

Transferibilidade de marcadores microssatélites de *Vochysia ferrugínea* Mart. para *Vochysia divergens* Pohl.

Transferability from microsatellites from *Vochysia ferrugínea* Mart. to *Vochysia divergens* Pohl.

DOI:10.34117/bjdv7n3-213

Recebimento dos originais: 08/02/2021

Aceitação para publicação: 01/03/2021

Kelli Évelin Muller Zortéa

Doutoranda em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, PPG-BIONORTE
Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado – UNEMAT,
Campus de Alta Floresta, Mato Grosso, Brasil
Av. Perimetral Rogério Silva, s/n, Jardim Flamboyant, CEP 78580-000, Alta Floresta,
MT
E-mail: kellimullerz@gmail.com

Ana Aparecida Bandini Rossi

Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas
Universidade do Estado de Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado – UNEMAT,
Faculdade de Ciências Biológicas e Agrárias, Campus de Alta Floresta, Mato Grosso,
Brasil. PGMP. PPGBioAgro. PPGBionorte/MT
Av. Perimetral Rogério Silva, s/n, Jardim Flamboyant, CEP 78580-000, Alta Floresta,
MT
E-mail: anabanrossi@unemat.br

Nilo Leal Sander

Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal
Instituto Brasileiro de Desenvolvimento e Sustentabilidade - IABS, Brasil
Centro Universitário Alves Faria - UNIALFA
E-mail: nilosander@gmail.com

Carolina Joana da Silva

Doutora em Ecologia e Recursos Naturais
Universidade do Estado do Mato Grosso Carlos Alberto Reyes Maldonado – UNEMAT,
Campus de Cáceres, Mato Grosso, Brasil
Avenida Tancredo Neves, 1095 - Cavahada III, CEP: 78217-900, Cáceres, MT
E-mail: carolina.silva@unemat.br

RESUMO

Vochysia divergens Pohl. ou cambará, como é popularmente conhecida, é a espécie madeireira mais importante para o aproveitamento racional no Pantanal. No entanto, estudos sobre diversidade genética dessa espécie e do gênero, são escassos. Os marcadores moleculares microssatélites são considerados altamente eficientes para análises de diversidade genética, no entanto, por serem específicos, seu desenvolvimento gera altos custos e despendem muito tempo e mão-de-obra qualificada. Uma alternativa ao uso de SSR em espécies relacionadas é a transferibilidade desses marcadores. Neste sentido, o

objetivo do estudo foi avaliar a transferibilidade de marcadores microssatélites, desenvolvidos para *Vochysia ferrugínea*, em *V. divergens*. Os testes de transferibilidade foram realizados em 13 indivíduos de *V. divergens* amostrados do estado de Mato Grosso, Brasil. Para os testes de amplificação via reação em cadeia da polimerase foram testados dez loci microssatélites desenvolvidos para *V. ferrugínea*. A partir dos resultados das amplificações, obteve-se o número de alelos por locus, a heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), o conteúdo de informação polimórfica (PIC) e a frequência dos alelos por locus. Dos dez loci microssatélites testados, oito amplificaram DNA de *V. divergens*, sendo todos polimórficos. Um total de 29 alelos foram amplificados, com média de 3,62 alelos por locus. O PIC variou de 0,132 (A1-08) a 0,579 (A1-20), com média de 0,438 e cinco loci foram considerados altamente informativos. A heterozigosidade esperada foi maior do que a observada para todos os loci analisados. O locus A1-39 apresentou o maior número de alelos e três, dos seis alelos raros encontrados nas análises. Os resultados preliminares para as medidas de diversidade genética deste estudo, indicam que os oito marcadores microssatélites transferidos para *V. divergens* tem potencial para aplicação em futuros estudos de diversidade genética da espécie.

Palavras-chave: Cambará, amplificação heteróloga, SSR, Diversidade genética.

