



BETTY ALESSANDRA DEL MILAGRO RIVERA AYASTA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS
MICROSSATÉLITES A PARTIR DO GENOMA DE *Handroanthus*
impetiginosus (Mart. ex DC) Mattos**

**LAVRAS-MG
2022**

BETTY ALESSANDRA DEL MILAGRO RIVERA AYASTA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS
MICROSSATÉLITES A PARTIR DO GENOMA DE *Handroanthus impetiginosus*
(Mart. ex DC) Mattos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Evandro Novaes
Orientador

**LAVRAS-MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Ayasta, Betty Rivera.

Desenvolvimento e caracterização de locos microssatélites
a partir do genoma de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex
DC) Mattos / Betty Rivera Ayasta. - 2022.

44 p. : il.

Orientador(a): Evandro Novaes.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal
de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Ipê-roxo. 2. Sequência simples repetidas (SSR). 3.
Diversidade Genética. I. Novaes, Evandro. II. Título.

BETTY ALESSANDRA DEL MILAGRO RIVERA AYASTA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS MICROSSATÉLITES A PARTIR DO GENOMA DE *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC) Mattos

CHARACTERIZATION OF MICROSATELLITE LOCUS AND DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS FROM THE GENOME OF *Handroanthus impetiginosus* (MART. EX DC) MATTOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de Março de 2022.
Dr. Dulcinea De Carvalho UFLA
Dr. Rosane Garcia Collevatti UFG

Prof. Dr. Evandro Novaes
Orientador

**LAVRAS-MG
2022**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e à vida, pela oportunidade que me foi dada.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

À Organização dos Estados Americanos (OEA)

Ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB)

Ao meu orientador Evandro Novaes, pela paciência, compreensão e apoio com esse trabalho.

Ao doutorando António, pela ajuda no desenvolvimento nesse trabalho.

Aos meus amigos do curso e trabalho que me auxiliaram de alguma forma nessa trajetória, principalmente com o entendimento de uma nova língua. A Kátia, Carlos, Danylo, Marcelo, Lorena, eu agradeço demais ter conhecido a vocês.

Agradeço também ao técnico Rafael quem me ajudou em todo o processo de desenvolvimento no laboratório de biologia molecular.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta somaram comigo para o desenvolvimento do mestrado e realização deste trabalho.

RESUMO

O ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*) é uma espécie florestal nativa da mata atlântica com alto potencial econômico devido à durabilidade e densidade da sua madeira, bem como ao seu elevado valor paisagístico pelas suas inflorescências. No entanto, a espécie vem sendo explorada ilegalmente e não possui um plano de manejo. O ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*) ainda não possui marcadores microssatélites desenvolvidos o que limita as possibilidades de estudos de genética seja em populações naturais ou em eventuais populações para melhoramento da espécie. Desta forma, este trabalho tem o objetivo de identificar e caracterizar os locos microssatélites no genoma de *H. impetiginosus*, bem como desenvolver marcadores microssatélites para a espécie. Para caracterizar e desenvolver os microssatélites de *H. impetiginosus* foram utilizadas as sequências do genoma da espécie, disponível no Banco do NCBI. As sequências foram submetidas ao programa MISA, que localiza e classifica os microssatélites quanto ao tipo e número de repetições. No genoma do ipê-roxo, foram detectadas 85.473 regiões microssatélites, sendo 53% mononucleotídeos, 36% dinucleotídeos, 5% trinucleotídeos, 1% tetranucleotídeos e 5% compostos. O tipo de motivo dinucleotídeos mais frequente foi AT/AT com 45% e de trinucleotídeos foi o AAT/ATT com 21%. A maioria dos microssatélites foi localizada em regiões intergênicas (86%), seguida de íntrons (12%). Primers foram desenhados para os 50 locos di- e tri-nucleotídeos intergênicos mais longos. Os primers foram utilizados em reações em cadeia da polimerase (PCR) e a qualidade das ampliações foi verificada em gel de agarose. Os 20 locos com melhores resultados tiveram um de seus primers marcados com fluoróforos (6-FAM, NED ou JOE) para genotipagem de alta resolução via eletroforese capilar. Esses 20 locos foram avaliados em uma triagem com cinco amostras de *H. impetiginosus*. Os nove melhores locos polimórficos foram selecionados para a genotipagem final em uma amostra de 20 indivíduos de *H. impetiginosus*. Nessa genotipagem obteve-se uma média de 7.89 alelos por loco, heterozigidade observada de 0.72 e esperada de 0.78. A transferabilidade desses nove locos também foi testada em nove amostras de *Handroanthus serratifolius* e oito amostras de *Handroanthus ochraceus*. Desses nove locos, sete amplificaram em *H. serratifolius* e quatro em *H. ochraceus*. A transferabilidade dos locos também foi avaliada em *Tabebuia roseo-alba* e *T. aurea*, mas nenhum deles amplificou. Entre as espécies genotipadas com sucesso foram identificados 54, 41 e 17 alelos privados em *H. impetiginosus*, *H. serratifolius* e *H. ochraceus*, respectivamente. De forma geral, os marcadores microssatélites desenvolvidos nesse trabalho em *H. impetiginosus* permitem a análise da diversidade genética não somente nessa espécie como também em *H. serratifolius* e *H. ochraceus*.

Palavras-chave: Ipê-roxo. Sequência simples repetidas (SSR). Diversidade Genética. Eletroforese capilar.

ABSTRACT

The pink ipê (*Handroanthus impetiginosus*) is a native forest species of the Atlantic Forest with high economic potential due to the durability and density of its wood, as well as its high landscape value because of the beauty of its inflorescences. However, the species has been illegally exploited and has no management plan. The pink ipê (*Handroanthus impetiginosus*) does not have microsatellite markers developed yet, which limits the possibilities of genetic studies either in natural or in eventual breeding populations. The objective of this work is to identify and characterize the microsatellite loci in the genome of *H. impetiginosus*, as well as to develop microsatellite markers for the species. The genome sequences of *H. impetiginosus*, available in the NCBI Bank, were analyzed in the MISA program, which locates and classifies the microsatellites according to the type and number of repetitions. In the pink ipê genome, 85,473 microsatellite regions were detected, of which 53% were mononucleotides, 36% dinucleotides, 5% trinucleotides, 1% tetranucleotides and 5% compounds. The most frequent dinucleotide motif type was AT/AT with 45% and of trinucleotides was AAT/ATT with 21%. Most microsatellites were in intergenic regions (86%), followed by introns (12%). Primers were designed for the 50 longest intergenic di- and tri-nucleotide loci. The primers were used in polymerase chain reactions (PCR) and the quality of amplifications was checked on agarose gel. The 20 loci with the best results had one of their primers marked with fluorophores (6-FAM, NED or JOE) for high-resolution genotyping via capillary electrophoresis. These 20 loci were evaluated in a screening with five samples of *H. impetiginosus*. The nine best polymorphic loci were selected for final genotyping in a sample of 20 individuals of *H. impetiginosus*. This genotyping obtained an average of 7.89 alleles per locus, observed heterozygosity of 0.72 and expected heterozygosity of 0.78. The transferability of these nine loci was also tested in nine samples of *Handroanthus serratifolius* and eight samples of *Handroanthus ochraceus*. Of these, seven amplified in *H. serratifolius* and four in *H. ochraceus*. The transferability of the loci was also evaluated in *Tabebuia roseo-alba* and *T. aurea*, but none of them amplified. Among the successfully genotyped species, 54, 41 and 17 private alleles were identified in *H. impetiginosus*, *H. serratifolius* and *H. ochraceus*, respectively. In general, the microsatellite markers developed in this work in *H. impetiginosus* allow the analysis of genetic diversity not only in this species but also in *H. serratifolius* and *H. ochraceus*.

Keywords: Pink ipê. Simple Sequence Repeat (SSR). Genetic diversity. Capillary electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mutação causado pelo deslizamento da polimerase (slippage) durante a replicação de locos microssatélites..... 17
- Figura 2 - Porcentagem dos motivos dinucleotídeos mais frequentes no genoma de *Handroanthus impetiginosus*. 24
- Figura 3 - Porcentagem dos motivos trinucleotídeos mais frequentes no genoma de *Handroanthus impetiginosus*. 25
- Figura 4 - Distribuição do número de repetições nos microssatélites de *Handroanthus impetiginosus*. 26
- Figura 5 - Localização dos SSR dentro do transcrito de *Handroanthus impetiginosus*. 28
- Figura 6 - Amplificação de 20 locos microssatélites com o DNA de cinco árvores de *Handroanthus impetiginosus*. 29
- Figura 7 - Eletroferogramas de 14 primers marcados com fluoróforos 6-FAM (azul), JOE (verde) e NED (amarelo) em indivíduos de *Handroanthus impetiginosus*..... 31
- Figura 8 - Representação da distância genética de Rogers, através de um gráfico de Componentes principais, entre as amostras de *H. impetiginosus*, *H. serratifolius* e *H. ochraceus*. As distâncias foram obtidas com os nove marcadores microssatélites desenvolvidos a partir a de *H. impetiginosus*. A correlação matricial entre as distâncias cofenéticas e de Rogers ($r = 0,75$) foram significativas ($p\text{-value} < 0,001$) pelo teste de Mantel. 36
- Figura 9 - Distância genética de Rogers mostrado mediante um dendograma entre as espécies de *H. impetiginosus*, *H. serratifolius* e *H. ochraceus*. A correlação matricial entre as distâncias cofenéticas e de Rogers ($r = 0,86$) foram significativas ($p\text{-value} < 0,001$) pelo teste de Mantel. As consistências dos nós foram avaliadas com 10.000 bootstraps. 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Locos marcados com três diferentes fluoróforos em sistemas duplex para análise na eletroforese capilar de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	21
Tabela 2 - Número e porcentagem dos microssatélites de acordo com os motivos de suas repetições de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	23
Tabela 3 - Proporção de tipos de motivos nos microssatélites localizados nas diferentes regiões do genoma de <i>Handroanthus impetiginosus</i>	27
Tabela 4 - Sequências dos 20 pares de primers SSR marcados para genotipagem em <i>Handroanthus impetiginosus</i>	30
Tabela 5 - Índices de diversidade genética de nove locos microssatélites em <i>Handroanthus impetiginosus</i>	32
Tabela 6 - Análise da diversidade genética e identificação de alelos privados nas três espécies: <i>H. impetiginosus</i> , <i>H. serratifolius</i> e <i>H. ochraceus</i> . Os nove microssatélites foram desenvolvidos a partir de <i>H. impetiginosus</i>	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Ipê Roxo: Botânica e importância.....	13
2.2 Marcadores microssatélites	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Identificação de regiões microssatélites e desenho dos primers.....	18
3.2 Material biológico para validação dos marcadores microssatélites.....	19
3.3 Padronização da amplificação com os primers	19
3.4 Transferabilidade para outras espécies do gênero <i>Handroanthus</i> spp.	21
3.5 Genotipagem e caracterização da variabilidade genética nos locos microssatélites ..	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Caracterização de locos microssatélites no genoma do ipê-roxo.....	23
4.2 Seleção dos microssatélites e desenho dos primers.....	28
4.3 Análise da variabilidade genética	31
4.4 Transferabilidade para outras espécies da aliança tabebuia	33
5. CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

Handroanthus impetiginosus conhecida como ipê-roxo, pau'd arco, ipê-roxo da mata, é uma espécie florestal economicamente importante no Brasil devido ao seu valor na indústria madeireira, importância na medicina e na área paisagística por suas inflorescências (MARTINS; DO LAGO; CÍCERO, 2012). As espécies de ipês estão contidas dentro da aliança Tabebuia, que é formada por espécies dos gêneros *Tabebuia* e *Handroanthus* (GROSE; OLMSTEAD, 2007a, 2007b; OLMSTEAD et al., 2009). O gênero *Handroanthus* compreende aproximadamente trinta espécies distribuídas pela América Central e do Sul (GROSE; OLMSTEAD, 2007b).

