

Transferibilidade de marcadores microssatélites para o estudo da diversidade genética da copaíba

Transferability of microsatellite markers to study the genetic diversity of the copaiba

Moisés Teixeira Rolim¹  ; Rayssa Gomes Vasconcelos¹  ; Antonio Saulo Cunha-Machado^{2*}  ; Jacqueline da Silva Batista³  ; Paulo de Tarso Barbosa Sampaio⁴  ; Raquel da Silva Medeiros⁴ 

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Programa de Pós-Graduação em Ciências de Florestas Tropicais (PPG-CFT); ² Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA), Laboratório de Biologia Molecular (LBM); ³ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Biodiversidade (COBIO), Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM); ⁴ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Laboratório de Silvicultura e Tecnologias Digitais (LASTED). *corresponding author: ascmbio@gmail.com

Recebido 08/03/2023

Aceito 04/12/2023

Publicado: 22/12/2023

Resumo:

Copaifera multijuga Hayne (copaíba) é a espécie do gênero mais abundante na Amazônia Central. Seu oleorresina possui elevada importância ecológica e socioeconômica para os povos tradicionais, destacando-se como um dos principais Produtos Florestais Não Madeireiros (PFNM) comercializados na região. Contudo, o acesso à diversidade genética de *C. multijuga* é dificultado pela ausência de marcadores microssatélites específicos para a espécie. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a transferibilidade de oito locos microssatélites da *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba-do-cerrado) para *C. multijuga*. Foram amostradas 27 árvores em população natural na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas. A extração de DNA foi realizada de aproximadamente 120 mg de folhas, conforme método de extração de tecidos vegetais CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio), com adaptações. O protocolo de amplificação utilizado foi adaptado do proposto para *C. langsdorffii*. Seis locos microssatélites foram amplificados e caracterizados com sucesso para *C. multijuga*. A análise dos genótipos revelou um total de 39 alelos, com média de 6,5 por loco. A heterozigosidade esperada média foi de 0,692. O índice de Conteúdo Informativo de Polimorfismo (PIC) revelou níveis relevantes para todos os locos utilizados (> 50%), exceto para o CL02 (48%). Apenas o loco CL01 apresentou baixo nível de heterozigotos. Esses marcadores, caracterizados pela primeira vez para *C. multijuga*, representam uma ferramenta valiosa para estratégias de manejo e estudos futuros de sistema reprodutivo e genética populacional desta espécie.

Palavras-chave: amplificação heteróloga; *Copaifera multijuga* Hayne; polimorfismo.

Abstract:

Copaifera multijuga Hayne (copaíba) is the most abundant species of the genus in Central Amazon. Its oleoresin has high ecological and socioeconomic importance for traditional peoples, standing out as one of the main Non-Timber Forest Products (NTFPs) traded in the region. However, access to the genetic diversity of *C. multijuga* is hampered by the absence of microsatellite markers specific for the species. In this sense, this study aimed to evaluate the transferability of eight microsatellite loci from *Copaifera langsdorffii* Desf. (copaíba-do-cerrado) to *C. multijuga*. Twenty-seven trees were sampled from a natural population in the Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas, Brazil. DNA extraction was performed from approximately 120 mg of leaves, according to the CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) method of plant tissue extraction, with adaptations. The amplification protocol used was adapted from that proposed for *C. langsdorffii*. Six microsatellite loci were successfully amplified and characterized for *C. multijuga*. Genotype analysis revealed a total of 39 alleles, with an average of 6.5 per locus. The average expected heterozygosity was 0.692. The Polymorphism Information Content Index (PIC) revealed relevant levels for all loci used (> 50%), except for CL02 (48%). Only the CL01 locus showed a low level of heterozygosity. These markers, characterized for the first time for *C. multijuga*, represent a valuable tool for management strategies and future studies of mating system and population genetics of this species.

Keywords: heterologous amplifications; *Copaifera multijuga* Hayne; polymorphism.

