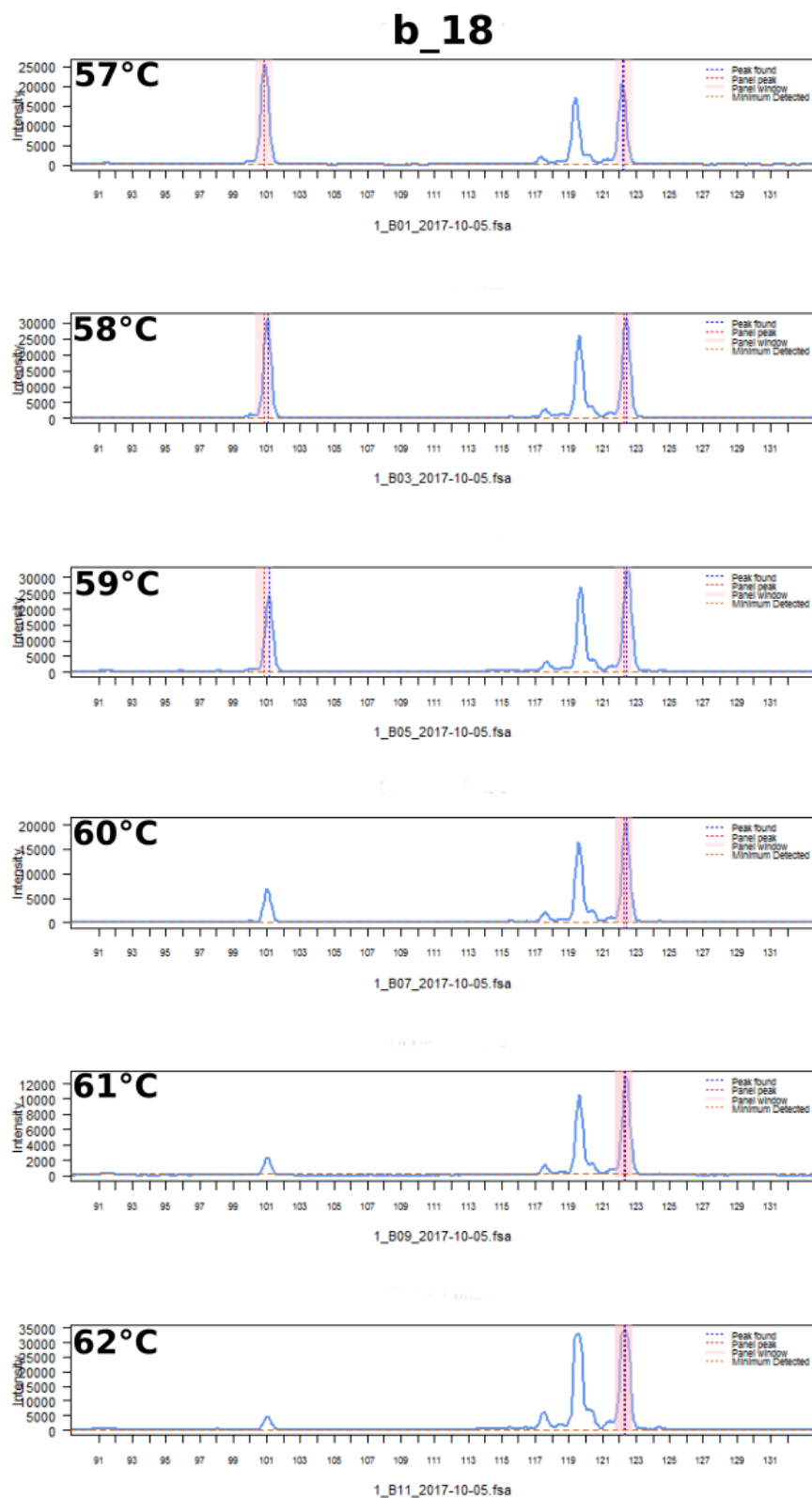
Anexo 11 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b₁₆



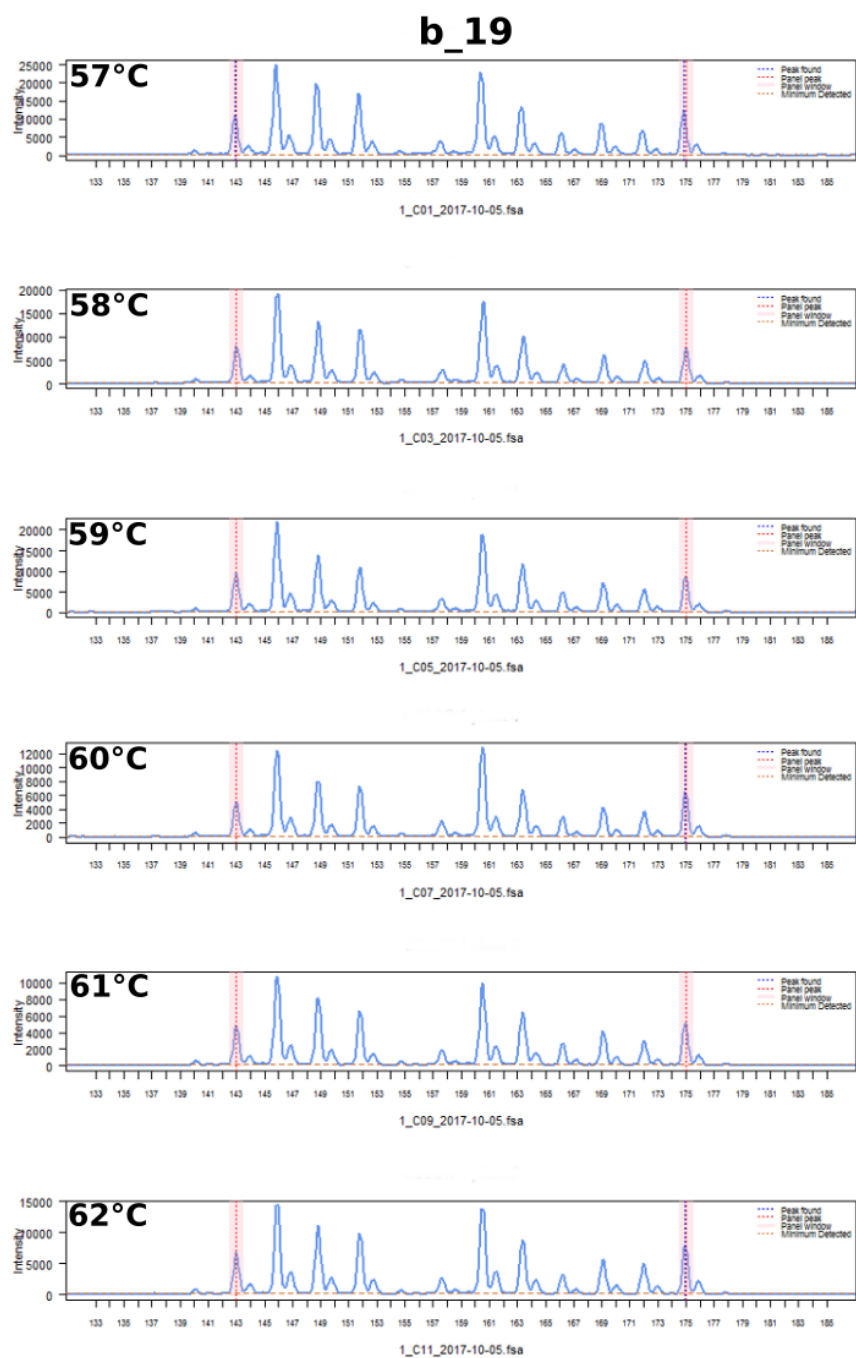