ABSTRACT

Vochysia divergens Pohl. or cambará, as it is popular known, is the most important timber species for rational use in Pantanal. However, studies about genetic diversity of this species and gender, are scarce. The microsatellite molecular markers are considered highly efficient to genetic diversity analysis, therefore, for being specific, its development generates high costs and demand a long time and qualified labor. An alternative to the use of SSR in related species is the transferability of these markers. In this sense the aim of the study was to evaluate the microsatellite markers transferability, developed to *Vochysia ferrugínea*, in *V. divergens*. The transferability tests were conducted in 13 individuals of *V. divergens* sampled in the state of Mato Grosso, Brazil. For the tests of amplification via polymerase chain reaction were tested ten microsatellites loci developed to *V. ferrugínea*. From the amplification results we obtained the number of alleles by locus, the expected (H_e) and observed (H_o) heterozygosity, the polymorphic information content (PIC) and the alleles frequency by locus. Of the ten tested microsatellites, eight amplified *V. divergens* DNA, all of them being polymorphic. A total of 29 alleles were amplified, with the average of 3.62 alleles by locus. The PIC varied from 0.132 (A1-08) to 0.579 (A1-20), with the average of 0.438 and five loci were considered highly informative. The expected heterozygosity was higher than the observed to all analyzed loci. The locus A1-39 presented the highest number of alleles and three, out of the six rare alleles found in analysis. The preliminary results for the measures of genetic diversity of this study, indicate that eight microsatellite markers transferred to *V. divergens* has potential to application in future studies of the species genetic diversity.

Key words: Cambará, heterologous amplification, SSR, Genetic Diversity.

1 INTRODUÇÃO

A diversidade genética é avaliada através das características agronômicas, morfológicas, moleculares, entre outras, e as informações obtidas com as avaliações, são expressas em medidas de dissimilaridade que representam a diversidade no conjunto de populações e genótipos estudados (CRUZ et al., 2011). Vários marcadores moleculares estão disponíveis para a caracterização molecular da diversidade, dentre eles, os microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeat*). Estes marcadores moleculares constituem em um par de *primers* complementares às sequências que flanqueiam os microssatélites. A variação é observada pela diferença no tamanho dos produtos amplificados por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) devido a ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do microssatélite, gerado por *crossing-over* desigual ou por erros da DNA polimerase durante a replicação (KALIA, et al., 2011; CAIXETA et al., 2016).

Os marcadores microssatélites são considerados altamente eficientes para análises de diversidade genética por possuírem herança codominante, serem altamente variáveis, multialélicos e reproduzidos via PCR (CAIXETA et al., 2016; AIELLO et al., 2020). A principal restrição ao uso desse tipo de marcador é a falta de iniciadores disponíveis para todas as espécies, uma vez que o mesmo é específico (ARNOLD et al., 2002). Aliado a este aspecto, está a demora e o alto custo despendido para identificar regiões microssatélites e desenvolver os iniciadores (SQUIRRELL et al., 2003). Ao mesmo tempo, muitos laboratórios não têm recursos e equipe qualificada para o isolamento e caracterização de novos iniciadores (ARNOLD et al., 2002).

Uma solução possível, neste caso, é a utilização de iniciadores desenvolvidos para espécies correlacionadas (FASANELLA et al., 2019; AIELLO et al., 2020). Essa técnica é denominada de transferibilidade ou amplificação heteróloga (VARSHNEY et al., 2005; BRAVO et al., 2006) e é possível por que as regiões flanqueadoras dos microssatélites geralmente são conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie ou gêneros próximos (ARNOLD et al., 2002; CAIXETA et al., 2016).

Vochysia divergens Pohl., conhecida popularmente como cambará (LORENZI, 2008; FLORA DO BRASIL, 2020, em construção), é a espécie madeireira mais importante para o aproveitamento racional no Pantanal (OLIVEIRA et al., 2018), onde forma grandes aglomerados monodominantes chamados de cambarazais (POTT et al., 2011). No entanto, não existem estudos sobre a diversidade genética dessa espécie, e tão pouco, marcadores moleculares microssatélites específicos que permitam tais estudos. Os únicos marcadores

microssatélites específicos para espécies do gênero *Vochysia* foram desenvolvidos para *Vochysia ferrugínea* Mart. por Lowe et al. (2002). A transferibilidade destes marcadores já foi realizada para outras espécies do gênero com êxito, entre elas *Vochysia guatemalensis* Donn. Smith (ROJAS et al., 2011) e *Vochysia bifalcata* Warm. (VIANA, 2015). No entanto, ainda não existem informações de transferibilidade para *Vochysia divergens*, que possibilitariam estudos de diversidade e estrutura genética para a espécie.

