

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM DUAS POPULAÇÕES DE *Pterogyne
nitens* Tul. UTILIZANDO SSR**

**Michele Perez Viegas
Bióloga**

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM DUAS POPULAÇÕES DE *Pterogyne
nitens* Tul. UTILIZANDO SSR**

Michele Perez Viegas

**Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
Coorientadora: Profa. Dra. Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das exigências
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Genética e Melhoramento de
Plantas)**

2013

V656d Viegas, Michele Perez
Diversidade genética em duas populações de *Pterogyne nitens*
Tul. utilizando SSR / Michele Perez Viegas. -- Jaboticabal, 2013
ix, 66 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientadora: Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva

Banca examinadora: Dilermando Perecin, Miguel Luiz Menezes de Freitas, Ana Yamaguishi Ciampi, Carla Renata da Silva Baleroni Guerra

Bibliografia

1. Microssatélites. 2. Marcadores moleculares. 3. Sistema de reprodução. 4. Tamanho efetivo. 5. Amendoim-bravo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:634.0.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DIVERSIDADE GENÉTICA EM DUAS POPULAÇÕES DE *Pterogyne nitens* Tul. UTILIZANDO SSR

AUTORA: MICHELE PEREZ VIEGAS

ORIENTADORA: Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. CRISTINA LACERDA SOARES PETRAROLHA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CRISTINA LACERDA SOARES PETRAROLHA SILVA
Fundação Educacional de Andradina / Andradina/SP

Prof. Dr. DILERMANDO PERECIN
Departamento de Ciências Exatas / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MIGUEL LUIZ MENEZES FREITAS
Instituto Florestal de São Paulo / São Paulo/SP

Profa. Dra. CARLA RENATA SILVA BALERONI GUERRA
Fundação Educacional de Andradina / Andradina/SP

Profa. Dra. ANA YAMAGISHI CIAMPI
Ministério do Meio Ambiente / Brasília/DF

Data da realização: 08 de fevereiro de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Michele Perez Viegas – nascida em 22 de junho de 1982, em Ilha Solteira-SP, É bióloga formada em dezembro de 2005 pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campus de Três Lagoas. Concluiu o mestrado em Agronomia com ênfase em Sistema de Produção pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Ilha Solteira, em fevereiro de 2009. No mestrado realizou parte das pesquisas na Embrapa-Cenargen em Brasília. Credenciada junto ao Conselho Regional de Biologia, área SP, MS e MT. Em março de 2009 início o Doutorado em Agronomia, área de Genética e Melhoramento de Plantas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Campus de Jaboticabal.

**Por mais difícil que seja uma situação, não deixe
de acreditar e de lutar até o último momento.**

**“A vida só pode ser compreendida, olhando-se para trás;
mas só pode ser vivida, olhando-se para frente.”**

**“As pessoas raramente reconhecem a oportunidade
porque ela surge disfarçada em trabalho árduo.”**

Mencken

Aos meus pais, Francisco Carlos Viegas e Edazina Perez Viegas,

A minhas grandes irmãs, Graciele e Daniele,

A Nossa Senhora Aparecida pela graça concedida,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por intercederem por mim no instante em que mais precisei, pois sem a mão deles eu não estaria aqui neste momento.

Aos meus pais, Francisco e Edazina, pelo apoio incondicional durante a realização deste trabalho, amor, carinho e compreensão.

As minhas irmãs Graciele que sempre apoiou e incentivou a conclusão de mais esta etapa, e a Daniele que também sempre esteve junto principalmente na etapa final dos trabalhos ajudando e muito na formatação dos trabalhos.

A toda minha família que direta ou indiretamente contribuíram e ajudaram de todas as formas possíveis durante estes quatro anos de luta.

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, ao Departamento de Tecnologia e ao LBMP – Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas pela oportunidade na realização deste doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento do trabalho e a bolsa.

À Prof. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela colaboração, oportunidade de realização deste projeto, orientação, apoio, compreensão, principalmente na finalização do trabalho, e grande amizade e conselhos transmitidos durante todo o período que passamos juntos.

À Prof. Dra. Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva (Kitty), pela orientação, apoio desde o início do processo seletivo para ingresso ao programa de doutorado, até a finalização deste trabalho, perdendo até noites de sono para ajudar nas correções e sugestões. E por último, mas não menos importante seus pais proporcionaram estada em sua casa quando necessitei.

Ao Prof. Dr. Hélio Ricardo Silva pelo apoio no georreferenciamento e construção do mapa de localização das árvores matrizes usadas neste trabalho.

À banca examinadora da qualificação, Prof. Dr. Rinaldo Cesar de Paula, Prof. Dr. Gustavo Vitti Morro, Prof. Dr. Sandra Helena UnedaTrevisoli e Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza, pelas considerações e sugestões de grande valia para este trabalho.

À banca examinadora da defesa, Dra. Ana Yamaguishi Ciampi, Dr. Miguel Luiz Menezes de Freitas, Profa. Dra. Carla Renata Silva Baleroni Guerra, Prof. Dr. Dilermando Perecin pelas valiosas sugestões visando a melhoria deste trabalho.

Aos meus chefes Prof. Dr. Carlos Antônio Alves (Departamento de Engenharia Elétrica), Prof. Dr. André Luiz Seixlack (Departamento de Engenharia Mecânica) e Prof. Dr. Luiz Carlos Facundo Sanches (Departamento de Matemática) da UNESP de Ilha Solteira, que me apoiaram e foram solidários aos meus pedidos de dispensa nos horários de serviço para realizar estágio de docência e deslocamentos até Jaboticabal para conclusão deste trabalho.

Aos funcionários da Seção de pós-graduação pela grande atenção e compreensão.

A todos os amigos que conheci no LBMP, que ajudaram na conquista deste título.

À amiga Andressa que sempre esteve pronta a ajudar em todos os momentos, sejam eles do dia ou da noite, até nos finais de semana, alterando seus horários para poder colocar minhas placas no sequenciador, nos momentos de depressão que saíamos para colocar a conversa e os problemas em dia... rrsrs... meu muito obrigado... você será sempre uma grande amiga, mesmo se não estivermos próximas.

Às amigas Silvana e Eliamar que sempre deram ótimas dicas de bancada, e muitos conselhos para serem levados por toda vida.

À amiga Gabriela pela colaboração durante o sequenciamento, perdendo tempo de seus finais de semana para colocar minhas placas no sequenciador para que eu conseguisse concluir as análises.

Ao amigo e técnico de laboratório João Carlos por toda a ajuda fornecida durante a realização deste trabalho.

E por último, mas não menos importante, todos os outros amigos do laboratório, Gisele, Karla, Wellington Moreira, Elisangela, Érica, Mariana, Thaís, Viviane Vieira, Viviane Schuch, Ludmila, Michelli Persona, Aylan, Ana Rita, Haroldo e Renato, que direta ou indiretamente ajudaram na execução deste trabalho.

E a todos que mesmo não citados aqui foram muito importantes nesta trajetória.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 – A espécie <i>Pterogyne nitens</i> Tul.....	4
2.2 – Consequências da fragmentação para os recursos florestais.....	7
2.3 – Contribuições de estudos genéticos moleculares para espécies arbóreas.....	9
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 - Material.....	12
3.2- Métodos.....	13
3.2.1 – Produção de mudas de <i>Pterogyne nitens</i>	13
3.2.2- Extração e Quantificação do DNA Genômico Total de <i>Pterogyne nitens</i>	14
3.2.3 – Construção da Biblioteca Genômica Enriquecida.....	15
3.2.3.1 – Restrição do DNA.....	15
3.2.3.2 – Ligaç�o do DNA aos adaptadores.....	16
3.2.3.3 – Preparo das contas magn�ticas para hibridiza�o ao DNA.....	16
3.2.3.4 – Amplifica�o via PCR para controle do enriquecimento da biblioteca.....	17
3.2.3.5 – Liga�o do DNA ao vetor de Clonagem e transforma�o em c�lulas competentes.....	17
3.2.3.6 – Manuten�o, sele�o e extra�o de DNA dos clones.....	18
3.2.3.7 – Rea�o de Seq�enciamento dos Clones.....	19
3.2.3.8 – An�lise das sequ�ncias e desenho dos iniciadores.....	20
3.2.3.9 – S�ntese de Oligonucleot�deos e otimiza�o das condi�oes de PCR para amplifica�o dos locos SSR.....	20
3.2.3.10 – Amplifica�o dos locos SSR para genotipagem em Sequenciador.....	21
3.2.3.11 – Preparo das PCRs para genotipagem.....	21
3.3 – An�lise dos dados.....	22
3.3.1– Diversidade gen�tica.....	22

3.3.2 – Sistema Reprodutivo.....	22
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1- Restrição do DNA e ligação do DNA aos adaptadores.....	24
4.2 – Preparo das contas magnéticas para hibridização ao DNA e amplificação via PCR para controle do enriquecimento da biblioteca	24
4.3 – Transformação em células competentes	25
4.4 – Extração e Quantificação do DNA clonado	25
4.5 – Sequenciamento dos clones, análise das sequências e desenho dos iniciadores.....	29
4.6 - Síntese de Oligonucleotídeos e Otimização das temperaturas de amplificação	35
4.7 - Genotipagem dos locos SSR	44
4.8 – Diversidade genética.....	50
4.9 - Sistema reprodutivo	56
5 – CONCLUSÃO	59
6 – REFERÊNCIAS.....	60

DIVERSIDADE GENÉTICA EM DUAS POPULAÇÕES DE *Pterogyne nitens* Tul. UTILIZANDO SSR

RESUMO - Os marcadores microssatélites têm sido utilizados com frequência como ferramenta efetiva para estudos de diversidade e sistema reprodutivo de populações, possuem aplicabilidade prática, uma vez que podem ser obtidos pela construção de bibliotecas genômicas enriquecidas. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar iniciadores SSR polimórficos para a espécie *Pterogyne nitens* e analisar a diversidade genética e o sistema reprodutivo de duas gerações dessa espécie em duas populações distintas. Foram avaliadas uma população localizada na cidade de Jaboticabal-SP (Pop. JB) e outra na cidade de Pereira Barreto-SP (Pop. PB), sendo 10 árvores matrizes e 30 progênies de cada árvore de cada população. Observou-se um total de 48 alelos para as duas gerações da Pop. JB e 41 alelos para a Pop. PB. O número efetivo de alelos por loco nas matrizes da Pop. JB ($\hat{A}_e = 2,73$) e progênies ($\hat{A}_e = 2,95$) foi inferior ao número médio de alelos por loco ($\hat{A} = 3,5$) e ($\hat{A} = 8$), nas matrizes e progênies respectivamente. O mesmo foi observado na Pop. PB ($\hat{A}_e = 2,17$) e ($\hat{A}_e = 2,65$) e ($\hat{A} = 2,66$) e ($\hat{A} = 6,83$) respectivamente para as matrizes e progênies, indicando que existe alelos em baixa frequência nas duas populações. A taxa de cruzamento multiloco foi alta para as duas populações. A diferença entre as taxas de cruzamento multiloco e uniloco ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) foi nula para a Pop. JB, indicando que não houve cruzamento entre aparentados e baixa para Pop. PB indicando pouco cruzamento entre aparentados. Assim, pode-se concluir que a espécie é de cruzamento misto, predominantemente alógama.