H. impetiginosus é uma espécie diploide ($2n = 40$) com um tamanho de genoma $2C$ estimado em ~ 1 Gb (COLLEVATTI; DORNELAS, 2016). Atualmente a redução de custos e o aumento do rendimento nas tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) têm promovido o desenvolvimento de vários marcadores moleculares, além de métodos de genotipagem baseados em sequenciamento. Recentemente, o genoma de *H. impetiginosus* foi sequenciado identificando 31,688 genes (SILVA et al., 2018). Essa abundância de dados de sequenciamento permitem a descoberta e genotipagem de um número muito grande de marcadores (DAVEY et al., 2011). Os marcadores moleculares são ferramentas úteis para analisar a variação genética e proporcionam um meio eficiente para compreender a variação fenotípica e genotípica em plantas cultivadas (KALIA, 2011; VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005). Porém, também são usados em análises de espécies não modelos, como espécies nativas e endêmicas (ZAKI et al., 2012).

Um dos marcadores moleculares mais usados na atualidade para análises genéticas populacionais são os marcadores microssatélites, também conhecidos como sequências simples repetidas (ou SSRs) (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). A grande utilidade dos marcadores SSR se deve à sua abundância no genoma, altos índices de polimorfismo, herança co-dominante, facilidade de uso, custo moderado e requisitos modestos de qualidade do DNA (NYBOM; WEISING; ROTTER, 2014). Como eles são compostos de sequências repetidas em tandem, é muito comum a ocorrência de pareamentos desiguais o que pode levar a erros durante a replicação ou recombinação nesses locos (ELLEGREN, 2004).

Uma outra vantagem dos microssatélites, em relação a outras classes de marcadores, é que eles podem ser transferíveis entre grupos de pesquisa e até para espécies diferentes, desde que filogeneticamente próximas (ZAKI et al., 2012). Essa alta transferabilidade se deve ao fato de que a variabilidade genética nos locos microssatélites é detectada por PCR usando primers projetados para anelar em sequências conservadas nos dois flancos dos SSRs (TURCHETTO-ZOLET et al.,

2017). Com uso da técnica de PCR e da eletroforese capilar, é possível genotipar os marcadores microssatélites de forma relativamente rápida e a um custo acessível. Por meio dessas técnicas é possível detectar polimorfismos baseados nas diferenças de comprimento entre os diferentes alelos nos locos microssatélites (CSENCISICS, 2010).

Atualmente, somente 21 locos microssatélites de *Tabebuia aurea* foram testados em *H. impetiginosus* (BRAGA et al., 2007). Assim, dado a relevância ecológica e o valor da madeira de *H. impetiginosus*, é muito importante conhecer sua diversidade e a estrutura genética de suas populações remanescentes, especialmente tendo em vista a forte pressão advinda da exploração ilegal da espécie. A existência de sequências genômicas para o ipê-roxo (SILVA et al., 2018), facilita sobremaneira a descoberta de locos microssatélites e o desenvolvimento de marcadores SSR.

Com isso, os objetivos desse trabalho foram: a) Identificar e caracterizar os locos microssatélites no genoma de *H. impetiginosus*; b) Desenvolver marcadores SSR para a espécie; c) Testar a transferabilidade dos marcadores SSR desenvolvidos em *Handroanthus serratifolius*, *H. ochraceus*, *Tabebuia roseo-alba* e *T. alba*. O desenvolvimento de marcadores microssatélites para o ipê-roxo deve facilitar e, possivelmente, até estimular os estudos de genética de populações com a espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ipê Roxo: Botânica e importância

O ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*) pertence à família Bignoniaceae. A família conta com aproximadamente cento vinte gêneros e oitocentas espécies. Portanto a taxonomia dessa família é complexa e vem sendo modificada ao longo dos anos. Por exemplo, com estudos de filogenia molecular mais recentes, o gênero *Handroanthus* foi separado do gênero *Tabebuia* (GROSE; OLMSTEAD, 2007b). Assim a espécie *H. impetiginosus* (Mart. ex DC) apresenta sinônimas taxonômicas, como *T. impetiginosa* (Mart ex DC Standl), *T. avellanadae* lor e *Tecoma impetiginosa* Mart. ex DC.

A espécie possui como nomes populares pau d'arco (GEMAQUE et al., 2002), ipê roxo de bola, ipê una, casquinho e ipê roxo da mata. Os ipês são nativas dos bosques tropicais de América central e do sul (SON et al., 2006). No Brasil a espécie *H. impetiginosus* pode-se encontrar em diferentes regiões como na região Norte (Acre, Pará, Rondônia, Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso) e Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) (LOHMANN, 2015)

Uma das características mais visíveis nos ipês, são as flores que constituem um elemento paisagístico admirável devido à sincronia de sua floração do tipo explosiva e à beleza de suas inflorescências, sendo amplamente utilizado para paisagismo e recuperação de ecossistemas florestais (MARTINS; DO LAGO; CÍCERO, 2012). Os ipês também apresentam propriedades medicinais. Contém o lapachol que é um produto natural com reconhecida ação anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e anti-neoplásica (ARAÚJO; ALENCAR; ROLIM-NETO, 2002). A tintura liofilizada da espécie também é capaz de reduzir a genotoxicidade causado pelos agentes quimioterápicos (BORIOLLO et al., 2017)

As sementes dos diferentes tipos de ipês em condições ótimas de armazenamento apresentam alta capacidade de germinação (DEGAN et al., 2001; MARTINS; DO LAGO; CÍCERO, 2012), sendo consideradas ortodoxas (CARVALHO; SILVA; DAVIDE, 2016) . Isso é uma vantagem para trabalhar com sementes em programas de melhoramento ou de conservação de germoplasma, uma vez que a propagação dos ipês ocorre majoritariamente por via sexuada (GEMAQUE; DAVIDE; ROCHA, 2002)

As espécies de *T. impetiginosa* e *T. serratifolia* são as mais extraídas da Amazônia pelas características da sua madeira e uso em construções civis e navais (SCHULZE et al., 2008). Devido às características de sua madeira, o ipê-roxo é uma das espécies mais valorizadas no mercado internacional de madeiras tropicais. Sua madeira pode chegar a mais US\$ 1.400 o m³ de madeira serrada dependendo do diâmetro da prancha e das condições de secagem (TROPICAL TIMBER MARKET REPORT-ITTO, 2020). Apesar das vantagens que apresenta a espécie *H. impetiginosus* na economia e no ecossistema Brasileiro, existem poucos trabalhos moleculares que permitam avaliar a sua diversidade e conservação (SILVA-JUNIOR, 2018)

2.2 Marcadores microssatélites

A redução de custos e o aumento dos rendimentos de tecnologias de sequenciamento de próxima geração (NGS) têm promovido o desenvolvimento de vários marcadores e métodos de genotipagem. Essas tecnologias permitem a descoberta de milhares de marcadores que são importantes para análises em genética populacional, genética ecológica e evolução (DAVEY, 2011).

Existem diferentes tipos de marcadores moleculares como o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), repetições de sequência simples (SSR) (POWELL et al., 1996) e os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) (APPELS; NYSTROM-PERSSON; KEEBLE-GAGNERE, 2014)

Um tipo de marcador muito usado é o microssatélite, também conhecido como sequências simples repetidas (SSR), caracterizados por repetições *in tandem* (lado a lado) de pequenos motivos com um a seis pares de bases no genoma dos eucariotos. Com base no número de repetições, podem variar desde mononucleotídeos a hexanucleotídeos (BALDWIN; OBERBAUER, 2022; BECKMAN; WEBER, 1992). Os microssatélites também são classificados de acordo com o tipo de sequência de repetição como perfeito, imperfeito, interrompido ou composto. Em um microssatélite perfeito, a repetição da sequência não é interrompida por nenhuma base que não pertença ao motivo (por exemplo, TATATATATATATA). Por outro lado, nos microssatélites imperfeitos, as sequências de bases iguais são interrompidas por um par de bases diferentes (por exemplo, TATATATACTATATA). No caso de uma interrupção do microssatélite, existe uma pequena sequência diferente dentro da sequência repetida que não corresponde à sequência do motivo (por exemplo, TATATACGTGTATATATATA). Já no microssatélite composto, a sequência contém

dois elementos distintos de sequência repetidas lado a lado (por exemplo, TATATATATAGTGTGTGTGT) (OLIVEIRA et al., 2006).

Os microssatélites são seletivamente neutros (SCHLÖTTERER, 1998) com altos níveis de polimorfismo e variação, por serem multialélicos, são hipervariáveis com ampla distribuição genômica, herança co-dominante, reprodutibilidade e localização específica nos cromossomos, o que facilita a sua transferabilidade entre diferentes genótipos e laboratórios (PARIDA et al., 2009). Muitas vezes, a transferabilidade ocorre mesmo entre espécies filogeneticamente próximas (PRETTI et al., 2014; SOARES et al., 2020), uma vez que nos flancos dos microssatélites geralmente existem sequências conservadas onde se anelam os primers da PCR (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017)

O multialelismo e as altas taxas de polimorfismo dos microssatélites se devem às altas taxas de mutações nesses locos (ELLEGEN, 2004) Embora os microssatélites tenham sido amplamente utilizados em diferentes áreas de estudo da genética, as taxas de mutações ainda não estão bem esclarecidas (SCHLÖTTERER; HARR, 2000). Vários mecanismos foram sugeridos para explicar a alta taxa de mutação dos microssatélites, incluindo permuta ou *crossing over* desigual e deslizamento da polimerase durante a replicação ou reparo do DNA (STRAND, et al 1993)

Quando ocorre um *crossing over* desigual, pode haver mudanças drásticas como a perda ou ganho de muitas repetições. Isso ocorre quando as regiões repetitivas de microssatélites estão exatamente na região do *crossing over* desigual. Nesse caso, um grampo pode ser formado durante a sinapse, o que significa que apenas algumas partes, geralmente de comprimento desiguais, para cada cromossomo será trocado. Com isso, um cromossomo receberá um fragmento maior por causa do número maior de repetições de microssatélites trocado, enquanto o outro cromossomo homólogo receberá um número menor de repetições (OLIVEIRA et al., 2006).

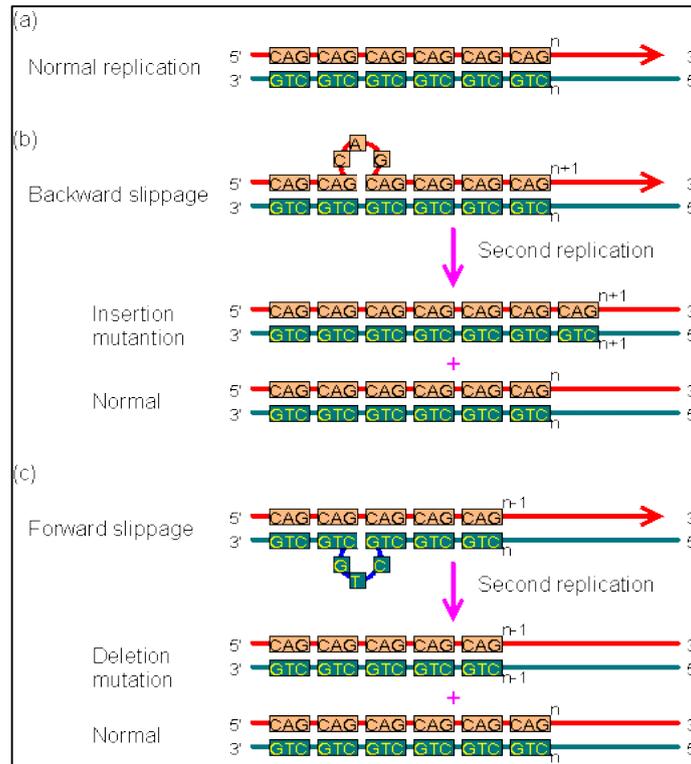
Durante a replicação ou reparo do DNA, nas regiões microssatélites pode ocorrer o deslizamento entre a fita que está sendo sintetizada pela enzima polimerase (*slippage*) e a fita molde na forquilha de replicação. O deslizamento ocorre porque, nessas regiões, o pareamento pode se dar entre as diferentes repetições dos SSRs, já que o mesmo motivo (sequência) se repete *in tandem*. Se esse pareamento errôneo ocorrer quando a polimerase está replicando o sítio microssatélite, mutações podem ocorrer, aumentando ou diminuindo o número de repetições do SSR. Se o deslizamento ocorrer na fita que está sendo replicada, haverá um aumento no número de repetições no alelo (FIGURA 1B). Por outro lado, se o deslizamento ocorrer na cadeia complementar (ou molde da replicação), haverá redução no número de repetições (FIGURA 1C) (OLIVEIRA et al., 2006).