Diante deste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a transferibilidade de marcadores microssatélites, desenvolvidos para a espécie *Vochysia ferrugínea*, em *Vochysia divergens*, visando seu emprego em análises de diversidade genética.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Foram selecionados 13 indivíduos de *V. divergens* em cinco populações naturais, distribuídas em três biomas, no estado de Mato Grosso, Brasil (Tabela 1). Folhas saudáveis e em estágio intermediário de desenvolvimento foram coletadas de cada indivíduo e ainda em campo foram identificadas e armazenadas em sacos plásticos contendo sílica gel.

Tabela 1. Identificação dos indivíduos de *Vochysia divergens* utilizados no estudo.

ID*	Município	Bioma**	Coordenadas
VD1	Cáceres, MT	Pantanal	16W 03' 10", 57S 41' 26"
VD2	Cáceres, MT	Pantanal	16W 02' 11" 57S 42' 57"
VD3	Cáceres, MT	Pantanal	16W 01' 58" 57S 43' 09"
VD4	Lucas do Rio Verde, MT	Cerrado	13W 03' 17", 55S 54' 02"
VD5	Lucas do Rio Verde, MT	Cerrado	13W 04' 45, 55S 52' 43"
VD6	Cotriguaçu, MT	Amazônia	9W 53' 05", 58S 13' 56"
VD7	Cotriguaçu, MT	Amazônia	9W 53' 45", 58S 14' 14"
VD8	Cotriguaçu, MT	Amazônia	9W 54' 54", 58S 13' 52"
VD9	Alta Floresta, MT	Amazônia	9W 38' 38", 55S 59' 34"
VD10	Alta Floresta, MT	Amazônia	9W 38' 19", 55S 58' 42"
VD11	Nova Canaã do Norte, MT	Amazônia	10W 41' 32", 55S 56' 52"
VD12	Nova Canaã do Norte, MT	Amazônia	10W 41' 29", 55S 56' 55"
VD13	Nova Canaã do Norte, MT	Amazônia	10W 41' 47", 55S 57' 30"

* ID = identificação do indivíduo de *Vochysia divergens*; **Delimitação dos biomas conforme MMA (2020).

2.2 AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

O DNA foi extraído e purificado usando o protocolo CTAB (Brometo de Cetil-Trimetil Amônio) descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações para a espécie: aumento da concentração de CTAB de 2% para 5% e de β -mercaptoetanol de 0,2% para 1,6% no tampão de extração; adição de 2 % polivinilpirolidona (PVP) e de 0,4% de proteinase K no tampão de extração; redução do tempo de incubação em banho-maria de 60' para 5', mantendo a temperatura de 65°C. A verificação da qualidade e da quantidade de DNA genômico extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% e por comparação com marcador de peso molecular conhecido DNA λ 100 ng μL^{-1} . Em seguida, as amostras de DNA foram diluídas em água ultrapura para concentração de 10 ng μL^{-1} .

Foram testados 10 loci microsatélites desenvolvidos por Lowe et al. (2002) para *V. ferrugínea* na amplificação de *V. divergens*. Primeiramente, foi realizado um teste de amplificação em 3 indivíduos e a partir dos resultados foram realizadas as amplificações em todos os indivíduos.

Para as amplificações via reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizou-se protocolo descrito para *V. ferrugínea* por Lowe et al. (2002), com modificações na concentração de DNA e no tampão. As amplificações foram realizadas em termociclador Mastercycler Nexus Eppendorf® em volume final de 15 μL contendo: 3 μL de tampão 5x GoTaq®, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,2 μM de cada primer, 2% de DMSO, 0,5 U de Taq DNA polimerase, 10 ng de DNA e água Milli-Q autoclavada. Utilizou-se o programa de amplificação descrito por Lowe et al. (2002), com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos; um programa touchdown de 95 °C por 15 s, 65 °C por 25 s e 72 °C por 35 s por 11 ciclos, em que a temperatura de anelamento diminuiu 1 °C por ciclo; seguido de 25 ciclos com temperatura de anelamento de 55 °C e uma extensão final de 15 minutos a 72 °C.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5% em tampão de corrida TBE 1X (Tris, ácido bórico e EDTA) a 80 volts por aproximadamente quatro horas. Posteriormente, os géis foram corados com de brometo de etídio (0,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$), fotografados sob luz ultravioleta com auxílio de transiluminador LTB – 20x20 STi Loccus Biotecnologia® e documentados utilizando o sistema LPix-STi Loccus Biotecnologia®. A eletroforese em gel foi utilizada para avaliar o número e tamanho dos fragmentos amplificados, bem como a detecção de polimorfismo e determinar a genotipagem dos indivíduos. O tamanho dos fragmentos foi mensurado através da comparação com DNA ladder 100 pb (Cellco) com auxílio do programa LabImage®.