1. Introdução

Dentre as espécies de *Copaifera* L. catalogadas na Amazônia Brasileira, a *C. multijuga* Hayne é uma das mais abundantes na Amazônia Central, onde é popularmente conhecida como “copaíba-angelim”, “copaíba-mari-mari” e “copaíba-roxa”, (Martins-da-Silva *et al.*, 2008). As árvores de copaíba produzem um oleorresina amplamente utilizado na medicina popular e como matéria-prima de diversos segmentos da economia. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam o Amazonas como o maior produtor de óleo de copaíba no Brasil, gerando uma receita de aproximadamente R\$ 4,9 milhões anualmente (IBGE, 2021).

Apesar de sua importância ecológica e socioeconômica, estudos voltados para a caracterização genética das populações de *C. multijuga* ainda são escassos ou incipientes. Para esta finalidade, os marcadores moleculares, especialmente os microssatélites, são ferramentas vantajosas para detectar polimorfismo em espécies ou indivíduos de uma mesma população (Turchetto-Zolet *et al.*, 2017). Os marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são sequências curtas de um a seis nucleotídeos repetidas em tandem (Frankham *et al.* 2010). São abundantes no genoma, fáceis de automatizar, codominantes, multialélicos, robustos e reprodutíveis (Borém & Caixeta 2009; Turchetto-Zolet *et al.* 2017).

Diversas espécies arbóreas tropicais de importância econômica têm sido avaliadas a partir dos SSRs, a exemplo da maçaranduba (*Manilkara huberi*) (Azevedo *et al.*, 2008), jatobá (*Hymenaea courbaril*) (Feres *et al.*, 2009), pupunheira (*Bactris gasipaes*) (Billotte *et al.*, 2004), entre outras. Entretanto, a principal limitação para utilização dessa classe de marcadores em estudos populacionais é a inexistência de marcadores espécie-específicos para a maioria das espécies florestais amazônicas. No caso de *Copaifera* L. a literatura aponta a existência de apenas oito locos microssatélites desenvolvidos para a copaíba-do-cerrado (*Copaifera langsdorffii* Desf.) por Ciampi *et al.* (2000).

Quando não há marcadores espécie-específicos disponíveis como no caso de *C. multijuga*, é possível testar a amplificação heteróloga ou transferibilidade. Nesta técnica, locos originalmente desenvolvidos para uma dada espécie, são amplificados em outras desde que estas sejam geneticamente próximas (Frankham *et al.*, 2010), reduzindo significativamente os custos e o tempo das análises genéticas (Butler *et al.*, 2004). Silva *et al.* (2019) testaram a transferibilidade de 21 locos

microssatélites de *Passiflora edulis* e *Passiflora alata* para outras espécies do gênero e obtiveram percentuais de 14,28 a 33,33%.

A mesma técnica tem sido empregada para acessar informações genéticas das espécies de *Copaifera* L., a partir dos locos microssatélites da copaíba-do-cerrado (Ciampi *et al.*, 2000). Em estudo conduzido por Silva *et al.* (2012) com a *Copaifera reticulata*, em duas áreas na Floresta Nacional do Tapajós (PA), a taxa de transferibilidade obtida foi de 75%. As análises revelaram um total de 78 alelos, com média de 13 por loco e heterozigosidade esperada média de 0,75. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a transferibilidade dos oito locos microssatélites de *C. langsdorffii* para a espécie amazônica *C. multijuga*.

2. Material e Métodos

Foram coletadas amostras de folhas em bom estado fitossanitário da parte inferior da copa de 27 árvores de uma população natural da Reserva Florestal Adolpho Ducke (2°55' S e 59°59' W) em Manaus, Amazonas, Brasil. A Reserva compreende uma área de 10 mil hectares de floresta de terra-firme, com clima do tipo Afi (Köppen) e relevo ondulado com variação latitudinal de 100 m entre as topossequências platô e baixio (Ribeiro *et al.*, 1999).

