



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

EDUARDO AUGUSTO RUAS

**ANÁLISE GENÉTICA DE ESPÉCIES ARBÓREAS DE UM  
REMANESCENTE DA MATA ATLÂNTICA “PARQUE  
ESTADUAL MATA DOS GODOY” EM LONDRINA-PR, POR  
MARCADORES MOLECULARES DE AFLP E  
MICROSSATÉLITES**

---

Londrina  
2009

EDUARDO AUGUSTO RUAS

**ANÁLISE GENÉTICA DE ESPÉCIES ARBÓREAS DE UM  
REMANESCENTE DA MATA ATLÂNTICA “PARQUE  
ESTADUAL MATA DOS GODOY” EM LONDRINA-PR, POR  
MARCADORES MOLECULARES DE AFLP E  
MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, com requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador(a): Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas  
Co- Orientador(a): Prof. Dra. Claudete de Fátima Ruas

Londrina  
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

R894a Ruas, Eduardo Augusto.

Análise genética de espécies arbóreas de um remanescente da Mata Atlântica  
“Parque Estadual Mata dos Godoy” em Londrina-PR, por marcadores moleculares  
de AFLP e Microssatélites / Eduardo Augusto Ruas. – Londrina, 2009.  
71 f.: il.

Orientador: Paulo Maurício Ruas.

Co-orientador: Claudete de Fátima Ruas.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro  
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Genética florestal – Teses. 2. Genética de populações – Teses. 3. Degradação  
ambiental – Teses. I. Ruas, Paulo Maurício. II. Ruas, Claudete de Fátima.  
III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa  
de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 581.5:634.02

EDUARDO AUGUSTO RUAS

**ANÁLISE GENÉTICA DE ESPÉCIES ARBÓREAS DE UM  
REMANESCENTE DA MATA ATLÂNTICA “PARQUE  
ESTADUAL MATA DOS GODOY” EM LONDRINA-PR, POR  
MARCADORES MOLECULARES DE AFLP E  
MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, com requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Titular: Prof. Dr. Ricardo Tadeu Faria – UEL

---

Titular: Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia – UEL

---

Titular: Prof. Dr. José Antônio Pimenta – UEL

---

Titular: Prof. Dr. Alberto José Prioli – UEM

---

Suplente: Prof. Dr. Edmílson Bianchini – UEL

---

Suplente: Prof. Dr. Moacyr Eurípedes Medri –  
UEL

---

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas – Orientador  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 18 setembro 2009.

### **Dedico esta tese...**

...aos meus familiares, em especial aos meus pais Paulo e Claudete, que participaram da minha formação como ser humano e como pesquisador, minha querida esposa Lígia que sempre me deu apoio, mesmo em meus momentos de desânimo e ao meu primo/amigo, irmão de caminhada, pela sua real, verdadeira e inabalável amizade.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Grande Mãe do Universo que sempre guiou meus passos e de onde tiro toda a força necessária para me manter no caminho da bondade, honra e retidão de caráter;

Aos meus pais e orientadores não só pelo constante apoio no desenvolvimento deste trabalho, mas sobretudo pela demonstração de caráter, força e determinação que sempre me nortearam para seguir em direção à realização dos meus sonhos;

Minha querida esposa que pelo apoio e companherismo durante esta jornada;

Ao meu irmão André e sua esposa Pâmela, pela amizade e por terem enriquecido minha vida com a vinda de minha querida sobrinha Beatriz;

A minha querida amiga Vilma, pelo incentivo e pelas horas de conversas agradáveis e descontraídas;

Ao meu primo e amigo Renan e meus tios Omar e Graice pelo apoio incondicional, carinho e amizade

Aos Professores, Edimílson, Pimenta, Luis dos Anjos, José Lopes e Sílvia, que contribuíram com informações relevantes para o desenvolvimento e conclusão desta tese;

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, pelo apoio financeiro por possibilitar o desenvolvimento deste trabalho e assim contribuir para minha formação;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

Ao CNPq (Processo no. 478179/2006-5 ) e Fundação Araucária (Processo no. 9705) pelo apoio financeiro;

E aos colegas do Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas, Luana, Bruno, Maikel, André, Juliana, Karina, Laís e todos os demais, que me apoiaram e que fizeram do ambiente de trabalho um local feliz e agradável para se trabalhar, e pela sincera amizade desenvolvida entre nós, ajudando a enfrentar com alegria os momentos difíceis.

RUAS, Eduardo Augusto. **Análise genética de espécies arbóreas de um remanescente da Mata Atlântica “Parque Estadual Mata dos Godoy” em Londrina-Pr, por marcadores moleculares de AFLP e Microssatélites.** 2009. 82f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## RESUMO

O intenso processo de fragmentação das florestas tropicais é um dos problemas ambientais mais marcantes do século XXI, sendo responsável não apenas degradação ambiental, como também, por alterações climáticas e perda da biodiversidade. Este processo tem sido foco de muitos estudos que visam, primariamente, identificar o efeito da devastação sobre o pool gênico de espécies e populações de áreas degradadas. A bacia do Rio Tibagi, localizada na porção centro-leste do Paraná e com uma área aproximada de 24.711 km<sup>2</sup>, detém cerca de 13% da superfície do Estado do Paraná. Por compreender tipos climáticos distintos, a vegetação da bacia do Rio Tibagi é altamente heterogênea. Entretanto, devido ao processo de colonização dos últimos 50 anos, a flora da região tem sido fortemente impactada e a cobertura florestal nativa remanescente corresponde, atualmente, a apenas 3,8% da vegetação original. Nestes fragmentos várias populações de espécies arbóreas se encontram mais ou menos isoladas. As técnicas de obtenção de marcadores moleculares tem sido amplamente utilizadas para o estudos de áreas impactadas pela ação humana. Este trabalho teve por objetivo o estudo de duas espécies arbóreas (*Campomanesi. xanthocarpa* e *Luehea divaricata*), que ocorrem na bacia do Rio Tibagi, usando marcadores de AFLP e microssatélites. Duas populações naturais de *Campomanesia xanthocarpa* originárias das porções norte e sul do Parque Estadual Mata dos Godoy, no baixo Tibagi, foram estudadas através de marcadores moleculares de AFLP. Seis combinações de primers seletivos foram amplificadas gerando 181 marcadores, dos quais, 92,27% e 92,82% foram polimórficos para as populações das regiões sul e norte, respectivamente. Valores de diversidade gênica ( $H_S$ ) para as populações do sul e norte do fragmento apresentaram resultados similares (0,3292 e 0,3221, respectivamente). O valor de  $F_{ST}$  foi 0,1801, com uma distância genética de 0,1006 entre populações. A análise de agrupamento PCoA mostrou a formação de dois clusters distintos, com alguns indivíduos da população sul agrupando juntamente com aqueles da população norte. Análise bayesiana para o número de agrupamentos K demonstrou que em 61,8% das vezes, indivíduos foram atribuídos às populações de onde foram amostrados. Os níveis de conservação genética foram considerados satisfatórios e representam informações valiosas para estas populações de *Campomanesia xanthocarpa*. Para os estudos com a espécie *Luehea divaricata*, isolamos, a partir do desenvolvimento de uma biblioteca enriquecida em microssatélites, dez locus de SSR. A amplificação destes locus gerou, em 42 indivíduos, um total de 45 alelos, com uma média de 4,5 alelos por locus. A média do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi de 0,546 e os valores de heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) variaram de 0 a 0,929 e 0,194 a 0,821, respectivamente. Quatro locus exibiram desequilíbrio de ligação ( $p \leq 0,01$ ). Os primers foram testados para amplificação cruzada em nove espécies da família Malvaceae. Estes resultados preliminares demonstram a utilidade destes microssatélites em acessar a estrutura genética de *Luehea divaricata* e gêneros relacionados.

**Palavras-chave:** Genética de populações. Fragmentos florestais. AFLP. Bibliotecas de microssatélites.

RUAS, Eduardo Augusto. **Analysis of genetic variation of tree species from a Atlantic Forest remnant “Parque Estadual Mata dos Godoy” in Londrina-Pr, with molecular markers AFLP and Microsatellites.** 2009. 82p. Thesis (Doctor in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

## ABSTRACT

The intense fragmentation process of the tropical forests is one of the most important issues of the XXI century, being directly responsible for environmental degradation, climate changes and the loss of biodiversity. Such process is the focus of many studies that intend, primarily, to identify the effect of devastation in the gene pool of species that occupy degraded areas. The Tibagi River basin, situated in the east-center portion of the Paraná State with an approximate area of 24.711 Km<sup>2</sup>, comprising around 13% of the area of the State. Extending through different climate zones, the vegetation of the Tibagi River basin is highly heterogeneous. However, due to the colonization process that occurred in the last 50 years, the flora of the region has being highly impacted and the native forest cover corresponds, nowadays, to only 3.8% of it's original area. Within these fragments many populations of tree species are more or less isolated. Molecular markers techniques have being widely used in studies of anthropogenic impacted areas. The aim of present study was to investigate two tree species (*Campomanesia xanthocarpa* e *Luehea divaricata*), that occur in the Tibagi River basin, using AFLP and microsatellite markers. Two natural populations of *Campomanesia xanthocarpa* originated from the north and south portions of the Parque Estadual Mata dos Godoy, Lower Tibagi region, were studied using AFLP markers. Six selective primer combinations were amplified generating 181 markers, of wich, 92.27% and 92.82% were polymorphic for the south and north populations, respectively. Values of gene diversity ( $H_S$ ) for the populations from south and north portions of the fragments yielded similar results (0.3292 and 0.3221, respectively). The  $F_{ST}$  for both populations was 0.1801, with a genetic distance of 0.1006 between populations. The principal coordinate analysis PCoA showed the formation of two distinct groups, with some individuals from the south population clustering with the individuals from the north population. Bayesian analysis for the number of cluster K, demonstrated that in 61.8%, individuals were signed to the populations from which they were sampled. The levels of genetic conservation are considered satisfactory and represent valuable information on the natural populations of *C. xanthocarpa* studied. For studies of the species *Luehea divaricata*, we isolated, through the development of a microsatellite enriched library, ten SSR loci. The amplification of these loci generated, in 42 individuals, a total of 45 alleles, with an average of 4,5 alleles per locus. The average polymorphic information content (PIC) was 0,546 and the values of observed ( $H_O$ ) and expected heterozigosity ( $H_E$ ) varied from 0 to 0.929 and 0.194 to 0.821, respectively. Four loci exhibited linkage disequilibrium ( $p \leq 0.01$ ). Primers were tested for cross-species amplification within nine species of the Malvaceae family. These preliminary results demonstrate the usefulness of these microsatellites in accessing the genetic structure of *Luehea divaricata* and related genera.

**Keywords:** Population genetics. Forest fragments. AFLP. Microsatellite library.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> – Cobertura florestal natural do Estado do Paraná (Sanquetta, 2003).....	21
<b>Figura 3.2</b> – Reflorestamento do Estado do Paraná (Sanquetta, 2003) .....	22
<b>Figura 3.3</b> – Zonas climáticas da bacia do Rio Tibagi (adaptado de Medonça, F. e Dani-Oliveira, I. F., 2002) .....	23
<b>Figura 3.4</b> – Tipos florestais da bacia do Rio Tibagi (adaptado de Maack, 1951).....	23
<b>Figura 3.5</b> – Etapas de reação da técnica de marcadores moleculares de AFLP .....	30
<b>Figura 3.6</b> – Padrão eletroforético de marcadores AFLP, resolvidos em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, para a espécie de <i>C. xanthocarpa</i> .....	31
<b>Figura 3.7</b> – Etapas de construção de uma biblioteca de microssatélite.....	36
<b>Figura 3.8</b> – Características morfológicas de <i>C. xanthocarpa</i> . Em detalhe ramos com flores, frutos, sementes, casca e aspecto da madeira (cf. Lorenzi, 1998).....	42
<b>Figura 3.9</b> – Características morfológicas de <i>L. divaricata</i> , detalhando ramo com flores, frutos, sementes, casca e aspecto da madeira (cf. Lorenzi, 1998).....	43
<b>Figure 4.1</b> – Location of two studied populations of <i>C. xanthocarpa</i> from Parque Estadual Mata dos Godoy (23°27'S, 51°15'W).....	49
<b>Figure 4.2</b> – Coefficient of variation for the number of amplified markers in two populations of <i>C. xanthocarpa</i> from Parque Estadual Mata dos Godoy .....	52
<b>Figure 4.3</b> – Principal Coordinate Analysis of two populations of <i>C. xanthocarpa</i> from Parque Estadual Mata dos Godoy .....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 4.1</b> – Percentage of polymorphic loci (Pp), Nei’s (1978) gene diversity (Hs) and genetic distance of two populations of <i>C. xanthocarpa</i> from Parque Estadual Mata dos Godoy, based on AFLP markers).....	53
<b>Table 4.2</b> – Analysis of molecular variance (AMOVA) in two populations of <i>C. xanthocarpa</i> from Parque Estadual Mata dos Godoy, based on AFLP data.....	54
<b>Table 5.1</b> – Characterization of ten polymorphic microsatellite loci genotyped in 42 individuals of the riparian species <i>L. divaricata</i> . <i>Allele size</i> is the range of observed alleles in bp; <i>K</i> is number of alleles; <i>PIC</i> is the polymorphic information content, <i>H<sub>O</sub></i> and <i>H<sub>E</sub></i> are observed and expected heterozygosities, respectively; <i>P</i> -value indicates significance of deviation from Hardy–Weinberg equilibrium .....	65
<b>Table 5.2</b> – Significant linkage disequilibrium for 24 pair combinations of ten microsatellite loci of <i>L. divaricata</i> .....	66
<b>Table 5.3</b> – Cross-amplification test of ten microsatellite loci throughout nine species of the Malvaceae family .....	67

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 JUSTIFICATIVAS .....	16
2.2 OBJETIVOS .....	16
2.2.1 Objetivos Gerais .....	16
2.2.2 Objetivos Específicos .....	17
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
3.1 DIVERSIDADE GENÉTICA E FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS .....	18
3.2 REGIÃO DE ESTUDO .....	21
3.3 MARCADORES MOLECULARES .....	25
3.3.1 Marcadores Moleculares de AFLP .....	28
3.3.2 Marcadores Moleculares de Microsatélites (SSR) e construção de bibliotecas enriquecidas de microsatélites .....	32
3.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ANÁLISES BAYESIANAS NO ESTUDO GENÉTICO DE POPULAÇÕES .....	37
3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS .....	40
3.5.1 <i>Campomanesia xanthocarpa</i> .....	40
3.5.2 <i>Luehea divaricata</i> .....	42
<b>4 ARTIGO A – GENETIC VARIATION IN TWO POPULATIONS OF <i>Campomanesia xanthocarpa</i> (Myrtaceae) FROM THE NATIVE FOREST OF THE PARQUE ESTADUAL MATA DOS GODOY USING AFLP MARKERS</b> .....	44
Abstract e Resumo .....	44
4.1 INTRODUCTION .....	46
4.2 MATERIAL AND METHODS .....	48
4.3 RESULTS AND DISCUSSION .....	51
4.4 ACKNOWLEDGEMENTS .....	56
4.5 REFERENCES .....	56

<b>5 ARTIGO B – ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TEN MICROSATELLITE LOCI FOR THE TREE SPECIES <i>Luehea divaricata</i> MART. (Malvaceae) AND INTERGENERIC TRANSFERABILITY .....</b>	<b>61</b>
Abstract e Resumo .....	61
5.1 ARTICLE .....	62
5.2 REFERENCES.....	68
 <b>6 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>69</b>
 <b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado como o país detentor da maior diversidade genética vegetal do planeta, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 a 550.000 espécies de plantas (DIAS, 1996). Esta biodiversidade, de acordo com o World Wide Resources Institute, encontra-se seriamente ameaçada. O ritmo atual de extinção de plantas já se encontra em um nível 50 a 100 vezes maior que as médias observadas no século passado. Enquanto estima-se que sem a ação antrópica uma espécie vive entre um e dez milhões de anos, as observações feitas nos últimos quatro séculos apontam a extinção de um mamífero a cada 400 anos e de uma ave a cada 200 anos (TILMAN et al., 1997).

Estima-se que, mantido o ritmo atual, até o ano de 2015 podem desaparecer entre 4 e 8% das espécies presentes nas florestas tropicais. Especificamente para plantas, estes valores correspondem a 15 milhões de hectares por ano, o que significa uma perda de aproximadamente 1% ao ano, já que restam 1 bilhão e 700 milhões de hectares de florestas tropicais. A América do Sul detém 52% destas florestas e, somente na década de 80, o Brasil respondeu por 28% das perdas de florestas tropicais e por 14% dos outros tipos de florestas (TILMAN et al., 1997).

O Estado do Paraná, com uma área de 200.000 Km<sup>2</sup> de extensão, possuía inicialmente 85% de sua área coberta por formações florestais (MAACK, 1968). Atualmente, devido ao intenso processo de devastação, a área de cobertura vegetal se encontra em apenas 2-4% da original. Desta pequena porcentagem, apenas 0,1%, se encontram dentro das 26 unidades de conservação do Estado (Secretaria Estadual do Meio-Ambiente-SEMA, 1995).

A bacia do Rio Tibagi, localizada na porção centro-leste do Paraná e com uma área de 24.711 km<sup>2</sup>, detém cerca de 13% da superfície do estado. Por compreender tipos climáticos distintos, a vegetação da bacia do Rio Tibagi é bastante heterogênea. Entretanto, devido ao processo de colonização intensificado nos últimos 50 anos, a flora da região tem sido fortemente afetada. A cobertura florestal nativa foi reduzida a 3,8% da área original, restando poucos remanescentes preservados nos quais, várias populações de espécies arbóreas se encontram mais ou menos isoladas (TOREZAN, 2002). Um dos maiores fragmentos de floresta

nativa preservada do Estado do Paraná encontra-se na bacia do Rio Tibagi, no Parque Estadual Mata dos Godoy o qual é composto de uma floresta estacional semidecidual. A Mata dos Godoy apresenta diferentes tipos de ambientes. Ao norte, a área do parque é formada por uma planície, enquanto uma área íngreme ocorre em direção à porção sul, com áreas aluviais alagáveis na delimitação sul, às margens do ribeirão dos Apertados. Estas características fazem com que este fragmento florestal apresente uma diversidade de espécies heterogênea ao longo de sua área (SILVEIRA, 1996).

O atual estágio de degradação do bioma florestal no Estado do Paraná resulta de um processo histórico de ocupação da terra, já que durante anos houve o incentivo da conversão de florestas para expansão da fronteira agrícola. Aliados a estes fatores, ocorre a falta de conhecimento em relação ao tamanho que uma comunidade deve apresentar, para se manter viável em uma população isolada em fragmentos. A presença de fragmentos florestais nativos pode significar a melhoria na diversidade paisagística da área, como também, pode aumentar a conexão funcional, como por exemplo, manutenção do fluxo gênico entre remanescentes (BITTENCOURT, 2007). Assim, uma das consequências da fragmentação é a alteração nos padrões de troca de genes entre as populações e, como consequência, alterações na variabilidade e estrutura genética das populações (BALLAL et al., 1994).

Segundo Young e Brown (1999), a perda de diversidade genética dentro de espécies pode estar relacionada a um efeito “gargalo”, que quando muito severo pode levar as populações de remanescentes florestais de tamanho efetivo pequeno a ação da deriva genética, caso estas populações permaneçam isoladas por certo número de gerações. A capacidade de uma espécie em responder a novas pressões ambientais é limitada dentro de sua diversidade intra-específica, podendo a diminuição desta variabilidade levar, em casos mais severos, esta população a extinção.