Esse deslizamento pode acarretar também no surgimento de novos microssatélites, além de aumentar o multialelismo daqueles que já existem. Assim, essas mutações fazem com que os microssatélites possam ser encontrados em diferentes regiões no genomas, tanto em regiões codificantes como não codificantes (TÓTH; GÁSPARI; JURKA, 2000)

Apesar do desenvolvimento de marcadores SNP (SEEB et al., 2011), o uso de microssatélites permanece pertinente e difundido por várias razões (GUICHOUX et al., 2011). Os microssatélites têm vantagens sobre outros marcadores na revelação da estrutura genética populacional em grande escala e para estimativa de parâmetros de diversidade genética e de relações de parentesco entre indivíduos (DEFAVERI, 2013). Assim mesmo os microssatélites fornecem resultados comparáveis e reprodutíveis entre laboratórios e para diferentes amostras da mesma espécie. Isso é uma vantagem sobre algumas das técnicas de genotipagem de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), como o sequenciamento RAD (DNA associado ao local de restrição) (DAVEY, 2011). O RAD e outras técnicas de genotipagem por sequenciamento são altamente dependentes das condições experimentais e, com isso, dificilmente os mesmos marcadores são genotipados em diferentes populações ou por diferentes laboratórios. Finalmente, os custos e o tempo de desenvolvimento e genotipagem de microssatélites tem sido consideravelmente reduzidos devido ao sequenciamento de alto rendimento (SANTANA, 2009)

A transferabilidade pode ser um fator muito importante para facilitar o uso dos microssatélites, pois reduz os custos ao permitir que os mesmos marcadores possam ser utilizados em táxons filogeneticamente próximos, sem sequências disponíveis ou microssatélites previamente descritos. A transferência de microssatélites é facilitada entre espécies filogeneticamente próximas e, portanto, com homologia na sequência de DNA das regiões franqueadoras dos microssatélites. No entanto, o sucesso na taxa de amplificação diminui quando a divergência genética entre espécies aumenta (AVISE; JOHNS, 2010; PRIMMER, C ; MERILÄ, 2002)

Figura 1 - Mutação causado pelo deslizamento da polimerase (slippage) durante a replicação de locos microssatélites.



Fonte: “Molecular Biology Web Book”

<https://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7F3.htm>

Os estudos genéticos de populações de plantas nativas aumentaram substancialmente nos últimos anos (COLLEVATTI et al., 2012; DINIZ-FILHO et al., 2012; PINHEIRO et al., 2010, 2011, 2013). No entanto, a inexistência de marcadores moleculares com níveis adequados de variação continua sendo um dos maiores entraves para a realização desses tipos de estudos para investigar a diversidade genética dentro e entre populações. Para essas finalidades, atenção especial pode ser dedicada aos locos microssatélites (JARNE; LAGODA, 1996),

Apesar do ipê roxo já ter o seu genoma sequenciado (SILVA-JUNIOR, 2018) ainda não há marcadores microssatélites desenvolvidos para esta espécie. No entanto, existem trabalhos de microssatélites desenvolvidos para outras espécies da aliança *Tabebuia* (BRAGA et al., 2007; FERES et al., 2009; PRETTI et al., 2014; YU et al., 2011) incluindo a espécie *H. impetiginosus*. Com isso, o desenvolvimento de microssatélites em *H. impetiginosus* pode facilitar sobremaneira os estudos da espécie sob diferentes aspectos genéticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Identificação de regiões microssatélites e desenho dos primers

Para a identificação das regiões microssatélites de *H. impetiginosus* utilizamos as sequências do genoma da espécie, disponível no Banco do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (SILVA-JUNIOR, 2018). As sequências foram analisadas pelo programa MicroSatellite (MISA), escrita na linguagem PERL (BEIER, 2017). Com o MISA foram identificados microssatélites com um mínimo de 15 repetições para os mononucleotídeos, 10 repetições para di e trinucleotídeos e sete repetições para os tetra, penta e hexanucleotídeos. Microssatélites adjacentes por até 100 pares de bases foram classificados, pelo programa MISA, como sendo um único loco composto. Utilizando o programa R (R Core Team 2021) os microssatélites identificados pelo MISA foram posteriormente classificados quanto ao tipo e tamanho dos motivos, número de repetições e sua localização dentro ou fora dos genes. Essa localização foi obtida com o programa intersectBED do *BEDTools* (QUINLAN; HALL, 2010), que comparou a posição dos microssatélites com a localização dos elementos gênicos no genoma da espécie (arquivo GFF). A saída do intersectBED foi analisada com um script R que classificou os microssatélites como localizados em regiões intergênicos, 5' não traduzida (5'UTR), sequência codante (CDS), íntron ou região 3' não traduzida (3'UTR).

Para desenvolvimento de marcadores SSRs, os maiores locos di- ou tri-nucleotídeos intergênicos foram selecionados para aumentar as chances de polimorfismo. Para os dinucleotídeos foram selecionados locos com no mínimo 30 repetições. Já os trinucleotídeos foram selecionados com no mínimo 25 repetições. Utilizando um script *Perl* e a função *getfasta* do programa *BEDTools* (QUINLAN; HALL, 2010), foi obtido um arquivo FASTA contendo a sequência de todos os locos selecionados com 150 bases a mais nos dois flancos (*upstream* e *downstream*) dos microssatélites. O desenho dos primers foi realizado nesse arquivo FASTA com o programa PrimerQuest (IDT Inc.).

O desenho dos iniciadores (*primers*) para Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizado de modo que o produto final da amplificação tivesse um tamanho entre 100 e 300 pb, englobando o loco microssatélite. Os *primers* foram projetados para terem um tamanho entre 18 e 22 pb, com temperatura de dissociação ou *melting* (T_m) variando de 55 a 65 °C e a porcentagem de GC entre 40 e 60%. Os pares de iniciadores também foram avaliados quanto a complementariedade das sequências para evitar a formação de dímero na extremidade 3' OH, bem como a formação de estruturas secundárias dentro dos *primers*.

3.2 Material biológico para validação dos marcadores microssatélites

Para avaliar a qualidade e o polimorfismo nos marcadores SSRs (ou microssatélites) selecionados, foram utilizados 20 indivíduos de *H. impetiginosus* coletados em área urbana do município de Lavras-MG. As amostras foliares coletadas em campo foram embaladas em papel alumínio e acondicionadas em gelo. Posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer (-20°C) no laboratório de biologia molecular do departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

O DNA foi extraído das folhas seguindo protocolo padrão baseado no detergente CTAB (DOYLE; DOYLE 1990). A qualidade e a concentração do DNA extraído foram avaliadas por meio de uma eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo (20 mg/mL). A determinação da concentração das amostras de DNA foi realizada por espectrometria no equipamento NanoDrop (Thermo Fisher) e diluídas para 10 ng/μL. As amostras com baixa qualidade e/ou concentração, foram submetidas a novas extrações de DNA.

Na identificação na colheita de cada indivíduo de *H. impetiginosus* se considerou a inicial do nome comum, ipê-roxo (R01). Para *H. serratifolius* foi considerada a letra A01 por ser conhecido como o ipê-amarelo, ou pela inicial do nome da espécie (S01). Para o caso de *H. ochraceus*, *T. roseo-alba* e *T. alba* foram identificadas pelas iniciais do nome científico, por exemplo, HO01, TRA01 e TA01, respectivamente.

3.3 Padronização da amplificação com os primers

A síntese dos primers foi feita na empresa Alpha DNA (Canada). A identificação de cada primer recebeu o prefixo de “Himp” como abreviação de *H. impetiginosus*. Após a síntese procedeu-se à amplificação de cada loco microssatélite por meio de PCR. Todos os locos foram amplificados em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Inicialmente os primers foram testados em três PCR com diferentes temperaturas de anelamento: 53°C, 55°C e 57°C. A padronização da temperatura de anelamento dos primers foi realizada por meio de uma triagem com três indivíduos de ipê-roxo (*H. impetiginosus*), uma amostra de ipê-amarelo (*H. serratifolius*) e um de ipê-branco (*T. roseo-alba*). Para verificar a qualidade dos reagentes e da amplificação com diferentes temperaturas de anelamento.

A amplificação por PCR foi realizada com reação de 16 μ L contendo 3,2 uL de 5x FIREPol Master Mix (Solis Biodyne), 1,6 uL do Primer Forward (a 2,5 uM), 1,6 uL do Primer Reverse (2,5 uM), 1,6 uL de DNA molde (a 10ng/uL) e água (8 uL). O protocolo de PCR foi realizado com as seguintes etapas: (1) desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, (2) desnaturação a 95°C durante 30 segundos; (3) temperatura específica de anelamento do teste (53, 55 ou 57° C), durante 1 minuto; (4) extensão pela Taq DNA polimerase a 72 ° C por 1 minuto; (5) extensão final à 72 °C durante 7 minutos. As etapas 2 a 4 foram repetidas em 35 ciclos de amplificação.

Os *amplicons* foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (20 mg/mL). A eletroforese foi realizada com tampão TBE 1X, por 90 minutos à 90 V. Os marcadores com boa amplificação foram selecionados para marcação com fluoróforo em um de seus primers para genotipagem em sistema multiplex via eletroforese capilar.

Dos 50 marcadores sintetizados, 20 foram selecionados para marcação com fluoróforos, de acordo com a qualidade da amplificação e a presença de polimorfismo. Desses 20 pares de iniciadores, 12 foram marcados na extremidade 5' do primer *forward* e 8 do reverse, com os dos fluoróforos: Rhodamine (NED-replacement), 6-FAM ou JOE.

Os 20 primers marcados foram testados em uma triagem, via PCR, com cinco amostras de *H. impetiginosus*. A partir dos resultados da amplificação, 14 foram selecionados para serem genotipados em eletroforese capilar no analisador automático de DNA, modelo ABI-3500 (Applied Biosystems), por meio de eletroforese capilar realizada na empresa ALPHA DNA (Canada).

As etapas de amplificação foram as mesmas descritas acima, exceto que a temperatura de anelamento foi a de 55°C para todos os locos e a eletroforese capilar foi realizado em sistema multiplex (TABELA 01). A partir dos resultados da triagem nos cinco indivíduos, os 11 melhores locos foram genotipados em mais 15 outros indivíduos, totalizando 20 indivíduos de *H. impetiginosus* genotipados para estimativas de parâmetros de diversidade genética com esses locos.

Tabela 1 – Locos marcados com três diferentes fluoróforos em sistemas duplex para análise na eletroforese capilar de *Handroanthus impetiginosus*.

DUPLEX	LOCO	MARCAÇÃO	TEMPERATURA
DUPLEX1	1891	6-FAM	55°C
DUPLEX1	2122	NED	55°C
DUPLEX2	2098	6-FAM	55°C
DUPLEX2	6574	NED	55°C
DUPLEX3	3455	6-FAM	55°C
DUPLEX3	6610	NED	55°C
DUPLEX4	6232	6-FAM	55°C
DUPLEX4	3219	JOE	55°C
DUPLEX5	4912	6-FAM	55°C
DUPLEX5	3352	JOE	55°C
DUPLEX6	8696	6-FAM	55°C
DUPLEX6	506	JOE	55°C
DUPLEX7	6732	6-FAM	55°C
DUPLEX7	5711	JOE	55°C

Fonte: “Do autor”, 2022

3.4 Transferabilidade para outras espécies do gênero *Handroanthus* spp.

Os primers desenvolvidos para *H. impetiginosus* foram testados quanto à transferabilidade em *H. serratifolius*, *H. ochraceus*, e espécies filogeneticamente mais distante: *T. roseo-alba* e *Tabebuia aurea*. As amostras foliares de *H. serratifolius* e de *T. roseo-alba* foram obtidas em região urbana, também no município de Lavras. Já as amostras dos ipês de cerrado (*H. ochraceus* e *T. aurea*) foram obtidas a partir de coletas em fragmentos de cerrado realizadas pela Profa. Rosane Garcia Collevatti da Universidade Federal de Goiás, em Goiânia. A coleta dessas amostras em fragmentos naturais está devidamente registrada no SisGen (registro AB85D75 para *T. aurea* e ACE1E21 para *H. ochraceus*). Para extração de DNA, foram utilizados de sete a 25 indivíduos, dependendo da espécie, e o protocolo foi o mesmo utilizado para *H. impetiginosus* (descrito na seção 4.2.). O conjunto de 20 marcadores que amplificaram em *H. impetiginosus* foi testado quanto à transferabilidade nessas espécies, seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

Esses vinte locos marcados, foram testados em géis de agarose (2%) com cinco amostras de cada espécie. Posteriormente, o DNA das amostras que amplificaram na agarose foram genotipadas em sistemas multiplex (Tabela 01) por eletroforese capilar. Os locos que melhor amplificaram foram utilizados em uma segunda genotipagem em eletroforese capilar com mais quatro amostras de *H. serratifolius* e três amostras de *H. ochraceus*.