As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel e foram transportadas ao Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LTBM/INPA). O DNA total foi extraído de aproximadamente 120 mg do material vegetal, conforme o método de extração de tecidos vegetais CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) de Doyle & Doyle (1987), com adição de Acetato de Sódio e Proteinase K (Oliveira *et al.*, 2017). A integridade do DNA foi analisada por eletroforese horizontal em gel de agarose (1% p/v). A quantificação foi realizada por comparação com concentrações conhecidas do DNA fago lambda (λ) (50, 100, 150 e 200 ng/ μ l). As amostras foram diluídas em água ultrapura (Milli-Q) e padronizadas a uma concentração final de 20 ng μ l⁻¹.

Para testar a amplificação heteróloga foram utilizados oito pares de iniciadores microssatélites (*primers*) originalmente desenvolvidos para *C. langsdorffii* (Ciampi *et al.*, 2000) (Tabela 1). A concentração dos reagentes e as ciclagens das amplificações por PCR foram realizadas de acordo com Sebbenn *et al.* (2011). As reações de PCR ocorreram em volume final de 10 μ l, contendo 1 μ l de buffer 10x e 0,6 μ l de MgCl₂ a 25 mM (ambos da Thermo Scientific); 2,1 μ l de dNTP (1 mM); 0,21 μ l de Taq polimerase (5 U ng/ μ l); 0,8 μ l do primer *reverse* e 0,4 μ l do primer *forward* (ambos a 4 μ M); 0,4 μ l da fluorescência (6-FAM, NED, HEX) (4 μ M) e 1 μ l de DNA alvo.

Tabela 1. Sequência de oito pares de primers microssatélites de *C. langsdorffii* testados em *C. multijuga*

Table 1. Sequence of eight pairs of *C. langsdorffii* microsatellite primers tested in *C. multijuga*

Loco	SSR	Sequência dos iniciadores (5'-3')	
		"Forward"	"Reverse"
CL01	(AG) ₂₄	AGACTCCATTCTTCCACAGC	CTGTCTTCTCTCTGCAACCA
CL02	(TC) ₂₅	CCTCGATCCTCCTTGTGTTC	TCAGTTCGGATAGCGATGC
CL06	(TC) ₁₄	GAGCGTTGCAAGGAATTCT	CGAAACTTGCATGCGGATA
CL20	(AG) ₂₁	ACCAATCTCAATCATCGAGC	GTGCGGGTGAATGTAGAGTT
CL27	(TC) ₂₅	GAATATACAATGCACCGCAA	CTCCAAAAGCCATGCAAG
CL32	(AG) ₂₄	GTGAGAGTATGGAATGTAAC	TAGTCATGAAAATAGGAGTG
CL34	(AG) ₃₃	TGTTGACATGACACTAATTC	ACAACCGACTTATTGGA
CL39	(TC) ₂₄	GCAGCTGTTCTCTTGTGACT	CAAGAATCCGTGACTTCATC

As amplificações foram realizadas em termociclador *Veriti® Thermal Cycler* (Applied Biosystems), seguindo as ciclagens: desnaturação inicial de 68 °C por 2 minutos (min); 29 ciclos de desnaturação a 92 °C por 30 segundos (s), temperatura de anelamento otimizada para cada loco (entre 50 e 60 °C) por 35 s; extensão a 68 °C por 20 s e uma extensão final a 72 °C por 35 min. O produto das reações foi visualizado em gel de agarose 1,5% (p/v). Foi acrescido 5 µl de azul de bromofenol à reação de PCR de cada amostra (2 µl), sendo o tamanho do fragmento amplificado estimado por comparação com o marcador Ladder 1kb Plus (Invitrogen®) e o percentual de transferibilidade (T) foi avaliado de acordo com a presença ou ausência de bandas: $T(\%) = (N^{\circ} \text{ locos transferíveis} / N^{\circ} \text{ de locos testados}) \times 100$.