Anexo 12 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b₁₇



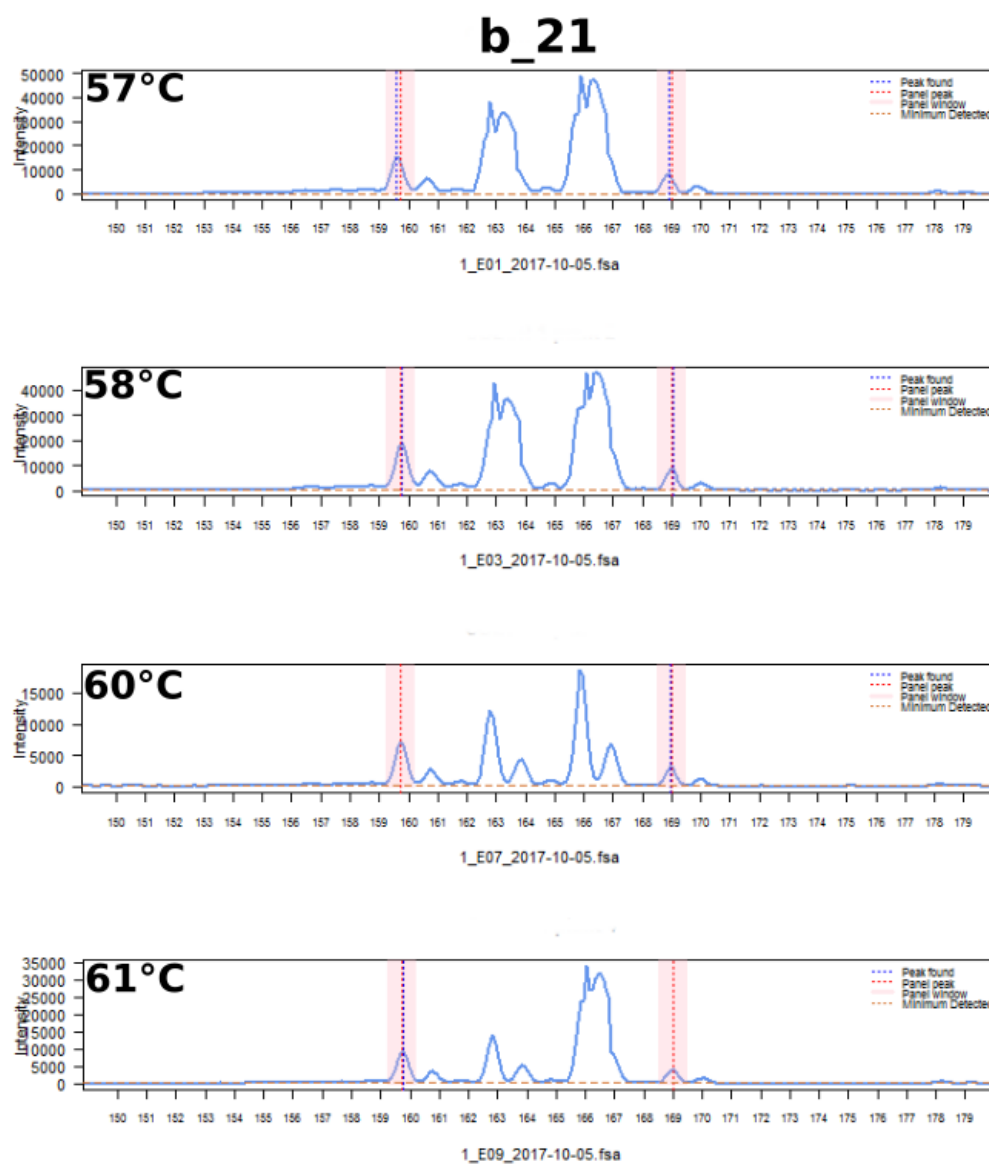
Anexo 13 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_18