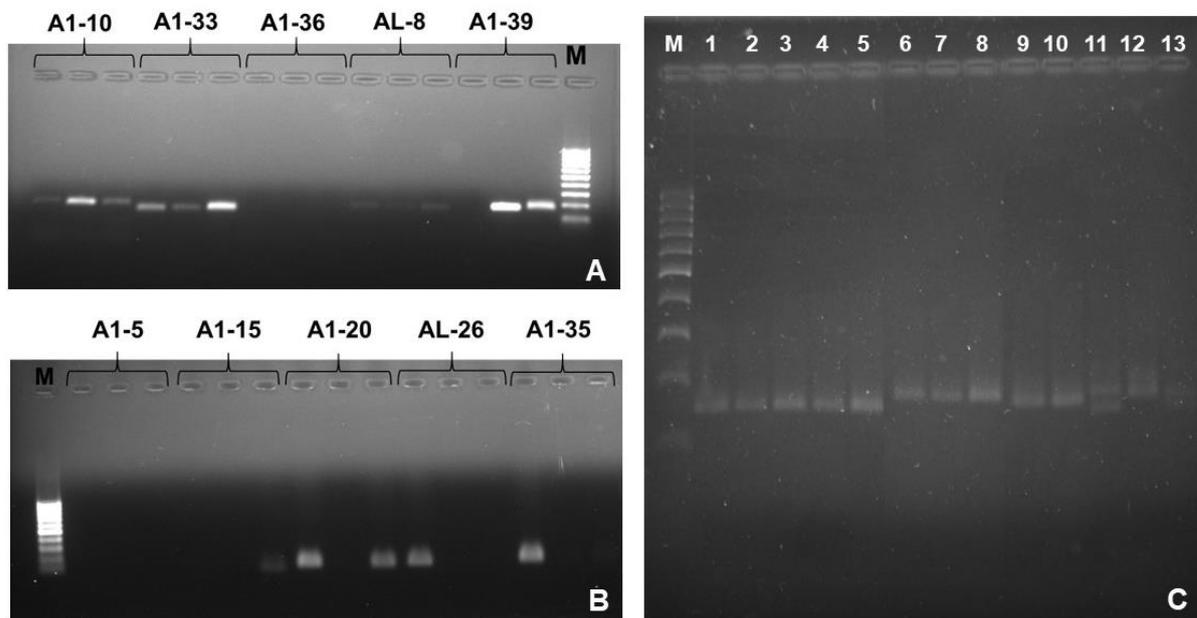
2.3 ANÁLISE DOS DADOS

Foram realizadas as análises de variabilidade genética dos loci microssatélites, utilizando o programa Power Marker (LIU; MOUSE, 2005). Obteve-se o número de alelos por locus, a heterozigosidade esperada (*He*) e observada (*Ho*) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC). Também foi calculada a frequência dos alelos para cada locus com o auxílio do suplemento do Excel GenAlEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2006, 2012), a fim de verificar a presença de alelos raros.

3 RESULTADOS

Dos dez loci microssatélites testados, oito amplificaram DNA de *V. divergens* no primeiro teste realizado sem apresentar produtos secundários (Figura 1A e B). Estes loci foram amplificados nos 13 indivíduos selecionados, sendo todos polimórficos (Figura 1C e Tabela 2). O tamanho dos produtos amplificados por esses marcados para *V. divergens* também está apresentado na Tabela 2.

Figura 1. Amplificação heteróloga de 10 microssatélites em *Vochysia divergens*. A e B: Teste inicial com os 10 loci microssatélites em três indivíduos (Gel de agarose 1%). C: Padrão de amplificação em 13 indivíduos para o locus A1-26 (Gel de agarose 2,5%). M: Marcador DNA Ladder 100 pb Cellco.



Fonte: os autores.

Os oito loci amplificaram um total de 29 alelos, com média de 3,62 alelos por locus. O PIC variou de 0,132 (A1-08) a 0,579 (A1-20), com média de 0,438. A heterozigosidade esperada foi maior do que a observada para todos os loci analisados (Tabela 2).