Os produtos amplificados da PCR foram genotipados em analisador automático de fragmentos de DNA por eletroforese capilar ABI 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) em sistema multiplex, com adição de 7,8 µl de HiDi™ Formamide e 0,2 µl do marcador GeneScan™ - 500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems). Os tamanhos dos alelos foram verificados e estimados em pares de bases no programa GeneMapper (versão 4.1, Applied Biosystems). A matriz de dados foi submetida ao programa Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) para verificar a ocorrência de erros de genotipagem: alelos nulos, *stutters* e *large dropout*.

O número total de alelos (A), a heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E), o coeficiente de endogamia (FIS) e o teste de desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram estimados com o auxílio do programa GenAlEx 6.41 (Peakall & Smouse, 2006). O teste de desequilíbrio de ligação (DL) entre os pares de locos foi realizado no programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2002). Os níveis de significância para o teste de EHW e para o DL foram corrigidos pelo método de Bonferroni (Rice, 1989).

3. Resultados e Discussão

Originalmente desenvolvidos para *C. langsdorffii* (Ciampi *et al.* 2000), seis de oito locos microssatélites foram amplificados com sucesso em *C. multijuga*, em diferentes temperaturas de anelamento (Tabela 2). A aplicabilidade da transferibilidade ou amplificação heteróloga desses locos também foi reportada para outra espécie do gênero (*Copaifera reticulata*) por Silva *et al.* (2012). Os autores também obtiveram um percentual de 75%, corroborando os resultados obtidos no presente estudo.

Quando realizada entre espécies do mesmo gênero ou de outros, desde que taxonomicamente relacionados, as chances de sucesso da técnica são maiores (Ciampi *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012). Em uma coleção de germoplasma de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa*), nove locos de *Hymenaea courbaril* (Ciampi *et al.*, 2008) foram empregados com o objetivo de caracterizar a magnitude e distribuição da variabilidade genética entre as progênies (Gonçalves *et al.*, 2019). Foram quantificados um total de 152 alelos (aproximadamente 16,9 por loco) e Heterozigosidade média esperada de 0,554.

Similarmente, Fortes *et al.* (2016) testaram a transferibilidade dos microssatélites de *Bactris gasipaes*, *Phoenix dactylifera* e *Astrocaryum aculeatum* para *Astrocaryum vulgare* e obtiveram percentuais divergentes. Conforme esperado por se tratar de espécies do mesmo gênero, os locos de *A. aculeatum* foram os mais eficientes (75%), enquanto para os de *P. dactylifera* não houve amplificação. Considerando os custos envolvidos no isolamento de marcadores microssatélites, os resultados aqui obtidos representam uma alternativa vantajosa para a caracterização genética de populações de *C. multijuga*.

Os demais locos de *C. langsdorffii* foram caracterizados como monofórmicos (CL27) para o conjunto de dados analisados ou não amplificaram (CL02) após sucessivas tentativas de otimização. Por este motivo, estes não foram considerados para as estimativas dos parâmetros genéticos. Após submetidos ao software Micro-Checker não foram observadas evidências de alelos nulos para os

demais locos avaliados. Quanto ao número de alelos (A) foi verificado um total de 39, com uma variação de 5 (CL39) a 10 (CL32) e valor médio de 6,5 (Tabela 2). Este valor médio foi inferior ao registrado no estudo de Silva *et al.* (2012), ao validarem os marcadores espécie-específicos de *C. langsdorffii* em *C. reticulata*. Este comportamento possivelmente está relacionado a amplitude amostral, visto que foram amostrados 136 indivíduos de *C. reticulata* distribuídos em duas populações, sendo superior ao presente estudo (N=27).