Estudos da estrutura genética em formações florestais com o enfoque de fragmentação de habitats ainda são escassos (ALDRICH et al., 1998). Entretanto, o entendimento da estrutura genética das espécies existentes nos fragmentos florestais é fundamental para a escolha correta das estratégias de manejo e conservação a serem implantadas nestas e em outras áreas (KAGEYAMA, 1987). Inúmeras técnicas, que fazem uso de marcadores moleculares, tem sido

utilizadas para gerar conhecimento sobre as características genéticas de espécies animais e vegetais dentro de uma população. Segundo Pigato e Lopes (2001), os marcadores moleculares têm auxiliado grandemente o estudo de populações florestais. Essas técnicas identificam polimorfismo ao nível molecular, facilitando a compreensão sobre a distribuição da variabilidade genética nas populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Atualmente, as técnicas de AFLP (Amplified Fragment length polymorphism) e de SSR (Simple Sequence Repeats) ou microsatélites tem sido amplamente utilizadas para identificar níveis de variabilidade genética entre populações. A técnica de AFLP, descrita por Vos et al. (1995), explora a simplicidade na geração de grande número de marcadores que abrangem todo o genoma, sem que haja necessidade de conhecimento prévio do mesmo. Uma das principais vantagens desta técnica é que a sua repetibilidade é relativamente elevada. Porém, os marcadores gerados por AFLP são dominantes e não é possível uma distinção entre homozigotos e heterozigotos (GAUDEUL et al., 2000). Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares, os SSRs tem sido com frequência escolhidos para estudos de diversidade e de estrutura genética de populações de plantas. A técnica tem como base a identificação de polimorfismo, gerado pela variação do tamanho de regiões repetidas de di-, tri-, tetra- ou penta-nucleotídeos no genoma. Entre as principais vantagens da técnica de SSR destacam-se, a pequena quantidade de DNA necessária por amostra, a facilidade de detecção por PCR, a facilidade de análise, a herança co-dominante, o multi-alelismo, assim como a alta informatividade e abundância no genoma (POWELL et al., 1996; GUPTA; VARSHNEY, 2000). A principal dificuldade no uso dos SSRs é a necessidade de seqüenciamento das extremidades das regiões do genoma com as repetições e o delineamento dos primers usados na PCR.

*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae), conhecida comumente como gabirobeira ou apenas gabiroba, é uma espécie arbórea com ampla ocorrência na bacia do Rio Tibagi. Esta espécie é seletivamente higrófila e mesófila podendo ser heliófila. É muito frequente em regiões de solos úmidos compactos das matas dos pinhais, em capões e em matas de galeria, chegando por vezes, a ser uma das espécies dominantes nas submatas mais abertas, sobretudo em áreas onde os solos tem grande umidade, tais como áreas com depressões ou proximidade de rios. Tais fatores fazem com que esta espécie seja de extrema

importância em programas que visem a recomposição de áreas de solos hidromórficos e fragmentos de matas no Estado do Paraná (REITZ, 1977) e em outras áreas de ocorrência da espécie. Os marcadores AFLP foram selecionados para o estudo de populações de *C. xanthocarpa*.

*Luehea divaricata* Martus et Zuccarini (Malvaceae), comumente conhecida como açoita-cavalo, é uma espécie pioneira frequentemente utilizada em programas de reflorestamento de fragmentos de florestas tropicais (LORENZI, 2002). Amplamente distribuída por todas as áreas da bacia do Rio Tibagi, esta espécie pode ser encontrada com frequência em fragmentos florestais, margeando cursos d'água e em solos de regiões secas e alagáveis. Uma biblioteca enriquecida em sequências de microssatélites foi desenvolvida para posteriores estudos populacionais na espécie *L. divaricata*. Por apresentarem um alto índice de informação polimórfica (PIC), os marcadores de microssatélites serão de grande utilidade para estudar a estrutura genética de populações desta espécie e inferir sobre possíveis eventos evolutivos que possam estar moldando esta variabilidade.

## 2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

### 2.1 JUSTIFICATIVAS

Devido a intensa degradação das matas no Estado do Paraná, provocada principalmente pela estabelecimento de campos de cultivo que se estendem por grandes áreas, onde outrora, florestas predominavam, se faz necessário a elaboração e execução de projetos de recuperação e manejo dos fragmentos florestais que ainda persistem. Tais projetos só podem ser adequados e eficientes se embasados em informações científicas obtidas a partir de estudos sistematizados das características genéticas e ambientais de cada uma destas áreas a serem recuperadas.

A ausência de um vasto número de estudos genéticos envolvendo espécies vegetais tropicais, especialmente arbóreas, leva à necessidade da elaboração de um quadro de informações com o maior número de espécies possível e que possa orientar a seleção de espécies e populações a serem utilizadas em projetos de reflorestamento de áreas degradadas.

### 2.2 OBJETIVOS

#### 2.2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral deste trabalho foi utilizar marcadores moleculares de AFLP e microssatélites para estudos dos sistemas populacionais de espécies arbóreas da bacia do Rio Tibagi, com ênfase nas espécies *Campomanesia xanthocarpa* e *Luehea divaricata*, de ampla ocorrência em fragmentos florestais e de grande potencial para programas de recuperação de áreas degradadas. Os objetivos específicos incluem: a) aplicar a técnica de AFLP para investigar a estrutura genética de duas populações de *C. xanthocarpa*, que ocorrem nas porções norte e sul do

Parque Estadual Mata dos Godoy, localizado em Londrina, PR, Brasil; b) desenvolver uma biblioteca enriquecida em microssatélites para a espécie *Luehea divaricata*, visando a construção de primers que possam ser aplicados em estudos de populações nesta espécie e em espécies próximas.

### **2.2.2 Obejetivos Específicos**

- Avaliar a diversidade genética de populações de *Campomanesia xanthocarpa* presentes em área de preservação permanente.
- Verificar a se ocorre diferenciação nas características genéticas de cada população devido a pressões ambientais diferentes em populações de *Campomanesia xanthocarpa*.
- Construção de biblioteca enriquecida em microssatélites para espécie arbórea *Luehea divaricata*.
- Identificar e caracterizar primers de microssatélites para futuros estudos genéticos da espécie arbórea *Luehea divaricata*.
- Testar a transferência dos primers caracterizados para outras espécies próximas da família Malvaceae.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 DIVERSIDADE GENÉTICA E FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS

A base para a evolução das espécies concentra-se na variação genética presente em cada população de uma determinada espécie (FOSTER; RAHS, 1985). A proteção da diversidade genética dentro das espécies em geral é uma prioridade inerente a projetos de conservação (BARRET; KOHN, 1991), sendo o objetivo a longo prazo manter a variabilidade das espécies, já que as características genéticas podem influenciar processos fisiológicos e demográficos das populações.

O entendimento da estrutura genética de populações das espécies de ocorrência nos remanescentes florestais é fundamental para o estabelecimento de critérios adequados no uso destas populações para a recomposição dos ecossistemas, objetivando a manutenção da biodiversidade (KAGEYAMA, 1987). Para tal, se faz necessário não só o conhecimento da diversidade de espécies, mas também conhecer a variabilidade genética dentro e entre populações presentes nestas áreas. Entretanto, poucos estudos foram realizados sobre a diversidade genética em regiões neotropicais, sendo este o maior desafio existente aos conservacionistas de recursos genéticos. Até hoje, a estrutura genética em uma ampla região geográfica das espécies arbóreas dos neotrópicos é praticamente desconhecida (CHASE et. al., 1995).

A variabilidade genética pode ocorrer em níveis distintos: 1) de espécies dentro de ecossistemas; 2) de populações dentro de espécies; e 3) de indivíduos dentro de populações de espécies. Sendo a caracterização destes níveis requisito básico para o planejamento de estratégias de conservação genética (KAGEYAMA, 1987). Assim, estrutura genética de uma espécie pode ser definida como a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, como resultado da combinação entre mutação, migração, seleção e deriva genética. Além disso, muitas espécies arbóreas possuem mecanismos efetivos para a dispersão de alelos sendo por isso, capazes de manter altos níveis de variabilidade genética

dentro de populações (HAMRICK et al., 1979; HAMRICK, 1983; LOVELESS; HAMRICK, 1987). Hamrick (1983), estudando várias populações naturais de espécies arbóreas tropicais, concluiu que a variabilidade genética entre e dentro de populações pode ser afetada diretamente pelo sistema reprodutivo, síndrome de dispersão de pólen e mecanismo de dispersão de sementes, além do tamanho efetivo de cada população. Estes fatores estão também diretamente relacionados com a distribuição geográfica da espécie e com o tipo de comunidade em que ela ocorre naturalmente.

O aumento da utilização dos recursos florestais, em face da perda gradual da sustentabilidade e do potencial das florestas (KAGEYAMA, 1987), enfatiza a importância do estudo da variação genética em florestas naturais, uma vez que, as espécies arbóreas presente nestas áreas, geralmente, são consideradas espécies de extrema importância nos ecossistemas florestais, sendo que muitas associações da fauna e flora dependem do ambiente criado em decorrência de sua instalação (RAJORA; MOSSLER, 2001). Ainda, a conservação e o manejo da biodiversidade mesmo em áreas protegidas, constituem-se em um desafio complexo que requer o conhecimento básico sobre a distribuição e abundância no número de espécies, sua biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações (ZUCCHI, 2002).

O processo de devastação das florestas tropicais é um dos problemas ambientais mais marcantes do século XXI, causando não apenas degradação ambiental, como também, alterações climáticas e perda da biodiversidade. A intensa fragmentação de áreas florestais e a sua ocupação desordenada, tanto para exploração agrícola como para a expansão de áreas urbanas e industriais, têm acarretado preocupações em relação ao uso não sustentável dos recursos naturais (BARBOSA; MANTOVANI, 2000). Em função dos sucessivos ciclos de uso do solo, grande parte das regiões tropicais apresentam sua cobertura florestal nativa altamente fragmentada e/ou restrita a pequenas porções de terra onde a expansão agropecuária ou urbana não foi possível. Neste processo de degradação, não foram poupadas nem mesmo as áreas ciliares ou de preservação permanente, sendo que nestas regiões, a expansão da agricultura é o principal fator causador de fragmentação de ecossistemas (RODRIGUES et al., 2004).

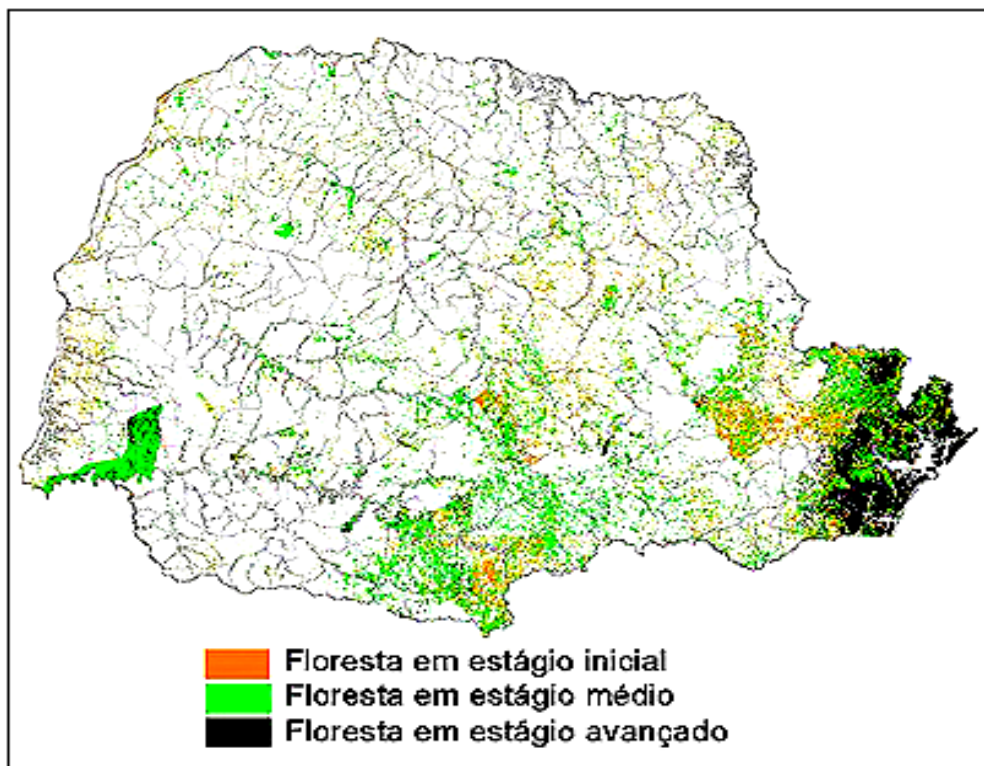
Tal processo contribui para o declínio da riqueza e crescente risco de

extinção de espécies vegetais (HARRIS, 1980). Estima-se que, em 50 anos, aproximadamente 25% das espécies vasculares estarão extintas (KALA, 2000). Tal perda de espécies não se dá simplesmente por um efeito de redução do número de indivíduos, mas também pela perda das condições do habitat onde elas se encontram, já que algumas espécies não persistem em fragmentos devido às alterações das condições microclimáticas em relação à floresta contínua, resultantes do efeito de borda (LOVEJOY, 1983). Outras espécies são extintas nos fragmentos devido a eventos genéticos ou demográficos (SHAFFER, 1981), perda de variabilidade genética (LANDE, 1988) e declínio das taxas de reprodução devido a perda de polinizadores (AIZEN; FEINSINGER, 1994). Nos fragmentos florestais pequenos, ocorre uma transição abrupta entre os habitats, dentro do fragmento e as regiões adjacentes, promovendo profundas alterações bióticas e abióticas nestes locais, que terão maior ou menor penetração dependendo do tamanho do fragmento (MURCIA, 1995). Em áreas de grande fragmentação, espécies invasoras, que se beneficiam das atividades antrópicas, podem, ao longo do tempo, alterar a composição original das florestas fragmentadas, e também influenciar a abundância e persistência de espécies da composição original (TERBORGH, 1992).

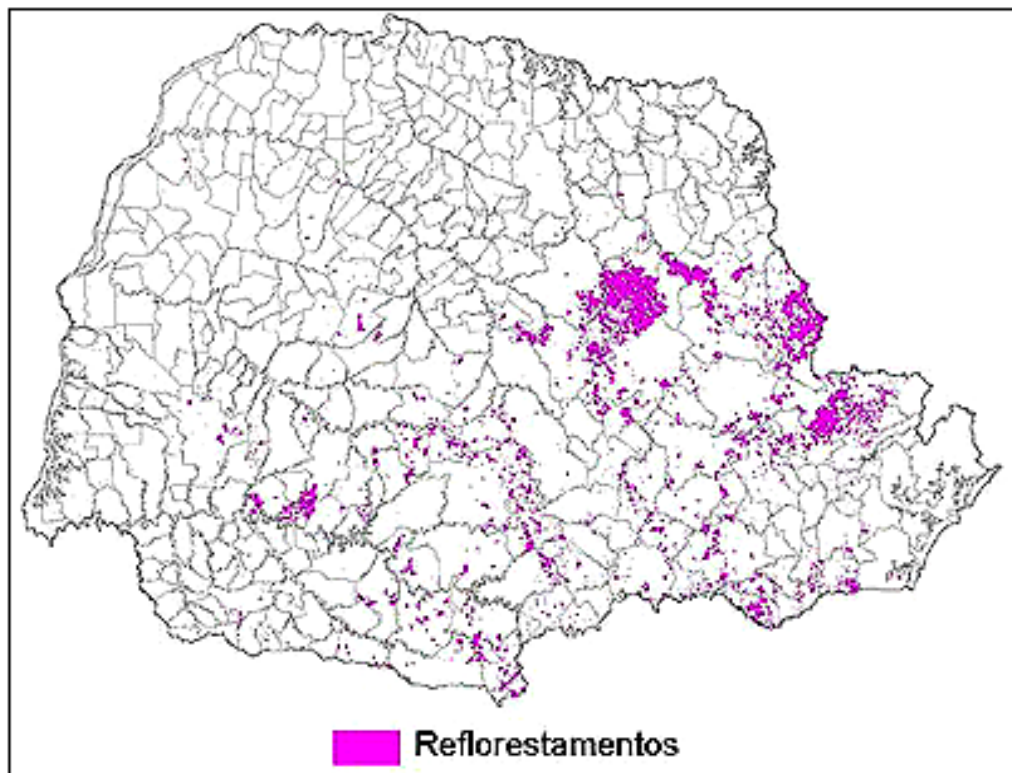
A conservação genética de espécies arbóreas tropicais é um dos tópicos mais prementes da atualidade, uma vez que as elevadas taxas de destruição das comunidades naturais e massiva extinção de espécies arbóreas é iminente (ZUCCHI, 2002). O Estado do Paraná, pela sua grande riqueza de ecossistemas terrestres e aquáticos, é também privilegiado por uma significativa biodiversidade (SEMA, 1995). Entretanto, é considerado como uma das áreas que vem sofrendo intensa pressão antrópica especialmente na bacia do Rio Tibagi, cuja situação ambiental é bastante precária, tanto em relação aos recursos hídricos quanto aos recursos florestais. Essa pressão ocorreu principalmente pela expansão da fronteira agrícola, na qual extensas áreas contínuas de vegetação natural foram substituídas por monoculturas e pastagens (DIAS et al., 1998).

### 3.2 REGIÃO DE ESTUDO

O Estado do Paraná, com uma área de aproximadamente 200.000 Km<sup>2</sup> de extensão, originalmente possuía 85% de sua área coberta por formações florestais (Maack, 1968). Atualmente, devido ao intenso processo de devastação, a área de cobertura vegetal se encontra em apenas 2-4% da original (Figura 3.1). Desta pequena porcentagem, apenas 0,1%, se encontram dentro das 26 unidades de conservação do Estado (Secretaria Estadual do Meio-Ambiente-SEMA, 1995). Recentemente, diversas iniciativas têm sido adaptadas para a recuperação de parte destas áreas onde ainda existe algum tipo de cobertura vegetal (Figura 3.2), como também, há uma crescente iniciativa de reestabelecimento das florestas ciliares (Instituto Ambiental do Paraná-IAP, 2002).

