



Protocolo de PCR para cpSSR marcados e não marcados Modificado de Canuto (2011)

Reagentes	Concentração inicial	Concentração final	Volume
Água MiliQ	-	-	4,9 µl
Tampão	10 X	1 X	1 µl
MgCl ₂	50 mM	2,5 mM	0,5 µl
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	0,8 µl
TBT	5 X	0,5 X	1 µl
Primer Foward	10 µM	0,25 µM	0,25 µl
Primer Reverse	10 µM	0,25 µM	0,25 µl
Taq (caseira)	-	-	0,3 µl
DNA	10 ng/µl	1 ng/µl	1 µl
Total			10 µl

PROGRAMA PCR cpSSR:

1. Desnaturação inicial – 1x:

94°C por 5min

2. Ciclos – 30x:

94°C por 1min

Temperatura de anelamento de cada primer por 1min [**ccmp2** (PET – 52°C), **ccmp3** (NED – 56°C), **ccmp4** (PET – 54°C), **ccmp5** (VIC – 54°C), **ccmp6** (VIC – 58°C), **ccmp7** (NED – 56°C), **ccmp10** (FAM – 54°C), desenvolvidos por Weising e Gardner (1999) e o **emcrc74** (FAM – 56°C) (Steane et al, 2005)]

72°C por 1min

3. Extensão final – 1x:

72°C por 10 min

CANUTO JZ (2011) Phylogeography of *Curatella americana* L. (Dilleniaceae): a tree species of the Amazon and savannas of central Brazil. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

STEANE DA, JONES RC, VAILLANCOURT RE (2005) A set of chloroplast microsatellite primers for Eucalyptus (Myrtaceae). Molecular Ecology Notes, 5:538-541.

WEISING K, GARDNER RC (1999) A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. Genome, 42:9-19.