Tabela 2. Relação de primers de *C. langsdorffii* amplificados com sucesso em amostras de *C. multijuga* e parâmetros genéticos

Table 2. List of *C. langsdorffii* primers successfully amplified in *C. multijuga* samples and genetic parameters

Loco	(pb)	Sequência dos iniciadores (5'-3')	T°C	PIC	A	H _O	H _E	F _{IS}
CL01	193-211	F: AGACTCCATTCTTCCACAGC ^{6-FAM} R: CTGTCTTCTCTCTGCAACCA	60	0.749	6	0.778	0.780	0.003*
CL02	305-333	F: CCTCGATCCTCCTTGTGTTC ^{NED} R: TCAGTTCGGATAGCGATGC	60	0.483	5	0.593	0.545	-0.088
CL06	156-186	F: GAGCGTTGCAAGGAATTTCT ^{HEX} R: CGAAACTTGCATGCGGATA	58	0.561	7	0.519	0.598	0.133
CL20	111-127	F: ACCAATCTCAATCATCGAGC ^{6-FAM} R: GTGCGGGTGAATGTAGAGTT	58	0.652	6	0.778	0.702	-0.107
CL32	172-254	F: GTGAGAGTATGGAATGTAAC ^{HEX} R: TAGTCATGAAAATAGGAGTG	60	0.839	10	0.926	0.855	-0.083
CL39	130-148	F: GCAGCTGTTCTCTTGTGACT ^{NED} R: CAAGAATCCGTGACTTCATC	60	0.615	5	0.778	0.670	-0.161

Pb: tamanho de fragmento em pares de bases; T °C: temperatura de anelamento; PIC: conteúdo de informação polimórfica; A: número de alelos por loco; Heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E); FIS: índice de fixação.

*Valores significativos após a correção de Bonferroni (p<0,008).

Os resultados referentes a Heterozigosidade esperada (H_E) superaram os da observada (H_O) nos locos CL01 e CL06, sugerindo moderada deficiência de heterozigotos, conforme demonstram o índice de fixação ou coeficiente de endogamia (FIS), cujos valores foram positivos (> 0,00) (Tabela 2). Este índice pode variar de -1 a 1, sendo que valores negativos (-1 a 0) indicam maiores níveis de heterozigotos e acasalamento ao acaso, enquanto os positivos (0 a 1) referem-se a menores níveis de heterozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O loco CL01 apresentou desvios significativos para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) após a correção de Bonferroni, provavelmente influenciado pelo déficit heterozigótico. Como a presença de alelos nulos não foi reportada, o número relativamente baixo de indivíduos avaliados neste estudo pode explicar o desvio.

As estimativas de H_E para os demais locos variaram de 0,545 (CL02) a 0,855 (CL32), enquanto a H_O foi de 0,593 (CL02) a 0,926 (CL32). Estes resultados diferem dos reportados para o jatobá (*H. courbaril*) (Ciampi *et al.*, 2008) (Tabela 2), onde H_O ≥ H_E atribuído aos desvios significativos para EHW, em virtude da presença de alelos nulos. Já o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), que determina a representatividade do marcador molecular heterólogo, foi altamente informativo (PIC > 50%) para todos os locos, exceto para o loco CL02 (PIC = 48%), classificado como moderadamente informativo (Tabela 2).

De modo geral, os resultados obtidos a partir da amplificação heteróloga dos locos microssatélites de *C. langsdorffii* estão de acordo com os observados para espécies do mesmo gênero ou família de *C. multijuga* (Tabela 3). Neste sentido, este conjunto de locos apresentou polimorfismo considerável, sendo úteis para realização de estudos populacionais da copaíba.