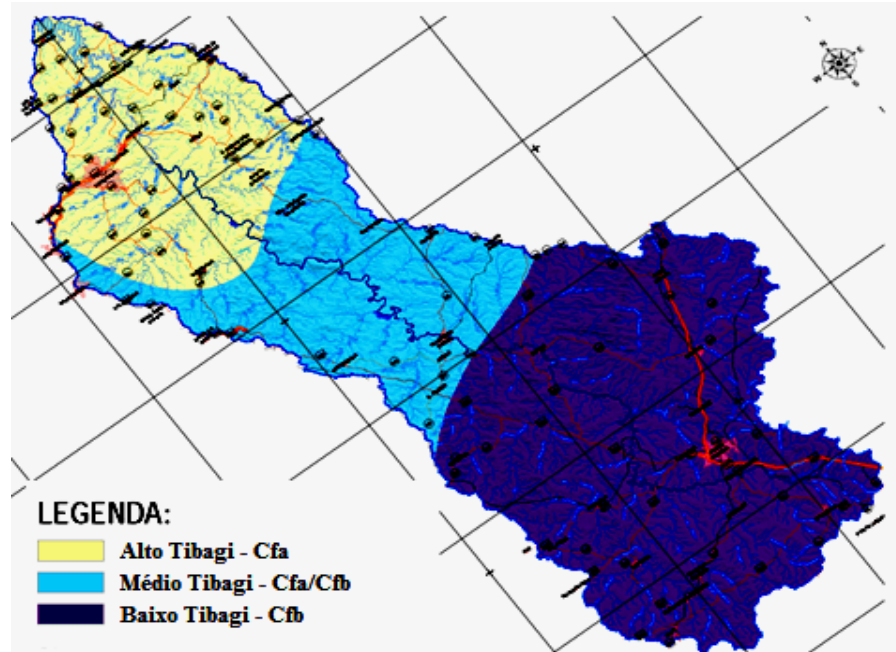


**Figura 3.1** – Cobertura florestal natural do Estado do Paraná (SANQUETTA, 2003).



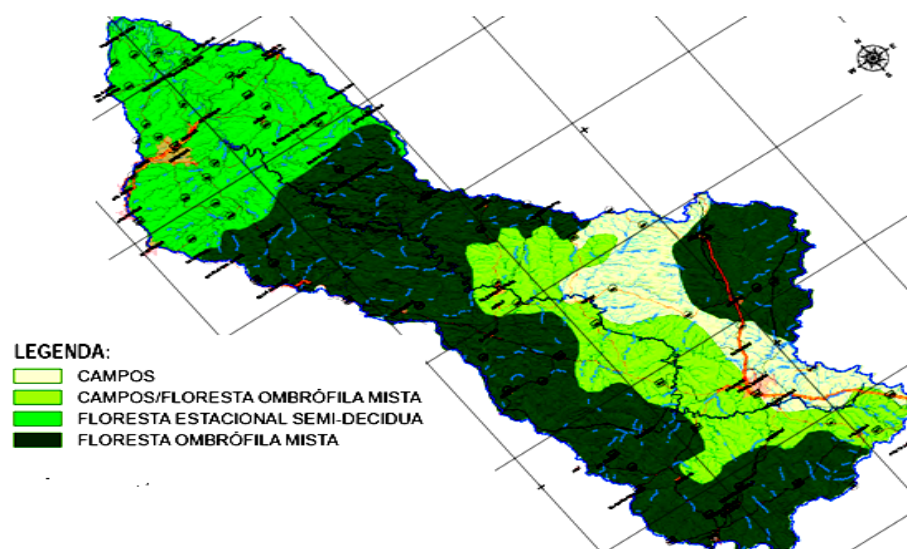
**Figura 3.2** – Reflorestamento do Estado do Paraná (SANQUETTA, 2003).

A bacia do rio Tibagi, localizada no estado do Paraná, conta com 54 municípios e cobre cerca de 24.711 Km<sup>2</sup>. É a terceira maior bacia hidrográfica do estado, ocupando 13% de sua área total. O rio Tibagi nasce em Palmeira, no segundo planalto e corre em direção ao terceiro planalto, desembocando no rio Paranapanema, no município de Primeiro de Maio. Devido aos diferentes climas que ocorrem ao longo de sua área de extensão, sua bacia hidrográfica é subdividida em três regiões, o baixo Tibagi, o médio Tibagi e o alto Tibagi, com altitudes entre 350-1.150 m e climas Cfa, Cfa/Cfb e Cfb (Figura 3.3).



**Figura 3.3** – Zonas climáticas da bacia do Rio Tibagi (adaptado de Medonça, F. e Dani-Oliveira, I. F., 2002).

Ao longo de seus 550 km de extensão são encontrados diversos tipos de vegetação (Figura 3.2). Floresta Estacional Semidecidual e Decidual (BT, MT), Floresta Ombrófila Mista (Floresta de *Araucaria*) (MT, AT), cerrados (MT), campos (AT) e florestas ripárias (BT, MT e AT) (TOREZAN 2002).



**Figura 3.4** – Tipos florestais da bacia do Rio Tibagi (adaptado de MAACK, 1951).

O Parque Estadual Mata dos Godoy foi criado pelo Decreto Estadual no. 5130, de 5 de junho de 1989. Localizado no município de Londrina (23°27' S e 51°15' W), Estado do Paraná e apresenta ótimas condições de preservação. Com uma área correspondente a 6,8 Km<sup>2</sup> e encontra-se na região do Trópico de Capricórnio, distante 15 Km da região central da cidade de Londrina (Pimenta, 1998). A área do parque é caracterizada como uma região subtropical úmida mesotérmica com clima do tipo Cfa, apresentando verões quentes e geadas pouco frequentes. Nesta região a temperatura anual média fica em torno de 21°C, variando de 4 a 7°C para mais ou para menos. O inverno é ameno, com temperatura média de 16,5 a 19,5°C, mas pode alcançar temperaturas mínimas entre 11 e 14°C. Entretanto, há registros de temperaturas tão baixas quanto 0°C. No verão as temperaturas médias ficam em torno de 31°C, podendo chegar ocasionalmente a 40°C. Nesta estação as chuvas são abundantes e podem chegar a 40% de toda a precipitação anual (VICENTE, 2006).

A Mata dos Godoy está assentada sobre solos derivados de rochas eruptivas básicas (basalto), que tem como característica a cor vermelha e que estão entre os mais férteis do mundo. Em quase metade de sua área o relevo é suave, ocorrendo latossolo vermelho eutrófico e terra vermelha estruturada eutrófica (região norte do fragmento). Nesta área os solos são profundos e bem estruturados, estando a 600 metros de altitude. Nas encostas ao sul, que são mais íngrimes, há ocorrência de solo litólico, que apresenta camada mais rasa e no qual é comum o afloramento de rochas. O ponto mais baixo da área está a 460 metros de altitude, às margens do Ribeirão dos Apertados, um dos afluentes da margem esquerda do Rio Tibagi (região sul do fragmento), formando um desnível de 140 metros entre as regiões norte e sul do Parque (BIANCHINI, 1998).

A vegetação da Mata dos Godoy é classificada como floresta estacional semidecídua submontana. Florestas como essa ocorrem entre 100 a 700 metros de altitude, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, e também em solos de fertilidade intermediária do Brasil Central. Elas são consideradas semidecíduas pois 50% de suas árvores perdem suas folhas durante o período mais seco do ano, e submontanas devido a faixa de altitude onde ocorrem (SILVEIRA, 2006).

### 3.3 MARCADORES MOLECULARES

O desenvolvimento tecnológico na área de marcadores moleculares tem sido extremamente rápido. A tecnologia do DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA via PCR (“Polymerase Chain Reaction”, ou reação de polimerase em cadeia), abriram o caminho para uma mudança no paradigma genético, fazendo a transição da “genética Mendeliana” para a “genética genômica” (BECKMANN, 1988). O estudo de genomas de plantas tem se beneficiado, sobretudo, dos avanços obtidos na área de genética humana.

O desenvolvimento dos marcadores moleculares, tem como base o polimorfismo encontrado em proteínas ou DNA e têm sido amplamente utilizados para acessar a variabilidade genética que pode ocorrer em populações humanas, de animais e de plantas. O uso de marcadores moleculares permite acessar a variabilidade genética, não mais ao nível fenotípico, mas diretamente nas variações dos padrões isoenzimáticos e de regiões aleatórias ou não do DNA. O polimorfismo genético identificado por marcadores moleculares pode ser usado para construção de mapas genéticos (WILLIAMS et al., 1990), assim como para revisar a posição sistemática de vários grupos de plantas e animais e para fazer estudos comparativos, permitindo fazer inferências sobre a origem e evolução de populações, espécies, gêneros e famílias como um todo. Além disso estes marcadores tem demonstrado grande poder de resolução da variabilidade genética encontrada em populações de plantas e animais e têm sido de grande utilidade em programas de conservação de recursos genéticos e recuperação de áreas degradadas (RAJORA; MOSSELER, 2001).

A revolução causada pelo uso dos marcadores moleculares teve início em 1959 por Market e Moller, com o descobrimento e utilização de marcadores isoenzimáticos, ampliando vastamente o número de marcadores genéticos e possibilitando a aplicação desta técnica a praticamente todas as espécies de plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). As isoenzimas consistem de múltiplas formas de uma mesma enzima, com função catalítica idêntica ou similar que diferem entre si na sequência de aminoácidos. O princípio básico da técnica consiste na utilização de eletroforese em gel e na visualização da atividade enzimática por métodos histoquímicos. Trata-se de uma técnica de fácil manipulação, ainda muito utilizada, de

custo relativamente baixo, permite analisar vários sistemas isoenzimáticos e grande número de indivíduos, permitindo a visualização de marcadores co-dominantes. Tem como propriedade mais expressiva a base genética simples envolvida na expressão destas enzimas (SOLTIS; SOLTIS, 1989), entretanto apresenta como limitações uma cobertura reduzida dos genomas investigados, devido ao pequeno número de locos que podem ser detectados, e o baixo nível de polimorfismo identificado por loco (ALFENAS, 1998; BORÉM; CAIXETA, 2006).

Com o descobrimento das enzimas de restrição, surgiu na década de 70 o primeiro marcador molecular que possibilitou detectar diferenças entre indivíduos através de clivagem em sítios específicos no DNA, o RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism” (polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição). Na técnica de RFLP, o DNA genômico de um indivíduo pode ser isolado e digerido com enzimas de restrição e os fragmentos obtidos separados em gel de agarose, gerando fragmentos de tamanho e número variáveis. Os fragmentos gerados por esta técnica necessitam ser transferidos por *Southern blot* para uma membrana de nylon ou nitrocelulose, hibridizados com sonda complementar ao DNA de interesse, marcadas radioativamente, e evidenciadas por meio de auto-radiografia (HELENTJARIS et al., 1986). O método evidencia polimorfismo nos sítios de restrição em diferentes indivíduos. Uma das principais vantagens desse marcador é a sua expressão co-dominante, que permite distinguir indivíduos homocigotos de indivíduos heterocigotos. Outra vantagem que merece destaque é a possibilidade de utilização de sondas heterólogas, permitindo o mapeamento comparativo entre as espécies. As principais desvantagens são o trabalho que envolve a execução de várias etapas, o alto custo e o uso de radioatividade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Na década de 80, surgiu uma tecnologia simples e eficiente que é a reação em cadeia da polimerase – PCR (“Polymerase Chain Reaction”) (MULLIS; FALOONA, 1987). Através deste processo é possível multiplicar *in vitro* e em escala exponencial, cópias de segmentos específicos de DNA, na presença da enzima DNA polimerase, gerando uma grande quantidade de cópias de seqüência específica de interesse. O desenvolvimento desta técnica levou Kary Mullis a ganhar o prêmio Nobel de química em 1993, devido ao impacto causado pela PCR e dos métodos dela derivados (NOBELPRIZE, 2006). Esta ferramenta de estudo promoveu também o surgimento de novos marcadores moleculares tais como os marcadores RAPD, STS, SCARS, AFLP, SNPs e SSRs entre outros.

O RAPD – “Random Amplified Polymorphic DNA” (DNA polimórfico amplificado ao acaso) – é constituído pela utilização de um primer único e pequeno de sequência alvo desconhecida. Esta técnica permite a detecção de uma vasta quantidade de fragmentos de DNA. Em relação aos RFLPs, os RAPDs são de custo mais baixo, requerem pouco tempo entre aplicação e análise e não necessitam de radioisótopos. Entretanto, os RAPDs tem sido considerados inadequados para estudos genéticos. As principais limitações são a sua natureza dominante e os baixos níveis de reprodutibilidade (WILLIAMS, 1990).

Desenvolvidos por Paran e Michelmore (1993), os marcadores STS – “Sequence Tagged Sites” (sítios marcados por seqüências), são marcadores de DNAs de seqüências curtas e de cópia única, que podem ser identificados mediante amplificação via PCR e, ou hibridização. Borem e Caixeta (2006), citam os STS como uma conversão de RFLP em marcadores que tem como base a PCR, considerando que estes oferecem grande vantagem em relação aos marcadores RAPD por apresentarem co-dominância, permitindo a distinção de indivíduos heterozigotos como também por ter uma maior reprodutibilidade que os marcadores RAPDs. Entretanto, as STS requerem algum conhecimento prévio da seqüência do DNA-alvo.

Os marcadores SCAR – “Sequence Characterized Amplified Regions” (regiões amplificadas caracterizadas por seqüências), a exemplo de STS são outra categoria de marcador molecular desenvolvida por conversão de um determinado marcador em outro. Os SCARs podem conter seqüências de DNA repetitivo e são usados como pontos de referência física no genoma, como também podem ser utilizados como marcadores genéticos. Marcadores SCAR são obtidos pela conversão de marcadores dominantes, como RAPD (PARAN; MICHELMORE, 1993) e AFLP (HUARACHA et al., 2004) em marcadores co-dominantes. Para desenvolvimento de marcadores SCAR é necessária a identificação de um primer que confere polimorfismo a dois “bulks” de DNA com fenótipos contrastantes, em seguida o isolamento e a clonagem do fragmento amplificado em um vetor, sequenciamento do fragmento isolado, desenho dos pares de primers específicos de 16 a 24 nucleotídeos complementares às extremidades do fragmento sequenciado, e por fim testar estes primers na espécie para qual eles foram desenhados (BÓREM; CAIXETA, 2006).

Alterações de uma única base no genoma podem ser identificadas a aproximadamente a cada 600 pares de bases, ao se comparar segmentos correspondentes de um genoma. Tais alterações, que podem ser causadas por

substituições e/ou deleções ou inserções (indels), são denominados SNPs – “Single Nucleotide Polymorphisms” (polimorfismo de um único nucleotídeo), quando correspondem a posições onde existe uma alternância dos nucleotídeos A, C, G, T em uma frequência alélica mínima de 1% em uma dada população (BROOKES, 1999). Os SNPs são, portanto, marcadores genéticos que tem como base a detecção de polimorfismos resultantes destas alterações. A detecção de SNPs emprega algumas metodologias. Inicialmente sua detecção consistia em amplificar e sequenciar fragmentos genômicos de regiões gênicas específicas do DNA de vários indivíduos e comparar suas sequências em busca de variações. Atualmente identificação de SNPs é feita pelo sequenciamento direto de fragmentos de DNA, amplificados por PCR, com primers desenvolvidos especificamente para este fim. Outra forma de identificação pode ser análise *in silico* feita em bancos de DNA (KWOK, 2001). Devido a sua alta frequência em diferentes organismos, os SNPs encontram inúmeras aplicações em humanos (DEN DUVEN; ANTONARAKIS, 2000; YUE; MOULT, 2006), animais (VIGNAL et al., 2002), em estudos genéticos de populações naturais (VÄLI et al., 2008), na caracterização de recursos genéticos (RAFALSKI et al, 2002) e para obtenção de mapas genéticos de alta resolução (NAKITANDWE et al., 2007) .

Marcadores Moleculares de AFLP e Microsatélites foram utilizados como ferramentas neste estudo portanto serão abordados mais detalhadamente a seguir.

### **3.3.1 Marcadores Moleculares de AFLP**

Os marcadores de AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, representa a tecnologia mais recente para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de procariotos e eucariotos. O ensaio da AFLP combina a especificidade, resolução e o poder da amostragem da digestão do DNA de interesse com enzimas de restrição, com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR. Desde o seu desenvolvimento e divulgação (ZABEAU, 1993), esta técnica tem sido amplamente utilizada para estudos de “fingerprinting”, mapeamento genético e diversidade genética de diversas

espécies de plantas (FERREIRA; GRATTAPLAGIA, 1998).

A análise de AFLP consiste essencialmente em quatro etapas (VOS et al., 1995):

1ª – Clivagem de DNA genômico:

Esta etapa é realizada pela adição de duas enzimas de restrição, uma de corte raro que reconhece e corta seis pares de bases (ex. *EcoRI*) e uma de corte frequente que reconhece apenas quatro pares de bases (ex. *MseI*) a um mix contendo aproximadamente 1000ng de DNA genômico. Com estas reações podem então ser gerados três tipos de fragmentos; fragmentos grandes, resultantes do corte com a enzima de corte raro; fragmentos pequenos, originados pelo corte com a enzima de corte frequente; e fragmentos de tamanho intermediário.

2ª – Ligação de adaptadores:

A segunda etapa consiste na ligação de adaptadores específicos que possuem extremidades complementares às extremidades resultantes da clivagem pelas enzimas de restrição. Estes adaptadores possuem de 20 a trinta pares de bases, cujas sequências são diferentes para cada adaptador. Com este passo, um grande número de fragmentos poderia ser amplificados via PCR. No entanto, o número de fragmentos nesta etapa seria demasiadamente excessivo, tornando impossível a resolução de fragmentos individuais, mesmo em gel de alta resolução. Assim, após a ligação dos adaptadores é feita uma diluição de 10 a 20 vezes de acordo com o material estudado.

3ª – Pré-seletivo:

Esta etapa consiste de uma seleção inicial de fragmentos através da utilização de primers de 20 a 25 pares de bases onde é adicionada um nucleotídeo, em relação a sequência dos adaptadores. Nesta fase, apenas fragmentos ligados aos adaptadores que contenham esta base adicional serão amplificados, limitando assim o número de fragmentos. O produto resultante da reação pré-seletiva é diluído de 5 a 10 vezes, também dependendo do material estudado.

4ª – Seletivo:

Nesta etapa é feita uma nova seleção de fragmentos a serem

amplificados via PCR, através da utilização de primers que contenham dois ou mais nucleotídeos seletivos, restringindo ainda mais o número de fragmentos amplificados, e assim, tornando possível a resolução e visualização de marcadores individuais. A Figura 2.2 ilustra as etapas necessárias a obtenção de marcadores de AFLP e a Figura 2.3. mostra o polimorfismo gerado a partir da aplicação da técnica de AFLP.

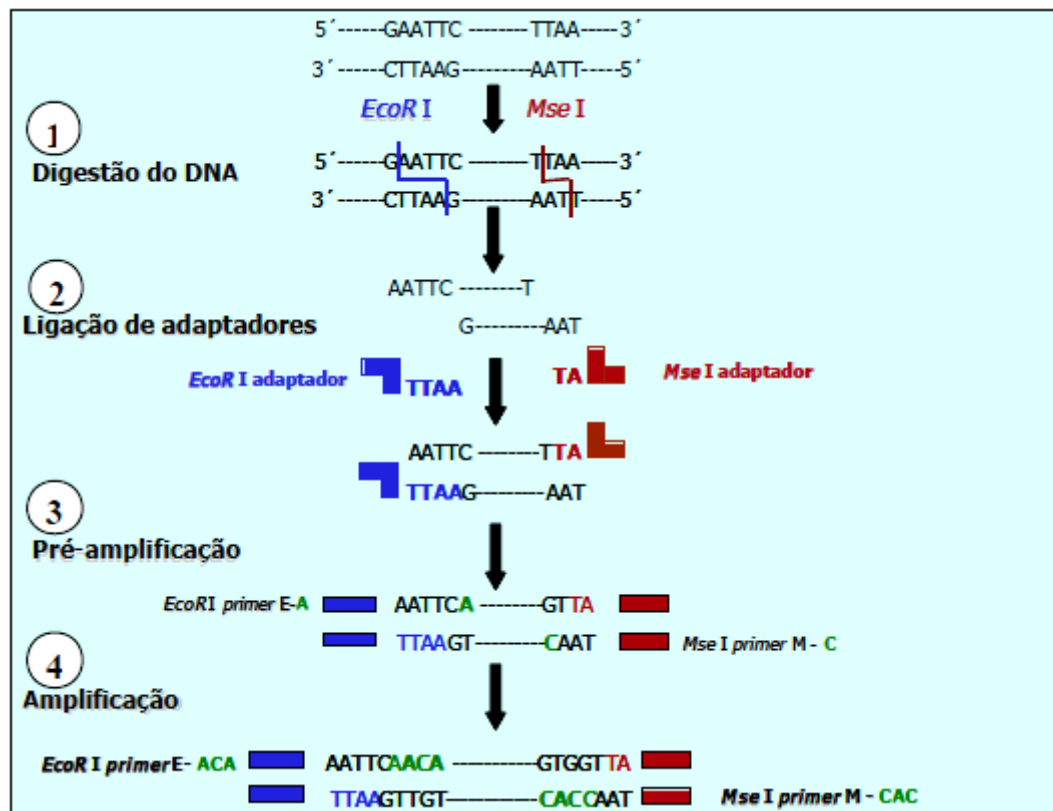
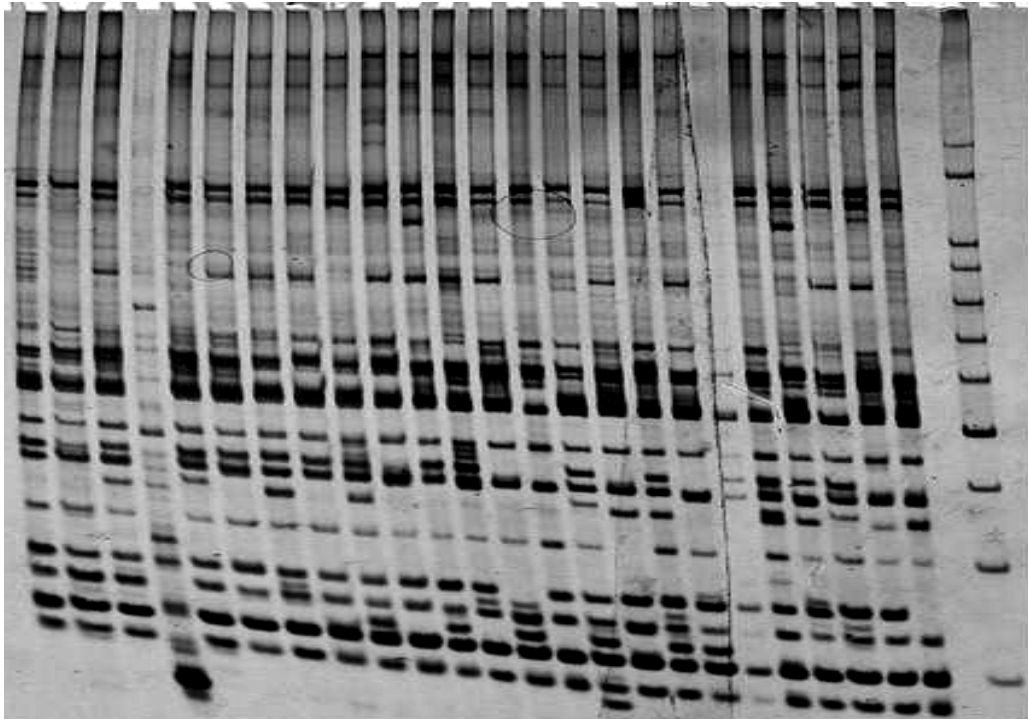


Figura 3.5 – Etapas de reação da técnica de marcadores moleculares de AFLP.