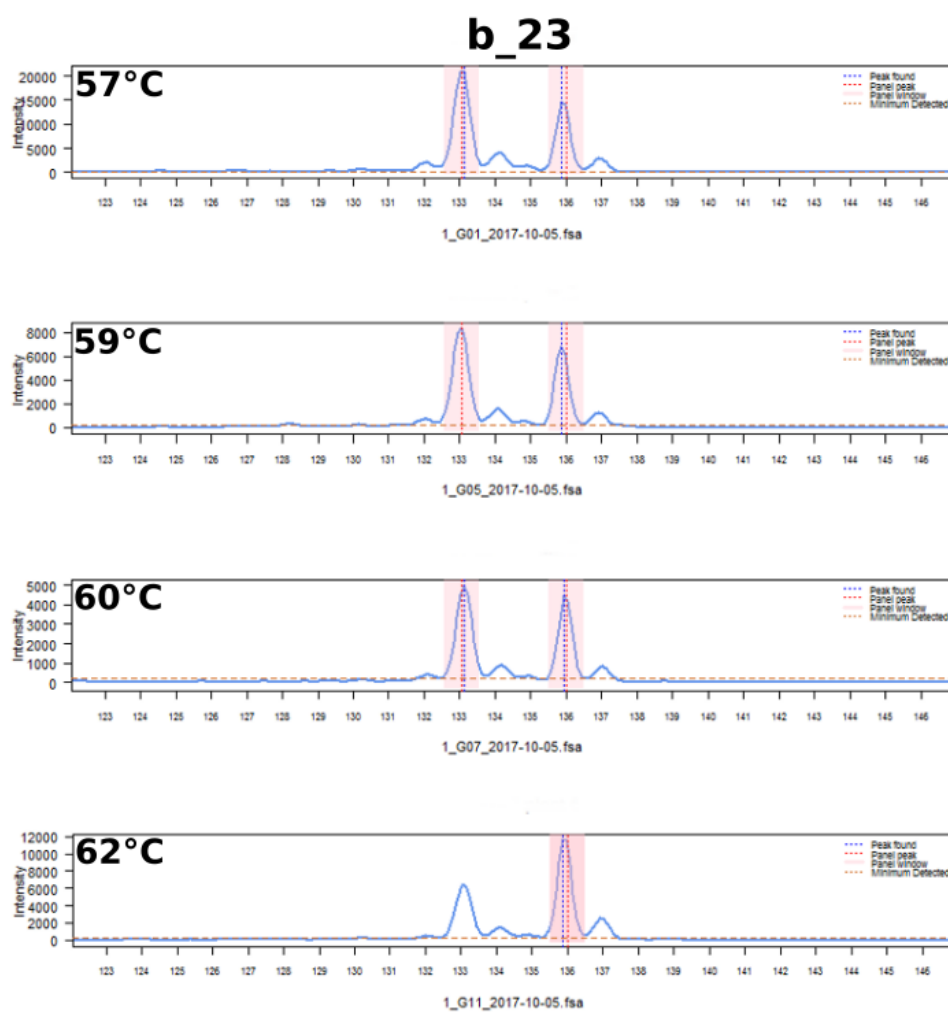
Anexo 14 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_19



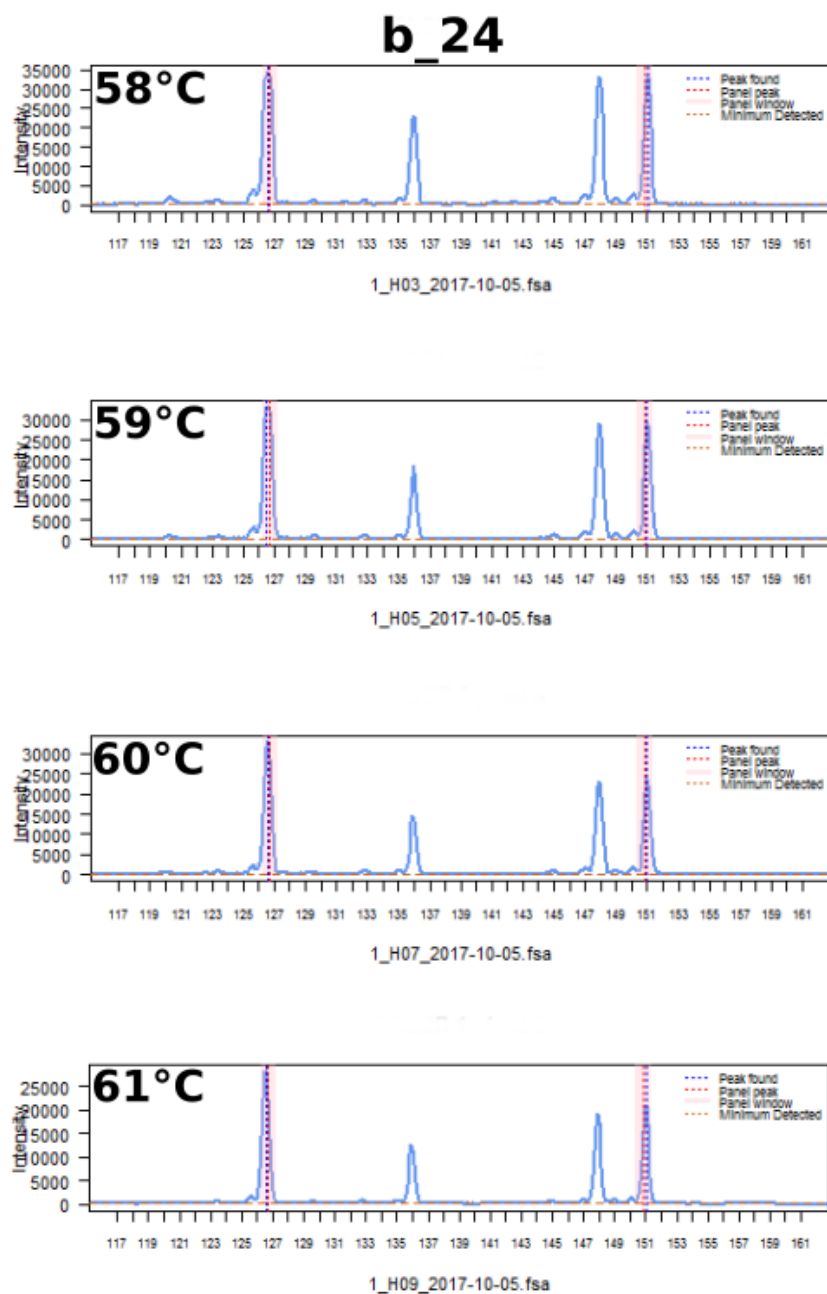