Palavras-Chave: Amendoim-bravo, Microssatélites, Marcadores genéticos, Sistema de reprodução, Tamanho efetivo

GENETIC DIVERSITY IN TWO POPULATIONS OF *Pterogyne nitens* Tul. USING SSR

ABSTRACT - Microsatellites molecular markers have been used with frequency as an effective tool for studies of diversity and reproductive system of the populations, have practical applicability, since they can be obtained by the construction of enriched genomic libraries. The aim of this work was to develop and validate SSR polymorphic iniciadores for the *Pterogyne nitens* species, and to analyze the genetic diversity and the reproduction system of two generations of this species in two different populations. The two populations evaluated are located in Jaboticabal-SP (Pop. JB) and Pereira Barreto-SP (Pop. PB) municipalities. It was evaluated 10 tree matrices and 30 progenies from each tree of each population. The results showed a total of 48 alleles for the two generations of the Pop. JB and 41 alleles for the Pop. PB. The effective number of alleles per locus in the matrices ($\hat{A}_e = 2,73$) and progenies ($\hat{A}_e = 2,95$) of the Pop. JB was lower than the average number of alleles per locus ($\hat{A} = 3,5$) and ($\hat{A} = 8$) of the matrices and progenies, respectively. It was also observed in the Pop. PB ($\hat{A}_e = 2,17$) and ($\hat{A}_e = 2,65$) and ($\hat{A} = 2,66$) and ($\hat{A} = 6,83$) for the matrices and progenies, respectively, which indicates that there are alleles with low frequency in both populations. The rate of multilocus crossing was high for the two populations. The difference between the multilocus and single locus rates of crossing ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) was zero for the Pop. JB, indicating that no crossing occurred between related individuals, and low for the Pop. PB, indicating little cross between related individuals. Thus, it can be concluded that the species is mixed mating, predominantly alogamous.

Keywords: Amendoim-bravo, Microsatellites, Genetic markers, Reproduction System, Effective size

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de amplificação dos iniciadores SSR para <i>Pterogyne nitens</i>	44
Tabela 2: Estimativa de parâmetros genéticos em seis locos para as duas populações e as duas gerações de <i>Pterogyne nitens</i> : n é o número total de indivíduos analisados; \hat{A} é o número de alelos por loco; \hat{A}_e é o número efetivo de alelos por loco; \hat{H}_o é a heterozigosidade observada; \hat{H}_e é a heterozigosidade esperada; $\hat{H}_{máx}$ é a máxima diversidade para cada loco; $\hat{H}_e / \hat{H}_{máx}$ é a proporção da diversidade máxima.	52
Tabela 3: Estimativas de índices de diversidade genética, obtidas para as Pop. JB e Pop. PB de <i>Pterogyne nitens</i> , em que: \hat{n} é o número médio de indivíduos analisados, \hat{A} é o número médio de alelos por loco; \hat{A}_e é o número efetivo de alelos por loco; \hat{H}_o é a heterozigosidade observada; \hat{H}_e é a heterozigosidade esperada; $\hat{f}_{(IS)}$ é o índice de fixação; \hat{N}_e é o tamanho efetivo populacional; \hat{N}_e / \hat{n} é a relação entre o tamanho efetivo e o tamanho amostral.	55
Tabela 4: Estimativas do sistema de reprodução e taxa de cruzamento para as duas populações de <i>Pterogyne nitens</i>	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** **A)** Árvore de *Pterogyne nitens*; **B)** Ramo com inflorescência; **C)** Ramo mostrando detalhes das folhas juntamente com a inflorescência; **D)** Detalhe das sementes verdes e maduras.5
- Figura 2:** Mapa da cidade de Jaboticabal com a localização aproximada das matrizes da Pop. JB de *Pterogyne nitens*.12
- Figura 3:** Imagem de satélite da distribuição espacial de matrizes de *Pterogyne nitens* no município de Pereira Barreto-SP. As marcações Mc1 a Mc10 são referentes aos números das matrizes de 1 a 10, respectivamente.13
- Figura 4:** Reação de Restrição da enzima SAU3AI no DNA de *Pterogyne nitens*. ..24
- Figura 5:** Perfil eletroforético em gel de agarose da reação de PCR para verificação do enriquecimento da biblioteca. A numeração corresponde a 1: DNA/adaptador, 2: Solução de Hibridização, 3: 1ª lavagem, 4: 2ª lavagem, 5: 3ª lavagem, 6: 4ª lavagem, 7: DNA adsorvido as beads.....25
- Figura 6** - Perfis eletroforéticos de DNAs clonados que constituem a biblioteca enriquecida de microssatélite de *Pterogyne nitens*. Sonda utilizada: AC₁₃.27
- Figura 7:** Perfis eletroforéticos de DNAs clonados que constituem a biblioteca enriquecida de microssatélite de *Pterogyne nitens*. Sonda utilizada: TC₁₃28
- Figura 8:** Imagem do Phred/Phrap/Consed. A segunda linha corresponde ao sequenciamento na extensão *Forward*, a terceira linha corresponde ao sequenciamento na extensão *Reverse* e a primeira linha corresponde à fita consenso com detalhe do microssatélite destacado em amarelo.30
- Figura 9:** Programa Iniciador3 usado para desenho de iniciadores nas regiões que flanqueiam o SSR. Dados como: *tm* temperatura de *melting* de cada iniciador, é essencial que a diferença de temperatura entre os iniciadores não seja maior que 3°C; a porcentagem de **GC** não deve ser inferior a 40%; * refere-se a sequência SSR; >>>sequência do iniciador *forward*; <<<<complementar da sequência do iniciador *reverse*; XXXX sequência dos adaptadores, que foram excluídos da análise.....31
- Figura 10:** Resultado do Programa Sequence Manipulation Suite de um par de iniciadores que não pode ser utilizado, destacando nas setas vermelhas o auto-anelamento e a formação de hairpin no iniciador *Forward*, e o auto-anelamento no iniciador *Reverse*.....33

- Figura 11:** Eletroferogramas de sequências que contem SSR: **A)** SSR dinucleotídeo. **B)** SSR trinucleotídeo. **C)** SSR tetranucleotídeo. **D)** SSR perfeito. **E)** SSR composto. **F)** SSR interrompido.....34
- Figura 12:** Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN1** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)36
- Figura 13:** Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN2** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)36
- Figura 14:** Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN3** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)37
- Figura 15:** Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN5** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)37
- Figura 16:** Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN6** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)38
- Figura 17:** Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN11** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)38
- Figura 18:** Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN12** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)39
- Figura 19:** Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN13** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)39
- Figura 20:** Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN15** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)40
- Figura 21:** Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN16** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)40

Figura 22: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador PN17 com DNA genômico de <i>Pterogyne nitens</i> em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)	41
Figura 23: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador PN18 com DNA genômico de <i>Pterogyne nitens</i> em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)	41
Figura 24: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador PN19 com DNA genômico de <i>Pterogyne nitens</i> em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)	42
Figura 25: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador PN20 com DNA genômico de <i>Pterogyne nitens</i> em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)	42
Figura 26: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador PN21 com DNA genômico de <i>Pterogyne nitens</i> em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)	43
Figura 27: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador PN22 com DNA genômico de <i>Pterogyne nitens</i> em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)	43
Figura 28: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN1.	45
Figura 29: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN2.	45
Figura 30: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN3.	45
Figura 31: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN6.	46
Figura 32: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN11.	46
Figura 33: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN12.	46
Figura 34: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN13.	47

Figura 35: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN15.	47
Figura 36: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN16.	47
Figura 37: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN17. Seta verde: alelos principais. Seta vermelha: picos <i>sttuters</i> . Seta azul: picos <i>plus A</i>	48
Figura 38: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN19.	48
Figura 39: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN21.	48
Figura 40: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de <i>Pterogyne nitens</i> no loco PN22.	49

1 – INTRODUÇÃO

O amendoim-do-campo, *Pterogyne nitens* Tul., é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae. Apresenta ampla distribuição geográfica, rusticidade e rapidez de crescimento e sua dispersão ocorre por sementes (ITOMAN et al., 1992; LORENZI, 1992; SIQUEIRA e NOGUEIRA, 1992, CARVALHO, 1994). É conhecida pela sua madeira de moderada resistência, muito empregada na construção civil e mobiliária, e também pela sua beleza ornamental, sendo empregada na arborização de vias urbanas e rodovias (LORENZI, 1992). Possui importante papel ecológico, sendo indicada para a reposição de mata ciliar em locais com inundações periódicas e para o emprego em plantios mistos em áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1992, CARVALHO, 1994). Comunidades guaranis do nordeste da Argentina utilizam o córtex do caule no tratamento de infestações parasitárias, em especial da *Ascaris lumbricoides* (CRIVOS et al., 2007). Os alcalóides guanidínicos das folhas e caules de *P. nitens*, apresentam atividade citotóxica sobre linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que contêm mutações relacionadas ao descontrole de proliferação celular, sugerindo atividade antitumoral potencial desses alcalóides (BOLZANI et al., 1995). Estudos demonstram que princípios ativos (flavonóides) extraídos do caule de *P. nitens* podem ser responsáveis pelo efeito antiproliferativo de células cancerígenas de melanomas. O flavonóide quercetina possui inibidor de crescimento e atua em várias células tumorais malignas *in vitro*, como leucemia, câncer de estômago, colo do útero, mama e câncer ovariano (REGASINI et al., 2007).