3.5 Genotipagem e caracterização da variabilidade genética nos locos microsatélites

As PCRs com primers marcados com fluoróforos foram analisadas na plataforma ABI-3730 (Applied Biosystems). Com 1 uL de cada PCR para mistura com 8,8 uL de formamida HiDi e 0,2 uL do marcador LIZ (GeneScan 500 LIZ, Applied Biosystems) por poço. Essa mistura foi feita em placa de 96 poços, com cada poço contendo um duplex ou tríplex do DNA amplificado das amostras estudadas. A placa foi mantida a 95 °C por 3 minutos em termociclador, em seguida foi mantida em gelo e colocada no sequenciador ABI-3730.

Os electroferogramas foram analisados e genotipados no programa Geneious (Biomatters), utilizando o GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems) como padrão de fragmentos conhecidos para estimar os tamanhos dos alelos nos locos microsatélites. A planilha de genotipagem foi utilizada no programa R. o pacote *adegenet* (Jombart, 2008) no R versão 4.1.2 (R CORE TEAM, 2021) para as análises de diversidade e distância genética entre os indivíduos.

Os parâmetros estimados foram o número de alelos por locos polimórficos (NA), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e). Todos esses parâmetros foram avaliados tanto na população de 20 indivíduos de *H. impetiginosus*, e de oito e nove indivíduos de *H. ochraceus* e *H. serratifolius*, respectivamente. Além disso, também foram realizadas análises de distância genética para verificar se os marcadores desenvolvidos conseguem separar os indivíduos das diferentes espécies de ipê. Para isso, o pacote *adegenet* foi utilizado para estimar as distâncias genéticas de Rogers e construir uma matriz de distâncias. As distâncias entre os ipês foram representadas em um gráfico com os dois primeiros componentes principais gerados pelo pacote *ape* (PARADIS; SCHLIEP, 2019) A matriz de distância de Rogers também foi representada por meio de um dendrograma gerado com a análise de agrupamento via UPGMA. A representatividade do dendrograma, bem como do gráfico de componentes principais, foi avaliada por meio da correlação cofenética. As significâncias das correlações cofenéticas foram avaliadas pelo teste de Mantel, realizado com 10.000 bootstraps pelo pacote *ape*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização de locos microssatélites no genoma do ipê-roxo

No genoma do *H. impetiginosus* foram identificadas 85.473 regiões microssatélites (TABELA 2). Os microssatélites foram classificados de acordo com seus motivos, desde mono a hexanucleotídeos incluindo também SSR-compostos (separados por no máximo de 100 pb).

Tabela 2 - Número e porcentagem dos microssatélites de acordo com os motivos de suas repetições de *Handroanthus impetiginosus*.

Tipos microssatélites	de	Número de locos	Porcentagem
Mononucleotídeos		45.173	53%
Dinucleotídeos		30.892	36%
Trinucleotídeos		4.156	5%
Tetranucleotídeos		843	1%
Pentanucleotídeos		55	0%
Hexanucleotídeos		32	0%
Compostos		4.322	5%
Total		85.473	100%

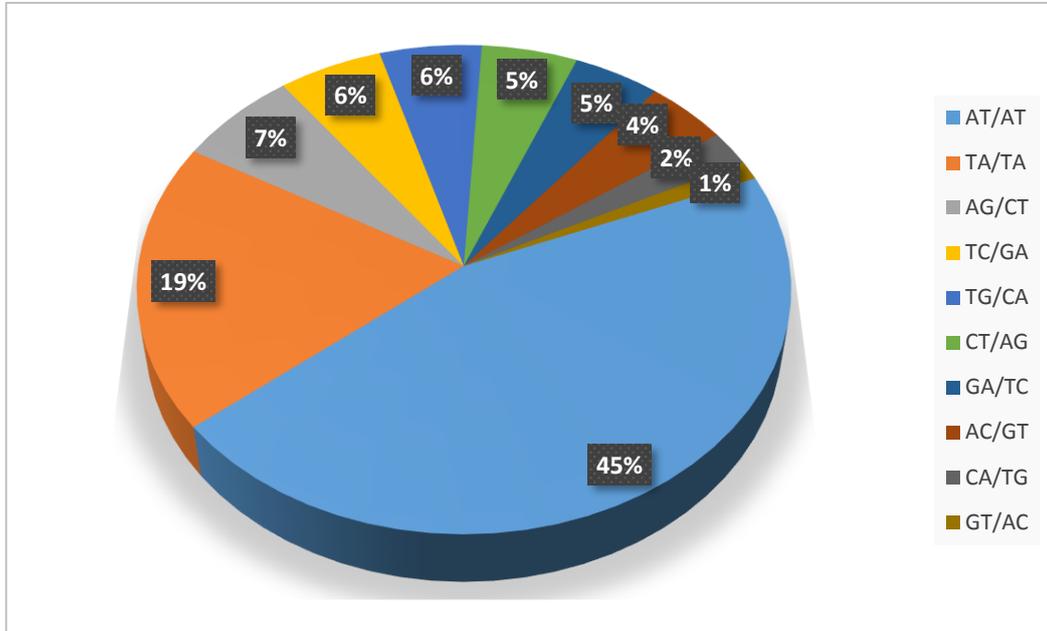
Fonte: “Do autor”, 2021

A maioria dos microssatélites foi os mononucleotídeos (53%), seguido dos dinucleotídeos (36%) e trinucleotídeos (5%) e 5 % de microssatélites compostos. Os microssatélites com motivos maiores (tetra a hexanucleotídeos) representaram uma baixa porcentagem dos locos identificados. Resultados similares em quantidade e tipos de microssatélites foram encontrados em uma espécie relacionada, *Handroanthus billbergii*, que possui um total de 61.074 microssatélites, sendo identificados 11.438 dinucleotídeos e 8.119 trinucleotídeos (MORILLO et al., 2016). Em outra espécie de importância madeireira, *Tectona grandis* L. f. da família Lamiaceae, foram identificados 182.712 locos microssatélites, sendo os monos, di- e trinucleotídeos os mais abundantes com 45.32%, 41.4% e 7.48%, respectivamente (YASODHA et al., 2018).

Os microssatélites apresentaram diferenças em relação à composição dos motivos, sendo o mais frequente dentre os dinucleotídeos de *H. impetiginosus* o AT/AT (45%), seguido de TA/TA (19%), enquanto os outros motivos apresentaram uma porcentagem menor do que 10% (FIGURA 2). Isso é comum em plantas, em que os dinucleotídeos mais abundantes são os AT/AT e GA/TC e, o menos comum é o GT/AC (LAGERCRANTZ; ELLEGREN; ANDERSSON, 1993). Em outros

eucariotos, o motivo dinucleotídeos mais abundante é do tipo AC, seguido de AG, enquanto os locos com AT e CG são os menos comuns (GAO et al., 2009).

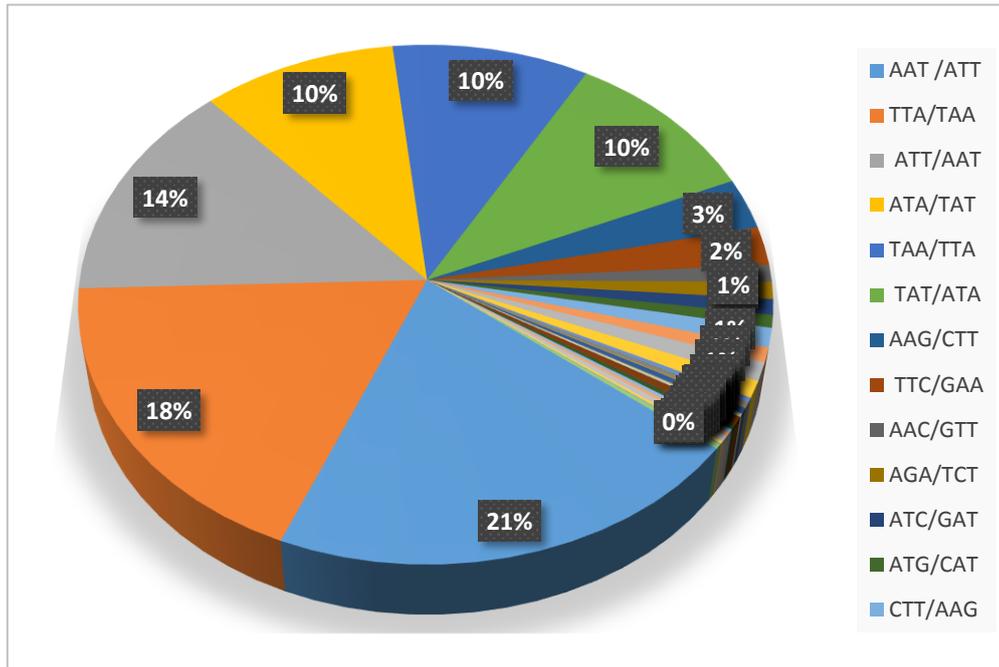
Figura 2 - Porcentagem dos motivos dinucleotídeos mais frequentes no genoma de *Handroanthus impetiginosus*.



Fonte: “Do autor”, 2022

Entre os trinucleotídeos, os tipos de motivos mais frequentes foram AAT/ATT (21%), TTA/TAA (18%), ATT/AAT (14%), e os motivos ATA/TAT, TAA/TTA, TAT/ATA com 10% cada um (FIGURA 3). Os outros tipos de motivos foram encontrados em quantidade menor ou igual a 3%. No pinheiro branco oriental (*Pinus strobus*) e pinheiro loblolly (*Pinus taeda*), os motivos AAT/ATT foram os mais abundantes, concordando com nossos resultados. No entanto outros tipos de trinucleotídeos mais abundantes foi o ATC/GAT (ECHT; MAY-MARQUARDT, 1997). As distribuições contrastantes de motivos de microssatélites em diferentes genomas indicam fortemente que há variação interespecífica nos mecanismos de mutação ou reparo de motivos específicos. Alternativamente, pode haver variação nas restrições seletivas que estão associadas a diferentes motivos de microssatélites (ELLEGRÉN, 2004)

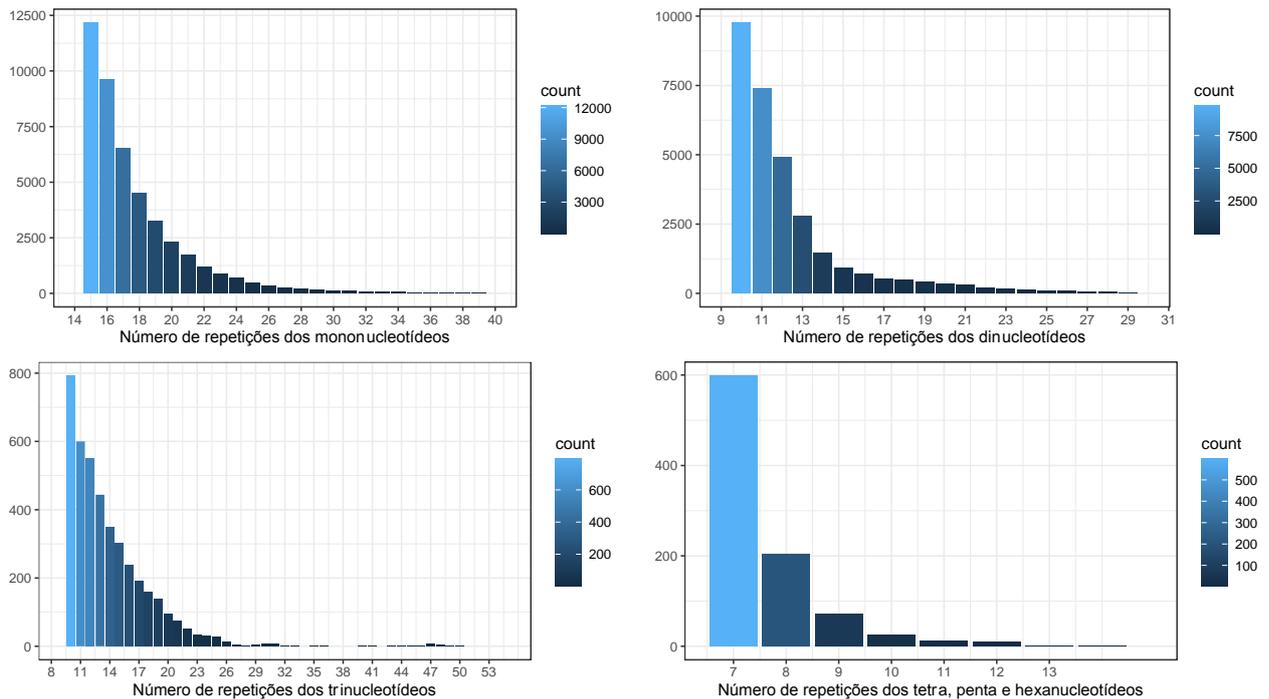
Figura 3 - Porcentagem dos motivos trinucleotídeos mais frequentes no genoma de *Handroanthus impetiginosus*.