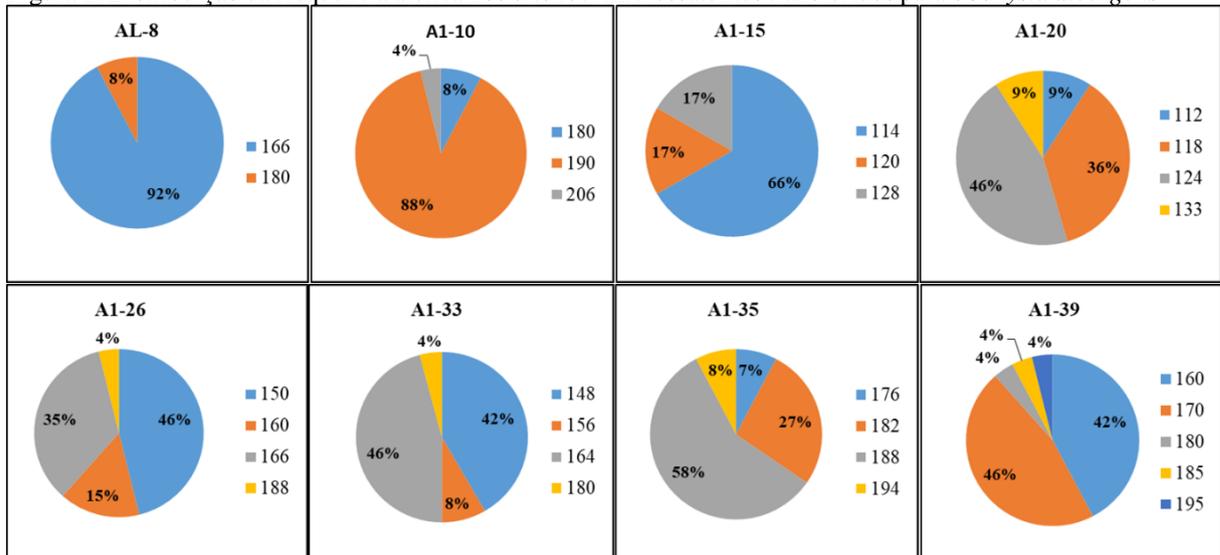
Tabela 2. Diversidade genética para os oito loci microssatélites em *Vochysia divergens*.

Locus	Repetição microssatélite	Tamanho dos produtos ¹	N	NA	PIC	He	Ho
AL-8	(GA) ₁₀	166-180 (162)	13	2	0,132	0,142	0,000
A1-10	(GA) ₁₃	180-190 (194)	13	3	0,198	0,210	0,077
A1-15	(GA) ₁₂	114-128 (92)	9	3	0,499	0,500	0,111
A1-20	(GT) ₈ GAGT(GA) ₁₂	112-133 (109)	11	4	0,579	0,645	0,182
A1-26	(GA) ₁₀ AA(GA) ₉	150-188 (192)	13	4	0,574	0,642	0,231
A1-33	(GA) ₁₅	148-188 (148)	12	4	0,528	0,608	0,083
A1-35	(GA) ₁₇	160-194 (170)	13	4	0,525	0,583	0,231
A1-39	(GA) ₅ GG(GA) ₆ GG(GA) ₆	160-190 (199)	13	5	0,524	0,603	0,231
Média		-	12,13	3,62	0,438	0,492	0,143

N: Número de indivíduos usados na análise; NA: Número de alelos; PIC: Conteúdo de Informação Polimórfica; He: Heterozigosidade esperada; Ho: Heterozigosidade observada. ¹O número entre parênteses corresponde ao tamanho do fragmento encontrado por Lowe et al. (2002).

O locus A1-39 apresentou o maior número de alelos e também a maioria dos alelos raros, enquanto o AL-8 foi o locus que apresentou o menor número de alelos, conforme pode ser verificado na Figura 2. Alelos raros foram observados também nos loci A1-10, A1-26 e A1-33.

Figura 2. Distribuição da frequência alélica nos oito loci microssatélites transferidos para *Vochysia divergens*.



Fonte: os autores.