A despeito da ampla ocorrência dessa espécie no Brasil, a exploração inadequada e a fragmentação florestal podem estar comprometendo a sobrevivência de várias populações naturais, tornando-as ameaçadas de extinção (SEBBENN et al., 1999). Assim, a variabilidade genética pode estar sendo perdida.

A fragmentação de habitats pode reduzir a diversidade genética de espécies através do “gargalo genético”. A deriva genética, a restrição do fluxo de pólen associados a intensa exploração podem aumentar o isolamento genético e a divergência. Para a definição de programas de manejo eficientes, fatores genéticos como perda de heterozigosidade, variação do índice de fixação e tamanho efetivo

populacional devem ser considerados em conjunto com os dados dendrométricos. Para estudos genéticos neste nível, os marcadores moleculares como os microssatélites tem sido intensamente utilizados, pois são ferramenta eficiente no estudo de estrutura genética de populações, fluxo gênico, paternidade, viabilidade populacional e na definição dos efeitos da fragmentação, sendo úteis na definição de estratégias de conservação (COLLEVATTI et al., 1999).

Polimorfismos baseados em sequências repetitivas de DNA, SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites são um dos mais informativos marcadores moleculares. São formados por sequências de uma a seis bases de comprimento repetidas em “tandem” (JACOB et al., 1991), sendo co-dominantes, multialélicos e encontrados em alta frequência e com ampla distribuição nos genomas de eucariotos (TÓTH et al., 2000). Apresentam o maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares (GOLDSTEIN & SCHLOTTERER, 2001).

O desenvolvimento de marcadores microssatélites tem se tornado popular devido a facilidade na obtenção e sua praticidade. Já foram desenvolvidos marcadores microssatélites para várias espécies arbóreas incluindo *Caryocar brasiliense* (COLLEVATTI et al., 1999), *Euterpes edulis* (GAIOTTO et al., 2000), *Copaifera langsdorffii* (CIAMPI et al., 2000), *Myracrodruon urundeuva* (CAETANO et al., 2005), *Hymenaea stigonocarpa* (CIAMPI et al., 2008). A construção da biblioteca genômica pode ser realizada por meio de vários protocolos de enriquecimento, sendo possível aplicar mais de um protocolo na mesma biblioteca.

Estudos que investigam a diversidade, estrutura genética e sistema de reprodução fornecem diretrizes para o uso racional dos recursos naturais, e para estratégias de conservação. Recentemente Paula (2007) realizou estudo sobre diversidade genética no que diz respeito a características de sementes e frutos de 45 árvores matrizes de *Pterogyne nitens* Tul. (amendoim-do-campo), localizadas na área urbana e rural do município de Jaboticabal-SP. A continuidade do estudo destes genótipos, em nível genético molecular, permitirá um melhor entendimento do sistema reprodutivo, da diversidade genética e da possível estruturação genético-espacial. A geração destes conhecimentos constitui-se em uma relevante forma de

contribuição para que sejam traçadas adequadas estratégias de conservação e melhoramento de populações naturais de *P. nitens*.

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar iniciadores SSR que detectam locos polimórficos para a espécie *P. nitens* e analisar a diversidade genética e o sistema de reprodução de duas gerações em duas populações distintas da referida espécie.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – A espécie *Pterogyne nitens* Tul.

Pterogyne nitens Tul., conhecida popularmente por amendoim-do-campo, *Pterogyne nitens* Tul., é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae-Leguminosae, de acordo com a classificação de APG III, é planta arbórea com folhas compostas pinadas, podendo atingir altura de 10 a 15 m e diâmetro à altura do peito (DAP) de 40 a 60 cm (LORENZI, 1992), entretanto alguns indivíduos podem atingir até 35 m de altura e DAP de 120 cm (CARVALHO, 1994).

Seu florescimento ocorre durante os meses de dezembro a março e a maturação dos frutos, entre os meses de maio a junho (Figura 1) (LORENZI, 1992), com dispersão anemocórica (SEBBENN et al., 1999). Em geral suas flores são bissexuais, porém mais comumente masculinas (CARVALHO, 1994). Há grandes probabilidades de que o seu sistema reprodutivo seja característico de planta alógama (NOGUEIRA, et al., 1986).

O amendoim-do-campo ocorre naturalmente no norte da Argentina, sul da Bolívia, noroeste do Paraguai e nos estados brasileiros de Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, e São Paulo (ITOMAN et al., 1992; LORENZI, 1992; SIQUEIRA; NOGUEIRA, 1992). No grupo sucessional a espécie é secundária inicial, comportando-se como pioneira em sítios arenosos e degradados. A espécie apresenta rusticidade e rapidez de crescimento e ocorre comumente em vegetação secundária como capoeiras, em altitudes de 120 a 920 m, em solos de baixa fertilidade natural e em solos calcários (LORENZI, 1992, CARVALHO, 1994).

Em função de suas características, *P. nitens* apresenta diversificadas aplicações, tanto no âmbito ecológico como no econômico. Assim, sua madeira por ser moderadamente pesada (densidade 0,77 g/cm³), dura e resistente ao apodrecimento, é própria para confecção de móveis finos, construção civil, como vigas, caibros, ripas, tacos e tábuas para assoalhos, confecção de carrocerias, interiores, embarcações, vagões, tonéis, barris e tanques (LORENZI, 1992). O

amendoim-do-campo possui também grande valor ornamental, dada à beleza e odor de suas flores, somada a intensidade de suas folhagens, sendo, portanto recomendada para arborização de vias urbanas e rodovias (LORENZI, 1992). É adequada para a reposição de mata ciliar em locais com inundações periódicas e também para emprego em plantios mistos em áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994).

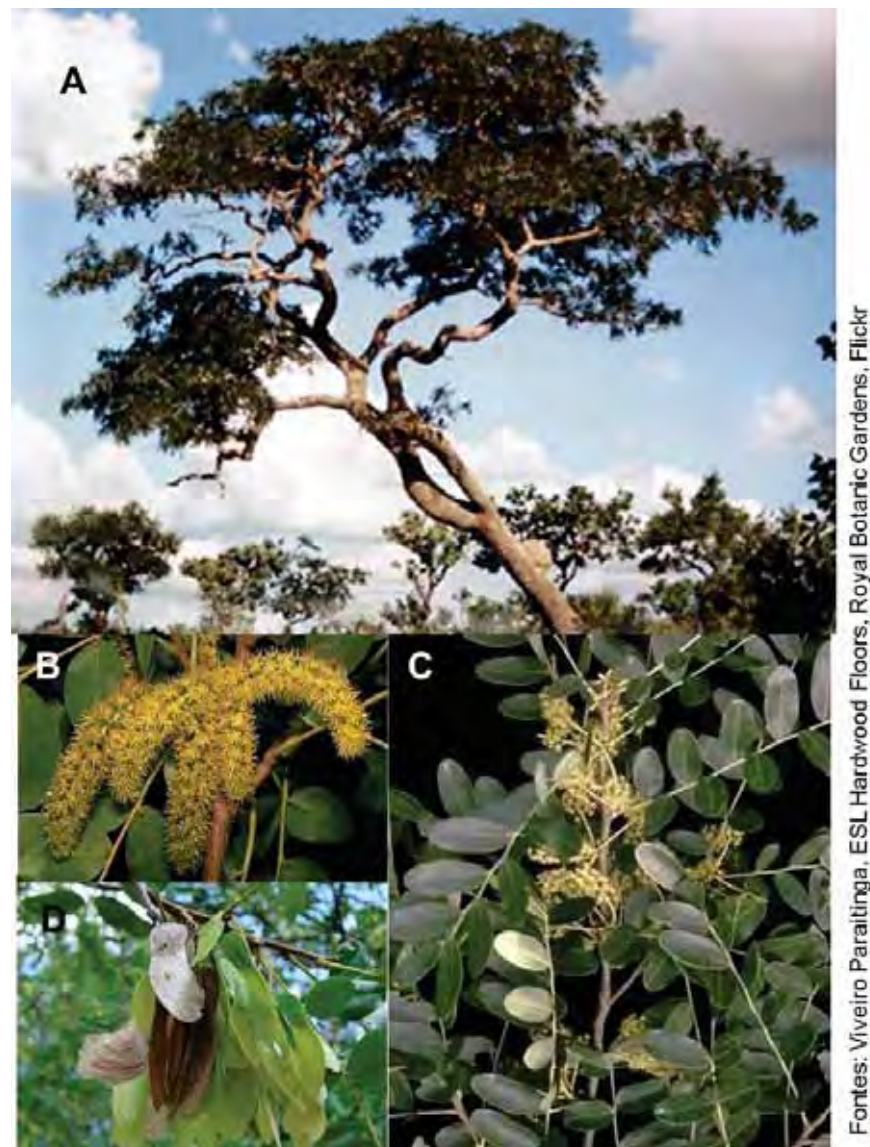


Figura 1: **A)** Árvore de *Pterogyne nitens*; **B)** Ramo com inflorescência; **C)** Ramo mostrando detalhes das folhas juntamente com a inflorescência; **D)** Detalhe das sementes verdes e maduras.

Na literatura encontram-se alguns estudos sobre compostos químicos produzidos por *P. nitens*, bem como as suas aplicações medicinais. Estudos etnofarmacológicos em comunidades guaranis do nordeste da Argentina revelam o uso das cascas do caule no tratamento de infestações parasitárias, principalmente no combate ao “tacho”, nome popular de *Ascaris lumbricoides* (CRIVOS et al., 2007). Em trabalhos fitoquímicos anteriores, foram isolados cinco alcalóides guanidínicos das folhas e caules de *P. nitens*, os quais mostraram atividade citotóxica sobre linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, que contêm mutações relacionadas ao descontrole de proliferação celular, sugerindo atividade antitumoral potencial desses alcalóides (BOLZANI et al., 1995). De acordo com Regasini et al. (2007) os flavonóides e/ou alcalóides guanidínicos extraídos do caule de *P. nitens* podem ser responsáveis pelo efeito antiproliferativo de células de melanoma. Em análises fitoquímicas foram extraídos dois tipos de flavonóides identificados como quercetina e isoquercetina. Este flavonóide, com propriedades antiproliferativas, ocorre amplamente na natureza. A quercetina possui inibidor de crescimento e atua em várias células tumorais malignas *in vitro*, como leucemia, câncer de estômago, colo do útero, mama e câncer ovariano. Assim *P. nitens* possui atividades antiproliferativas e pode ser fonte importante de agentes antitumorais, sendo útil para o desenvolvimento de novas drogas anti-neoplásicas, incluindo alcalóides guanidina e flavonóides. Em estudos químicos das flores de *P. nitens*, Regasini et al. (2008) isolaram onze substâncias de três classes químicas distintas: flavonóides (flavonóis, diidroflavonóis e catequinas), derivados do ácido cinâmico e alcalóides. Concluindo ainda que os metabólitos secundários acumulados nas flores desta espécie são predominantemente de natureza fenólica.