Fonte: “Do autor”, 2022

O número mínimo de repetições dos microssatélites, estabelecido no default do programa MISA (BEIER, 2017), foi 15 para mononucleotídeos, 10 para di e trinucleotídeos e sete para os demais (tetra a hexanucleotídeos). No geral, em todas as classes de microssatélites, quanto maior o número de repetições menor é a proporção de locos encontrados (FIGURA 4). Isso ocorre porque, geralmente, o surgimento de microssatélites mais longos depende de um maior número de passos mutacionais por deslizamento da polimerase, conforme descrito no modelo de mutação “stepwise” (ELLEGREN, 2004). Com isso, esses microssatélites com maior número de repetições são menos prováveis de ocorrer em comparação com os mais curtos (SAMADI et al., 1998). Apesar da menor abundância, cabe ressaltar que os microssatélites com maior número de repetições tendem a ser mais polimórficos (ELLEGREN, 2004) e, portanto, preferidos como marcadores moleculares.

Figura 4 - Distribuição do número de repetições nos microssatélites de *Handroanthus impetiginosus*.



Fonte: “Do autor”, 2022

A maioria dos microssatélites identificados está localizada nas regiões intergênicas (86%), seguido dos introns (12,15%), regiões 5'UTR (0,95%), 3' UTR (0,7%), e por último somente 110 locos (0,13%) foram localizados em sequências codantes de proteínas (TABELA 3). A menor abundância dos SSR em regiões codantes já foi citada na literatura (HANCOCK, 1995; SINGH et al., 2018; SORKHEH et al., 2016) e é devida a alta taxa de mutação dos microssatélites. Geralmente, em organismos eucarióticos, os dinucleotídeos são os motivos menos frequentes em éxons (TÓTH; GÁSPARI; JURKA, 2000). Já os trinucleotídeos e hexanucleotídeos tendem a ser mais abundantes nessa região, pois os microssatélites com motivo múltiplo de três tendem a não ocasionar mudanças no quadro de leitura da tradução quando sofrem mutações (SELKOE; TOONEN, 2006; TÓTH; GÁSPARI; JURKA, 2000). Uma maior proporção de tri e hexanucleotídeos também foi observada nos microssatélites localizados dentro de sequências codantes (CDS) no genoma de *H. impetiginosus*. Em CDS, a proporção de trinucleotídeos é de 24%, enquanto nas demais regiões do genoma essa proporção é de 4,8%. Para hexanucleotídeos a diferença é ainda maior (de ~22×), com 0,91% em CDS e 0,04% nas demais regiões.

Tabela 3 - Proporção de tipos de motivos nos microssatélites localizados nas diferentes regiões do genoma de *Handroanthus impetiginosus*.

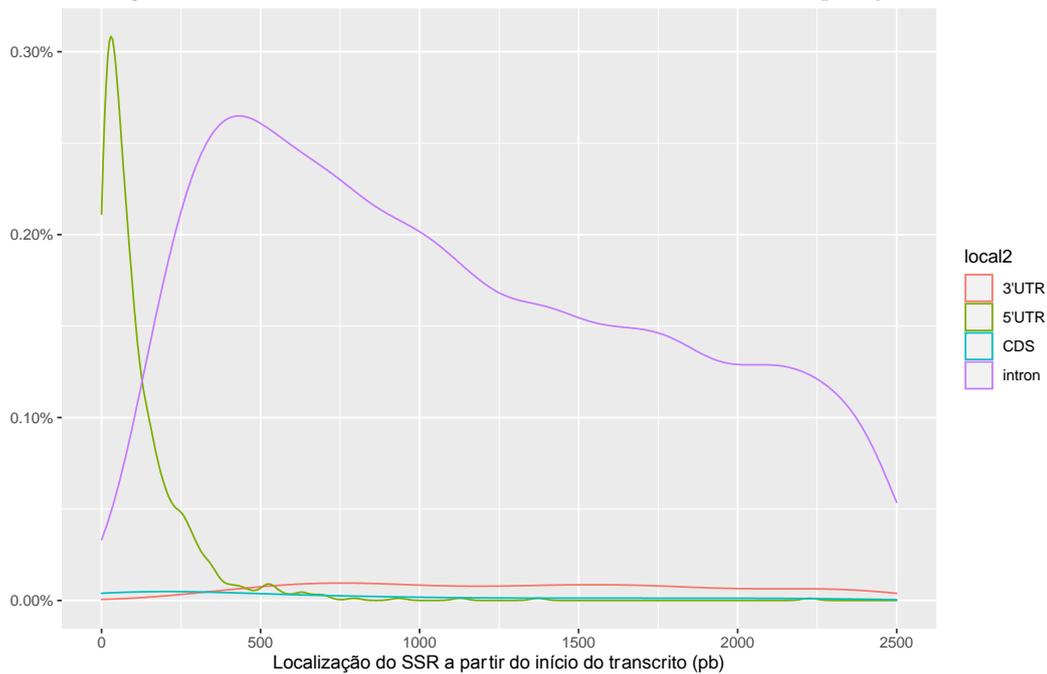
Motivos/ Regiões no genoma	INTERGENE	INTRONS	CDS*	5 UTR	3 UTR
Mononucleotídeos	38965	5653	44	193	318
Dinucleotídeos	26356	3720	30	543	243
Trinucleotídeos	3792	303	27	14	20
Tetranucleotídeos	715	116	1	5	6
Pentanucleotídeos	51	4	0	0	0
Hexanucleotídeos	28	3	1	0	0
Compostos	3659	589	7	54	13
TOTAL	73566	10388	110	809	600

* CDS: seqüências codantes de proteínas

Fonte: “Do autor”, 2021

A maioria dos SSR gênicos foram encontrados no início dos genes, principalmente nas regiões 5' UTR e em introns (FIGURA 5). Resultados similares foram encontrados em espécies de árvores do grupo das angiospermas, onde a maioria dos SSR localizava-se em regiões 5' UTR, seguido das regiões 3' UTR e as CDS, denominada pelos autores de ORF ou “open reading frame” (RANADE et al., 2014). Nesse mesmo estudo, o gênero *Prunus* foi o que apresentou a maior quantidade de SSR em regiões 5' UTR. No caso das espécies de gimnospermas arbóreas, a proporção de SSR em regiões 5' UTR, 3' UTR e ORF é muito menor em comparação com as angiospermas. (RANADE et al., 2014). Uma diferença foi encontrada no transcriptoma de *Larix gmelinii*, uma árvore de importância pela qualidade da sua madeira, os microssatélites foram encontrados em ORF (54,4%) e na região 5' não traduzida (5'-UTR, 31,2%), enquanto que na região 3'-não traduzida (3'-UTR) a frequência foi bem menor (14,4%) (ZHANG et al., 2015).

Figura 5 - Localização dos SSR dentro do transcrito de *Handroanthus impetiginosus*.



Fonte: “Do autor”, 2021

4.2 Seleção dos microssatélites e desenho dos primers

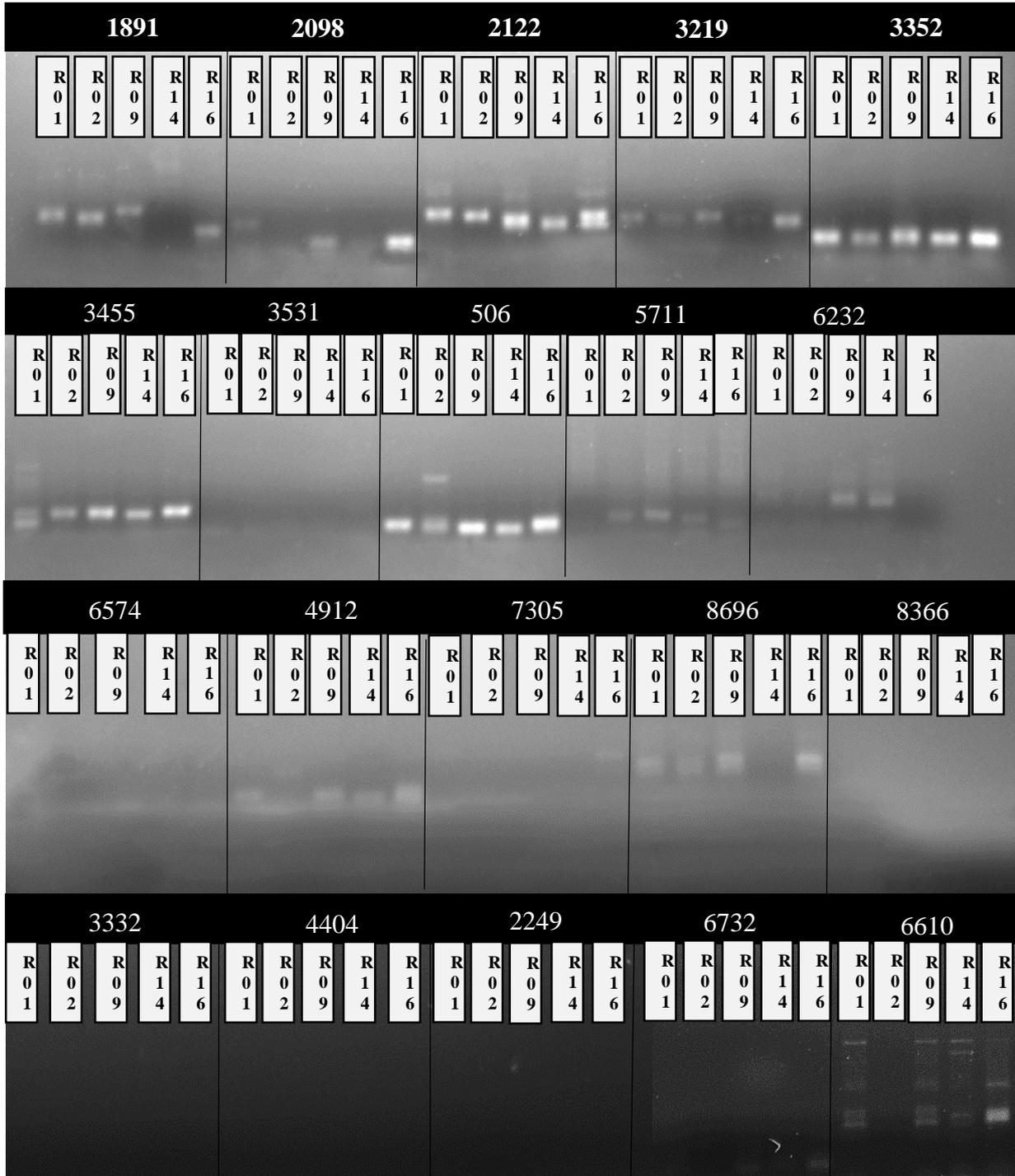
Para o desenho dos primers, 50 locos microssatélites do genoma de *H. impetiginosus* foram selecionados. Para testar os 50 pares de primers foi feita uma primeira PCR com três amostras de ipê-roxo nas temperaturas de anelamento de 53, 55 e 57 °C. Nessas PCRs verificou-se uma boa amplificação em 21 locos microssatélites.