Anexo 15 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_21



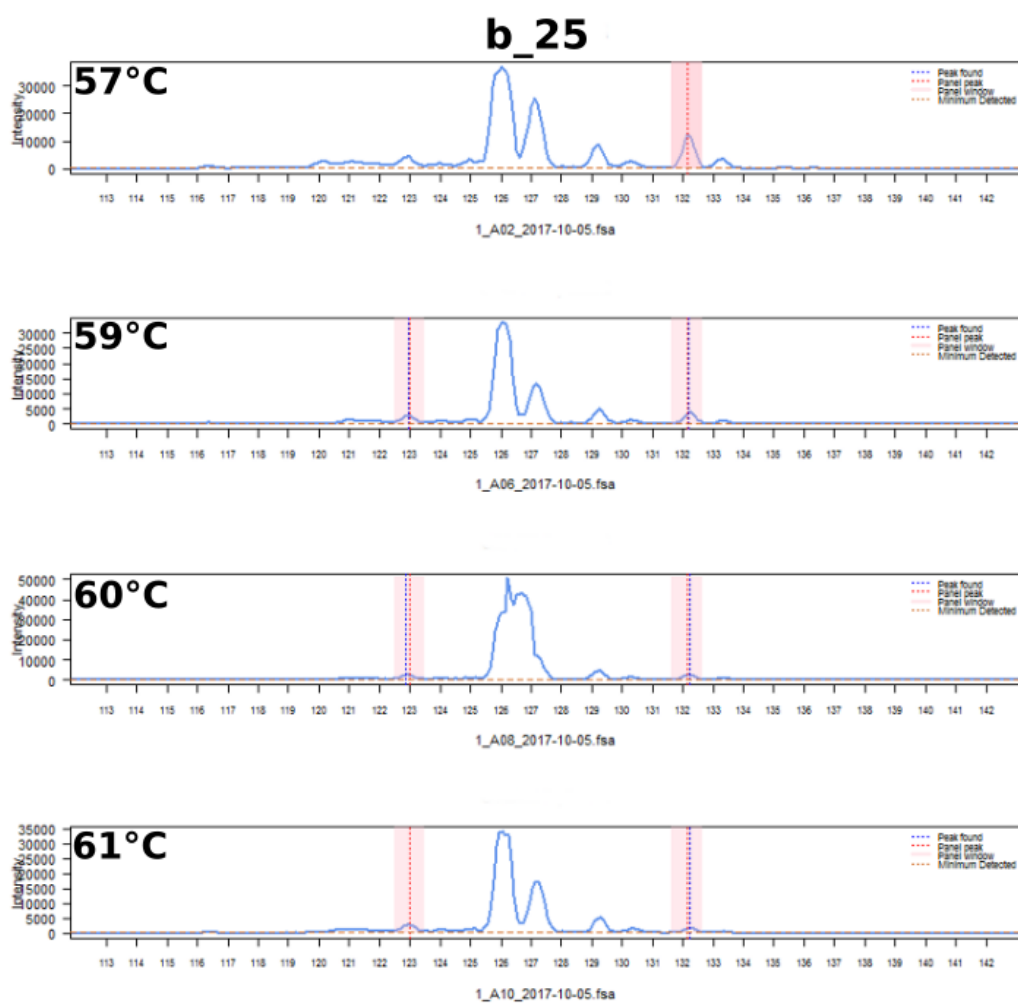
Anexo 16 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_23