A despeito de toda a sua importância ecológica e econômica, *P. nitens* encontra-se em eminente risco de extinção devido à procura por sua madeira, (LORENZI, 1992), que foi empregada indiscriminadamente pela construção civil (CARVALHO, 1994). Assim, esta leguminosa pertencente a um gênero monoespecífico encontra-se seriamente ameaçada de extinção (CARVALHO, 1994).

2.2 – Consequências da fragmentação para os recursos florestais

A espécie *P. nitens* habita os remanescentes de vegetação paulista, atualmente bastante fragmentada, e é uma das espécies que se encontra sob risco de extinção, fazendo parte da lista de espécies recomendadas para a conservação genética no estado de São Paulo (ITOMAN et al. 1992, LORENZI, 1992, SIQUEIRA; NOGUEIRA, 1992).

Os fragmentos florestais são resultantes de diferentes histórias de perturbação da vegetação, nas quais interagiram, ao longo do tempo, fatores inúmeros e diversos (ARAGAKI, 1997). De acordo com VIANA (1990), um fragmento florestal é qualquer área de vegetação natural contínua, interrompida por barreiras antrópicas (estradas, cidades, culturas agrícolas, pastagens, etc.) ou naturais (montanhas, lagos, etc.), capazes de diminuir significativamente o fluxo de animais, pólen e/ou sementes. É, portanto, produto de uma ação natural ou antrópica.

As consequências da fragmentação florestal são: diminuição da diversidade biológica, redução da área de ecossistemas naturais, distúrbio no regime hidrológico das bacias hidrográficas, mudanças climáticas, erosão do solo, inundações e assoreamento das bacias hídricas, degradação dos recursos naturais, favorecimento ao estabelecimento de espécies invasoras e, ainda, mudanças nos fluxos químicos e físicos da paisagem, incluindo os movimentos de calor, vento, água e nutrientes (OLIVEIRA et al., 1997; VIANA, 1990; VIANA; TABANEZ; MARTINEZ, 1992; RODRIGUES, 1993; RODRIGUES; CAMARA; DIAS, 1995; ARAGAKI, 1997; SILVA, 1997; TABANEZ; VIANA; DIAS, 1997; ISHIHATA, 1999).

Com a fragmentação, ocorre imediata redução no número de indivíduos de cada espécie e do tamanho efetivo populacional. Como os indivíduos podem se tornar restritos a pequenos fragmentos, pode ocorrer isolamento espacial entre as populações remanescentes. Tais alterações refletem nos processos de deriva genética, fluxo gênico, seleção e no sistema de cruzamentos. Sendo esses processos determinantes do grau de diversidade genética na espécie, bem como sua distribuição entre os indivíduos e populações. Os principais efeitos genéticos da fragmentação florestal são a diminuição da diversidade genética nas populações e espécies, a mudança na estrutura genética populacional e o aumento da endogamia,

que acarretam fortes prejuízos as populações e espécies florestais (YOUNG; BOYLE, 2001; PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A exploração predatória de espécies arbóreas, nas florestas tropicais, pode afetar a estrutura genética das populações e, como conseqüências, trazer a perda de alelos raros, a redução da heterozigosidade e o aumento da endogamia. A perda de alelos leva à redução na capacidade das espécies de responder a adversidades ambientais em gerações futuras; pode ocorrer redução na adaptabilidade das espécies (YOUNG et al., 1996).

A caracterização dos graus de variabilidade e estrutura genética e o conhecimento da movimentação de alelos proporcionam as bases necessárias da execução de estratégias, para maximizar a eficiência dos programas de manejo e conservação genética (RAPOSO et al., 2007). O estudo da estrutura genética de populações naturais ou, em outras palavras, da distribuição da variação genética entre e dentro de populações de uma espécie, é de fundamental importância para delimitar as estratégias ótimas para a conservação, manejo e melhoramento de organismos. É também fundamental o conhecimento do seu sistema reprodutivo, visto que determina como os genes são recombinados e mantidos pela espécie para a perpetuação de sua variabilidade genética natural, base do seu contínuo potencial evolutivo (SEBBENN et al., 1999).

A variação entre populações dentro de espécies florestais surge da adaptação das espécies às condições edafoclimáticas distintas, podendo-se esperar que as populações que ocorrem em diferentes condições ecológicas tenham diferentes características adaptativas. Embora as populações estejam classificadas como pertencentes a mesma espécie, geralmente variam na sua constituição genética, em função de sua adaptação a diferentes habitats (KAGEYAMA, 1987). Todavia, estas diferenças podem ser minimizadas pelo fluxo gênico entre populações. Tendo em vista que até o início do século XIX, as florestas nativas na maioria das regiões brasileiras eram contínuas, favorecendo a intensa troca gênica entre populações, possivelmente as populações florestais remanescentes, apesar de atualmente reduzidas e fragmentadas, apresentem ainda muitos genes em comum, não sendo, portanto, geneticamente tão divergentes. Espera-se que esta divergência

entre populações seja tanto maior quanto for a distância entre populações, devido a limitações na dispersão do pólen e sementes (SEBBENN et al., 1999).

Em estudo com 36 famílias de *P. nitens* de polinização livre, procedentes de quatro populações naturais, Sebbenn et al. (1999) verificaram ocorrência de baixa divergência genética entre as populações, o que segundo os autores, sugere que no passado existiu intenso fluxo gênico entre elas, levando as distintas populações a compartilharem genes em comum. Todavia, no futuro, devido ao efeito da fragmentação dessas populações estudadas e a característica de raridade da espécie, (fatores que levam à redução no tamanho efetivo), possivelmente essas venham a sofrer efeitos de seleção e deriva genética que, por sua vez, poderão aumentar a divergência entre elas e até levar à especiação e/ou à extinção de algumas populações ou ainda, infelizmente, da espécie.

Recentemente, Paula (2007) com intuito de determinar a divergência genética para caracteres biométricos de frutos e sementes, e parâmetros da qualidade fisiológica de sementes entre matrizes de *P. nitens* nativo e cultivado em Jaboticabal-SP, encontrou considerável divergência genética entre as matrizes estudadas.

Estudos da estrutura genética de populações naturais, a partir de marcadores moleculares, têm revelado baixa divergência genética entre populações, mostrando que a maior parte da variabilidade encontra-se dentro das populações. Dentre estes estudos pode-se citar os realizados por Reis (1996) para *Euterpes edulis*, Viegas (2009) para *Myracrodruon urundeuva* e Ferreira et al. (2012) para *Elaeis guineensis*.

2.3 – Contribuições de estudos genéticos moleculares para espécies arbóreas

Os marcadores moleculares constituem-se em uma ferramenta auxiliar na geração de subsídios para programas de conservação e de melhoramento genético de espécies arbóreas, uma vez que a partir deles é possível estimar a diversidade genética, nível de parentesco, estimativa de tamanho efetivo, estruturação genética, fluxo de pólen, paternidade entre outros (SEBBENN; ETTORI, 2001). Assim,

informações quanto ao grau de organização e dinâmica da variabilidade genética em populações de uma espécie são fundamentais para se delinearem estratégias eficientes de conservação e para a definição de estratégias de manejo sustentável. Entretanto, estudos desta natureza, para espécies arbóreas tropicais, ainda são em número inferior ao desejável (DAYANANDAN et al., 1999; COLLEVATTI et al., 2001; CAVERS et al., 2003; LEMES et al., 2003; CLOUTIER et al., 2007; SILVA et al., 2008).

Dentre os marcadores genético moleculares, os que fornecem uma maior riqueza de informação são os de caráter co-dominante, onde é possível discriminar-se genótipos homocigotos de heterocigotos (BARREIRA et al., 2006).

Poucos marcadores moleculares possuem um uso tão difundido como os microssatélites, ou SSR – *Simple Sequence Repeats* (TAUTZ, 1989) que são um dos tipos mais variáveis de sequências de DNA no genoma e de ampla distribuição no genoma, o que justifica a grande utilidade deste marcador. Sua crescente utilização deve-se ao fato de serem co-dominantes, multialélicos, altamente reproduzíveis, polimórficos, têm grande resolução e estão baseados em PCR (OLIVEIRA et al., 2006). Assim, os SSRs são sequências formadas por um motivo de uma única sequência de até seis bases repetidas *in tandem* sem interrupção por outra base ou motivo (GOLDSTEIN; SCHLOTTERER, 2001), entretanto também podem ser classificados como imperfeitos, quando possuem um ou mais nucleotídeos interferindo na ordem das repetições, e finalmente classificados como compostos, quando possuem dois conjuntos de repetições unidos (WEBER; MAY, 1989).

A obtenção e a análise de dados discretos a partir de marcadores moleculares, com base em polimorfismo de DNA, como é o caso dos SSR, têm se tornado uma forma eficiente de gerar informações para um grande número de indivíduos, populações e espécies. A evolução e a disponibilização de técnicas de biologia molecular têm contribuído significativamente para as investigações, cada vez mais detalhadas, da diversidade genética (AZEVEDO et al., 2008).

Embora seja inquestionável a eficiência da aplicação dos marcadores SSR nos estudos genéticos e nos programas de conservação e de melhoramento de

espécies florestais, o custo de desenvolvimento destes marcadores ainda é alto (ARENS et al., 2004).