4 DISCUSSÃO

Dos dez loci testados, apenas dois não amplificaram regiões do genoma de *V. divergens*. A ausência de amplificação desses loci pode estar relacionada com mutações na

região flanqueadora dos microssatélites. De acordo com Callen et al. (1993) mutações na região de ligação dos iniciadores inibem seu anelamento, impedindo a amplificação dos produtos de PCR, o que caracteriza os alelos nulos. Alelos nulos são comuns tanto em indivíduos da mesma espécie quanto em indivíduos de espécies distintas, sendo que, em estudos com espécies diferentes espera-se que a quantidade de alelos nulos aumente proporcionalmente à distância taxonômica (ROBINSON; HARRIS, 1999).

O número médio de alelos por locus encontrado neste estudo (3,62) foi similar ao encontrado por Lowe et al. (2002) em *V. ferrugínea*, onde esses autores verificaram média de 3,90 alelos por locus. Outros autores encontraram médias superiores às relatadas neste estudo usando os mesmos marcadores. Viana (2015) encontrou média de 4,85 alelos por locus em *Vochysia bifalcata* Warm., enquanto Rojas et al. (2011), obtiveram média de 6,25 alelos por locus.

O locus mais polimórfico neste estudo foi o A1-39, com cinco alelos e o menos polimórfico foi o AL-8, com dois alelos. Esses resultados diferem dos encontrados por Lowe et al. (2002) para *Vochysia ferrugínea*, quando selecionaram esses microssatélites, onde esses loci não apresentaram polimorfismo, amplificando apenas um alelo cada. O A1-20 foi o locus mais polimórfico no trabalho de Lowe et al. (2002), com sete alelos e neste estudo apresentou o mesmo polimorfismo que os loci A1-26, A1-33 e A1-35, com quatro alelos cada. Os loci A1-20 e A1-35 também apresentaram quatro alelos em um estudo realizado por Rojas et al. (2007) em *Vochysia guatemalensis* Donn. Sm. e foram considerados os mais polimórficos para a espécie.

O tamanho dos alelos encontrados neste estudo está próximo aos tamanhos relatados por Lowe et al. (2002), conforme verifica-se na Tabela 1, sendo que os loci A1-15 e A1-26 apresentaram os tamanhos mais distantes do esperado. Em um estudo para estimar a diversidade genética de *Vochysia guatemalensis*, Rojas et al. (2011) encontraram amplitudes semelhantes à deste estudo no tamanho dos alelos para os loci A1-15 (97-124) e A1-35 (160-184). Variações no tamanho dos alelos estão relacionadas com a ocorrência de diferentes números de unidades repetitivas dentro da estrutura do microssatélite (ROBINSON; HARRIS, 1999), geradas por erros da DNA polimerase durante a replicação (*slippage*) e por *crossing-over* desigual (STRAND et al., 1993; JARNE; LAGODA, 1996). Essas variações acumulam-se mais rapidamente do que as mutações de ponto e as mutações de inserção e deleção (CAIXETA et al., 2016). De acordo com Bravo et al. (2006) o número de repetições, ou seja, o tamanho dos alelos, bem como o nível de polimorfismo podem

variar muito entre as espécies para as quais os marcadores foram desenvolvidos e as espécies para os quais foram transferidos.

O polimorfismo em loci microssatélites, como já foi demonstrado, depende da variação no número de unidades repetitivas. De acordo com Caixeta et al. (2016) as diferentes repetições de microssatélites existentes podem ser classificadas em simples, composta, perfeitas e imperfeitas. Conforme Rai et al. (2017), a taxa de mutação nas repetições de sequência curta é mais alta, sendo que microssatélites de repetição de dinucleotídeos são mais variáveis do que os de repetições de tri-nucleotídeos, tetra-nucleotídeos ou marcadores SSR compostos e imperfeitos. Os *primers* transferidos para *V. divergens* neste estudo amplificam microssatélites simples ou compostos perfeitos com repetição de dois nucleotídeos.

Com relação ao conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada locus, verificou-se que cinco loci foram altamente informativos, dois foram mediamente informativos e dois foram pouco informativos. Essa classificação é baseada na descrição de Botstein et al. (1980) que afirmam que para um locus ser considerado altamente informativo o PIC deve ter valor superior a 0,50. A estimativa do PIC é importante, pois é utilizada para a avaliação do poder discriminatório de um locus (REZENDE et al., 2009). De acordo com Rafalski et al. (1996) quanto mais informativo for o marcador, mais fácil se torna detectar um polimorfismo entre dois indivíduos avaliados. Esses resultados reforçam a eficiência da transferibilidade destes microssatélites e sua capacidade de acessar a diversidade genética em *V. divergens*. O nível de polimorfismo encontrado neste estudo indica que, em combinação, esses oito loci devem fornecer alta resolução para avaliar a diversidade e estrutura genética de *V. divergens*.