Tabela 3. Comparativo das estimativas de diversidade genética de espécies de *Copaifera* L. e de outras filogeneticamente relacionadas, obtidas a partir de marcadores microssatélites

Table 3. Comparative genetic diversity estimates of *Copaifera* L. species and other phylogenetically related species obtained from microsatellite markers

Espécie	N	Nº locos	Nº alelos	A/L	Ho	He	Referência
<i>Hymenaea courbaril</i>	41	9	97	10,8	0,687	0,836	Ciampi <i>et al.</i> , (2008)
<i>Hymenaea estinocarpa</i>	40	7	45	6,4	0,389	0,389	Ciampi <i>et al.</i> , (2008)
<i>Hymenaea courbaril</i> var. <i>stilbocarpa</i>	79	6	65	13,2	0,607	0,607	Feres <i>et al.</i> , (2009)
<i>Copaifera langsdorffii</i>	53	8	125	13	0,732	0,732	Antiqueira <i>et al.</i> , (2014)
<i>Copaifera reticulata</i>	136	6	67	11,2	0,452	0,452	Silva <i>et al.</i> , (2012)
<i>Copaifera multijuga</i>	27	6	39	6,5	0,729	0,692	Presente estudo

N: número amostral; A/L: número de alelos por loco; Heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He)

4. Conclusão

Os locos microssatélites de *C. langsdorffii* apresentaram percentuais satisfatórios de transferibilidade para *C. multijuga*, com perfil de amplificação consistentes e níveis de polimorfismo aplicáveis em estudos de genética populacional de *C. multijuga*, caracterização do sistema reprodutivo e afins. Dada a amplitude amostral, estudos futuros para a caracterização da diversidade genética dessa espécie devem priorizar um maior número de indivíduos e populações.

Referências

- ANTIQUEIRA, L. M. O. R.; SOUZA, R. G. V. C.; BAJAY, M. M.; KAGEYAMA, P. Y. Genetic structure and diversity of *Copaifera langsdorffii* Desf. in Cerrado fragments of the São Paulo State, Brazil. **Revista Árvore**, v. 38, n. 4, p. 667-675, 2014. DOI: 10.1590/S0100-67622014000400010.
- BILLOTTE, N.; COUVREUR, T.; MARSEILLAC, N.; BROTTIER, P.; PERTHUIS, B.; VALLEJO, M.; NOYER, J. L.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P.; RISTERUCCI, A. M.; PINTAUD, J. C. A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth); characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 4, p. 580-582, 2004. DOI:10.1111/j.1471-8286.2004.00741.x.
- BORÉM, A; CAIXETA, E. T (Eds.). **Marcadores Moleculares**. 2. ed. Brasília: Universidade Federal de Viçosa, 2016. 385p.
- BUTLER, John M. et al. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis*, v. 25, n. 10-11, p. 1397-1412, 2004.
- BUTLER, J. M.; BUEL, E.; CRIVELLENTI, F.; MCCORD, B. R. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 1011, p. 1397-1412, 2004. doi:10.1002/elps.200305822.
- CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C. R.; GAIOTTO, F. A.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 5, p.1074-1077, 2008. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2008.02159.x