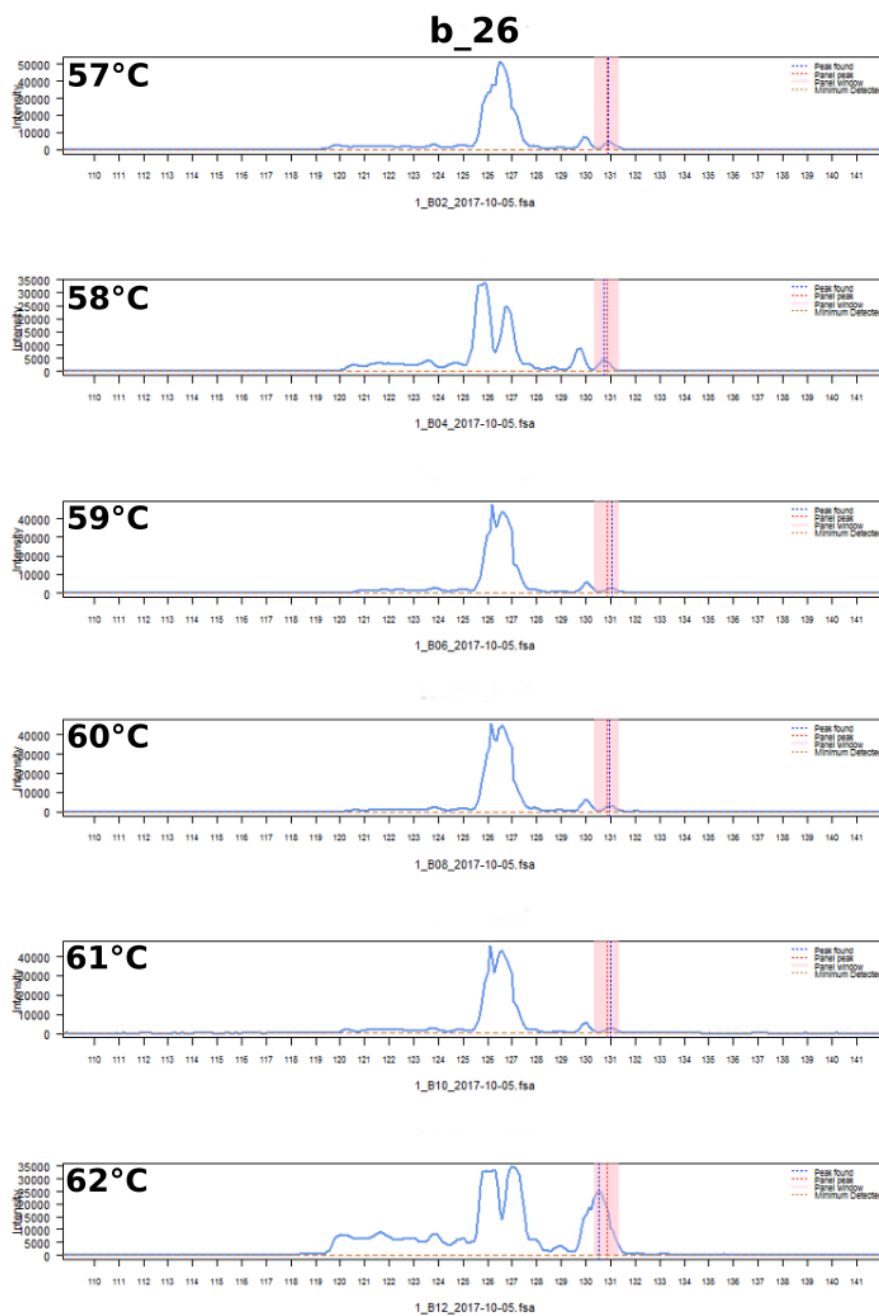
Anexo 17 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_24



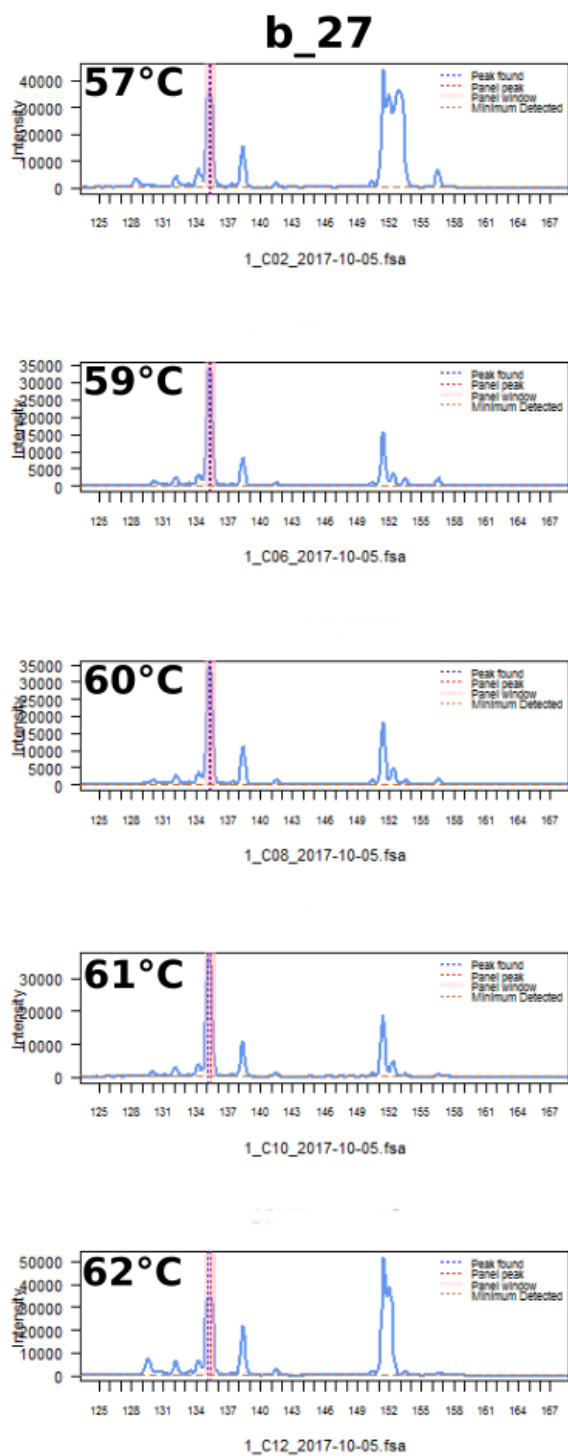