A transferabilidade dos 50 primers-SSR também foi testada para *H. serratifolius* e *T. roseo-alba*. Em *H. serratifolius* 15 locos apresentaram uma boa amplificação nas temperaturas testadas. Nenhum loco amplificou em *T. roseo-alba*. Esse resultado pode ter devido à maior distância filogenética entre *H. impetiginosus* e *T. roseo-alba* (GROSE; OLMSTEAD, 2007a, 2007b)

Após a análise das amplificações com os 50 primers, 20 foram selecionados em virtude de apresentar amplificação mais robusta, sendo estes marcados com os fluoróforos (Figura 6). Os primers marcados foram testados em cinco amostras de DNA de *H. impetiginosus* e 14 foram selecionados para serem utilizados em eletroforese capilar (Figura 7). O tamanho dos alelos variou de 90 a 300 pb (Tabela 4).

Os locos Himp_2098, Himp_6574 e Himp_4912 foram descartados devido à dificuldade em genotipar. Com isso, eles foram eliminados, restando 11 locos para a genotipagem completa, com mais indivíduos, em sistema multiplex.

Figura 6 - Amplificação de 20 locos microssatélites com o DNA de cinco árvores de *Handroanthus impetiginosus*.



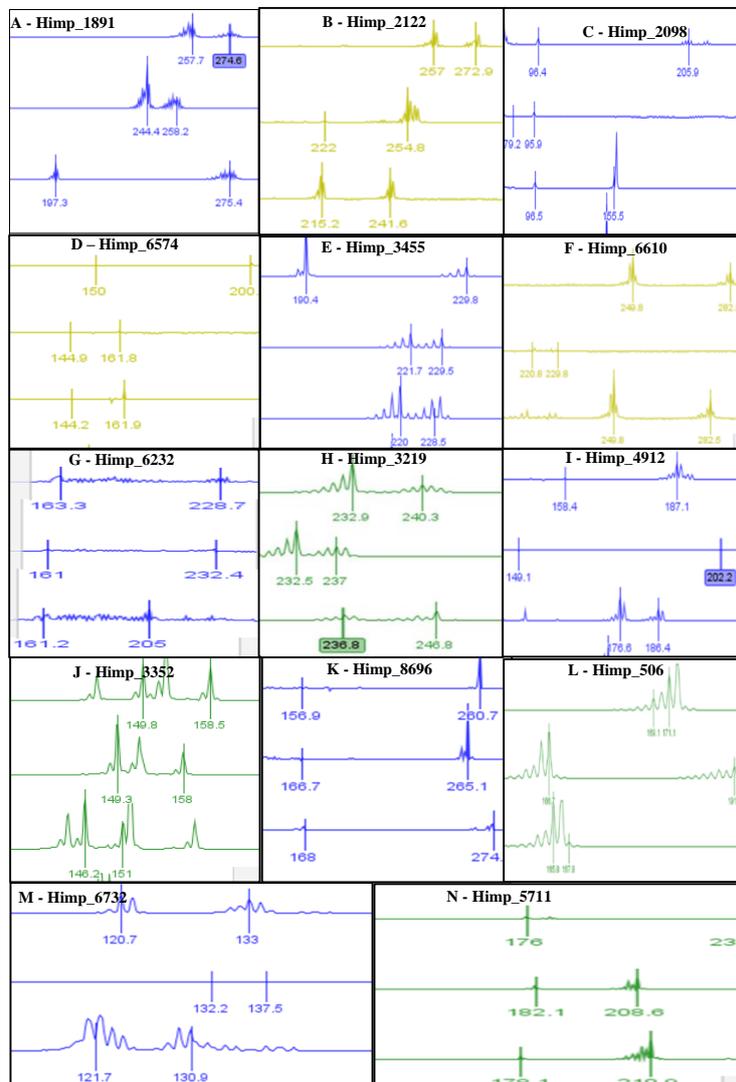
Fonte: "Do autor", 2022

Tabela 4 - Sequências dos 20 pares de primers SSR marcados para genotipagem em *Handroanthus impetiginosus*.

PRIMER	SEQUÊNCIA	MOTIVO	AMPLITUDE ALÉLICA	Ta (°C)	MARCA
Himp_1891_R	ACCGTTCAGGTGGTAAGA	(CT) 33	190-280	55°C	6-FAM
Himp_1891_F	ACACTAGAAACGAAGCCAAA				
Himp_2098_F	CTAGTCCGATTGACCTTTCAC	(TC)32	90-206	55°C	6-FAM
Himp_2098_R	GCTGGAGCCATTCATATCTT				
Himp_2122_R	GGCAATGACTGATACCCTAAT	(AAT)26	210-280	55°C	NED
Himp_2122_F	CAGGGAAGTACAGCCATATAAA				
Himp_2249_F	CCTGTTACACCGTGCATTAT	(GA)32	-----	55°C	NED
Himp_2249_R	ACGAGAGCCTTCTCTTCTT				
Himp_3219_F	ACACTACTCTTGGCTTCATATC	(TC)37	230-250	55°C	JOE
Himp_3219_R	CAATAGCCTGAGTCGAACAA				
Himp_3332_F	TGTACATGGCACATAGCATT	(TC)32	-----	55°C	JOE
Himp_3332_R	GGGCGCTTCTGTCATT				
Himp_3352_R	CGAGTGAAGAAGTTGGAGTG	(CGC)80	100-170	55°C	JOE
Himp_3352_F	GTGGGTGTTGGATGGATTT				
Himp_3455_R	GGTCGACCTGCAACTAAAC	(CT)44	190-230	55°C	6-FAM
Himp_3455_F	GCCGGAGATTTGCCTATTT				
Himp_3531_F	ACTTGTGTGCGGTTATGA	(AAT)29	-----	55°C	NED
Himp_3531_R	ACTTGTGTGCGGTTATGA				
Himp_4404_R	GGCAAGTCGGCAATAAGA	(AAT)28	-----	55°C	JOE
Himp_4404_F	CCAATCGTGGCGTACATT				
Himp_4912_F	GGGTCGGTCTTAGAAGTATG	(AC)37	160-210	55°C	6-FAM
Himp_4912_R	CTTAGTGGTGTGTGAGAGAG				
Himp_506_F	GGTCACTGAACCAAGATGAC	(CT)31	160-195	55°C	JOE
Himp_506_R	TCCGTATTCACCACCTCTAT				
Himp_5711_F	ACCCATTACCAGAATCATCAC	(CT)34	160-230	55°C	JOE
Himp_5711_R	TGCTTCCAGTTAACCAATGT				
Himp_6232_F	GACGGAATGAGATGCAGAAG	(ATT)26	160-250	55°C	6-FAM
Himp_6232_R	ACACTCCCTACCTGTTAGTC				
Himp_6574_F	TGGAGTGCGCAAGATATTC	(TAA)47	140-200	55°C	NED
Himp_6574_R	GTAAAGCCTTCAGTGGTGAT				
Himp_6610_R	CTCATTCGACCAGTACACAC	(TAT)26	230-290	55°C	NED
Himp_6610_F	CAGAATAGGGAGGCATGTAAG				
Himp_6732_F	GGCCATAAGCAACCAATTT	(TAA)48	110-140	55°C	6-FAM
Himp_6732_R	ACAGGGTGACCAAAGTAAA				
Himp_7305_F	ACTCGATGCCTGTACATCT	(TC)31	-----	55°C	JOE
Himp_7305_R	ATGGGCACTTGCATTTGA				
Himp_8366_R	GGTGAGTCTTGGGTCAATTT	(TAA)29	-----	55°C	NED
Himp_8366_F	TCAGTGGAGAGCGACTTT				
Himp_8696_R	GCTGGAACCCAACCTTACT	(ATA)32	150-280	55°C	6-FAM
Himp_8696_F	TGGAATGATGAACCACTTT				

Fonte: “Do autor”, 2022

Figura 7 - Eletroferogramas de 14 primers marcados com fluoróforos 6-FAM (azul), JOE (verde) e NED (amarelo) em indivíduos de *Handroanthus impetiginosus*.



Fonte: “Do autor”, 2022

4.3 Análise da variabilidade genética

Na genotipagem detectou-se que dois marcadores (Himp_3352 e Himp_6732) amplificaram um excesso de fragmentos, sendo que vários deles segregaram, dificultando a análise. Por isso, esses dois locos não foram utilizados nas análises de diversidade genética. A genotipagem dos 20 indivíduos de *H. impetiginosus* com os nove primers SSR restantes, mostrou uma média de 7,89 alelos por loco, variando de 6 (Himp_1891, Himp_1891) a 11 (Himp_6232) alelos polimórficos (TABELA 5).

Tabela 5 - Índices de diversidade genética de nove locos microssatélites em *Handroanthus impetiginosus*.

Ipê-roxo	NA	HE	HO
Himp_1891	6	0,78	0,47
Himp_506	7	0,73	0,4
Himp_2122	9	0,8	0,95
Himp_8696	6	0,67	0,37
Himp_5711	9	0,83	0,84
Himp_3455	8	0,81	0,75
Himp_6610	7	0,8	0,94
Himp_6232	11	0,81	0,89
Himp_3219	8	0,79	0,89
média	7,89	0,78	0,72

NA = número de alelos; HE = heterozigiosidade esperada; HO = heterozigiosidade observada

Fonte: “Do autor”, 2022

As heterozigiosidades observada e esperada variaram de 0,4 a 0,95 (média = 0,72) e de 0,67 a 0,83 (média = 0,78), respectivamente. O número de alelos por loco se correlaciona com os resultados da heterozigiosidade, mostrando a existência de variabilidade genética entre as árvores amostradas. (BRAGA et al., 2007). Em um primeiro estudo feito com 36 indivíduos de *Tabebuia aurea*, mostraram 21 locos com 9 até 26 alelos polimórficos e uma heterozigiosidade esperada alta (média = 0,913) (BRAGA et al., 2007). Já, em *H. billbergii* foram genotipados 23 indivíduos, identificando-se 30 locos que tiveram uma heterozigiosidade esperada entre 0,51 a 0,64 e a observada de 0,48 a 0,66 nos 30 locos avaliados (MORILLO et al., 2016). Os estudos demonstraram que existe variabilidade genética entre as espécies relacionadas de *H. impetiginosus*.

Para *T. cassinoides*, foram desenvolvidos cinco locos com uma variação de dois até oito alelos polimórficos quando genotipados em 67 indivíduos (PRETTI et al., 2014). Os locos tiveram uma heterozigiosidade esperada variando entre 0,1123 e 0,6685 (média = 0,4298) e uma heterozigiosidade observada entre 0,0434 e 0,7272 (média = 0,3908) (PRETTI et al., 2014), revelando uma menor diversidade genética comparado a observada para ipê-roxo nesse estudo.

Em outra espécie da família Bignoniaceae foram observados altos níveis de polimorfismo. Indivíduos de *Arrabidaea chica* apresentaram um padrão de múltiplas bandas, sugerindo que a espécie é provavelmente poliploide com 9 a 17 alelos por loco (FIGUEIRA et al., 2010).

4.4 Transferabilidade para outras espécies da aliança *Tabebuia*

Os 20 primers de *H. impetiginosus* marcados com fluoróforos foram testados em: *H. serratifolius*, *T. roseo-alba*, *T. aurea* e *H. ochraceus*. O primeiro teste desses 20 locos foi realizado em gel de agarose, mostrando que 14 locos amplificaram bem em *H. serratifolius* e *H. ochraceus*. Nenhuma amplificação foi observada em *T. roseo-alba* e *T. aurea*. Portanto, a transferabilidade não foi bem sucedida nessas espécies filogeneticamente mais distantes. Esse é um resultado esperado já que a transferabilidade dos microssatélites é mais efetiva entre espécies filogeneticamente próximas (MNEJJA et al., 2010). Os 14 locos amplificados em *H. serratifolius* e *H. ochraceus* tiveram cinco indivíduos de cada espécie genotipados em eletroforese capilar.