**Figura 3.6** – Padrão eletroforético de marcadores AFLP, resolvidos em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, para a espécie de *C. xanthocarpa*.

As principais vantagens e limitações da técnica de AFLP:

A vantagem que mais diferencia esta tecnologia das demais é o grande número de fragmentos que são gerados e resolvidos em um único gel. O índice de “multiplex” do ensaio AFLP, ou seja, o número de marcadores simultaneamente analisados em um único gel, é o mais alto entre as tecnologias disponíveis. A técnica de AFLP é, portanto, muito eficiente na amostragem ampla e simultânea de um genoma. A segunda vantagem é o grande poder de detecção de variabilidade genética, que explora simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição, tal como no ensaio de RFLP, e a ocorrência ou não de amplificação a partir de sequências arbitrárias, tal como no ensaio de RAPD. Conseguem-se com isso uma flexibilidade significativa na obtenção de marcadores polimórficos. Outra vantagem é a maior robustez do ensaio AFLP quando comparado com o ensaio RAPD. Isto se deve basicamente ao fato de que primers bem mais longos são utilizados nas etapas de PCR, o que aumenta significativamente a especificidade da amplificação, evitando com isso a competição que ocorre durante a PCR no ensaio RAPD. AFLP reúne, portanto, a vantagem da

PCR específica com a vantagem da RAPD em se explorar sequências arbitrárias.

De forma análoga aos marcadores RAPD, a principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por loco, já que apenas um alelo, ou seja, o fragmento que é amplificado é detectado. As demais variações alélicas são classificadas como um alelo nulo. Marcadores AFLP são, portanto, marcadores “dominantes” e os dados têm natureza binária (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Outro ponto relevante na técnica de AFLP é o número maior de etapas do que a técnica de RAPD. Uma maior quantidade de reagentes é necessária juntamente com maior número de equipamentos de biologia molecular. O DNA necessário deve ser mais puro, o que demanda protocolos de extração mais elaborados. São necessárias etapas de digestão enzimática e ligação de adaptadores, assim como, os produtos de AFLP devem ser separados em gel de maior poder de resolução como a poliacrilamida. Em outras palavras, a digestão parcial ou má qualidade do DNA pode facilmente levar a interpretações errôneas do polimorfismo.

### **3.3.2 Marcadores Moleculares de Microssatélites (SSR) e Construção de Bibliotecas Enriquecidas de Microssatélites**

Diferentes experimentos no início dos anos 80 demonstraram que os genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de sequências repetidas, umas mais complexas e outras mais simples. Sequências poli TG e poli CA foram descritas em conexão com expressão de genes por Hamada et al. (1984) e foram denominadas de sequências simples repetidas (“SSR – Simple Sequence Repeats”). Mais tarde estas sequências foram denominadas também de “microssatélites” (LITT; LUTY, 1989). Os SSRs consistem de pequenas sequências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem. Weber e May (1989), Tautz (1989) e Litt e Luty (1989), simultaneamente propuseram a utilização destas regiões polimórficas amplificadas via PCR como marcadores moleculares.

Microssatélites têm sido observados em diversos organismos como em seres humanos, baleias, *Drosophila*, camundongos, bovinos e caprinos, entre outros. Em plantas, uma busca em bancos de dados de sequência de DNA publicadas

revelou que os sítios de microssatélites são largamente distribuídos com uma frequência de um sítio a cada 50 mil pares de bases (FERREIRA; GRATAPLAGLIA, 1998). As bases genéticas deste marcadores são constituídas por regiões contendo sequências simples repetidas que são amplificadas individualmente através de PCR utilizando-se um par de “primers” específicos complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. Segmentos amplificados a partir destes sítios quase que invariavelmente apresentam um polimorfismo extensivo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos. Assim cada microssatélite independentemente do elemento repetido (CA, TG, ATG etc.) constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco.

A detecção de sequências de microssatélites via PCR é feita através de eletroforese em gel de agarose de alta resolução ou em gel de poliacrilamida sendo que a visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente por coloração com brometo de etídio, nitrato de prata ou através de autoradiografia ao se utilizar primers marcados com radioisótopos na reação de PCR.

Locos SSR são geralmente estáveis, possuem expressão co-dominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados e são altamente multialélicos, numa população onde potencialmente todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados.

#### As principais vantagens e limitações dos marcadores de microssatélites

Tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem o maior conteúdo de informação sobre polimorfismo, na terminologia de marcadores moleculares. Devido a isso, toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético. Assim, a escolha da população para mapeamento não mais precisa ser feita com base na maximização da distância genética e sim visando a população mais informativa do ponto de vista das características biológicas ou econômicas de interesse. Os SSR são muito mais frequentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. A relevância, o nível de recursos e o número de laboratórios

envolvidos fez com que milhares de marcadores SSR fossem desenvolvidos como parte do projeto de mapeamento do genoma humano.

Estas e outras características, fazem com que marcadores SSR sejam ideais para mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Porém, a maior limitação da tecnologia microssatélites é a grande quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores e a adequação dos protocolos de amplificação de cada loco desenvolvido, sendo muitas vezes necessário a determinação de um protocolo específico de PCR para cada loco a ser utilizado.

#### Método para obtenção de microssatélites e para construção de bibliotecas enriquecidas em microssatélites:

A primeira metodologia descrita para o desenvolvimento dos marcadores microssatélites consiste no “screening” de bibliotecas genômicas (RASSMANN et al., 1991). Esta metodologia apresenta uma baixa eficiência na obtenção de clones positivos (0,04 a 12%), sendo hoje utilizada apenas para espécies que apresentam maior frequência de regiões microssatélites ou quando uma pequena quantidade de marcadores é desejada. Para evitar a construção de bibliotecas genômicas foi proposta uma metodologia rápida, que tem como base a técnica do RAPD (LUNT et al., 1999). Entretanto, a metodologia se mostrou ineficaz na obtenção de seqüências contendo regiões repetitivas e outras metodologias foram propostas para a construção de bibliotecas enriquecidas em microssatélites.

Estratégias que se baseiam na extensão de primers foram descritas por Paetkau (1999) e Ostrander et al. (1992), resultando em maior eficiência na obtenção de colônias positivas de 40-50% a até 100%, respectivamente. Porém, o grande número de etapas realizadas limita a popularização destes métodos. A técnica de hibridização seletiva descrita por Karagyozev et al. (1993), é muito utilizada em diferentes protocolos, com pequenas modificações. A eficiência pode variar de 20-90%, de acordo com a espécie estudada. Um método mais eficaz e com menor custo foi descrito por Billote et al. (1999).

Uma metodologia denominada FIASCO (“Fasted Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats”), inspirada na técnica do AFLP (“Amplified Fragment

Length Polymorphism”), também foi proposta (ZANE et al., 2002). Mais recentemente, um protocolo que utiliza o duplo enriquecimento da biblioteca foi introduzido, visando aumentar a proporção de seqüências contendo regiões repetitivas (DINIZ et al., 2007). Os marcadores microssatélites também podem ser obtidos a partir de seqüências expressas (EST – “Expressed Sequence Tags”) depositadas em bancos de dados, uma estratégia rápida, mais fácil e econômica. Entretanto, por se tratarem de seqüências que codificam proteínas, geralmente são mais conservadas, resultando em um menor polimorfismo. Diversos programas computacionais estão disponíveis para a busca de regiões repetitivas e desenho de primers. A detecção do polimorfismo é realizada em géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata ou por meio de seqüenciadores utilizando primers marcados por fluorescência. Nem todas as seqüências contendo regiões repetitivas são utilizadas para o desenvolvimento de marcadores microssatélites.

A presença de seqüências redundantes, regiões flanqueadoras pequenas ou inapropriadas para o desenho de primers são responsáveis por reduzir o contingente de marcadores desenvolvidos. Além disso, a existência de locos monomórficos ou a não amplificação também diminuem a quantidade de marcadores informativos desenvolvidos. Portanto, a escolha adequada da metodologia utilizada é muito importante para o sucesso na obtenção de marcadores microssatélites, além de permitir um planejamento em relação aos gastos (materiais e estrutura necessária) e ao tempo necessário para o desenvolvimento da biblioteca.

A Figura 2.4 mostra um esquema dos passos relacionados com a construção de uma biblioteca genômica enriquecida com locos microssatélites, conforme o protocolo descrito por Billotte et al. (1999)

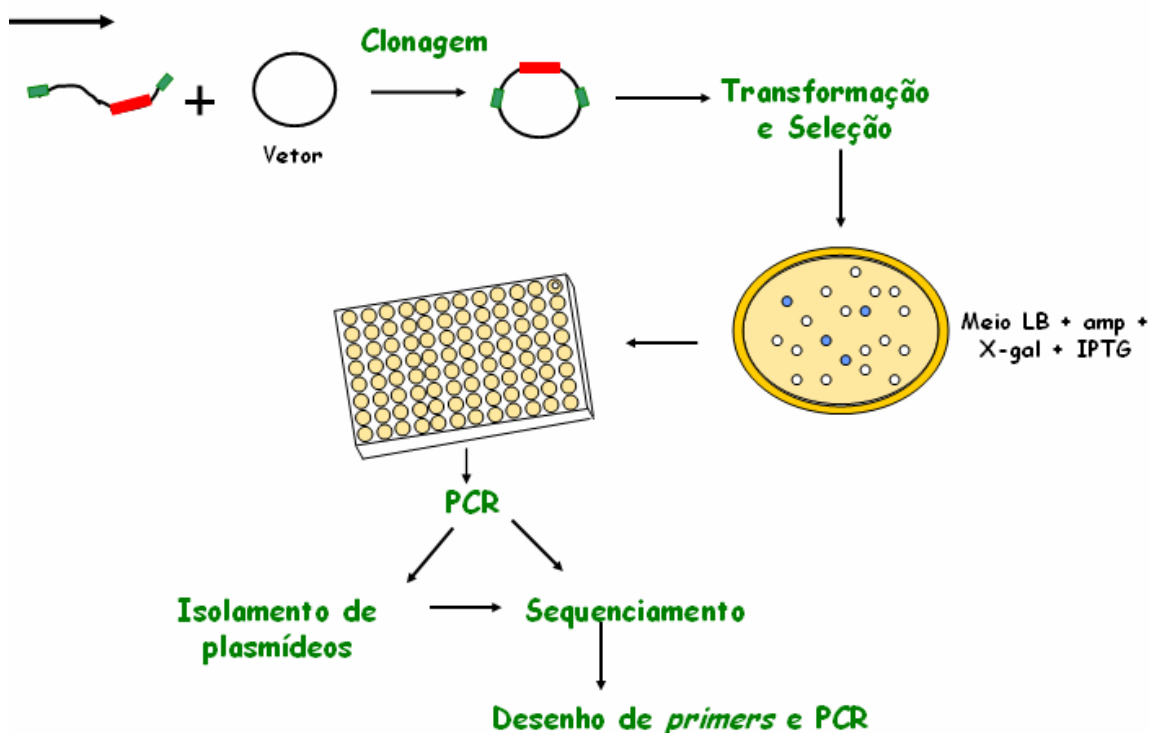
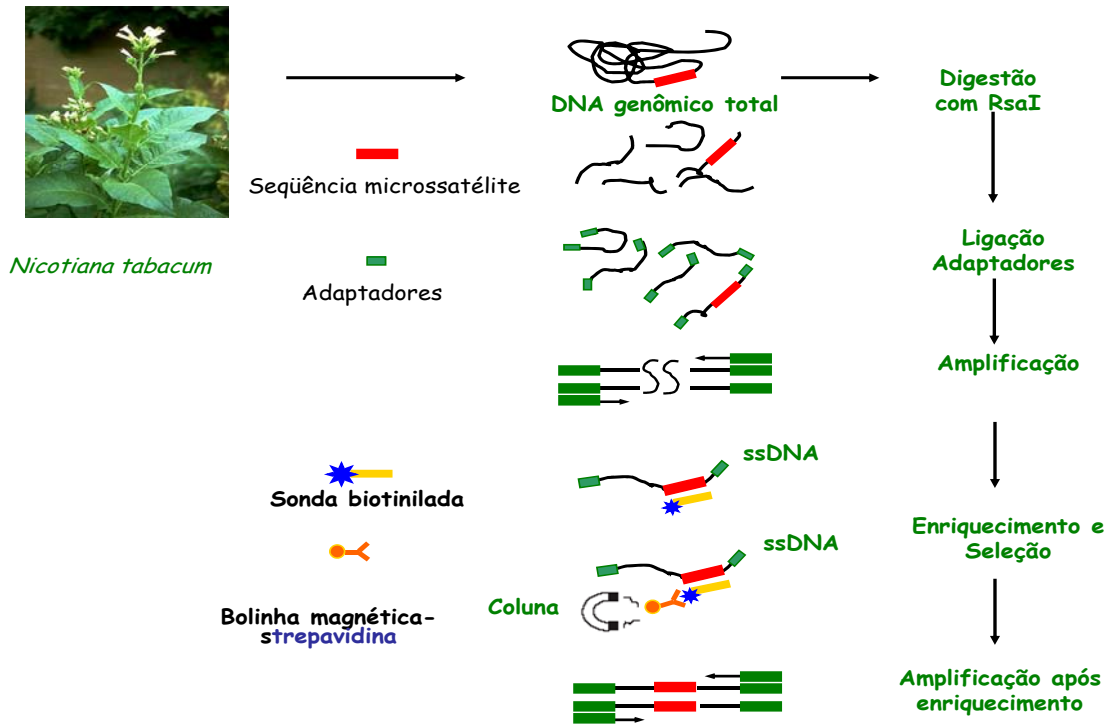


Figura 3.7 – Etapas Etapas de construção de uma biblioteca de microssatélites.

### 3.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ANÁLISES BAYESIANAS NO ESTUDO GENÉTICO DE POPULAÇÕES

Tecnologias de análise molecular mais acessíveis e eficientes estão constantemente sendo aprimoradas. Os métodos estatísticos acompanham este desenvolvimento, permitindo a manipulação de enormes quantidades de dados.

Os métodos tradicionais de análise de dados moleculares com base nas estatísticas de Wright, Nei, Weir, Cockerham, Schnieder dentre outros, vêm sendo amplamente utilizados nas análises de dados moleculares. Estes foram amplamente abordados por Ruas (2006).

A abordagem bayesiana surge como uma alternativa que possibilita tornar mais fácil a interpretação das hipóteses sob teste. No paradigma bayesiano, a probabilidade de uma medida direta da incerteza pode ou não representar a frequência de ocorrência de um determinado evento a longo prazo (SHOEMAKER et al., 1999). Os resultados nestes casos são apresentados como estimativas das distribuições de probabilidade *a posteriori* que, explicitamente, representam o grau de credibilidade atribuído a cada uma das hipóteses alternativas.

Conforme descrito por Shoemaker et al. (1999), a abordagem bayesiana, consiste em se obter uma distribuição de probabilidade associada aos diferentes valores que o parâmetro de interesse pode assumir, de modo a representar o grau de credibilidade associado a cada um deles, levando-se em conta sempre o conjunto de dados observados (BEAMOUNT; RANNALA, 2004). Para realização de um estudo de probabilidade através do método bayesiano, o ponto de partida é uma distribuição de probabilidade, dita *a priori*, obtida de considerações anteriores às observações de genótipos. Esta distribuição de probabilidade pode então ser atualizada pela utilização do teorema de Bayes, de modo a se considerar as informações obtidas das observações.

Seja  $f(\theta)$  a função densidade de probabilidade *a priori* associada a um vetor de parâmetros  $(\theta)$ . A função densidade de probabilidade *a posteriori* condicional ao conjunto de dados observados  $(X)$ , neste caso é expressa por:

$$\phi(\theta|X) = \frac{\phi(\theta) \cdot \phi(X|\theta)}{\phi(X)}$$

A função densidade de probabilidade *a priori* a ser adotada deve refletir necessariamente o grau de conhecimento disponível acerca dos parâmetros de interesse. É interessante observar que a expressão  $\phi(X|\theta)$  refere-se à função que descreve a probabilidade de ocorrência dos dados, condicional aos valores dos parâmetros que compõe, e, em termos práticos, tem a mesma forma da função de verossimilhança dos parâmetros.

Diversos métodos têm sido empregados na obtenção das distribuições de probabilidade *a posteriori* (GAMERMAN, 1997). Alguns métodos, por utilizarem funções densidade de probabilidade *a priori* adequadas, fornecem expressões algébricas explícitas, como observado por Shoemaker et al. (1998), outros, no entanto, obtêm as distribuições de probabilidade empiricamente utilizando algoritmos de randomização via Cadeias de Markov, como o de Metropolis-Hastings, utilizando em Ayres e Balding (1998).

O algoritmo Metrópolis-Hastings utilizado para obtenção da distribuição marginal *a posteriori* exige somente que a função de verossimilhança seja expressa algebricamente. A função de densidade de probabilidade *a priori* é levada em consideração na obtenção dos estados sugeridos da Cadeia de Markov, enquanto que a expressão algébrica da função que descreve a probabilidade marginal de ocorrência dos dados não é exigida (BALDI; BRUNAK, 1999).