Os microssatélites de dinucleotídeos são os mais frequentes e os mais polimórficos, seguidos pelos de tri e tetranucleotídeos. Em virtude da alta taxa de polimorfismo, observa-se que a maioria dos trabalhos de desenvolvimento de marcadores microssatélites é realizada para sequências de dinucleotídeos. Entretanto, a genotipagem de indivíduos utilizando marcadores deste tipo é mais delicada e portanto, é preferível que seja realizada em equipamentos de alta resolução e precisão, como os analisadores automáticos de fragmentos que utilizam fluorescência, sendo capazes de realizar uma discriminação precisa ao nível de uma unidade de base nitrogenada (AZEVEDO, 2007).

É possível obter sequências de SSR de várias formas, como busca em bancos de sequências, transferibilidade entre espécies correlatas e desenvolvimento a partir de uma série de diferentes protocolos descritos por Zane et al. (2002).

Os métodos mais utilizados são aqueles que envolvem construções de bibliotecas genômicas. Dois métodos são descritos por Ostrander et al. (1992) e por Paetkau (1999), sendo o último semelhante ao descrito por Rafalsky et al. (1996). Esses métodos têm por objetivo construir bibliotecas genômicas enriquecidas para sequências SSR e se diferenciam no fato em que no protocolo de Paetkau (1999) alguns passos adicionais estão presentes, os quais utilizam contas magnéticas ligadas à oligonucleotídeos de sequências repetitiva para a recuperação dos fragmentos contendo SSR. O isolamento de sequências SSR por hibridização seletiva também é uma técnica muito eficaz e comumente utilizada em associação com a construção de biblioteca genômica enriquecida, que apesar de ser um procedimento trabalhoso, apresenta resultados satisfatórios (AZEVEDO, 2007).

O trabalho em questão utilizou o método de construção de biblioteca genômica enriquecida utilizando contas magnéticas ligadas à Bio-oligos associado à hibridização seletiva de clones.

Os marcadores moleculares que serão desenvolvidos funcionarão como ferramenta auxiliar no conhecimento genético da espécie *Pterogyne nitens*, permitindo entre outros, avaliações da adequação da base genética das populações para utilização em futuros programas de melhoramento.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

As análises moleculares foram conduzidas no Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas – LBMP, no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária de Jaboticabal, FCAV-UNESP.

3.1 - Material

Duas populações de *P. nitens* foram estudadas para fins de análise da diversidade da espécie, podendo comparar o nível de diversidade e as consequências da fragmentação florestal para as duas populações. As matrizes da população de Jaboticabal-SP (Pop. JB) estão localizadas em diferentes bairros dentro da cidade, fazendo parte atualmente da arborização urbana (Figura 2), árvores estas, conservadas pela população após o desmatamento para crescimento urbano. A outra população está localizada às margens da Rodovia SP-563, no município de Pereira Barreto-SP (Pop. PB), em um remanescente de mata ciliar localizada às margens do rio Tietê (Figura 3).



Figura 2: Mapa da cidade de Jaboticabal com a localização aproximada das matrizes da Pop. JB de *Pterogyne nitens*.

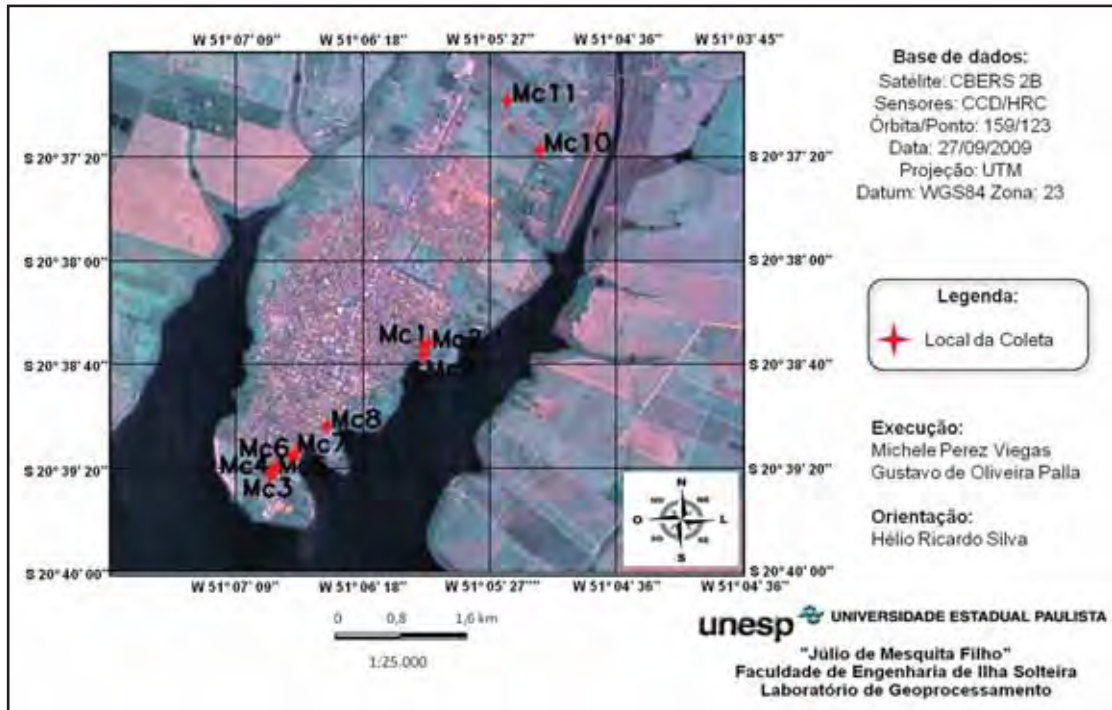


Figura 3: Imagem de satélite da distribuição espacial de matrizes de *Pterogyne nitens* no município de Pereira Barreto-SP. As marcações Mc1 a Mc10 são referentes aos números das matrizes de 1 a 10, respectivamente.

Amostras foliares das matrizes foram coletadas e armazenadas em freezer para posterior extração de DNA. Em cada população estudada, foram coletadas sementes de 10 matrizes visando a produção de mudas das progênies. De cada matriz foram produzidas 30 progênies, com um total de 300 progênies por população.

3.2- Métodos

3.2.1 – Produção de mudas de *Pterogyne nitens*

As sementes foram coletadas entre os meses de novembro de 2009 e janeiro 2010. O armazenamento das sementes foi em sacos de papel até o período de germinação. Foi feita a retirada da semente do fruto, para que em seguida fosse realizada a quebra de dormência de forma mecânica, com o auxílio de uma lixa de madeira numero 100. Após a escarificação mecânica as sementes foram embebidas

em água por 24 horas. Durante este período todos os lotes de sementes foram devidamente separados e identificados de acordo com a numeração das matrizes referentes a cada população.

Após o período de 24 horas em água as sementes foram transplantadas em tubetes, contendo substrato expandido, vermiculita, e mantidas em casa de vegetação. Durante os sete primeiros dias foi necessário irrigar o substrato duas vezes ao dia. Após o 8º dia apenas uma vez ao dia a planta recebia água. Com 20 dias, os cotilédones já eram evidentes e com 60 dias, quando as plantas já estavam com altura de 15 a 20 centímetros e com cerca de 5 a 6 folhas, foi realizada a coleta de amostras foliares, as quais foram armazenadas em sacos de papel, devidamente identificadas e imediatamente colocados em um saco plástico contendo sílica gel para secagem uniforme, visando posterior extração de DNA.

3.2.2- Extração e Quantificação do DNA Genômico Total de *Pterogyne nitens*

Para extração do DNA total, foi utilizado tecido foliar de *P. nitens* previamente armazenados em sílica gel. A extração foi feita de acordo com o protocolo proposto por Ferreira e Grattapaglia (1998) com algumas modificações, utilizando 100mg de amostra por tubo para extração do DNA genômico total. Para o rompimento das paredes e membranas celulares do tecido, foi usado nitrogênio líquido e um bastão de vidro. Ao tecido macerado foram adicionados 750 µL de tampão de extração (CTAB 2%; 1,4M NaCl; 20mM EDTA; 100mM Tris-HCl; 1% Polyvinylpyrrolidone; 0,2% β-Mercaptoetanol), e incubado por 90 minutos a 65°C em banho-maria, agitando a cada 10 minutos. Um processo de extração orgânica foi realizado utilizando 450 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados e centrifugados a 12000 xg por 10 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e adicionados 20 µL RNase (110µg/ml) e mantidos em banho-maria a 37°C por 2 horas, para eliminação de RNA. Os ácidos nucléicos foram precipitados com a adição de 400 µL de isopropanol absoluto e incubados a -20°C por 2 horas. Os tubos foram centrifugados a 12000 xg por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado duas vezes com etanol 70% por 5

minutos e uma lavagem com etanol absoluto. Após o descarte do sobrenadante os pellets foram secos em fluxo laminar e ressuspendido em 30 μ L TE (10mM Tris-HCl pH8,0; 1mM EDTA).

Para a verificação da qualidade e integridade do DNA genômico extraído, empregou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose 0,8%, em TEB 1X (Tris 28 mM, Ácido Bórico 88 mM, EDTA 7 mM, pH 8,3) contendo brometo de etídio (5 μ g/mL). No preparo das amostras de DNA para a eletroforese foram utilizados 3 μ L DNA e 2 μ L de tampão de carregamento de amostra (1g glicerol; 1,5ml água destilada, 230 μ L azul bromofenol). A corrida foi realizada por 1 hora sob tensão constante de 80 V.

A visualização do DNA foi realizada sob luz UV e a imagem foi documentada em fotodocumentador (BIO RAD – GEL DOC 1000), através do software QuantityOne^R (BIO RADTM, HERCULES, CA, USA). O DNA obtido também foi analisado em espectrofotômetro NanoDrop ND-100 para a determinação da concentração e pureza da amostra. A verificação de sua pureza foi avaliada por meio da relação de OD 260nm/280nm e 260nm/230nm.