Com base nessa primeira genotipagem, onze desses 14 locos foram utilizados em uma segunda genotipagem. Porém, como já foi mostrado para *H. impetiginosus*, dois locos tiveram problemas para análises dos amplicons. Portanto, os nove locos foram genotipados com mais quatro indivíduos de *H. serratifolius* e três de *H. ochraceus*, além dos cinco já genotipados na triagem com 14 locos. Entre os nove locos testados, sete foram polimórficos em *H. serratifolius* e quatro em *H. ochraceus* (TABELA 6). Portanto, dentre os locos testados, esses são os que podem ser transferidos para essas espécies. Os locos Himp_1891, Himp_506, Himp_2122, Himp_8696, Himp_5711, Himp_3455, Himp_6610, Himp_6232, Himp_3219 foram eficientes na transferabilidade para as espécies *H. serratifolius* e *H. ochraceus*.

Na aliança *Tabebuia* existem vários estudos que testaram a transferabilidade de locos microssatélites entre espécies diferentes. O primeiro estudo foi de 21 locos microssatélites desenvolvidos em *T. aurea* e transferidos para espécies do mesmo gênero: *T. ochracea*, *T. serratifolia*, *T. roseo-alba* e *T. impetiginosa* (BRAGA et al., 2007). Destes, amplificaram entre 10 e 11 locos em *T. roseo-alba*, *Tabebuia impetiginosa*, *T. ochraceus* e *T. serratifolia* (BRAGA et al., 2007). No caso de *T. roseo-alba* foram testados 10 locos dos 21 identificados em *T. aurea*. Desses 10, nove amplificaram e tiveram alelos polimórficos (FERES et al., 2009). Esses resultados além de mostrar que a transferabilidade entre as espécies da aliança *Tabebuia* funciona, também mostra um alto polimorfismo. No entanto, em *T. cassinoides*, desses 21 locos de *T. aurea* somente sete amplificaram e três foram polimórficos (PRETTI et al., 2014).

Uma outra estatística analisada nessa dissertação foi o número de alelos privados. Os alelos privados são aqueles encontrados em uma única população (SZPIECH; ROSENBERG, 2016), nesse caso em uma única espécie de ipê. Assim, em *H. impetiginosus* foram encontrados um total de 54 alelos privados em nove locos microssatélites. Em *H. serratifolius* foram encontrados 41 locos

privados, distribuídos em sete locos. Já em *H. ochraceus*, foram identificados 17 locos privados em quatro SSRs (TABELA 6). Em análises de populações naturais, a existência de alelos privados é importante em programas de conservação de recursos genéticos. Cabe destacar que o baixo número de indivíduos amostrados por espécie, aumenta as chances de os alelos não serem identificados em todas as espécies. Mesmo podendo estar presente nas outras espécies, o alelo pode não ser detectado em um pequeno número de árvores.

A análise da distância genética foi realizada entre os indivíduos das três espécies, utilizando uma matriz de distância de Rogers decomposta pela análise de componentes principais. As distâncias genéticas reveladas pelos dois primeiros componentes (FIGURA 8) mostraram que os microssatélites desenvolvidos em nosso trabalho separaram *H. impetiginosus* de *H. serrtaifolius* e *H. ochraceus*. No entanto, essas duas últimas espécies não conseguiram separar-se em grupos distintos (FIGURA 8). O mesmo ocorreu quando as distâncias genéticas de Rogers foram representadas em um dendrograma, que apresentou uma clara separação das três espécies (FIGURA 9).

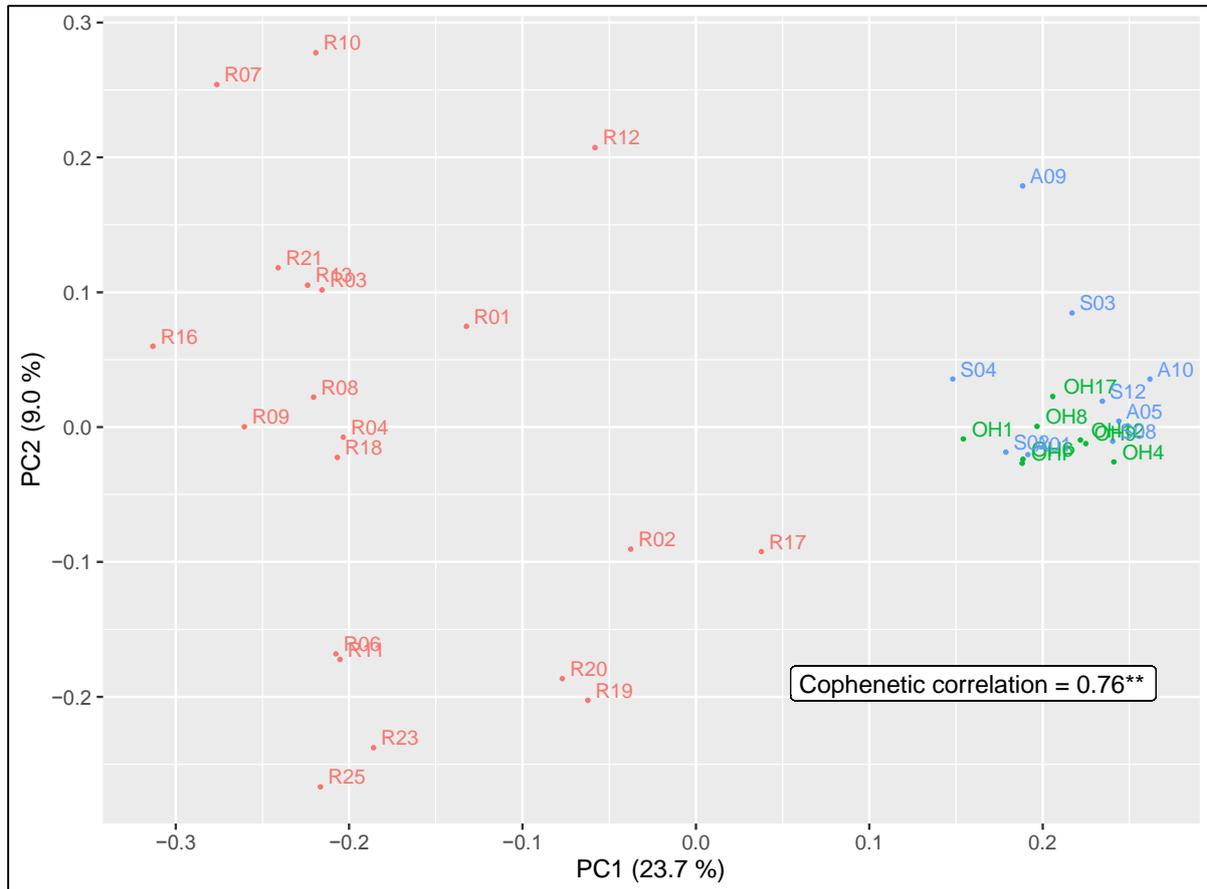
Tabela 6 - Análise da diversidade genética e identificação de alelos privados nas três espécies: *H. impetiginosus*, *H. serratifolius* e *H. ochraceus*. Os nove microssatélites foram desenvolvidos a partir de *H. impetiginosus*.

<i>H. impetiginosus</i>	NA	HE	HO	AP	<i>H. serratifolius</i>	NA	HE	HO	AP	<i>H. ochraceus</i>	NA	HE	HO	AP
Himp_1891	6	0,78	0,47	6	Himp_1891	12	0,9	0,88	12	Himp_1891	---	---	---	0
Himp_506	7	0,73	0,4	3	Himp_506	11	0,89	1	7	Himp_506	9	0,88	0,83	5
Himp_2122	9	0,8	0,95	7	Himp_2122	9	0,87	0,57	7	Himp_2122	6	0,71	0,71	4
Himp_8696	6	0,67	0,37	6	Himp_8696	---	---	---	0	Himp_8696	---	---	---	0
Himp_5711	9	0,83	0,84	7	Himp_5711	6	0,8	0,86	4	Himp_5711	---	---	---	0
Himp_3455	8	0,81	0,75	5	Himp_3455	4	0,55	0,75	3	Himp_3455	6	0,73	0,62	3
Himp_6610	7	0,8	0,94	5	Himp_6610	4	0,72	0	2	Himp_6610	---	---	---	---
Himp_6232	11	0,81	0,89	7	Himp_6232	10	0,87	0,75	6	Himp_6232	9	0,87	0,86	5
Himp_3219	8	0,79	0,89	8	Himp_3219	---	---	---	0	Himp_3219	---	---	---	---
Média	7,89	0,78	0,72	54		8,00	0,8	0,69	41		7,5	0,80	0,76	17

NA = número de alelos; HE = heterozigosidade esperada; HO = heterozigosidade observada

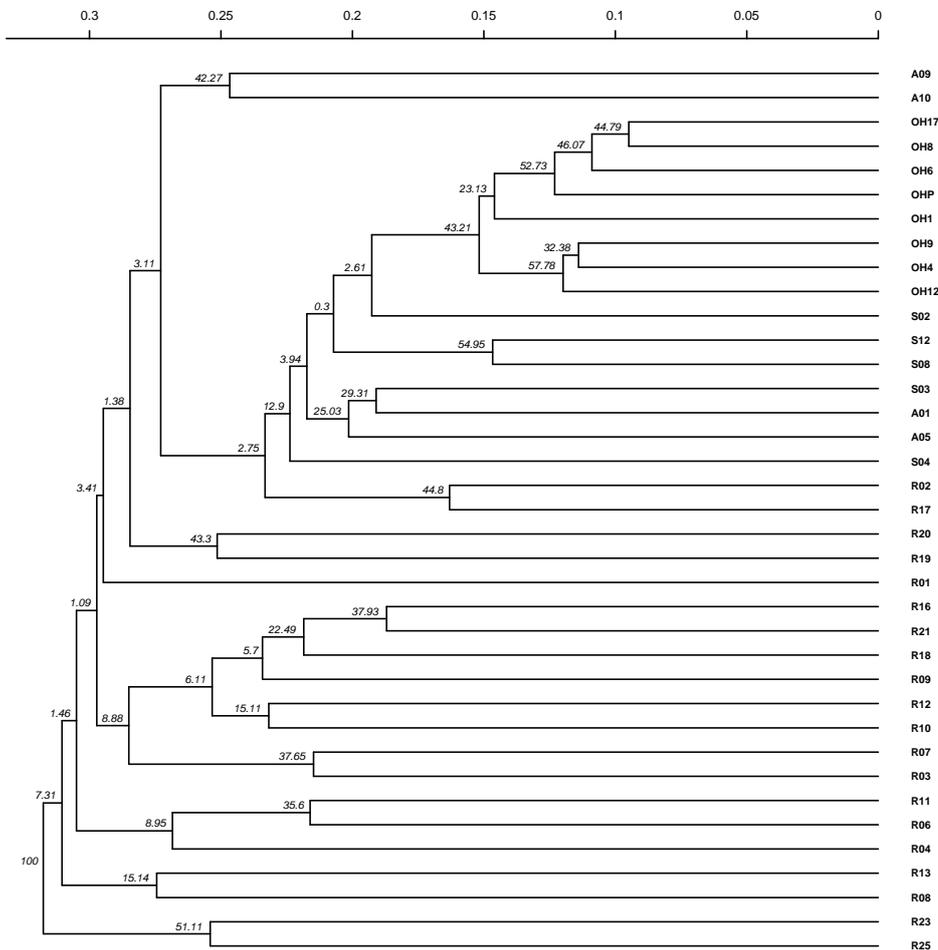
Fonte: “Do autor”, 2022

Figura 8 - Representação da distância genética de Rogers, através de um gráfico de Componentes principais, entre as amostras de *H. impetiginosus*, *H. serratifolius* e *H. ochraceus*. As distâncias foram obtidas com os nove marcadores microssatélites desenvolvidos a partir a de *H. impetiginosus*. A correlação matricial entre as distâncias cofenéticas e de Rogers ($r = 0,75$) foram significativas ($p\text{-value} < 0,001$) pelo teste de Mantel.



Fonte: "Do autor", 2022

Figura 9 - Distancia genética de Rogers mostrado mediante un dendograma entre as espécies de *H. impetiginosus*, *H. serratifolius* e *H. ochraceus*. A correlação matricial entre as distâncias cofenéticas e de Rogers ($r = 0,86$) foram significativas ($p\text{-value} < 0,001$) pelo teste de Mantel. As consistências dos nós foram avaliadas com 10.000 bootstraps.