O algoritmo consiste em se produzir um conjunto de valores simulados para a função densidade de probabilidade *a posteriori*  $\phi(X|\theta)$ , utilizando uma Cadeia de Markov, em que a probabilidade de transição de um determinado estado ( $x$ ) para um estado subsequente ( $x'$ ) é dada por:

$$\min \left[ \frac{\phi(x')q(x|x')}{\phi(x)q(x'|x)}, 1 \right]$$

em que:

- ( $x$ ) é a densidade de probabilidade associada ao estado  $x$ ;  
 ( $x'|x$ ) é a probabilidade de que o estado  $x'$  seja sugerido, estando-se em  $x$ . De modo geral, se novos estados são sugeridos por uma distribuição uniforme  $q(x'|x) = q(x|x')$  e os termos se cancelam.

Assim, a partir de um ponto qualquer do espaço paramétrico ( $x$ ), valores aleatórios são sugeridos pela distribuição *a priori*. O novo estado é então aceito ou não com probabilidade dada pela probabilidade de transição. O conjunto final de valores assim obtidos representa uma amostra de observações da distribuição *a posteriori*.

Em muitos casos, métodos Bayesianos podem acessar questões de interesse de forma mais direta do que métodos estatísticos tradicionais. Como por exemplo questões envolvendo a presença ou não de Equilíbrio de Hardy-Weimberg em uma população natural livre em forças evolutivas que alterem as frequências alélicas. No contexto da estatística tradicional, um teste para saber se a população está exatamente em Equilíbrio de Hardy-Weimberg e então evidências contrárias são procuradas para esta hipótese nula. No entanto, em muitos casos, o pesquisador não acredita que esta população esteja em um equilíbrio exato, e desta forma pode rejeitar erroneamente uma hipótese nula falsa.

As análises bayesianas, buscam resolver esta questão de forma mais relevante, que pode ser expressa, neste caso, perguntando se 'os desvios do equilíbrio são grandes o suficiente para serem importantes?'. Sendo que hoje se sabe que para se avaliar os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weimberg, deve-se levar em conta o tamanho deste desvio em relação a população, as forças evolutivas que agem sobre ela, sabendo que estes fatores podem mudar de acordo com o habitat onde estas populações estão inseridas (SHOEMAKER et al., 1999).

Análises bayesianas tem também se mostrado extremamente eficientes em evidenciar fluxo gênico entre populações naturais, evidenciar processos evolutivos que podem ocorrer em pequena ou larga escala dentro de populações naturais, como gargalos de garrafa, determinar com um maior grau de confiabilidade o parentesco entre indivíduos e atribuir indivíduos as suas populações de origem (BEAMOUNT; RANNALLA, 2004).

Os métodos bayesianos podem portanto serem considerados uma revolução na maneira como dados genéticos eram tratados e interpretados, vindo a

complementar os métodos estatísticos tradicionais, permitindo um grande aumento na quantidade de informação que pode ser retirada da mesma quantidade de dados genéticos, quando estes são estudados apenas com o enfoque da estatística tradicional (SHOEMAKER et al., 1999).

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES ESTUDADAS

#### 3.5.1 *Campomanesia xanthocarpa*

*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae), é uma espécie arbórea popularmente conhecida como Gabirobeira ou simplesmente Gabiroba, podendo chegar de 10 a 20 metros de altura, dotada de copa alongada e densa. Nativa do Brasil, esta espécie encontra-se distribuída desde Minas Gerais, até o Rio Grande do Sul, em quase todas as formações florestais (LORENZI, 1998), sendo também encontrada no Uruguai, Argentina e Paraguai (CORREA, 1974; LEGRAND, 1957; MATTOS, 1983; LOPEZ et al., 1987; BIAVATTI et al., 2004). As plantas de *C. xanthocarpa* apresentam tronco ereto de 30 a 50 cm de diâmetro, com caneluras e com casca suberosa e descascante. As folhas são simples e opostas, membranáceas, frequentemente assimétricas, brilhantes, de 4-8 cm de comprimento por 3-5 cm de largura, sobre pecíolos de 6-11 mm de comprimento. As flores solitárias são pediceladas e brancas e os frutos são na forma de baga globosa, tipo braga com polpa adocicada e carnosa, contendo muitas sementes (LORENZI, 1998).

*Campomanesia xanthocarpa* (Figura 2.2) é uma planta decídua mesófila, heliófila e seletiva higrófila, sendo abundante nas partes úmidas das matas de altitude (semidecídua e de pinhais), comuns na floresta semidecídua da Bacia do Paraná, e rara na mata pluvial da encosta Atlântica. A espécie produz grande quantidade de sementes que são amplamente disseminadas pela avifauna. A polinização é zoocórica feita principalmente por abelhas (PIMENTA, 1998).

A espécie é de grande importância na preservação ambiental, na composição de mata ciliar, sendo ótima para recuperação de área degradadas. Devido a sua excelente capacidade de adaptação às condições agroecológicas de

quase todas as regiões brasileiras, a espécie pode ser cultivada em quase todas as regiões brasileiras, o que torna a sua exploração uma alternativa altamente promissora na fruticultura nacional. Os frutos são nutritivos com altos teores vitamínicos, podendo ser consumidos em natura ou utilizados na fabricação de geléias e licores. Atualmente, devido a demanda crescente de produtos a base de frutas nativas e de sabor exótico, as plantas de *C. xanthocarpa* tem encontrado espaço nos mercados interno e externo especialmente para a agricultura familiar, sendo cultivada em pomares domésticos, principalmente nas regiões Sul e Sudeste (LORENZI et al., 2002).

Estudos sobre as propriedades nutricionais de *C. xanthocarpa* revelam alto conteúdo de água (81,4%), 1,9% lipídeos (1.9%), 8,9% carboidratos, 6,3% de fibras, além de conteúdos consideráveis de ácido ascórbico (17.8 mg.100 g<sup>-1</sup>), e traços de riboflavina (0.09mg.100 g<sup>-1</sup>) (VALLILO et al., 2008). Outra grande importância de *C. xanthocarpa* é o seu potencial para uso farmacêutico. Embora não existam ainda informações relevantes sobre as propriedades medicinais de *C. xanthocarpa*, a espécie é amplamente usada na medicina popular. Infusão de folhas ou da pele de frutos produz um óleo que é usado no tratamento de diarreia (LOPES et al., 1987, MARKMAN et al., 2004). Infusão preparada com folhas é também considerada efetiva como depurativo, como limpador facial, como anti-reumático e para reduzir os níveis de colesterol no sangue (BALLVE ALICE et al., 1995). Em experimentos realizados com ratos, Biavatti et al. (2004) demonstraram que a infusão de folhas de *C. xanthocarpa* reduziu significativamente os níveis glicêmicos e o peso de ratos submetidos a dietas altamente calóricas. Outro aspecto importante da planta é a formação de uma copa piramidal densa e decorativa, que possibilita seu emprego em paisagismo em geral. A madeira Madeira de *C. xanthocarpa* é empregada em tabuados em geral, para confecção de instrumentos musicais, cabos de ferramentas, e para lenha e carvão.



**Figura 3.8** – Características morfológicas de *C. xanthocarpa*. Em detalhe ramos com flores, frutos, sementes, casca e aspecto da madeira (cf. LORENZI, 1998).

### 3.5.2 *Luehea divaricata*

*Luehea divaricata* Martus (Malvaceae) é uma espécie arbórea popularmente conhecida como açoita-cavalo. Esta espécie pode chegar de 15-25 metros de altura, com tronco de 50-60 cm de diâmetro, folhas simples, quase glabras e densamente pubescentes e de cor esbranquiçada na face inferior, de 9-12 cm de comprimento por 4-6 cm de largura. Com uma ampla área de distribuição, ocorre desde o sul da Bahia, passando pelos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, até Rio Grande do Sul nas florestas aluviais.

Planta decídua, heliófila, seletiva higrófila, característica das florestas aluviais (matas ciliares e de galeria). Apresenta dispersão irregular e descontínua, sendo frequentemente ao longo de rios, terrenos rochosos e íngremes, onde a floresta é mais aberta e nas formações secundárias. Produz anualmente grande quantidade de

sementes viáveis, moderadamente disseminadas pelo vento. Espécie de polinização cruzada, zoocórica, realizada por insetos (Figura 2.3).

Como uma planta pioneira de rápido crescimento, *L. divaricata* não pode faltar nos reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente. A árvore possui características ornamentais que a recomendam para o paisagismo em geral. Sua madeira é utilizada na indústria moveleira para estrutura de móveis, confecção de coronhas de armas, caixotarias, cadeiras, tamancos, salto de calçados, indústria da construção civil como ripas, caibros, molduras e outros tipos de maderamento de construção.



**Figura 3.9** – Características morfológicas de *L. divaricata*, detalhando ramo com flores, frutos, sementes, casca e aspeto da madeira (cf. LORENZI, 1998).

#### 4. Artigo A: GENETIC VARIATION IN TWO POPULATIONS OF *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae) FROM THE NATIVE FOREST OF THE PARQUE ESTADUAL MATA DOS GODOY USING AFLP BASED MARKERS.

(O artigo será submetido ao Conservation Genetics)

**Abstract:** *Campomanesia xanthocarpa* is a tree species usually found in semi-deciduous forests and it is considered one of the most important species used to recompose degraded and heterogeneous forest fragments. We used Amplified Fragment Length Polymorphism markers (AFLP) to investigate the genetic structure of two natural populations of *C. xanthocarpa* from south and north sides of the Parque Estadual Mata dos Godoy, located at Londrina city, in the Paraná state of Brazil. Six combinations of selective primer pairs rendered 181 well-amplified markers, of which, 92.27% and 92.82% were polymorphic for the populations of south and north regions, respectively. The coefficient of variation for the number of amplified markers was close to 5%, revealing a good level of trustworthiness in our results. Values of gene diversity ( $H_S$ ) for the population of south and north portions of the fragment presented similar values (0.3292 and 0.3221, respectively). The value of  $F_{ST}$  was 0.1801 with a genetic distance of 0.1006 between populations. PCoA clustering analysis revealed the formation of two distinct groups with some individuals from the south populations grouping with the north population. Bayesian analysis for K number of clusters further supports the results from the PCoA indicating that in 61.8% of the times individuals were assigned to the populations to which they were sampled. The levels of genetic conservation are considered satisfactory and represent valuable information on the natural populations of *C. xanthocarpa* studied. This knowledge is important not only for further studies of populations of *C. xanthocarpa* from disturbed areas, but also to evaluate the level of genetic degradation in other areas, as well as to use these populations as source of genetic variability to recover degraded areas.

**Keywords:** Conservation genetics. *Campomanesia xanthocarpa*. AFLP. Population structure. Tree genetics.

**Resumo:** *Campomanesia xanthocarpa* é uma espécie arbórea comumente encontrada em florestas semi-decíduais e pode ser considerada uma das espécies mais importantes utilizadas para a recomposição de florestas heterogêneas degradadas. Nós utilizamos marcadores de AFLP para investigar a estrutura genética de duas populações naturais de *C. xanthocarpa* originária da porção norte e sul do Parque Estadual Mata dos Godoy, localizada no município de Londrina, no Estado do Paraná-Brasil. Seis pares de primers seletivos foram utilizados gerando 181 marcadores bem amplificados, dos quais, 92,27% e 92,82% foram polimórficos para as populações das regiões sul e norte, respectivamente. O coeficiente de variação ficou próximo de 5%, mostrando um bom nível de confiabilidade em nossos resultados. Valores para diversidade gênica ( $H_S$ ) para as populações do sul e norte do fragmento apresentaram resultados similares (0,3292 e 0,3221, respectivamente). Os valores de  $F_{ST}$  foram 0,1801 com uma distância genética de 0,1006 entre populações. A análise de agrupamento PCoA mostrou a formação de dois grupos distintos com alguns indivíduos da população sul agrupando juntamente com a

população norte. Análise bayesiana para o número de agrupamentos K demonstrou que em 61,8% das vezes, indivíduos foram atribuídos as populações de onde foram amostrados. Os níveis de conservação genética foram considerados satisfatórios e representam informações valiosas para estas populações de *C. xanthocarpa*. Este conhecimento é importante não só para estudos mais amplos de populações de *C. xanthocarpa* em áreas degradadas, mas também, para avaliar os níveis de degradação genética em outras áreas, como também, utilizar estas populações como fonte de variabilidade genética para recuperação de áreas degradadas.

**Palavras-chave:** Genética da conservação. *Campomanesia xanthocarpa*. AFLP. Estrutura populacional. Genética de árvores.

## 4.1 Introduction

Environmental heterogeneities can modify the distribution of genetic variability within or between populations of the same species resulting in genetic differentiation over relatively small geographic distances (Linhart et al., 1981; Knowles, 1984). According to Lowe (2005), fragmentation in neo-tropical tree species can provoke an increase in disease and infestation by pest and also the establishment of deleterious alleles over the short-term. In the long-term it is expected that the loss of genetic variation would significantly reduce the ability of plant populations to positively respond to different selection pressures, such as reduction in soil oxygen due to flooding periods. Successful management strategies and the preservation of forest tree species is thus dependent on an accurate assessment of their genetic diversity to address questions regarding the genetic relationships among individuals as well as the levels and structures of their genetic variation. Knowledge of a particular plant population structure also provides a historical perspective of the evolutionary changes that characterize a species and allows researchers to more accurately predict how populations of plants will respond to future events of both natural and artificial origin (Wallace, 2002). For instance, deforestation and climatic change are threatening plant biodiversity over increasingly large areas, which have forced conservation efforts to larger spatial scales. Even when a population survives deforestation, it still experiences the effects caused by fragmentation and isolation (Cardoso et al., 2000).

*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae) is a tree species of highly occurrence in humid portions of semi-deciduous forests. This species shows a broad distribution throughout forest fragments of many Brazilian biomes. It can be found scattered from the state of Espírito Santo going all the way down to the southern regions of Brazil, and also in Uruguay, Argentina and Paraguay (Correa, 1974; Legrand, 1957; Mattos, 1983; Lopez et al., 1987; Biavatti et al., 2004). Growing from 8 to 25 meters in height and from 30 to 60 cm in diameter, this species produces a great amount of green–yellow skinned fruits. The very small flowers are hermaphrodites, occasionally dioecious, and pollinated by bees, particularly of the species *Tetragonisca angustula*. Flowering occurs from September to November and fruit ripens between the months of November and February (Lorenzi, 2002).

With a very dense and well formed top, the trees of *C. xanthocarpa* are commonly used for arborization of urban areas (Carvalho, 2006). The edible fruits are sweet and greatly appreciated by birds, especially, Glaucous Tanager (*Thraupis sayaca*), Green-Headed Tanager (*Tangara celadon*) and Rufous-Billed Thrush (*Turdus rufiventris*) (Frisch and Frisch, 2005). Studies on nutritional composition of fruits indicated high content of water (81.4%), lipids (1.9%), total carbohydrates (8.9%), dietary fibers (6.3%), considerable amounts of ascorbic acids (17.8 mg.100 g<sup>-1</sup>), and traces of riboflavin (0.09mg.100 g<sup>-1</sup>) (Vallilo et al., 2008). The fruits are, therefore, suitable for human consumption and can be used *in natura* or as industrialized products, including juices, ice creams, jams and liquors (Carrara and Carrara, 1996). The fruits are also an important nutrition source for frugivorous fish species (Maixner and Ferreira, 1976). Because of its chemical properties, *C. xanthocarpa* is of common use in the folk medicine and it is scientifically proven to be efficient in the prevention of gastric ulcers, without toxic side effects in rats. An infusion prepared from the fruit skin or leaves produces oil that can be used to treat diarrhea (Lopes et al., 1987, Markman et al., 2004). In addition, infusion prepared from leaves is popularly used as a depurative, cleanser, anti-rheumatic and to decrease the blood cholesterol (Ballve Alice et al., 1995).

*Campomanesia xanthocarpa* is one of the main species found in semideciduous forest fragments, where it plays a key role in the forest structure (Britez et al., 1992). The species is indicated for planning the recovering of riparian degraded areas including those with flooding period of less than 60 days (Carvalho, 2006). In recent years, several molecular based techniques have been developed to analyze and estimate genetic diversity in plants. Amongst all the techniques, the amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) provides many advantages, including technical simplicity, reliable repeatability and large numbers of markers spanning the whole genome, without requiring any prior genomic information (Vos et al., 1995; Gaudel et al., 2000). AFLP is one of the most suitable molecular marker systems to study population genetics.

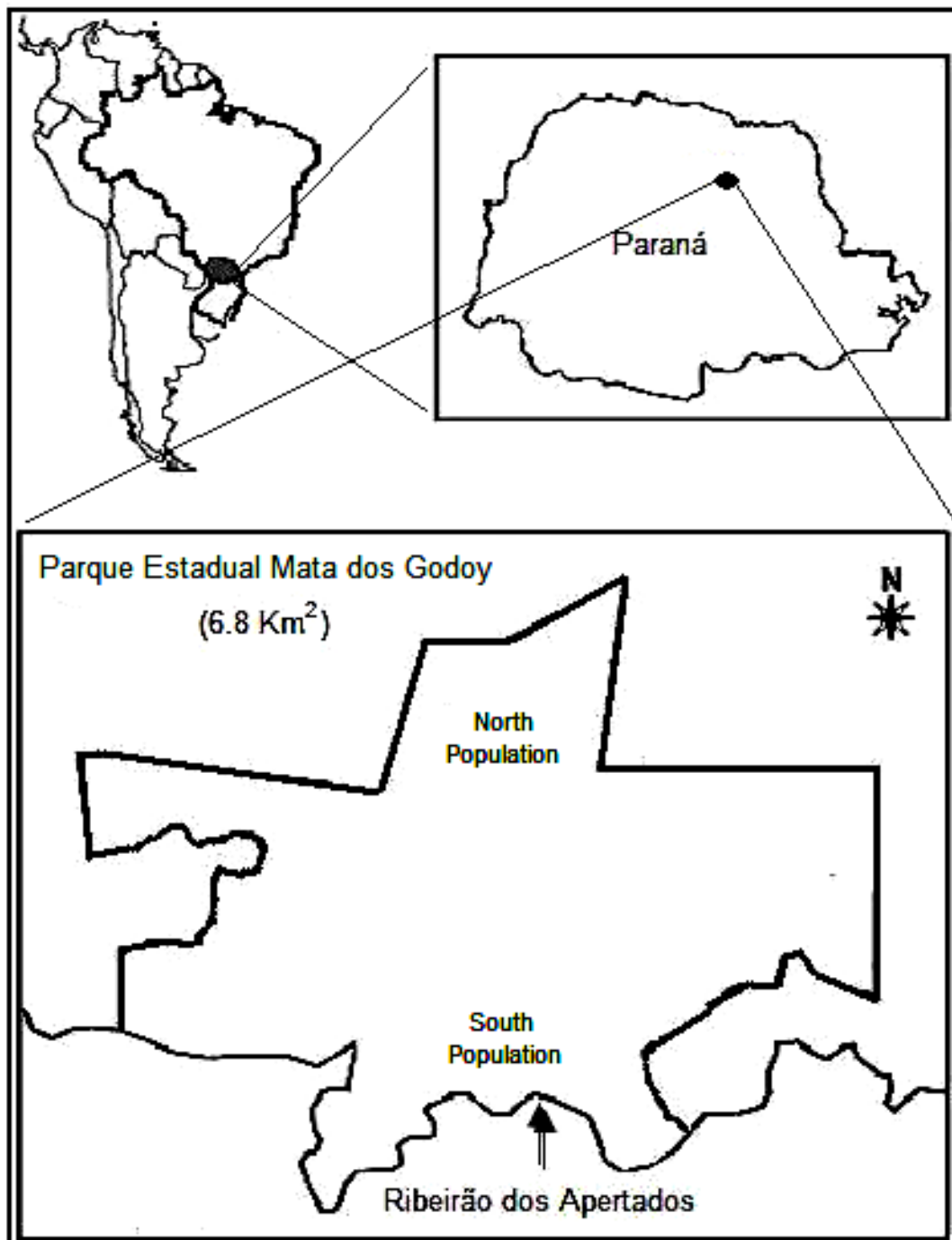
Around 50 years ago, the State of Paraná in south Brazil, was completely covered by the Atlantic Tropical Forests. However, the expansion of settlers into this area over the last decades was highly associated with environmental degradation and nowadays, only 3% of the original forest cover remains. The Parque

Estadual Mata dos Godoy (Londrina) is one of the largest and most important native semi-deciduous forest fragment present in the Paraná state. The goals of our study were to measure the genetic variability and genetic differentiation in two populations of *C. xanthocarpa* present within these fragment to demonstrate the relationships between the molecular data, natural environment, and abiotic characteristics in these areas, to thereby establish if these populations could be used in future studies as parameter to evaluate the levels of genetic conservation in degraded areas.