Anexo 18 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_25



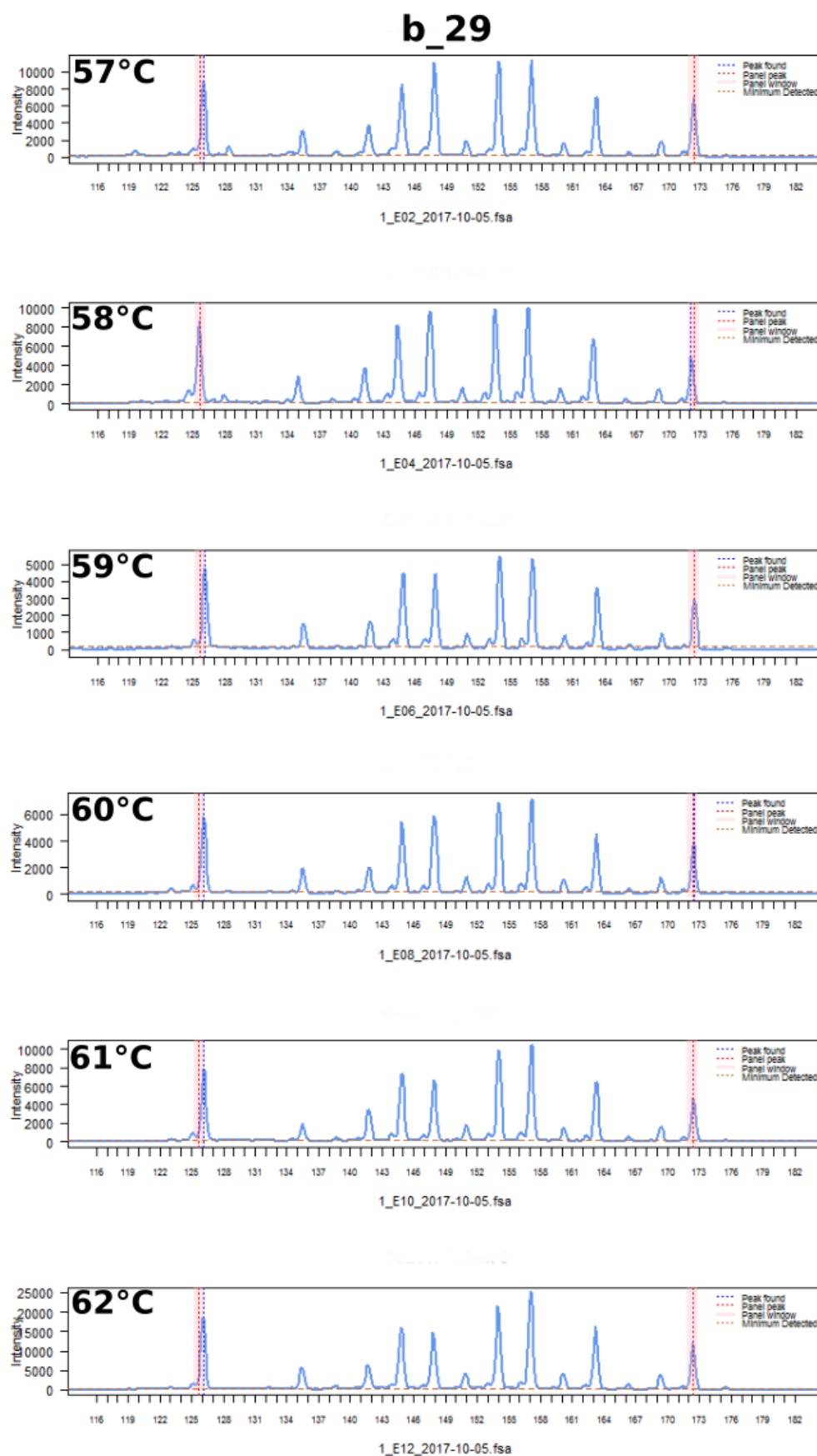
Anexo 19 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b₂₆