3.2.3 – Construção da Biblioteca Genômica Enriquecida

Iniciou-se a construção de biblioteca genômica enriquecida para microssatélite, utilizando o protocolo descrito por Rafalski et al. (1996), com algumas modificações, conforme os passos a seguir:

3.2.3.1 – Restrição do DNA

Para início da construção da biblioteca genômica enriquecida foi feito um pool de DNA de vários indivíduos de *P. nitens*, incluindo indivíduos adultos e progênies das duas populações, e um volume de 33 μ g do DNA genômico foi digerido com 20U de Sau3AI - Promega (2 μ L de enzima a 10U/ μ L) em 2x de tampão B (16 μ L a 10x) para um volume final de 20 μ L de reação. Esta enzima de restrição (Sau3AI) possui o sítio de restrição 5' GATC 3' E 3' CTAG 5'. A reação foi realizada a 37°C por 16 horas e inativada a 65°C por 15 minutos. Após a restrição, 2 μ L da reação foi quantificado em gel de agarose Low Melting 2% para confirmar a restrição

do DNA. Os 18 μL restantes foram usados para a ligação dos adaptadores às extremidades dos fragmentos de DNA. Toda esta etapa foi realizada em duplicata para posteriormente serem usadas com as sondas TC_{13} e AC_{13} .

3.2.3.2 – Ligação do DNA aos adaptadores

Cerca de 10 μg dos fragmentos de DNA foram ligados a 200 μmol de adaptadores do sítio de restrição *Short* (5' CAGCCTAGAGCCGAATTCACC 3') e *Long* (5' GATCGGTGAATTCGGCTCTAGGCTG 3') numa reação com 1x tampão de T4 Ligase, 4U de T4 ligase (1U/ μL), para um volume final de 50 μL de reação. A reação foi incubada a 20°C por 2 horas de acordo com instruções do fabricante da enzima. A reação de ligação dos adaptadores foi realizada em duplicata, pois na etapa seguinte foram usadas duas sondas diferentes, a TC_{13} e a AC_{13} , e para todas as sondas foi necessária uma reação de ligação dos adaptadores.

3.2.3.3 – Preparo das contas magnéticas para hibridização ao DNA

Para hibridização foram usados 100 μL de contas magnéticas (*StreptavidinMagne Sphere® Paramagnetic Particles*– Promega), sendo descartado o líquido, segurando as “beads” na parede do tubo com o auxílio de um ímã, e lavadas 1X com 400 μL de SSC 0,5x. O líquido foi descartado após a lavagem e realizado uma nova lavagem com 400 μL BEW 1x. As contas magnéticas foram ressuspensas em 200 μL BEW 2x, 170 μL de água estéril, homogeneizados e adicionado 3 μL da sonda biotinizada a 100mM. Esse material foi levado em “shaker” sob agitação constante a temperatura ambiente por 1 hora intercalando com agitações em vórtex rapidamente. Após esse período as beads + oligos foram lavadas 2x com 400 μL de BEW 1x e uma lavagem com 400 μL de SSC 5x +0,1% SDS. Ressuspendido em 150 μL de SSC 10x + 0,2% SDS pré-aquecido a 65°C. Incubou-se a 65°C por 15 minutos e armazenou-se a 4°C. O complexo DNA + adaptadores foi desnaturado a 95°C por 15 minutos. Enquanto isso, sete tubos foram preparados para as lavagens da solução, que tiveram a finalidade de retirar excessos de reagentes como contas, biotina e oligos que não formaram complexos.

No primeiro tubo, que foi utilizado como controle, foi adicionado 1 μL de DNA + adaptadores em 999 μL de água ultrapura estéril. À solução DNA + adaptadores foi adicionado ao complexo beads + oligos e incubado a 65°C por 90 minutos agitando a cada 10 minutos. Após a hibridização precipitou-se e armazenou-se o sobrenadante no tubo 2, novamente o complexo foi lavado duas vezes, por 5 minutos e duas vezes por 15 minutos com 400 μL de SSC 2x + 0,1% SDS. Cada sobrenadante foi reservado em tubos numerados de três a seis. Ao final das lavagens o complexo foi ressuscitado em 200 μL de água estéril ultrapura. Todo o processo de lavagem das contas magnéticas foi realizado em duplicata, pois em cada tubo foi adicionado uma sonda, a TC₁₃ e a AC₁₃.

3.2.3.4 – Amplificação via PCR para controle do enriquecimento da biblioteca

A reação de PCR foi realizada com todos os materiais reservados durante a lavagem das beads, com o objetivo de avaliar o enriquecimento e determinar se houve perda de DNA durante o processo. Para isso foram utilizados 3 μL de amostra reservada, tampão PCR 1x (10x, 50mM KCl; 10mM Tris-HCl), 1,4mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 1mM de iniciador complementar a sequência dos adaptadores, 2,5U de Taq DNA Polimerase e água ultrapura estéril para um volume final de 25 μL . O programa de amplificação via PCR foi ajustado no termociclador para: 95°C por 3 minutos, seguidos de 25 ciclos a 94°C por 45 segundos, 56°C por 45 segundos, 72°C por 2 minutos, e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

3.2.3.5 – Ligação do DNA ao vetor de Clonagem e transformação em células competentes

Após a amplificação, 2 μL do produto de PCR (75ng/ μL) foram adicionados a 10 μL de tampão 2X, 1 μL de DNA Bluting do kit “CloneJET PCR Cloning” (*Fermentas*) e 5 μL de água ultrapura estéril. Esta reação foi incubada a 70°C por 5 minutos e em seguida mantida em gelo e adicionado 1 μL de enzima T4 Ligase do kit e 1 μL pJET1.2/blut Cloning Vector (50ng/ μL). Esta nova reação foi incubada em

temperatura ambiente por 30 minutos. Com isto, os fragmentos amplificados via PCR foram ligados a um vetor de clonagem, para a transformação em células DH10B competentes. Para a transformação, 10 µL da reação de ligação foram mantidas em gelo por dois minutos e adicionados 100 µL de células competentes. A reação de transformação foi armazenada em gelo por 5 minutos e imediatamente transferida para placas contendo meio LB sólido com ampicilina (100µg/mL), em cada placa foi distribuído 20 µL de reação. As placas foram incubadas invertidas em estufa BOD a 37°C por 12 horas para o crescimento das colônias.

3.2.3.6 – Manutenção, seleção e extração de DNA dos clones

Para obter resultados satisfatórios na construção (vetor + fragmento) foram utilizadas placas do tipo ELISA de 96 poços, contendo em cada poço 1000 µL de meio de cultura LB líquido suplementado com 50mg/mL de ampicilina. As colônias contendo as sequências de DNA de *P. nitens* foram transferidas para as placas do tipo ELISA com o auxílio de palitos de madeira estéreis e as placas incubadas a 37°C em shaker a 250 rpm por 18 horas para o crescimento das colônias. Após este período, uma alíquota de 120 µL de solução de clones foi transferida para placas estéreis de cultura de células de 96 poços, contendo 120 µL de glicerol 40% e imediatamente armazenados em freezer -80°C, como estoque. Com o material restante, foi realizado a extração de DNA dos clones de acordo com o protocolo de Sambrook, et al. 2001, com algumas modificações. Iniciou-se com a centrifugação das placas durante 10 minutos, 10°C, a 2254 xg, descartando o sobrenadante e vertendo a placa em papel absorvente. Foram adicionados 240 µL de solução GET [(Glicose 50mM; Tris-HCl 25mM (pH 8); EDTA 10mM)] em cada poço e agitado em vórtex vigorosamente. Centrifugou-se novamente nas mesmas condições anteriores. A cada poço foi adicionado 60 µL de GET com RNase 10µg/mL, ressuspenso por agitação e mantendo em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 120 µL de solução de lise (NaOH 0,2N; SDS 1%), agitado suavemente e mantido em bancada por 5 minutos. Foram adicionados 90 µL de acetato de potássio 3M pH 5,2, agitado e armazenado em freezer a -80°C por 5 minutos para precipitação do DNA. Logo o material foi descongelado por 10 minutos em

temperatura ambiente, centrifugado durante 20 minutos, 10°C, a 2254 xg. O volume de 250 µL e sobrenadante foi transferido para uma placa de fundo “U”, centrifugado por 20 minutos, a 10°C a uma velocidade de 2254 xg. Foram transferidos para outra placa 160 µL de sobrenadante e acrescentado 16 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 110 µL de isopropanol gelado. As placas foram seladas com adesivo e armazenadas durante 30 minutos em freezer -80°C, logo depois a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 4°C na velocidade de 2254 xg. O sobrenadante foi descartado e o DNA lavado com 240 µL de etanol 70%, centrifugado por 5 minutos, 4°C a 2254 xg. O DNA foi seco no speedvac por 10 minutos a 45°C e ressuscitado em 40 µL de água estéril ultrapura. A quantificação foi realizada em gel de agarose a 1% e em nanodrop, sendo diluídos a uma concentração final de 120 ng/µL para posterior utilização na reação de sequenciamento.

3.2.3.7 – Reação de Seqüenciamento dos Clones

O sequenciamento dos fragmentos de DNA clonado foi realizado em microplacas nas seguintes condições: 3 µL tampão 5X (400mM Tris-HCl pH 9; 10mM MgCl₂), 1 µL iniciador pJET1.2 (10µM) *Forward* ou *Reverse* (Fermentas), 1,5 µL DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing kit (GE), 120ng DNA e água estéril ultrapura para um volume final de 8 µL. O programa de amplificação utilizado foi 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos. Para eliminar possíveis interferentes ou excessos de reagentes da reação de sequenciamento e deixar as amostras prontas para serem sequenciadas, as mesmas foram purificadas com 80 µL de isopropanol 75%, e agitada em vórtex por alguns segundos. Após 15 minutos em repouso à temperatura ambiente as placas foram centrifugadas por 45 minutos a 15°C, a 2254 xg, descartando o sobrenadante e mantendo as placas vertidas em papel absorvente por alguns segundos. Em seguida foi adicionado 180 µL de etanol 70%, centrifugado por 5 minutos a 15°C, a 2254 xg. O sobrenadante foi descartado e as placas secas no equipamento Speedvac durante 15 minutos a 30°C. Para aplicação em seqüenciador, as amostras foram ressuscitadas em 9 µL de Hi-Di Formamide (ABI PRISM) e desnaturadas

por 5 minutos a 95°C. O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático ABI PRISM modelo 3100.