A heterozigiosidade esperada foi superior à observada para todos os loci analisados, demonstrando que a proporção de heterozigotos observada entre os treze indivíduos de *V. divergens* é menor do que o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esse resultado pode estar relacionado com o baixo número de indivíduos amostrados neste estudo, podendo ser diferente em estudos com amostragem maior. O baixo número de heterozigotos também pode ser atribuído à existência de alelos nulos (MIRANDA et al., 2012). Existem ainda outros fatores, segundo Wright (1965), que podem afetar o número de heterozigotos nas populações naturais, como o sistema de acasalamento e a história evolutiva das espécies.

Foram observados seis alelos raros distribuídos em oito loci. Os alelos são considerados raros quando apresentam frequência igual ou inferior a 0,05 (5%)

(SEBBENN, 2003). Os alelos raros são importantes para maximizar a proteção da diversidade genética pois indicam áreas prioritárias de conservação e manejo sustentado (MONTAGNA et al., 2012). Dessa forma, os marcadores transferidos para *V. divergens*, serão úteis em gerar dados que auxiliem futuros programas de conservação e manejo da espécie.

5 CONCLUSÃO

Dos dez loci microssatélites testadas neste estudo, oito foram transferidos com sucesso para *V. divergens* (AL-8, A1-10, A1-15, A1-20, A1-26, A1-33, A1-35 e A1-39) e são recomendados para análises de diversidade e estrutura genética da espécie.

Os valores preliminares encontrados para as medidas de diversidade genética neste estudo, indicam que os marcadores microssatélites de *V. ferrugínea* transferidos para *V. divergens* tem grande potencial para serem utilizados em futuros estudos moleculares da espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pelo financiamento do projeto de pesquisa do qual este trabalho faz parte (Projeto: Corredor ecológico, econômico e cultural do Rio Paraguai no contexto de mudanças climáticas no Pantanal. Processo n°: 0308817/2017).

REFERÊNCIAS

- AIELLO, D.; FERRADINI, N.; TORELLI, L.; VOLPI, C.; LAMBALK, J.; RUSSI, L.; ALBERTINI, E. Evaluation of Cross-Species Transferability of SSR Markers in *Foeniculum vulgare*. **Plants**, v. 9, n. 2, 175, 2020. DOI: 10.3390/plants9020175
- ARNOLD, C.; ROSSETTO, M.; MCNALLY, J.; HENRY, R. J. The application of SSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. **American Journal of Botany**, v. 89, n. 1, p. 22-28, 2002. DOI: 10.3732/ajb.89.1.22.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLMICK, H.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.
- BRAVO, J. P.; HOSHINO, A. A.; ANGELICI, C. M. L. C. D.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 516-524. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000300021>
- CAIXETA, E. T.; OLIVEIRA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BOREM, A.; CAIXETA, E. (eds.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2016. p. 9-93.
- CALLEN, D. F.; THOMPSON, A. D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H. A.; RICHARDS, R. I.; MULLEY, J. C.; SUTHERLAND, G. R. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, v. 52, p. 922-927, 1993.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 620p.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochem Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 11-15, 1987.
- FASANELLA, M.; SOUTO, C. P.; PREMOLI, A. C. Preliminary cross-genera transferability of SSRs among threatened South American Cupressaceae. **New Zealand Journal of Botany**, v. 58, n. 2, p. 153-166, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/0028825X.2019.1685552>
- FLORA DO BRASIL. Vochysiaceae. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB33324>>. Acesso em: 02 de julho de 2020.
- JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Tree**, v. 11, n. 10. p. 424-429, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10049-5](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5)
- KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309-334, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0286-9>

LIU, K.; MOUSE, S. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 2128-2129, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti282>

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. v. 1. 384p.