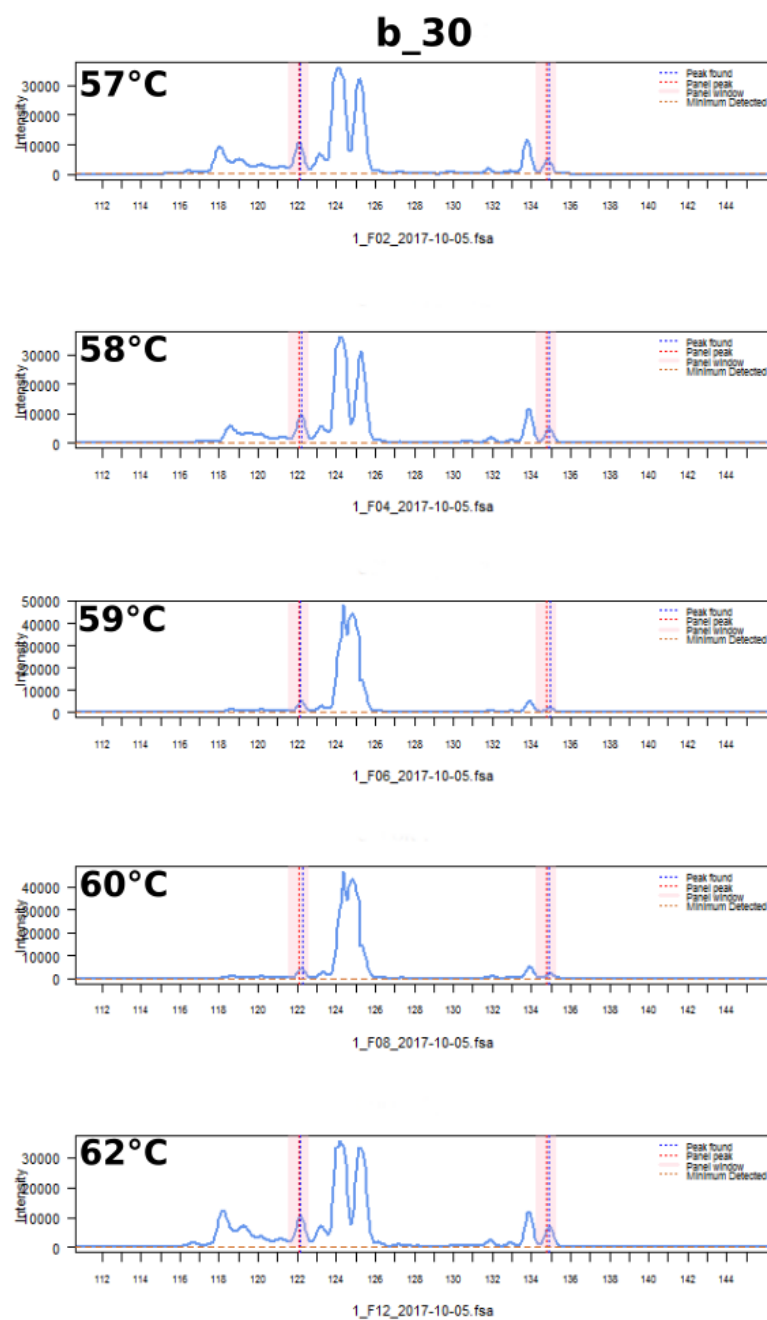
Anexo 20 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_27



Anexo 21 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_29



Anexo 22 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_30



Anexo 23 - Gráfico da intensidade de fluorescência do produto da PCR do marcador b_31