## 4.2 Materials and Methods

### Characterization of studied areas and sampling

The State Park Mata dos Godoy, located at the city of Londrina (23°27'S, 51°15'W) in the Paraná State of Brazil (Figure 1), is a tropical semi-deciduous forest fragment with an area of 6.8 Km<sup>2</sup> (Bianchini et al., 2001). The landscape in the north portion of the park is characterized by a flat terrain with eutrophic red latosol and an altitude of 600 meters. The south portion is represented by an accentuated 140 meters slope, followed by a flat area at an altitude of 460 meters that is covered by a litolic red soil. The distance between south and north areas is around 1km apart, in average. The south area is delimited by the a small river, named Ribeirão dos Apertados, that is 20 kilometers long and five meters width, with average depth of three meters, characterizing a small basin with several effluents (Vicente, 2006). These aspects particularly, account for the occurrence of periodic flooding in the southern part of this area. Species richness is smaller (64) in the south, in comparison to the north area (100), resulting a lower canopy with higher incidence of sunlight and higher thermal amplitude. Nevertheless, the numbers of individuals of *C. xanthocarpa* is higher



**Figure 4.1** – Location of two studied populations of *C. xanthocarpa* from Parque Estadual Mata dos Godoy (23°27'S, 51°15'W).

in the south region (Bianchini et al., 2003). The north area shows lower frequency of *C. xanthocarpa*, associated to a more prominent inter-specific competition and less luminosity (Soares-Silva et al., 1998; Bianchini et al., 2003). It is also noticeably that plants from the north region are bigger in diameter and height and have a greater quantity of leaves than those of south part of the fragment.

For this study, leaves from 31 and 29 individuals of *C. xanthocarpa* were sampled from south and north portions of the park, respectively. A minimum distance of 30 meters between individual plants was considered to minimize the collection of siblings.

### **DNA isolation and AFLP reactions**

Total genomic DNA was isolated from approximately 0.5 g of fresh young leaves using a modified cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol as outlined in Doyle and Doyle (1987). The AFLP reactions were performed essentially as described by Vos et al. (1995) with minor modifications. Briefly, DNA samples were submitted to restriction using *EcoRI/MseI* endonuclease mixture (5 and 50 units, respectively) and ligation with double-stranded adaptors. Following incubation at 37°C overnight, the restriction-ligation reactions were diluted (1:20) in pure nuclease-free water. Pre-selective amplification was done using primers complementary to the adaptors with one additional selective 3' nucleotide and diluted (1:10). For selective amplification an initial screening of selective primers using 16 primer combinations with selective nucleotides was performed on four individuals of each population. The six primer combinations chosen for the selective PCR were *EcoRI-AGC/MseI-CTCG*, *EcoRI-ACT /MseI-CTGA*, *EcoRI-ACG /MseI-CAC*, *EcoRI-ACG /MseI-CA*, *EcoRI-AGC /MseI-CAG* and *EcoRI-ATC /MseI-CTCG*. Six individuals were replicated in order to exclude non-reproducible bands. The selective amplification products were separated on acrylamide:bisacrylamide gels (29:1) for 3 hours at 200 V and stained with silver nitrate. Amplified fragments from 50 to 350 base pairs were scored, and exported as a presence/absence matrix. Similar intensity, straightforward interpretability and reproducibility between independent replicates were used as criteria for choosing the AFLP bands used.

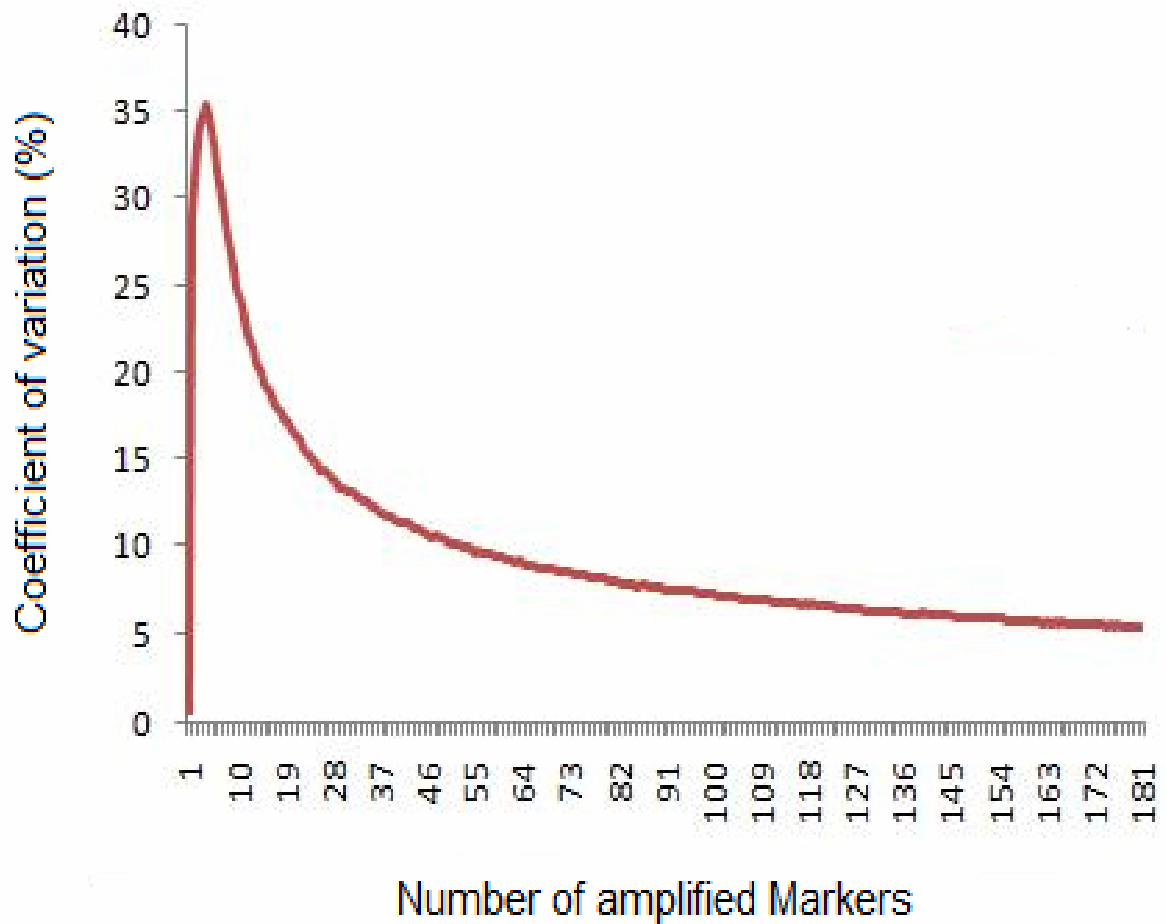
## Data analysis

The presence/absence matrix originated with the six primer combinations was imported into several softwares for genetic analysis. The estimative of allele frequencies and gene diversity of populations from dominant markers can be problematic (Zhivotosky, 1999; Alexander et al., 2004). The possibility of statistical biases could be eliminated in highly polymorphic marker data sets (Krauss et al., 2000). It has also been shown (Tero et al., 2003), that for accurate estimates of the population genetics parameters, large numbers of AFLP loci and around 30 individuals per population should be used. The software dBoot v 1.1 (Coelho, 2001) was applied to our data set to check the coefficient of variation (CV %) for the number of amplified markers, yielding a parameter to which we could determine if enough polymorphic markers were amplified. The percentage of polymorphic loci, gene diversity ( $H_S$ ) (Nei, 1978) and genetic distance were calculated for both populations using the software POPGENE v. 1.31 (Yeh et al., 2000). To evaluate the distribution of the total genetic variation within and between subpopulations as well as the fixation index  $F_{ST}$  we use the analyses of molecular variance (AMOVA), conducted with Arlequin v. 3.11 (Excoffier et al., 2005). A Principal Coordinate Analysis was used to evaluate the distribution of the genetic distance into clusters by the software FAMD (Schluter, 2002). The trustworthiness of these clusters was tested by the Bayesian clustering analysis applied through the software STRUCTURE (Pritchard et al., 2000).

## 4.3 Results and Discussion

The six AFLP primer combinations generated 181 unambiguous DNA fragments in two populations of *C. xanthocarpa* from the Parque Estadual Mata dos Godoy, located at Londrina city, in the Paraná State of Brazil. The average number of markers was 30.17 per primer combination. The coefficient of variation (CV) was close to 5%, demonstrating a good level of trustworthiness (Figure 2). The percentage of polymorphic loci (92.27; 92.82) and the gene diversity ( $H_S = 0.3294$ ; 0.3221) (Nei, 1978) were very similar for both, south and north populations (Table 1).

Similarities in the characteristics and diversity in populations in different sites within the same forest formation have also been observed by many authors (De Steven and Putz, 1984; Olmsted and Alvarez-Buylla, 1995; West, 1995).



**Figure 4.2** – Coefficient of variation for the number of amplified markers in two populations of *C. xanthocarpa* from Parque Estadual Mata dos Godoy.

**Table 4.1** – Percentage of polymorphic loci (Pp), Nei's (1978) gene diversity (Hs) and genetic distance of two populations of *C. xanthocarpa* from Parque Estadual Mata dos Godoy, based on AFLP markers.

Populations	Pp	Hs
South	92.27	0.3294
North	92.82	0.3221
Genetic distance		0.1006

Analysis of molecular variance demonstrated that 18.01% of the genetic variation was between populations and 81.99% within populations. These results are also in accordance with the genetic distance (Nei, 1978) observed between populations ( $G_d = 0.1006$ ) suggesting that although the levels of diversity are similar for both populations, the genetic structure within each population is different to a moderate level ( $F_{ST} = 0.18012$ , Table 2). When comparing a population of *Luehea divaricata* that undergoes periods of flooding with a population that only occurs in dry soil, Carvalho et al. (2008), found a  $F_{ST}$  of 0.1034, indicating a moderate divergence between these populations, but in that case the percentage of polymorphic loci and gene diversity were higher for the population present in the flooded area. The authors concluded that the observed values could be related to different pressures of natural selection provoked by the flooding periods. In our study, many ecological features, such as variation in soil types, presence of periodic floodings, species diversity, incidence of sun light are different for both populations, contributing to the  $F_{ST}$  and genetic distances observed between the south and north areas of the Parque Estadual Mata dos Godoy.

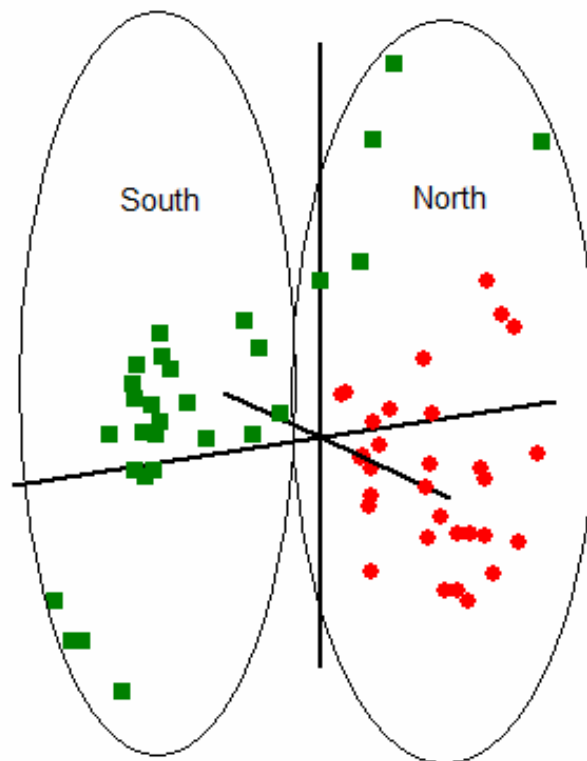
The Principal Coordinate Analysis (PCoA) separated the populations of *C. xanthocarpa* into two well-defined groups, one with the individuals of the south and the other with the individuals of north population. Few individuals from south region, however, were intermixed with individuals from the north population (Figure 3). This result is corroborated by the estimation of Bayesian clustering analysis. The K value, suggested that in 61.8% of the times individuals were assigned to the populations from which they were sampled, confirming the moderate pattern of genetic differentiation observed between populations.

**Table 4.2** – Analysis of molecular variance (AMOVA) in two populations of *C. xanthocarpa* from Parque Estadual Mata dos Godoy, based on AFLP data.

Source of variation	d. f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Between populations	1	218.542	6.33116	18.01**
Withing populations	58	1671.442	28.81796	81.99
Total	59	1889.983	35.14912	
Fixation index	$F_{ST} = 0.18012^{**}$			

\*\* P < 0.01; (significance test given through 1023 permutations).

Given that genetic structure can occur from local to regional scales, it is critical that comparative studies and conservation recommendations be based on genetic information collected at the appropriate spatial scale (Rivera-Ocasio, 2006). In this study, even though the spatial scale was very small, well distinct areas could be observed within the same forest fragment. Therefore, we may infer from that distinct selective pressures present in each population site, do not reduce the genetic diversity in any of these populations. Although a clear patterns of differentiation could be observed between populations, the results from the Principal Coordinate analysis (Figure 3) and Bayesian clustering analysis, suggests that gene flow do occur between these areas and it is probably a result of pollination and seed dispersal syndromes for these species. Carvalho et al. (2008), and Ruas (personal communication), found higher levels of polymorphic loci and gene diversity in populations of *Luehea divaricata* and *Chrysophyllum gonocarpum*, that were submitted to flooding periods, but on their study no gene flow could be observed between populations to homogenize these values.



**Figure 4.3** – Principal Coordinate Analysis of two populations of *C. xanthocarpa* from Parque Estadual Mata dos Godoy.

Similar results for gene diversity and moderate levels of genetic differentiation, found between the populations of *C. xanthocarpa*, might be directly linked to the fact that bees are responsible for pollination and can carry pollen between the populations, while birds may easily disperse the seeds throughout these areas. Our results demonstrate that the populations of *C. xanthocarpa* from Parque Estadual Mata dos Godoy are well conserved and gene flow occurs throughout these areas, contributing to the maintenance of the genetic variability within these populations. This knowledge is important not only for further studies of populations of *C. xanthocarpa* from disturbed areas, but also to evaluate the level of genetic degradation in other areas, as well as to use these populations as source of genetic variability to recover degraded areas.

#### 4.4 Acknowledgements

We tanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the grant of a scholarship for the period of this study. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (process n° 478179/06-5) and Fundação Araucária (protocol n° 9705) for providing financial research support.

#### 4.5 References

- Alexander, J. A.; Liston, A.; Popovich, J. Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, v. 91, 2004. p. 2004–2012.
- Ballve Alice, C.; Saraiva de Siqueira, N. C.; Mentz, L. A.; Silva, G. A. B.; José, K. F. D. Plantas medicinais de uso popular (Atlas farmacognóstico). Editora da ULBRA, Canoas, 1995. 205p.
- Bianchini, E.; Pimenta, J. A.; Santos, F. A. M. Spatial and temporal variation in the canopy cover in a tropical semi-deciduous forest. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 44, 2001. p. 269-276.
- Bianchini, E.; Popolo, R. S.; Dias, M. C.; Pimenta, J. A. Diversidade e estrutura de espécies arbóreas em área alagável do município de Londrina, Sul do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 17, 2003. p. 405-419.
- Biavatti, M. W. C.; Farias, C.; Curtius, F.; Brasil, L. M.; Hort, S.; Schuster, L.; Leite, S. N.; Prado S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 93, 2004 p. 385–389.
- Britez, R.M. de; Reissman, C.B.; Silva, S.M.; Santos-Filho, A. dos. Deposição estacional de serrapilheira e macronutrientes em uma floresta de araucária, São Mateus do Sul, Paraná. Edição dos Anais do 2º Congresso Nacional sobre

Essências Nativas. Revista do Instituto Florestal, São Paulo, v.4(3), 1992. p.766-772.

Cardoso, S. R. S.; Eloy, N. B.; Provan, J.; Cardoso, M. A.; Ferreira, P. C. G. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology*, v. 9, 2000. p. 1753–1760.

Carrara, M. dos S.; Carrara, D. Importância econômica e medicinal de duas espécies de *Campomanesia Ruiz & Pavón*. In: Congresso Nacional de Botânica, v. 47, 1996, Nova Friburgo. Resumos. Nova Friburgo: Sociedade Botânica do Brasil, 312 p.

Carvalho, P.E.R. Espécies Arbóreas Brasileiras. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Centro Nacional de Pesquisa de Florestas – Colombo: EMBRAPA-CNPQ. Brasília, v. 2, 2006. 628 p.

Carvalho, M.C.C.G.; Silva, D.C.G.; Ruas, P.M.; Medri, M. E.; Ruas, E.A.; Ruas, C.F. Flooding tolerance and genetic diversity in populations of *Luehea divaricata* *Biologia Plantarum*, v. 52, 2008. p. 771-774.

Coelho, A. S. G. Software: dBOOT - Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap, v. 3.0. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2001.

Correa, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional, v. 5, 1974. p. 512.

De Steven, D.; Putz, F. E. Impact of mammals on early recruitment of a tropical canopy tree, *Dipteryx panamensis*, in Panama. *Oikos*, v. 43, 1984. p. 207-216.

Dickel, M. L.; Rates, S. M. K.; Ritter, M. R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, 2007, p. 60-71.

Doyle, J. J.; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation for small quantities 161 of leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, v. 19, 1987. p. 11–15.

- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, (Online), v. 1, 2005. p. 47–50.
- Frisch, J. D.; Frisch, C. D. *Aves Brasileiras e Plantas que as Atraem*. 3ed. São Paulo: Dalgas Ecoltec-Ecologia Técnica Ltda, 2005. 480 p.
- Gaudeul, M.; Taberlet, P.; Till-Bottraud, I. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology*, v. 9, 2000. p. 1625–1637.
- Knowles, P. Genetic variability among and within closely spaced populations of Lodgepole pine. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, v. 26, 1984. p. 177-184.
- Legrand, C. D. *Myrtaceae catharinense novae*. *Sellowia*, v. 8, 1957. p. 71-79.
- Linhart, Y. B.; Mitton, J. B.; Sturgeon, K. B.; Davis, M. L. Genetic variation in space and time in a population of *Ponderosa pine*. *Heredity*, v. 46, 1981. p. 407-426.
- Lopez, J. A.; Little-Junior, E. L.; Ritz, G. F.; Rombold, J. S.; Hahn, W. J. *Arboles communes del Paraguay: ñande yvyra mata kuera*. Washington: Cuerpo de Paz, 1987. 425p.
- Lorenzi, H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. 2 ed. Nova Odessa, São Paulo: Ed. Plantarum Ltda. v. 2, 2002. 368 p.
- Lowe, A. J.; Boshier, D.; Ward, M.; Bacles, C. F. E.; Navarro, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, v. 95, 2005. p. 255 – 273.
- Maixner, A. E.; Ferreira, L. A. B. Contribuição ao estudo das essências florestais e frutíferas nativas do Estado do Rio Grande do Sul – II. Trigo e Soja, Porto Alegre, v.18, 1976. p. 3-20.