3.2.3.8 – Análise das seqüências e desenho dos iniciadores

Após o sequenciamento, os eletroferogramas foram analisados com o auxílio do programa Phred/Phrap (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998) usado na determinação da confiabilidade de cada base sequenciada e formação dos *contigs*, respectivamente, assim como o reconhecimento e a exclusão da seqüência do vetor usado na construção da biblioteca. Posteriormente os microsatélites foram identificados visualmente e as seqüências *fasta* foram submetidas ao programa *Iniciador3* (<http://frodo.wi.mit.edu/iniciador3/>) (ROZEN; SKALETSKY, 2000), para que fosse possível realizar o desenho dos iniciadores, sendo excluídas nesta etapa as seqüências dos adaptadores *Short* e *Long*. Os critérios adotados para o desenhos dos iniciadores foram: apenas seqüências de boa qualidade, para garantir um alto padrão de complementaridade entre os iniciadores; tamanho dos iniciadores entre 18 e 26 pares de bases; conteúdo de G e C entre 40 e 60%; temperatura de *melting* (Tm) entre 55°C e 72°C; evitando pares de iniciadores com diferença de temperatura de *melting* superior a 3°C; iniciadores com diferença de conteúdo genético de G e C inferior a 5%. Após o desenho dos iniciadores seguindo todos os critérios descritos, os pares de iniciadores foram inseridos no programa SMS – Sequence Manipulation Suite (STOTHARD, 2000), a fim de analisar a formação de estruturas secundárias como, autoanelamento e *hairpin*.

3.2.3.9 – Síntese de Oligonucleotídeos e otimização das condições de PCR para amplificação dos locos SSR

Os oligonucleotídeos foram sintetizados e marcados na extensão *Forward* com o fluoróforo FAM, para posterior análise por eletroforese capilar para detecção dos alelos por fluorescência, em sequenciador automático de fragmentos ABI Prism 3100 (Applied Biosystem). Optou-se apenas pela marcação FAM devido ao menor custo do fluoróforo.

Com o intuito de identificar a temperatura ideal de pareamento dos iniciadores SSR, uma amostra de DNA foi escolhida aleatoriamente e empregada nas reações de PCR-SSR. Assim, a reação foi conduzida nas seguintes condições: 10µL de reação contendo 10ng DNA genômico, 6 µL Go Taq Master Mix Colorless (Promega), 1,2mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada iniciador (*forward* e *reverse*) e água estéril ultrapura. Para amplificação dos alelos o programa utilizado foi o seguinte: um ciclo de 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, temperatura de pareamento por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e um ciclo final de 72°C por 5 minutos. Para cada iniciador, foram testadas 12 temperaturas de pareamento, sendo elas: 55°C, 55,2°C, 55,7°C, 56,6°C, 57,8°C, 59,1°C, 60,5°C, 61,8°C, 63,1°C, 64,2°C, 65°C e 65,5°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, em TEB 1X.

3.2.3.10 – Amplificação dos locos SSR para genotipagem em sequenciador

A reação geral de amplificação consistiu em um volume de 6 µL de reação contendo 10ng DNA genômico, 3 µL Go Taq Master Mix Colorless (Promega), 1,2mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada iniciador (*forward* e *reverse*) e água estéril ultrapura. As condições de amplificação foram: um ciclo de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 60 segundos, temperatura de pareamento por 90 segundos, 72°C por 60 segundos, e um ciclo final de 72°C por 7 minutos.

Os alelos das amostras testadas foram separados por eletroforese de capilar em sequenciador ABI Prism 3100 (Applied Biosystem).

3.2.3.11 – Preparo das PCRs para genotipagem

Os produtos de amplificação foram diluídos de 1 a 10 vezes em água estéril autoclavada para permitir que o sinal de fluorescência fosse adequado a sensibilidade do equipamento. Após as diluições uma reação contendo 1 µL do amplificado, 0,37 µL de padrão de tamanho molecular *GeneScan 500 Rox™ Size Standard* (Applied Biosystems), 8 µL formamida *Hi-Di*, foi montada para

posteriormente ser analisada em sequenciador. Esta reação foi desnaturada a 95°C por 5 minutos e então submetida a eletroforese de capilar.

3.3 – Análise dos dados

3.3.1– Diversidade genética

A diversidade genética de cada população foi estimada agrupando todas as progênes. O número total de alelos (\hat{A}_t), o número médio de alelos (\hat{A}), a heterozigosidade observada (\hat{H}_o) e a esperada (\hat{H}_e) em Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados para locos e média entre locos.

Os parâmetros de diversidade genética intrapopulacional foram estimados com o uso do programa GDA (LEWIS & ZAYKIN, 2006): número médio de alelos por loco (\hat{A}), heterozigosidade esperada (\hat{H}_e) em equilíbrio de Hardy-Weinberg, heterozigosidade observada (\hat{H}_o).

A máxima diversidade possível, em cada loco, de cada população, foi calculada a partir do número de alelos observados, em que: $H_{máx}^{\hat{}} = (\hat{A} - 1)/\hat{A}$. O número efetivo de alelos por loco (\hat{A}_e) foi calculado a partir de $\hat{A}_e = 1/(1 - \hat{H}_e)$. A taxa de cruzamento aparente (\hat{t}_a) foi estimada conforme Weir (1996) e Vencovsky (1994), em que $\hat{t}_a = (1 - \hat{f})/(1 + \hat{f})$, onde o índice de fixação de Wright (\hat{f}) foi estimado por $\hat{f} = 1 - \hat{H}_o/\hat{H}_e$. O tamanho populacional efetivo (\hat{N}_e) foi estimado de acordo com Vencovsky; Crossa (2003), onde $\hat{N}_e = n/(1 - \hat{f})$, em que n é o número de indivíduos analisados. Foi verificada a representatividade genética (\hat{N}_e/n) das amostras.

3.3.2 – Sistema Reprodutivo

O sistema de reprodução foi analisado com base nos modelos de reprodução mista (RITLAND; JAIN, 1981) e cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1989) utilizando o programa “MLTR – *Multilocus Mating System Program*” (RITLAND, 2002), usando o método de máxima verossimilhança (Algoritmo Newton-Rapson). Os parâmetros estimados foram: taxa populacional de cruzamento multiloco (\hat{t}_m), taxa populacional de cruzamento uniloco (\hat{t}_s), taxa de cruzamento entre aparentados ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$), correlação multiloco de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$), correlação uniloco de paternidade ($\hat{r}_{p(s)}$), onde se derivam a proporção de irmãos completos ($\hat{r}_{p(s)} \hat{t}_m$) e meios irmãos [$\hat{t}_m (1 - \hat{r}_{p(s)})$]. Para estimar o erro padrão da taxa de cruzamento multiloco e uniloco, para as populações, foi utilizado o método de *bootstrap*, onde a unidade de amostragem eram plantas dentro de famílias, sendo utilizadas 1000 reamostragens.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Restrição do DNA e ligação do DNA aos adaptadores

A digestão do DNA genômico ocorreu com eficácia, resultando em fragmentos de tamanhos acima de 250pb, com melhor restrição entre 500 a 1000pb, em comparação com o *Ladder* 100pb (Figura 4).

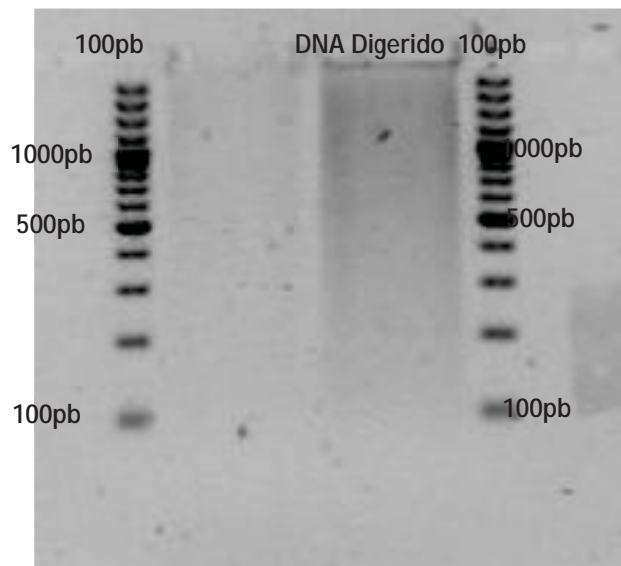


Figura 4: Reação de Restrição da enzima SAU3AI no DNA de *Pterogyne nitens*.

No gel foi aplicado apenas 2 μ L de reação, apenas para verificar a eficiência da restrição. O restante da reação foi utilizado diretamente na ligação dos adaptadores, excluindo assim a necessidade de eluição dos fragmentos de DNA do gel.

A ligação dos adaptadores *Short* e *Long* aos fragmentos digeridos foi necessária para garantir que todos os fragmentos de DNA tivessem uma terminação comum conhecida, que possibilite a pré-seleção de sequências com microssatélite.

4.2 – Preparo das contas magnéticas para hibridização ao DNA e amplificação via PCR para controle do enriquecimento da biblioteca

A lavagem das contas magnéticas mostrou resultados satisfatórios a partir do momento em que o tampão SSPE (NaCl/ EDTA/ NaH_2PO_4) foi substituído pelo

tampão SSC (NaCl 3M/ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 0,3M). Desta forma foi possível obter a hibridização das sondas biotinizadas, TC_{13} e AC_{13} aos fragmentos de DNA de *P. nitens*. Este resultado foi confirmado através da reação de PCR que mostra as ampliações que ocorreram no DNA ligado ao adaptador (canaletas 1), assim como no DNA ligado as beads (canaletas 7), mostrando também que não houve perda de DNA durante as lavagens das contas magnéticas, o que é confirmado pela ausência de amplificação, como é possível observar nas canaletas de 2 a 6 (Figura 5).