LOWE, A. J.; GOODALL-COPESTAKE, W. P.; CARON, H.; KREMER, A.; DECROOCQ, S. A set of polymorphic microsatellites for *Vochysia ferruginea*, a promising tree for land reclamation in the Neotropics. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 3, p. 209-210, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00192.x>

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Download de dados geográficos**. Disponível em: <http://mapas.mma.gov.br/i3geo/datadownload.htm>. Acesso em 13 de maio de 2020.

MIRANDA, F. D.; GONTIJO, A. B. P. L.; SANTILIANO, F. C.; FAVORETO, F. C. SOARES, T. C. B. Transferability and characterization of microsatellite markers in five Bromeliaceae species belonging to the subfamilies Pitcairnoideae and Bromelioideae. **Biota Neotropica**, v. 12, n. 3, bn02812032012, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032012000300032>

MONTAGNA, T.; FERREIRA, D. K.; STEINER, F.; FERNANDES, C. D.; BITTENCOURT, R.; SILVA, J. Z.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. A importância das unidades de conservação na manutenção da diversidade genética de xaxim (*Dicksonia sellowiana*) no estado de Santa Catarina. **Biodiversidade Brasileira**, v. 2, n. 2, p. 26-32, 2012.

OLIVEIRA, A. K. M.; ALVES, F. F.; FERNANDES, V. Germinação de sementes de *Vochysia divergens* após armazenamento em três ambientes. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 2, p. 525-531, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/1980509832035>

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: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>

PEAKALL, R.; SMOUSE P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012. DOI: [10.1093/bioinformatics/bts460](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460)

POTT, A.; OLIVEIRA, A. K. M.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A.; SILVA, J. S. V. Plant diversity of the Pantanal wetland. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 265-273, 2011. DOI: [10.1590/s1519-69842011000200005](https://doi.org/10.1590/s1519-69842011000200005)

RAI, M. K.; SHEKHAWAT, J. K.; KATARIA, V.; SHEKHAWAT, N. S. Cross species transferability and characterization of microsatellite markers in *Prosopis cineraria*, a multipurpose tree species of Indian Thar Desert. **Arid Land Research and Management**, v. 31, n. 4, p. 462-471, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/15324982.2017.1338791>

RAFALSKI, J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIREEN, B.; LAI, E.

(org.). **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. San Diego, Academic Press, 1996. p. 75-129.

REZENDE, R. K.; PAIVA, L. V.; PAIVA, R.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; TORGA, P. P.; MASETTO, T. E. Divergência genética entre cultivares de gérbera utilizando marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p. 2435-2440, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000176>.

ROBINSON, J. P.; HARRIS, S. A. Amplified fragment length polymorphisms and microsatellites: a phylogenetic perspective. In: GILLET, E. M. (ed.). **Which DNA marker for which purpose?** 1999. Disponível em <<http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>> Acesso em 06 de junho de 2020.

ROJAS, F.; MURILLO, O.; ARAYA, E.; AGUILAR, G.; ROCHA, O. Validación y adaptación de la técnica de microsatélites para el análisis genético de *Vochysia guatemalensis* Donn. Sm. **Foresta Veracruzana**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2007.

ROJAS, F.; MURILLO, O.; AGUILAR, G.; ROCHA, O.; ARAYA, E. Análisis genotípico en *Vochysia guatemalensis* Donn Smith (Vochysiaceae) mediante microsatélites. **Revista Floresta Mesoamericana Kurú**, v. 8, n. 20, p. 9-10, 2011.

SEBBENN, A. M. Número de populações para conservação genética *in situ* de espécies arbóreas. **Revista do Instituto Florestal**, v. 15, n. 1, p. 45-51, 2003.

SQUIRRELL, J.; HOLLINGSWORTH, P. M.; WOODHEAD, M.; RUSSELL, J.; LOWE, A. J.; GIBBY, M.; POWELL, W. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? **Molecular Ecology**, v. 12, n. 6, p. 1339-1348, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-294x.2003.01825.x.

STRAND, M.; PROLLA, T. A.; LISKAY, R. M.; PETES, T. D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, v. 365, 6443, p. 274-276, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1038/365274a0>

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite makers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.005>

VIANA, L. S. Caracterização da diversidade genética de duas populações naturais de *Vochysia bifalcata* Warm no Parque Nacional do Caparaó/ES. **Nucleus**, v. 12, n. 1, p. 173-179, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3738/1982.2278.1159>

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-Statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, n. 3, p. 395-420, 1965. DOI: 10.2307/2406450