- Markman, B. E. O.; Bacchi, E. M.; Kato, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, 2004. p. 55-57.
- Mattos, J. R. Myrtaceae do Rio Grande do Sul. *Roesslária*, v. 5, 1983. p. 169-370.
- Nei, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, v. 89, 1978. p. 583–590.
- Olmsted, I.; Alvarez-Buylla, E. Sustainable harvesting of tropical trees: demography and matrix models of two palm species in Mexico. *Ecological Applications*, v. 5, 1995. p. 484-500.
- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v.155, 2000. p. 945–959.
- Rivera-Ocasio, E.; Aide, M.; McMillan, W. O. The influence of spatial scale on the genetic structure of a widespread tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Fabaceae). *Conservation Genetics*, v.7, 2006. p. 251–266.
- Schluter, P. M.; Harris, S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, 2006. p. 569-572.
- Tero, N.; Aspi, J.; Siikama, P.; Niemi, " KI, A. JA" KA" LA"; Tuomi, J. Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silene tatarica*. *Molecular Ecology*, v. 12, 2003. p. 2073–2085.
- Vallilo, M. I.; Moreno Oliveira, P. R. H.; Elesabeth, E.; Lamardo, L. C. A.; Garbelotti, M. L. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, 2008. p. 231-237.
- Vicente, F. R. O Parque Estadual Mata dos Godoy. In: *Ecologia do Parque Estadual Mata dos Godoy*. J. M. D. Torezan. (Org.), Itedes, Londrina, 2006. p. 19-27.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van De Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, v. 23, 1995. p. 4407–4414.

- Wallace, L. E. Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae): inferences from allozyme and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Species Biology*, v. 17, 2002. p. 37-49.
- West, C. J. Sustainability of *Beilschmiedia tawa* dominated forest in New Zealand: population predictions based on transition matrix model analysis. *Australian Journal of Botany*, v. 43, 1995. p. 51-71.
- Yeh, F. C.; Yang, R.; Boyle, T. J.; Xiyan, J. M. Pop Gene 32. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, v. 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 2000.
- Zhivotovsky, L. A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, v. 8, 1999. p. 907–913.

## 5. ARTIGO B: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TEN MICROSATELLITE LOCI FOR THE TREE SPECIES *Luehea divaricata* MART. (MALVACEAE) AND INTERGENERIC TRANSFERABILITY.

(Artigo publicado no Conservation Genetics Resources)

**Abstract:** We isolated and characterized ten microsatellite loci for *Luehea divaricata*, a South American outcrossing pioneer tree species that is frequently used in reforestation programs of tropical riparian forests in Brazil. A total of 45 alleles were detected across a sample of 42 individuals, with an average number of 4.5 alleles per locus. The average polymorphic information content (PIC) was 0.546 and the observed ( $H_O$ ) and expected ( $H_E$ ) heterozygosity values varied from 0 to 0.929 and 0.194 to 0.821, respectively. Four loci exhibited significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $P \leq 0.001$ ) and 24 pair combinations of the ten loci showed significant linkage disequilibrium ( $P \leq 0.01$ ). The primers were tested for cross amplification in nine species of the Malvaceae family. These preliminary results demonstrate the usefulness of these microsatellite loci for assessing the genetic structure of *L. divaricata* and related genera.

**Keywords:** Microsatellite primers. Genetic diversity. Cross amplification. *Luehea divaricata*.

**Resumo:** Nós isolamos e caracterizamos dez locus de microssatélites para *Luehea divaricata*, uma espécie arbórea Sul Americana de fecundação cruzada que é frequentemente utilizada em programas de reflorestamento de florestas tropicais ripárias no Brasil. Um total de 45 alelos foram detectados em 42 indivíduos, com uma média de 4,5 alelos por locus. A média do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi de 0,546 e os valores das heterozigosidades observadas ( $H_O$ ) e esperadas ( $H_E$ ) variaram de 0 a 0,929 e 0,194 a 0,821, respectivamente. Quatro locus exibiram desequilíbrio de ligação ( $P \leq 0.01$ ). Os primers foram testados para amplificação cruzada em nove espécies da família Malvaceae. Estes resultados preliminares demonstram a utilidade destes microssatélites em acessar a estrutura genética de *L. divaricata* e gêneros relacionados.

**Palavras-chave:** Primers de microssatélites. Diversidade genética. Amplificação cruzada. *Luehea divaricata*.

## 5.1 Article

*Luehea divaricata* Martus et Zuccarini (Malvaceae) is a South American outcrossing pioneer tree species that is frequently used in reforestation programs of tropical riparian forests in Brazil. This species is found from North to South of Brazil (Lorenzi, 2002) occupying wet and drained areas of riparian forests. The wood of *L. divaricata* has been intensely used in industry to make furniture, boxes, wooden shoes, baseboard, garniture and picture-frames (Lorenzi, 2002). The barks of the plants are also used in alternative medicine as anti-inflammatory and antireumatic (Bighetti et al., 2004). Besides its economical importance *L. divaricata* is also important to recuperate disturbed areas of riparian forest. Because of the severe devastation of Brazilian riparian forests and the human exploitation of this species, *L. divaricata* could be considered an endangered species in many regions. The main goal of this study was to develop and characterize microsatellite markers from *Luehea divaricata*, aiming future population genetic studies needed to guide for the conservation of the genetic resources of this species and for the recovering of disturbed riparian forests. Total genomic DNA was extracted from leaf tissue using the cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method (Doyle and Doyle, 1987). Microsatellites were isolated using a hybridization-based capture methodology following the protocol described by Billotte et al. (1999) with (CT)<sub>8</sub> and (GT)<sub>8</sub> probes in the enrichment step. Approximately 5 ng of genomic DNA was digested with *Rsa*I and the blunt-ended fragments were ligated to adaptors (*Rsa*I-21 5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3' and *Rsa*I-25 5'TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACAA3'). Fragments containing CT and GT repeats were selected by hybridization with biotinylated oligonucleotides, complementary to the repetitive sequence and recovered by streptavidin coated magnetic beads (Dynal). Microsatellite-rich fragments were amplified by PCR with *Rsa*I-21 primer, cloned into the pGEM-T Easy Vector and then, transformed into *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' super-competent cells (Stratagene). Plasmids from individual colonies were isolated and sequenced using the ABI 377 Automated Sequencer (Applied Biosystems, CA). Sequenced fragments were screened for microsatellites using the program Gramene markers database (Ware et al., 2002). Sequences containing microsatellites that consisted of five or more repeats surround

by a flanking region suitable for primer design were chosen for further study. Of 98 clones sequenced, 19 had microsatellites but only ten were suitable for primer design and amplification of polymorphic loci (Table 1). Although the (CT)<sub>8</sub> and (GT)<sub>8</sub> oligomer was used for the precloning enrichment, other repeat motifs were also found in the cloned products (Table 1).

Primer pairs complementary to sequences flanking the repeat elements were designed using the PRIMER3 web interface software (Rozen and Skaletsky 2000). PCR amplifications were carried out across 42 individuals from disturbed areas of three populations of *L. divaricata*, one with twenty-one individuals and two additional populations with eleven and ten individuals each. Reactions were performed in 25 µl volume containing 1x PCR buffer, 1U *Taq* DNA polymerase, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 8 pM forward and reverse primers, and 20–30 ng of template DNA. PCR conditions were defined using a touchdown thermal cycling program considering a starting annealing temperature of 65°C for each primer. The cycles parameters consisted of: 1 cycle of 94°C for 4 m, followed by 16 cycles of 94°C for 30 s, 65°C for 30 s with a decreasing of 1°C per annealing cycle until 50°C, and 72°C for 30 s; followed by 20 additional cycles of 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C 30 s and a final extension of 7 m at 72°C. Characteristics of the ten microsatellite loci are given in Table 1.

The amplified PCR products were resolved in a 5% acrylamide:bisacrylamide (29:1) gels and silver stained (Creste et al. 2001). We used Cervus version 2.0 (Marshall et al. 1998) to estimate the number of alleles per locus (K), observed and expected heterozygosities and polymorphic information content (PIC). Deviations from Hardy–Weinberg equilibrium were determined using Genepop version 3.4 software (Raymond and Rousset 1995). The ten polymorphic loci produced a total of 45 alleles, ranging from 2 (Ldiv-40, Ldiv-52 and Ldiv-57) to 8 (Ldiv-31 and Ldiv-53) with an average of 4.5 alleles per locus (Table 1). The average polymorphic information content (PIC) was 0.546 and the values of observed (H<sub>O</sub>) and expected (H<sub>E</sub>) heterozygosity varied from 0.000 to 0.952 and from 0.194 to 0.821, respectively. Four loci (Ldiv-42, Ldiv-48A, Ldiv-53 and Ldiv-58) deviated from expectations of Hardy–Weinberg equilibrium ( $P \leq 0.001$ ) after Bonferroni correction for multiple comparisons (Table 1), while twenty-four pairwise comparisons among the ten loci (Table 2) exhibited significant linkage disequilibrium ( $P \leq 0.01$ ). Besides its importance for the recovering of disturbed areas *L. divaricata* is also economically

very important species with great potential for human use, therefore, studies focused on the preservation and management of genetic resources of this species become very urgent.

These microsatellite loci were tested for cross-amplification in nine other species belonging to eight related genera. All these species were earlier classified into different families: *Heliocapus popayensi* and *Luehea grandiflora* (Tiliaceae); *Ceiba speciosa* and *Pseudobombax grandiflora* (Bombacaceae); *Sida carpinifolia*, *Sida paniculata*, and *Pavonia sepium* (Malvaceae); and *Dombeya wallichii* and *Triumfetta semitriloba* (Sterculiaceae). Nevertheless, studies of Alverson et al. (1998), Whitlock, (2001) and Baum et al. (2004) using a two-step parsimony analysis on 125 rbcL sequences, chloroplast gene *ndhF*, and *trnK/matK*, found that all these species should be grouped into the Malvaceae family. The cross-amplification tests comprised of 5 individuals from each species. Of the ten microsatellite loci tested only the locus Ldiv-48A transferred to all the nine species, while the loci Ldiv-31 and Ldiv-57 did not transfer to any of them (Table 3). These results suggest that some of these developed loci may be applied for further studies of genetic diversity and population structures in species from different genera within the Malvaceae family.

**Table 5.1** – Characterization of ten polymorphic microsatellite loci genotyped in 42 individuals of the riparian species *L. divaricata*. *Allele size* is the range of observed alleles in bp; *K* is number of alleles; *PIC* is the polymorphic information content,  $H_O$  and  $H_E$  are observed and expected heterozygosities, respectively; *P*-value indicates significance of deviation from Hardy–Weinberg equilibrium.

<i>Locus</i>	<i>Primer sequence 5'-3'</i>	<i>Repeat motif</i>	<i>Anneal</i>	<i>Allele size</i>	<i>K</i>	<i>PIC</i>	$H_O$	$H_E$	<i>P</i> -value
Ldiv 48A	F: GCCCTTCAGAATGCAAACCTC R: AAAATTAACACAGGCCACCA	(AG) <sub>10</sub>	59.6	205-230	4	0.588	0.952	0.664	0.0000014 <sup>***</sup>
Ldiv 53	F: TTCCTCGCGGATAAATTGAC R: CGCGGACACAACCTCATATCTT	(GT) <sub>10</sub>	60.1	240-260	8	0.766	0.429	0.803	0.0000001 <sup>***</sup>
Ldiv 55	F: ATTCACCAGCACAGCATCAA R: ATAAGTGGGGGAAGGGCTAA	(AC) <sub>9</sub> ...(TC) <sub>3</sub>	60.0	155-170	5	0.721	0.929	0.770	0.0000001 <sup>***</sup>
Ldiv 31	F: ACCTCACATGGATGCCAGTA R: GAGGTTTCACACGTGGCTTT	(TG) <sub>3</sub> ...(GT) <sub>6</sub>	59.6	230-255	8	0.784	0.810	0.819	0.0477000 <sup>NS</sup>
Ldiv 57	F: CGCGTGGACTAACGGTATTA R: CGATGGTGGAAATTTGCTAAG	(AG) <sub>4</sub> AAA (AG) <sub>6</sub>	58.4	160-170	2	0.173	0.214	0.194	1.0000000 <sup>NS</sup>
Ldiv 42	F: CAACCCTCAGGCCTTACAGA R: GTTGAAGCAAGGCATGTTGA	(CAG) <sub>5</sub>	60.1	180-200	3	0.501	0.929	0.596	0.0000001 <sup>***</sup>
Ldiv 40	F: GCTTCTTGCCAAAATGGTC R: ATGTTTAATGCCGCGTTTTT	(ACC) <sub>4</sub> ...(CT) <sub>3</sub> ...(CA) <sub>3</sub>	59.9	250-260	2	0.297	0.333	0.367	0.5416000 <sup>NS</sup>
Ldiv 52	F: TGAAACAACCACTCAGTCAACC R: TTTCTCCAGGTTTGGTTTTT	(AT) <sub>3</sub> ...(ATT) <sub>3</sub> ...(TCT) <sub>3</sub>	60.0	180-210	2	0.188	0.000	0.212	-
Ldiv 58	F: GACGCATGATGGAAGGAAAT R: TGATGGTCTGAGCAGTCAGG	(AC) <sub>15</sub> ...(ATC) <sub>3</sub>	60.0	150-175	4	0.659	0.762	0.718	0.5498000 <sup>NS</sup>
Ldiv 62	F: CACGGTTCGCTTTTTCTTTC R: CGGCAAATCTCAGGGACTAA	(GGT) <sub>3</sub> ...(AT) <sub>4</sub> (AC) <sub>9</sub>	60.0	210-260	7	0.787	0.643	0.821	0.0180000 <sup>NS</sup>

$P \leq 0.01$

**Table 5.2** – Significant linkage disequilibrium for 24 pair combinations of ten microsatellite loci of *L. divaricata*.

Primers	Ldiv-48 <sup>a</sup>	Ldiv-53	Ldiv-55	Ldiv-31	Ldiv-57	Ldiv-42	Ldiv-40	Ldiv-52	Ldiv-58	Ldiv-62
Ldiv-48A										
Ldiv-53	-									
Ldiv-55	+	-								
Ldiv-31	+	+	+							
Ldiv-57	-	-	+	+						
Ldiv-42	+	-	+	+	-					
Ldiv-40	-	-	-	-	-	-				
Ldiv-52	-	+	+	+	-	-	-			
Ldiv-58	+	+	+	+	+	+	+	-		
Ldiv-62	-	-	+	+	-	-	+	+	+	

$P \leq 0.01$



## 5.2 References

- Alverson, W.S.; Karol, K.G.; Baum, D.A.; Chase, M.W.; Swensen, S.M.; McCourt, R.; Sytsma, K.J. Circumscription of the Malvales and relationships to other Rosidae: evidence from rbcL sequence data. *American Journal of Botany*, v. 85, 1998. p. 876-887.
- Baum, D.A.; Smith, S.D.; Yen, A.; Alverson, W.S.; Nyffeler, R.; Whitlock, B.A.; Oldham, R. Phylogenetic relationships of Malvaceae (Bombacoideae and Malvoideae; Malvaceae sensu lato) as inferred from plastid DNA sequences. *American Journal of Botany*, v. 91, 2004. p. 1863-1871.
- Bighetti, A.E.; Carvalho, J.E.; Antônio, M.A.; Foglio, M.A.; Possenti, A. Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini. *Lecta Brasil* 22, 2004.p. 53-58.
- Billotte, N.; Lagoda, P.J.R.; Risterucci, A.M.; Baurens, F.C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, v. 54, 1999. p. 277–288.
- Creste, S.; Tulmann Neto, A., Figueira, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Report*, v. 19, 2001. p. 299–306.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid DNA isolation for small quantities 161 of leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, v. 19, 1987. p. 11–15.
- Lorenzi, H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*, 2nd ed. Plantarum, Nova Odessa, 2002.
- Marshall, T.C.; Slate, J.; Kruuk, L.; Pemberton, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 1998. p. 639–655.
- Raymond, M.; Rousset, F. (1995) Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* v. 86, 1995. p.248–249.
- Rozen, S.; Skaletsky, H.J.; PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz SA (eds) *Bioinformatics methods and protocols*. Humana Press, 181 Totowa, 2000.
- Ware, D.; Jaiswal, P.; Ni, J.; Pan, X.; Chang, K.; Clark, K.; Teytelman, L.; Schmidt, S.; Zhao, W.; Cartinhour, S.; McCouch, S.; Stein, L. Gramene: a resource for comparative grass genomics. *Nucleic Acids Resources*, v. 30, 2002. p. 103–105.
- Whitlock, B.A.; Bayer, C.; Baum, D.A. Phylogenetic relationships and floral evolution of the Byttnerioideae (Sterculiaceae or Malvaceae s.l.) based on sequences of the chloroplast gene, ndhF. *Systematic Botany*, v. 26, 2001. p. 420-437.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

Mesmo levando-se em conta o grau de desmatamento no Estado do Paraná, foi possível encontrar populações nativas de *C. xanthocarpa* que apresentaram bons níveis de preservação de seus recursos genéticos. Este fato nos permitira em futuros estudos de outros fragmentos, comparar estes dados com os obtidos em outras áreas para se ter uma real compreensão do grau de degradação dos fragmentos florestais menores. Desta forma poderemos direcionar esforços de forma mais efetiva na recuperação de populações desta espécie ao longo da bacia do Rio Tibagi.

Os primers de microssatélites desenvolvidos se mostraram altamente eficientes em acessar a variabilidade genética para espécie *L. divaricata* e outras espécies dentro da família das Malvaceae. Com um alto conteúdo informativo, estes primers serão de grande utilidade no estudo de populações desta e de outras espécies ao longo da bacia do Rio Tibagi e por toda a sua área de distribuição.

Devemos frisar neste momento que bibliotecas enriquecidas em microssatélites deverão ser desenvolvidas futuramente para as espécies *C. xanthocarpa* e *C. gonocarpum*, sendo esta última também parte deste doutorado (Artigo apresentado para a banca de qualificação).

## REFERÊNCIAS

AIZEN, M. A.; FEINSINGER, P. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a chaco dry forest, Argentina. *Ecology*, v. 75, 1994. p. 330-351.

ALDRICH, P. R.; HAMRICK, J. L.; CHAVARRIACA, P.; KOCHERT, G. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented population of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology*, v. 7, 1998 p. 933-944.

ALEXANDER, J. A.; LISTON, A.; Popovich, J. Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, v. 91, 2004. p. 2004–2012.

ALFENAS, A. C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574p.

ALVERSON, W. S.; KAROL, K. G.; BAUM, D. A.; CHASE, M. W.; SWENSEN, S. M.; MCCOURT, R.; SYTSMA, K. J. Circumscription of the Malvales and relationships to other Rosidae: evidence from rbcL sequence data. *American Journal of Botany*, v. 85, 1998. p. 876-887.

BALDI, P.; BRUNAK, S. *Bioinformatics: the machine learning approach*. Cambridge: The MIT Press, 1999. 351p.

BALLAL, S. R.; FORÉ, S. A.; GUITTMEN, S. I. Apparent gene flow and genetics structure of *Acer saccharum* subpopulations in forest fragments. *Canadian journal of botany*, v.72, 1994. p.1311-1315.

BALLVE ALICE, C.; Saraiva de Siqueira, N. C.; Mentz, L. A.; Silva, G. A. B.; José, K. F. D.; 1995. *Plantas medicinais de uso popular (Atlas farmacognóstico)*. Editora da ULBRA, Canoas, 1995. 205 p.