- CIAMPI, A. Y; BRONDANI, R. P. V; GRATTAPAGLIA, D. **Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco e desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorffii* Desf. (Copaiba)-Leguminosae-Caesalpinoideae**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 40p.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of freshleaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.
- FERES, J. M.; GUIDUGLI, M. C.; MESTRINER, M. A.; SEBBENN, A. M.; CIAMPI, A. Y.; ALZATE-MARIN, A. L. Microsatellite diversity and effective population size in a germplasm bank of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Leguminosae), an endangered tropical tree: recommendations for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 56, n. 6, p. 797-807, 2009. DOI: 10.1007/s10722-008-9402-2.
- FORTES, A. C. R.; OLIVEIRA, M. S. P.; OLIVEIRA, N. P.; SANCHES, E. N. M.; CUNHA, E. F. M. Transferibilidade de locos microssatélites desenvolvidos em outras espécies de palmeiras para *Astrocaryum vulgare* Mart. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 59, n. 1, p. 80-86, 2016. DOI: 10.4322/rca.1844.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to conservation genetics**. 2. nd. Cambridge University Press, 2010. 1210p.
- FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.
- GOUDET, J. FSTAT, program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Disponível em: <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Acesso em: 15 jan. 2022.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2021 Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. Disponível em: (<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2021>). Acesso em 19 dez. 2022.
- MARTINS-DA-SILVA, R. C, V.; PEREIRA, J, F.; LIMA, H. C. O gênero *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinoideae) na Amazônia brasileira. **Rodriguésia**, v. 59, n. 3, p. 455-476, 2008. DOI: 10.1590/2175-7860200859304.
- OLIVEIRA, L. C; RODRIGUES, D. P.; HOPKINS, M. J. G. Comparação de seis protocolos de extração de DNA para análises moleculares em espécies de Fabaceae. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 3, p. 38-45, 2017.
- PEAKALL, R.; SMOUSE P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A; SOTHERS, C. A; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; *et al.* 1999. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1999. 816p.
- RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223-225, 1989. DOI: 10.2307/2409177.
- SEBBENN, A. M; CARVALHO, A. C. M; FREITAS, M. L. M; MORAES, S. M. B; GAINO, A. P. S. C; SILVA, J. M; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, v. 106, n. 1, p.134-145, 2011. DOI: 10.1038/hdy.2010.33.

SILVA, E. S.; MATHIAS, C. D. S.; LIMA, M. C. F.; JUNIOR, V. F. D. V.; RODRIGUES, D. P.; CLEMENT, C. R. Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 47, n. 11, p. 1621-1628, 2012. DOI: 10.1590/S0100-204X2012001100009.

SILVA, L. P.; MAROSTEGA, T. N.; GILIO, T. A. S.; SERAFIM, M. E.; ARAÚJO, K. L.; NEVES, L. G. Transferibilidade de marcadores microssatélites para espécies silvestres de maracujazeiro. **Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 62, p. 1-6, 2019. DOI: 10.22491/rca.2019.2914.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. (Eds.). **Marcadores moleculares na Era Genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181p.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D.P.; SHIPLEY, P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.

Author contribution:

Os autores Raquel da Silva Medeiros e Antonio Saulo Cunha Machado idealizaram e contextualizaram o presente estudo; Raquel da Silva Medeiros e Moisés Teixeira Rolim coletaram as amostras; Rayssa Gomes Vasconcelos e Moisés Teixeira Rolim realizaram as análises de laboratório e geraram os dados genéticos; Antonio Saulo Cunha Machado e Rayssa Gomes Vasconcelos realizaram as análises de bioinformática; Paulo de Tarso Barbosa Sampaio, Jacqueline da Silva Batista e Raquel da Silva Medeiros foram orientadores de Moisés Teixeira Rolim; Moisés Teixeira Rolim escreveu a primeira versão do manuscrito; Rayssa Gomes Vasconcelos escreveu o manuscrito final. Todos os autores revisaram e aprovaram o manuscrito. Raquel da Silva Medeiros liderou a equipe nessa pesquisa.

Acknowledgment

Agradecemos a José Edmilson da Costa Souza (Movido) pelo importante apoio nas coletas. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa concedida a Rayssa Gomes Vasconcelos. Ao Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) e a Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA) pela bolsa concedida a Antonio Saulo Cunha Machado. A infraestrutura do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) onde essa pesquisa foi realizada.

Financing Sources

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio do Governo do Estado do Amazonas por meio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (Chamada Universal Amazonas - Edital 006/2019; Processo: 062.00247/2020, coordenação: Raquel da Silva Medeiros). Do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Chamada MCTIC/CNPq 28/2018 - Universal; Processo: 428261/2018; coordenação: Raquel da Silva Medeiros). Do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) e da Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA) (Pronametro - Edital 01/2019; coordenação: Antonio Saulo Cunha Machado).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Associate Editor

Luciana da Silva Borges

ORIGINAL ARTICLE