Fonte: “Do autor”, 2022

Essa dificuldade em separar as espécies demonstra que talvez esses locos não sejam suficientemente informativos para separar as espécies. Isso pode ser devido à existência de homoplasia que ocorre quando alelos de mesmo tamanho se originam independentemente, ou seja, sem ancestralidade comum. A existência de homoplasia dificulta bastante as análises genéticas com os marcadores microssatélites, afetando as estimativas em inferências demográficas (ORTEGA-DEL VECCHYO et al., 2017). Isso porque as análises genéticas com SSRs assumem similaridade genética a partir do compartilhamento de alelos de mesmo tamanho. A homoplasia pode ser frequente em marcadores com altas taxas de mutação, como é o caso dos microssatélites (ESTOUP; JARNE; CORNUET, 2002).

5 CONCLUSÕES

Neste estudo foram identificados 85.473 locos microssatélites no genoma de ipê-roxo, sendo os mononucleotídeos (53%), dinucleotídeos (36%) e trinucleotídeos (5%) os mais abundantes dentro do genoma. Além disso, os microssatélites foram encontrados majoritariamente nas regiões intergênicas (86%) e em íntrons de genes (12%).

Com base nos microssatélites identificados, foram desenvolvidos nove locos polimórficos para *H. impetiginosus*. Esses locos revelaram uma alta variabilidade genética entre os indivíduos de ipê-roxo amostrados.

Dos nove locos microssatélites desenvolvidos para *H. impetiginosus*, sete foram transferidos com sucesso em *H. serratifolius* e quatro em *H. ochraceus*. Nas espécies de *Tabebuia-roseo alba* e *T. aurea* os locos não podem ser transferidos pois não houve amplificação nenhuma.

Com todas as informações apresentadas neste trabalho, é possível utilizar esses nove locos para estudo de genética de populações de *H. impetiginosus*, bem como desenvolver outros locos microssatélites a partir da lista completa dos 85.473 locos microssatélites identificados no genoma de ipê-roxo.

REFERÊNCIAS

- APPELS, R.; NYSTROM-PERSSON, J.; KEEBLE-GAGNERE, G. Advances in genome studies in plants and animals. **Functional and Integrative Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.
- ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM-NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 57–59, 2002.
- AVISE, J. C.; JOHNS, G. C. Proposal for a standardized temporal scheme of biological classification for extant species. **Molecular Ecology and Evolution: The Organismal Side: Selected Writings from the Avise Laboratory**, v. 96, n. June, p. 469–474, 2010.
- BALDWIN, T. A.; OBERBAUER, S. F. Essential oil content of *Rhododendron tomentosum* responds strongly to manipulation of ecosystem. **Canadian Science Publishing**, v. 19, n. February, p. 1–19, 2022.
- BECKMAN, J.; WEBER, J. L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, 1992.
- BEIER, S. ET AL. Sequence analysis MISA-web : a web server for microsatellite prediction. **Bionformatics**, v. 33, n. April, p. 2583–2585, 2017.
- BORIOLO, M. F. G. et al. Reduction of doxorubicin-induced genotoxicity by *Handroanthus impetiginosus* in mouse bone marrow revealed by micronucleus assay. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 1, p. 1–12, 2017.
- BRAGA, A. C. et al. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 1, p. 53–56, 2007.
- BRAGA, A. ET AL. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 1, p. 53–56, 2007.
- CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação fisiológica de sementes florestais quanto à tolerância à dessecação e ao comportamento no armazenamento. **Cerne**, v. 22, n. 1, p. 85–92, 2016.
- COLLEVATTI, R. G. E. AL. Phylogeography of *tibouchina papyrus* (Pohl) toledo (Melastomataceae), an endangered tree species from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the pleistocene. **Ecology and Evolution**, v. 2, n. 5, p. 1024–1035, 2012.
- COLLEVATTI, R. G.; DORNELAS, M. C. Clues to the evolution of genome size and chromosome number in *Tabebuia alliance* (Bignoniaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 302, n. 5, p. 601–607, 2016.

CSENCICS, D. B. S. H. R. Cost-Effective , Species-Specific Microsatellite Development for the Endangered Dwarf Bulrush (*Typha minima*) Using Next-Generation Sequencing Technology. **Journal of Heredity**, v. 101, n. 6, p. 789–793, 2010.

DAVEY, J. W. ET AL. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 7, p. 499–510, 2011.

DEFAVERI, J. ET AL. Characterizing genic and nongenic molecular markers: Comparison of microsatellites and SNPs. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 3, p. 377–392, 2013.

DEGAN, P. et al. Influência de métodos de secagem na conservação de sementes de Ipê-branco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 5, n. 3, p. 492–496, 2001.

DINIZ-FILHO, J. A. F. E. AL. Planning for optimal conservation of geographical genetic variability within species. **Conservation Genetics**, v. 13, n. 4, p. 1085–1093, 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13–15, 1990.

ECHT, C. S.; MAY-MARQUARDT, P. Survey of microsatellite DNA in pine. **Genome**, v. 40, n. 1, p. 9–17, 1997.

ELLEGREN, H. MICROSATELLITES: SIMPLE SEQUENCES WITH COMPLEX EVOLUTION. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. June, 2004.

ESTOUP, A.; JARNE, P.; CORNUET, J.-M. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1591–1604, 2002.

FERES, J. M. et al. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 1, p. 434–437, 2009.

FIGUEIRA, G. M. et al. A set of microsatellite markers for *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae), a medicinal liana from the Neotropics. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 7, 2010.

GAO, H. et al. Discrepancy variation of dinucleotide microsatellite repeats in eukaryotic genomes. **Biological Research**, v. 42, n. 3, p. 365–375, 2009.

GEMAQUE, R. C.; DAVIDE, A. C.; ROCHA, J. M. PHYSIOLOGICAL MATURITY INDICATORS FOR “IPÊ ROXO” SEEDS (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Cerne**, v. 8, n. 2, p. 84–91, 2002.

GROSE, S. O.; OLMSTEAD, R. G. Evolution of a charismatic neotropical clade: Molecular phylogeny of *Tabebuia* s. l., *Crescentieae*, and allied genera (Bignoniaceae). **Systematic Botany**, v. 32, n. 3, p. 650–659, 2007a.

GROSE, S. O.; OLMSTEAD, R. G. Taxonomic Revisions in the Polyphyletic Genus *Tabebuia* s. l

. **BioOne**, v. 32, n. 3, p. 660–670, 2007b.

GUICHOUX, E. ET AL. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 4, p. 591–611, 2011.

HANCOCK, J. M. The Contribution of Slippage-Like Processes to Genome Evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, p. 1038–1047, 1995.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Elsevier**, v. 5347, n. October, 1996.

KALIA, R. K. ET AL. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, v. 177, n. 3, p. 309–334, 2011.

LAGERCRANTZ, U.; ELLEGREN, H.; ANDERSSON, L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 5, p. 1111–1115, 1993.

LOHMANN, L. G. Bignoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro.**, 2015.

MARTINS, L.; DO LAGO, A. A.; CÍCERO, S. M. CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE IPÊ-ROXO. **Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v. 16, n. 1, p. 3743–3835, 2012.

MNEJJA, M. et al. Prunus microsatellite marker transferability across rosaceous crops. **Tree Genetics and Genomes**, v. 6, n. 5, p. 689–700, 2010.

Molecular Biology Web Book. Disponível em: <<https://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7F3.htm>>.

MORILLO, E. et al. Characterization of Microsatellites Identified by Next-Generation Sequencing in the Neotropical Tree *Handroanthus billbergii* (Bignoniaceae) . **Applications in Plant Sciences**, v. 4, n. 5, p. 1500135, 2016.

NYBOM, H.; WEISING, K.; ROTTER, B. DNA fingerprinting in botany: Past, present, future. **Investigative Genetics**, v. 5, n. 1, p. 1–35, 2014.

OLIVEIRA, E. J. ET AL. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294–307, 2006.

OLMSTEAD, R. G. et al. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 9, p. 1731–1743, 2009.

ORTEGA-DEL VECCHYO, D. et al. Appropriate homoplasmy metrics in linked SSRs to predict an underestimation of demographic expansion times. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2017.

PARADIS, E.; SCHLIEP, K. Ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. **Bioinformatics**, v. 35, n. 3, p. 526–528, 2019.

PARIDA, S. K. et al. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 118, n. 2, p. 327–338, 2009.

PINHEIRO, F. ET AL. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). **Molecular Ecology**, v. 19, n. 18, p. 3981–3994, 2010.

PINHEIRO, F. ET AL. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: A neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 10, p. 1923–1935, 2011.

PINHEIRO, F. ET AL. Phylogeographic Structure And Outbreeding Depression Reveal Early Stages Of Reproductive Isolation In The Neotropical Orchid *Epidendrum Denticulatum*. **Evolution**, v. 67, n. 7, p. 2024–2039, 2013.

POWELL, W. et al. The comparison of RFLP , RAPD , AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 225–238, 1996.

PRETTI, V. Q. et al. Development and characterization of microsatellite loci for *Tabebuia cassinoides* (Bignoniaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 5601–5605, 2014.

PRIMMER, C ; MERILÄ, J. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. **Conservation Genetics**, v. 3, p. 445–449, 2002.

QUINLAN, A. R.; HALL, I. M. BEDTools : a flexible suite of utilities for comparing genomic features. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 841–842, 2010.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical Computing, Vienna, Austria.**

RANADE, S. S. et al. Comparative in silico analysis of EST-SSRs in angiosperm and gymnosperm tree genera. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2014.

SAMADI, S. et al. The influence of mutation, selection and reproductive systems on microsatellite variability: A simulation approach. **Genetical Research**, v. 71, n. 3, p. 213–222, 1998.

SANTANA, Q. C. ET AL. Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. **BioTechniques**, v. 46, n. 3, p. 217–223, 2009.

SCHLÖTTERER, C.; HARR, B. *Drosophila virilis* has long and highly polymorphic microsatellites. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 11, p. 1641–1646, 2000.

SCHULZE, M. ET AL. Evaluating ipê (*Tabebuia*, Bignoniaceae) logging in Amazonia: Sustainable management or catalyst for forest degradation? **Biological Conservation**, v. 141, n. 8, p. 2071–

2085, 2008.

SEEB, J. E. ET AL. Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. SUPPL. 1, p. 1–8, 2011.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, n. 5, p. 615–629, 2006.

SILVA-JUNIOR, O. ET AL. Genome assembly of the Pink Ipê (*Handroanthus impetiginosus*, Bignoniaceae), a highly valued, ecologically keystone Neotropical timber forest tree. **GigaScience**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2018.

SINGH, A. K. et al. Identification, analysis and development of salt responsive candidate gene based SSR markers in wheat. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2018.

SOARES, S. D. et al. Genetic diversity in populations of African mahogany (*Khaya grandfoliolata* C. DC.) introduced in Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 20180162, n. 43, 2020.

SON, D. J. et al. Inhibitory effects of *Tabebuia impetiginosa* inner bark extract on platelet aggregation and vascular smooth muscle cell proliferation through suppressions of arachidonic acid liberation and ERK1/2 MAPK activation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 148–151, 2006.

SORKHEH, K. et al. In silico search, characterization and validation of new EST-SSR markers in the genus *Prunus*. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016.

STRAND, M. ET AL. DESESTABILIZATION OF TRACTS OF SIMPLE REPETITIVE DNA IN YEAST BY MUTATIONS AFFECTING DNA MISMATCH REPAIR. **NATURE**, v. 365, p. 3, 1993.

TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes : Survey and Analysis. **Genome Research**, v. 10, p. 967–981, 2000.

TROPICALTIMBERMARKET REPORT-ITTO. v. 24, n. 12, 2020.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**, p. 181, 2017.

VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48–55, 2005.

YASODHA, R. et al. Draft genome of a high value tropical timber tree, Teak (*Tectona grandis* L. f): insights into SSR diversity, phylogeny and conservation. **DNA Research**, v. 25, n. 4, p. 409–419, 2018.

YU, H. Y. et al. Development of polymorphic microsatellite markers for *Incarvillea sinensis* (Bignoniaceae). **American Journal of Botany**, v. 98, n. 8, ago. 2011.

ZAKI, N. M. et al. *Elaeis oleifera* genomic-SSR markers: Exploitation in oil palm germplasm diversity and cross-amplification in arecaceae. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 4, p. 4069–4088, 2012.

ZHANG, G. et al. Development and characterization of novel EST-SSRs from *Larix gmelinii* and their cross-species transferability. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12469–12480, 2015.