BARBOSA, L. M.; MANTOVANI, W. Degradação Ambiental: Conceituação e bases para repovoamento vegetal. In: *Recuperação de áreas degradadas da Serra do Mar e Formações Florestais Litoraneas*. São Paulo, 2000. p. 33-40.

BARRETT, S. C. H.; Kohn, J. R. Genetics and evolutionary consequences of small population size in plants: Implications for conservation. In Falk, D.A., Holsinger, K.E. (Eds.), *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York, USA, 1991. p. 3–30.

BAUM, D. A.; SMITH, S. D.; YEN, A.; ALVERSON, W. S.; NYFFELER, R.; WHITLOCK, B. A.; OLDHAM, R. Phylogenetic relationships of *Malvatheca* (Bombacoideae and Malvoideae; Malvaceae sensu lato) as inferred from plastid DNA sequences. *American Journal of Botany*, v. 91, 2004. p. 1863-1871.

BEAMOUNT, M. A., RANNALA, B. 2004. The Bayesian revolution in genetics. *Nature Reviews-Genetics*, v. 5. p. 251-261.

BECKMANN, J. S. Genomics genetics: an essential link between conventional and transgenic breeding. *Proceedings of the Expert Consultation of Biothecnology in Livestock Production and Healthin Developing Countries. Animal Production and Health Division -FAO, Rome, 1990, pg. 45 - 57.*

BIANCHINI, E. Ecologia de população de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl. no Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, PR. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; SANTOS, F. A. M. 2001. Spatial and temporal variation in the canopy cover in a tropical semi-deciduous forest. *Brazilian Archives of Biology Technology, Curitiba*, v. 44, 2001. p. 269-276.

BIANCHINI, E.; POPOLO, R. S.; DIAS, M. C.; PIMENTA, J. A. Diversidade e estrutura de espécies arbóreas em área alagável do município de Londrina, Sul do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 17, 2003. p. 405-419.

BIAVATTI, M. W. C.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; Brasil, L. M.; Hort, S.; Schuster, L.; Leite, S. N.; Prado S. R. T. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 93, 2004. p. 385-389.

BIGHETTI, A. E.; CARVALHO, J. E.; ANTÔNIO, M. A.; FOGLIO, M. A.; POSSENTI, A. Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata* Martus et Zuccarini. *Acta Brasil*, 22, 2004. p. 53-58.

BILLOTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, v. 54, 1999. p. 277-288.

BITTENCOURT, J. V. M. Genetic diversity and dynamics in remnant patches of *Araucaria angustifolia* forest in Paraná State, Brazil: implications for conservation and restoration. PhD thesis (Landscape Ecology) - The University of Reading, 2007. 226p.

BÓREM, A.; Caixeta, E. T. Marcadores moleculares. Viçosa – Minas Gerais, 2006. 374p.

BRITEZ, R. M. de; REISSMAN, C. B.; SILVA, S. M.; SANTOS-FILHO, A. Deposição estacional de serrapilheira e macronutrientes em uma floresta de araucária, São Mateus do Sul, Paraná. Revista do Instituto Florestal, São Paulo, v.4, pt.3, p.766-772. Edição dos Anais do 2º Congresso Nacional sobre Essências Nativas, São Paulo, 1992.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. Construction of Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms", American Journal of Human Genetics, v. 32, 1980. p. 314-331.

BROOKES, A. J. 1999. The essence of SNPs. Gene, v. 234, 1999. p. 177-186.

CARDOSO, S. R. S.; ELOY, N. B.; PROVAN, J.; CARDOSO, M. A.; FERREIRA, P. C. G. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP analysis. Molecular. Ecology, v. 9, 2000. p. 1753–1760.

CARRARA, M. S.; CARRARA, D. Importância econômica e medicinal de duas espécies de Campomanesia Ruiz & Pavón. In: Congresso Nacional de Botânica, v. 47, 1996, Nova Friburgo. Resumos. Nova Friburgo: Sociedade Botânica do Brasil. 312 p.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G.; RUAS, P. M.; MEDRI, M. E.; RUAS, E. A.; RUAS, C. F. Flooding tolerance and genetic diversity in populations of *Luehea divaricata* Biologia Plantarum, v. 52, 2008. p. 771-774.

CARVALHO, P. E. R. Espécies Arbóreas Brasileiras. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Centro Nacional de Pesquisa de Florestas – Colombo: EMBRAPA-CNPq. Brasília. v. 2, 2006. 628 p.

CHASE, M. R.; BOSCHER, D. H.; BAWA, K. S. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1. Genetic variation in natural populations. American Journal of Botany, v. 82, 1995. p. 468-475.

COELHO, A. S. G. Software: dBOOD - Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap Versão 3.0. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2001.

CORREA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro. Imprensa Nacional, v. 5, 1974. p. 512.

CRESTE, S.; TULMANN Neto, A., FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Report*, v. 19, 2001. p. 299–306.

DEN DUVEN, J. T.; ANTONARAKIS S. E. "Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion". *Human Mutation*, v. 15, 2000. p. 7–12.

DE STEVEN, D.; PUTZ, F. E. Impact of mammals on early recruitment of a tropical canopy tree, *Dipteryx panamensis*, in Panama. *Oikos*, v. 43, 1984. p. 207-216.

DIAS, B. F. S. A implementação da Convenção sobre Diversidade Biológica no Brasil: Desafios e Oportunidades. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1996. 10 p.

DIAS, M. C.; VIEIRA, A. O. S.; NAKAJIMA, J. N.; PIMENTA, J. A.; LOBO, P. C. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares do rio Iapó, na bacia do Rio Tibagi, Tibagi, PR. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 21, 1998. p. 183-195.

DICKEL, M. L.; RATES, S. M. K.; RITTER, M. R. Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, 2007. p. 60-71.

DINIZ, F. M.; IYENGAR, A.; Lima, P. S. C. L.; Maclean, N.; Bentzen, P. Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use of tailed primers for high throughput genotyping. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, 2007. p. 380-384.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation for small quantities 161 of leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, v. 19, 1987. p. 11–15.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, v. 1, 2005. p. 47–50.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 3. ed, 1998. 220p.

FOSTER, B. R.; RAHS, E. Y. A study of canyon-dwelling mountain goats in relation to proposed hydroelectric development in Northwestern British Columbia, Canada. *Biological Conservation*, v. 33, 1985. p. 209-228.

FRISCH, J. D.; FRISCH, C. D. Aves Brasileiras e Plantas que as Atraem. 3 ed. São Paulo: Dalgas Ecoltec-Ecologia Técnica Ltda, 2005. 480 p.

GALLO, M. C. C. Tolerância ao alagamento e caracterização da variação de genética em populações de *Luherea divaricata* Mart (Tilliaceae). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina - PR, 2002. 164p.

GAMERMAN, D. Markov Chain Monte Carlo: stochastic simulation for Bayesian inference. London: Chapman and Hall, 1997. 245p.

GAUDEUL, M.; TABERLET, P.; TILL-BOTTRAUD, I. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology*, v. 9, 2000. p. 1625–1637.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, v. 113, 2000. p. 163-165.

HAMADA, H. M.; SEIDAMAN, B. H.; HOWARD, C.; GORMAN, M. Enhanced gene expression by the poly(dT-dG) and poly(dC-dA) sequence. *Molecular and Cellular Biology*, v. 4, 1984. p. 2622-2630.

HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B.; MITTON, J. B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 10, 1979. p. 173-200.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: Schone-Wald-Cox, C. M., Chambers, S. H.; MacByde, B., Thomas, L.

(Ed.). Genetics and Conservation. Menlo Park: Benjamin Cummings, 1983. p. 335-348.

HARRIS, A. R. Population studies of *Xiphinema pachtaicum* and *X. americanum* in a vineyard in north-eastern Victoria. Victoria : Mildura Horticultural Research Station, Department of Agriculture, 1980. 8 p.

HELENTJARIS, T.; SLOGUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAFFER, A.; NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, v. 72, 1986. p. 761-769.

HUARACHA, E. M.; XU, M. L.; GASIC, K.; PAUWELS, E.; Van Den Putte, A.; KEULEMANS, J. W.; KORBAN, S. S. Phenotypic Reaction and Genetic Analysis Using AFLP-derived SCARs for Resistance to Apple Scab. Journal of Phytopathology, v.152, 2004. p. 260-266.

INSTITUTO Ambiental do Paraná - IAP, 2002. Desenvolvimento Florestal – 2002. Disponível em: [www.pr.gov.br/sema/ifema.shtml](http://www.pr.gov.br/sema/ifema.shtml). Acessado em: 22/09/2009.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; Thein, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature, v. 314, 1985. p. 67-73.

KAGEYAMA, P. Y. Conservação *in situ* de recursos genéticos de plantas. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais - IPEF, v. 35, 1987. p. 7-37.

KALA, C. P. Status and conservation of rare and endangered medicinal plants in the Indian trans-Himalaya. Biological Conservation, v. 93, 2000. p. 371-379.

KARAGYOZOV, L.; KALCHEVA, I. D.; CHAPMAN, V. M. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. Nucleic Acids Research, v. 21, 1993. p. 3911-3912.

KNOWLES, P. Genetic variability among and within closely spaced populations of Lodgepole pine. Canadian Journal of Genetics and Cytology, v. 26, 1984. p. 177-184.

KWOK, P. Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. Annual Review of Genomics and Human Genetics, v. 2, 2001. p. 235-258.

LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. *Science*, v. 241, 1988. p. 1455-1461.

LEGRAND, C. D. *Myrtaceae catharinense novae*. *Sellowia*, v. 8, 1957. p. 71-79.

LINHART, Y. B.; MITTON, J.B.; STURGEON, K.B.; DAVIS, M. L. Genetic variation in space and time in a population of *Ponderosa pine*. *Heredity*, v. 46, 1981. p. 407-426.

LITT, M. LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, v. 44, 1989. p. 397-401.

LOPEZ, J. A.; LITTLE-JUNIOR, E. L.; RITZ, G. F.; Rombold, J. S.; HAHN, W. J. *Arboles communes del Paraguay: ñande yvyra mata kuera*. Washington: Cuerpo de Paz, 1987. 425p.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras - Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, SP, Editora Plantarum. v. 2, 1998. 367 p.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*. 2 edição. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum. v. 2, 2002. 368 p.

LOWE, A. J.; BOSCHER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, v. 95, 2005. p. 255 – 273.

LOVEJOY, T. E. Ecological dynamics of tropical forest fragments. In: Sutton, S. L.; Whitmore, T. C., Chadwick, A. C. *Tropical Rain Forest: Ecology and Management*. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1983. p. 377-384.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 15, 1987. p. 65-95.

LUNT, D. H.; HUTCHINSON, W. F.; CARVALHO, G. R. An efficient method for PCR-based identification of microsatellite arrays (PIMA). *Molecular Ecology*, v. 8, 1999. p. 893-894.

MAACK, R. *Mapa Fitogeográfico do Estado do Paraná*. IBT. Curitiba, 1951.

MAACK, R. Geografia física do Estado do Paraná. BADEP/UFPR/IBPT, Curitiba, 1968. 350 p.

Maixner, A. E.; Ferreira, L. A. B. Contribuição ao estudo das essências florestais e frutíferas nativas do Estado do Rio Grande do Sul – II. Trigo e Soja, v.18, 1976. p. 3-20.

MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. Journal of Ethnopharmacology, v. 94, 2004. p. 55-57.

MARKET, C. L.; MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: issue, ontogenetic and species specific patterns. Proceedings of the National Academy of Science, USA, v. 45, 1959. p. 753-763.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUIK, L.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology, 7, 1998. p. 639–655.

MATTOS, J. R. Myrtaceae do Rio Grande do Sul. Roessléria. v. 5, 1983. p. 169-370.

MENDONÇA, F. A.; DANI-OLIVEIRA, I. M. Climatologia: Noções Básicas e Climas do Brasil. São Paulo, Contexto, 2002.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology, v. 55, 1987. p. 335-350.

MURCIA, C. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. Trends in Ecology and Evolution, v. 10, 1995. p. 58-62.

NAKITANDWE, J.; TROGNITZ, F.; TROGNITZ, B. Reliable allele detection using SNP-based PCR primers containing Locked Nucleic Acid: application in genetic mapping. Plant Methods (Open access), v. 3 (2), 2007 9p.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, v. 89, 1978. p. 583–590.

NOBELPRIZE – Nobelprize.org, <http://nobelprize.org/nobelprizes/chemistry/laureates/1993/index.html>, (15 julho 2006).

OLMSTED, I.; AIVAREZ-BUYLLA, E. Sustainable harvesting of tropical trees: demography and matrix models of two palm species in Mexico. *Ecological Applications*, v. 5, 1995. p. 484-500.

OSTRANDER, E. A.; JONG, P. M.; RINE, J.; DUYK, G. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 89, 1992. p. 3419-3423.

PAETKAU, D. Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol. *Biotechniques*, v. 26, 1999. p. 690-697.

PARAN, I. MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-based markers linkage to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 85, 1993. p. 985-993.

PIGATO, S.M.P.C.; LOPES, C.R. Avaliação da variabilidade genética em quatro gerações de *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake por meio do marcador molecular RAPD. *Scientia Forestalis*, v. 60, 2001. p. 119- 133.

PIMENTA, J. A. Estudo Populacional de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae) no Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, PR. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998. 150p

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, v. 1, 1996. p. 215-222.

PRITCHARD, J. K.; STEPHANS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, 2000. p. 945-959.

Rajora, O. P.; Mosseler, A. Challenges and opportunities for conservation of Forest genetic resources. *Euphytica*, v. 118, 2001. p. 197-212.

RASSMANN, K.; SCHÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, v. 12, 1991. p. 113-118.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. (1995) Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. v. 86, 1995. p. 248-249.

REITZ, P. R. Flora Ilustrada Catarinense – Myrtaceas. Parte 1. Raolino Reitz (ed), Itajaí, 1977.

RIVERA-OCASIO, E.; AIDE, M.; MCMILLAN, W. O. The influence of spatial scale on the genetic structure of a widespread tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Fabaceae). *Conservation Genetics*, v. 7, 2006. p. 251–266.

RODRIGUES, R. R.; MARTINS, S. V.; BARROS, L. C. Tropical rain Forest regeneration in area degraded by mining in Mato Grosso State, Brazil. *Forest Ecology and Management*, v.190, 2004. p. 323-333.

ROZEN, S.; Skaletsky, H. J. PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz SA (eds) *Bioinformatics methods and protocols*. Humana Press, 181 Totowa, 2000.

RUAS, E. A. Estudos de Diversidade Genética e Anatomia Ecológica de Populações da Espécie Arbórea Ciliar da Bacia do Rio Tibagi *Schinus terebinthifolius* (Anacardeaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, 2006.

SANQUETTA, C. R. Os números atuais da cobertura florestal do Paraná. Universidade Federal do Paraná. Curitiba: UFPR, 2003. Disponível em: <http://www.reasul.org.br/paginas/noticias.php?id=568>. Rede Sul Brasileira de Educação Ambiental. Acesso em: 16/09/2009.

SCHLUTER, P. M.; HARRIS, S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, 2006. p. 569-572.

SEMA/GTZ – SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENTE/DEUTSCHE GESSELLSCHAFT FÜR TECHNISCHE ZUSAMMERARBEIT. Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado do Paraná. Curitiba, 1995. 139 p.

SHAFFER, M. L. Minimum population sizes for species conservation. *Bioscience*, v. 31, 1981. p. 131-134.

SHOEMAKER, J. S.; PAINTER, I. S.; Weir, B. S. A Bayesian characterization of Hardy-Weinberg disequilibrium. *Genetics*, v. 149, 1998. p. 2079-2088.

SHOEMAKER, J. S.; PAINTER, I. S.; WEIR, B. S. Bayesian statistics in genetics: a guide for the uninitiated. *Trends in Genetics*, v. 15, 1999. p. 354-358.

- SILVEIRA, M. A Vegetação do Parque Estadual Mata dos Godoy. In: Ecologia do Parque Estadual Mata dos Godoy. J. M. D. Torezan. (Org.), Itedes, Londrina, 2006. p. 13-18.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. Isozymes in plant biology. Dioscorides. Portland, OR, 1989.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, v. 17. 1989. p. 6463–6471.
- TERBORGH, J. Maintenance of diversity in tropical forests. *Biotropica*, v. 24. 1992. p. 283-292.
- TERO, N.; ASPI, J.; SIIKAMA, P.; NIEMI, " KI, A. JA" KA" LA"; Tuomi, J. Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silene tatarica*. *Molecular Ecology*, v. 12, 2003. p. 2073–2085.
- TILMAN, D.; KNOPS, J.; WENDIN, D. The influence of functional diversity and composition on ecosystem process. *Science*, v. 277, 1997. p. 1300-1302.
- TOREZAN, J.M.D. 2002. Nota sobre a vegetação do rio Tibagi. p. 103-108. In: Medri, M. E.; Bianchini, E.; Shibatta, O. A.; Pimenta, J. A. A Bacia do Rio Tibagi. Londrina.
- VÄLI, U.; BRANDSTRÖM, M.; JOHANSSON, M.; ELLEGREN, H. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genetics*, v. 9, 2008. 8p.
- VALLILO, M.I.; MORENO OLIVEIRA, P.R.H.; ELESABETH, E.; LAMARDO, L.C.A.; GARBELOTTI, M. L. Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, 2008. p. 231-237.
- VICENTE, F. R. O Parque Estadual Mata dos Godoy. In: Ecologia do Parque Estadual Mata dos Godoy. J. M. D. Torezan. (Org.), Itedes, Londrina, 2006. p. 19-27.
- VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. "A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics". *Genetics, Selection, Evolution*, v. 34(3), 2002. p. 275–305.

VOS, P. T.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; Frijters, A.; Pot, J.; PELEMAN, J.; Kulper, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, v. 23, 1995. p. 4407–4414.

WALLACE, L. E. Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae): inferences from allozyme and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Species Biology*, v. 17, 2002. p. 37-49.

WARE, D.; JAISWAL, P.; NI, J.; PAN, X.; CHANG, K.; CLARK, K.; TEYTELMAN, L.; SCHMIDT, S.; ZHAO, W.; CARTINHOOR, S.; MCCOUCH, S.; STEIN, L. Gramene: a resource for comparative grass genomics. *Nucleic Acids Resources*, v. 30, 2002. p. 103–105.

WEBER, J.L.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms can be typed using polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, v. 44, 1989. p. 397-401.

WEST, C. J. Sustainability of *Beilschmiedia tawa* dominated forest in New Zeland: population predictions based on transition matrix model analysis. *Australian Journal of Botany*. v. 43, 1995. p. 51-71.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v. 18, 1990. p. 6531-6535.

WHITLOCK, B.A.; BAYER, C.; BAUM, D.A. Phylogenetic relationships and floral evolution of the Byttnerioideae (Sterculiaceae or Malvaceae s.l.) based on sequences of the chloroplast gene, *ndhF*. *Systematic Botany*, v. 26, 2001. p. 420-437.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. J.; XIYAN, J. M. Pop Gene 32. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, v. 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 2000.

YOUNG, A. G.; Brown, A. H. D. Paternal bottlenecks in fragmented populations of the grassland daisy *Rutidosia leptorrhynchoides*. *Genetical Research*. v. 73, 1999. p. 111-117.

YUE, P.; Moul, J. "Identification and analysis of deleterious human SNPs". *Journal of Molecular Biology*, v. 356(5), 2006. p. 1263–74.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a Review. *Molecular Ecology*, v.11, 2002. p.1-16.

Zhivotovsky, L. A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, v. 8, 1999. p. 907–913.

ZUCCHI, M. I. Análise da estrutura genética de *Eugeniadysenterica* DC. utilizando marcadores de RAPD e SSR. Tese Doutorado - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002. 130p.