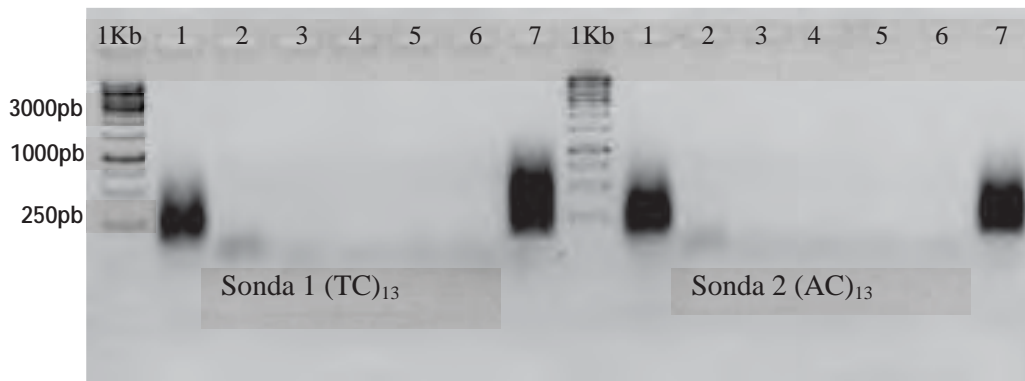


Figura 5: Perfil eletroforético em gel de agarose da reação de PCR para verificação do enriquecimento da biblioteca. A numeração corresponde a 1: DNA/adaptador, 2: Solução de Hibridização, 3: 1ª lavagem, 4: 2ª lavagem, 5: 3ª lavagem, 6: 4ª lavagem, 7: DNA adsorvido as beads.

4.3 – Transformação em células competentes

Obteve-se sucesso na transformação de células competentes de *E. coli* DH10B com os plasmídios recombinantes contendo os fragmentos de DNA. Um total de 960 colônias foram obtidos, com maior eficiência para a transformação contendo os fragmentos de DNA capturados com a sonda TC_{13} .

4.4 – Extração e Quantificação do DNA clonado

Após a coleta das colônias contendo as sequências de DNA de *P. nitens*, obteve-se um total de 960 clones, sendo 288 clones contendo supostamente sequências SSR enriquecidas pela utilização da sonda AC_{13} utilizada na hibridização

ao DNA, e 672 clones contendo supostamente sequências SSR enriquecidas pela utilização da sonda TC₁₃ que também foi hibridizada ao DNA de *P. nitens*.

A integridade do DNA clonado foi verificada nos perfis eletroforéticos (Figuras 6 e 7). As bandas do DNA apresentaram-se muito bem definidas, sem a presença de *smears*, portanto sem quebras de moléculas. Nenhuma contaminação de RNA foi verificada, podendo ser comprovada nas figuras 6 e 7 pela inexistência de bandas de RNA ribossômico.

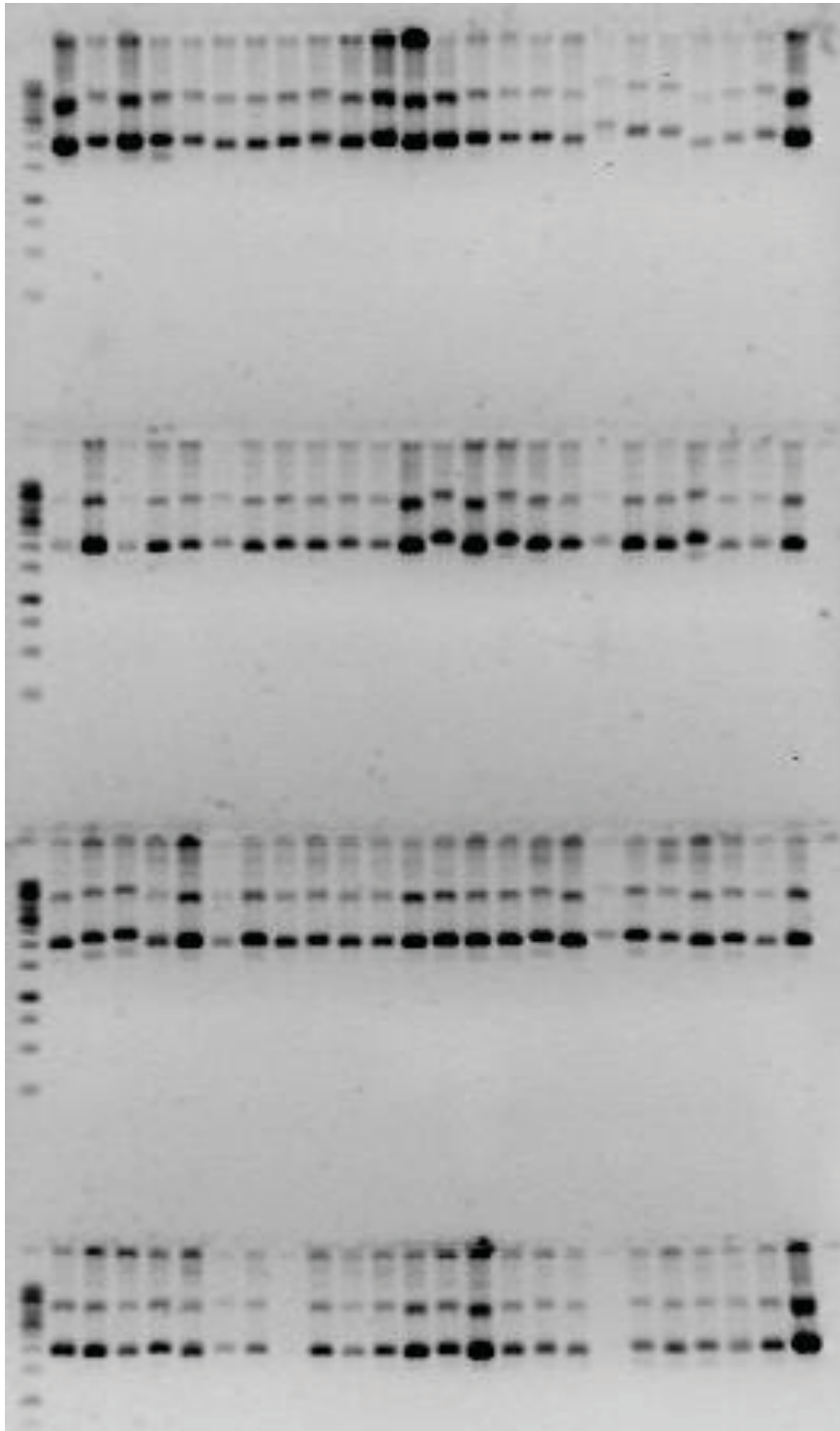


Figura 6 - Perfis eletroforéticos de DNAs clonados que constituem a biblioteca enriquecida de microssatélite de *Pterogyne nitens*. Sonda utilizada: AC₁₃.

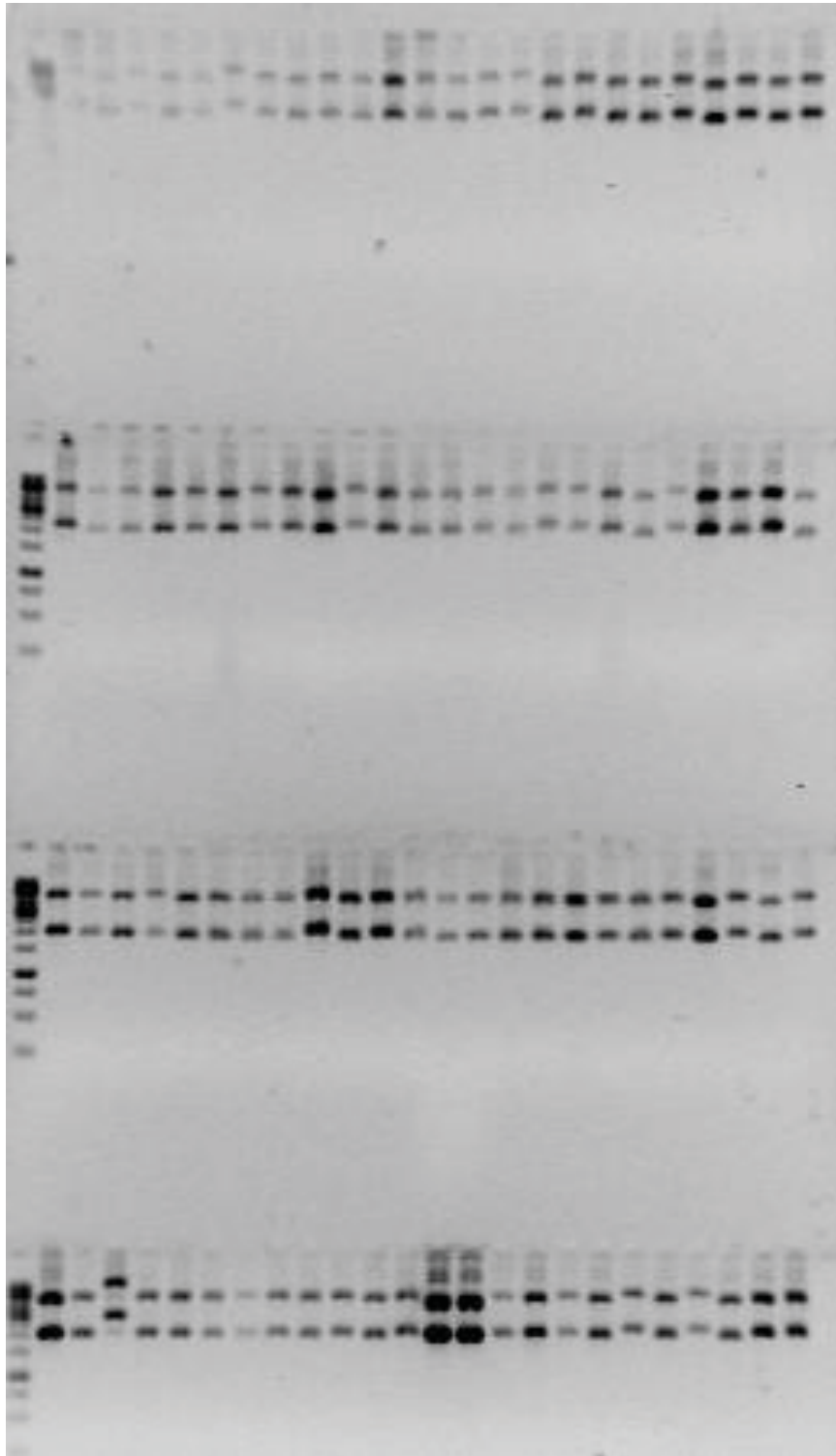


Figura 7: Perfis eletroforéticos de DNAs clonados que constituem a biblioteca enriquecida de microssatélite de *Pterogyne nitens*. Sonda utilizada: TC₁₃

4.5 – Sequenciamento dos clones, análise das sequências e desenho dos iniciadores

A construção da biblioteca resultou em 960 clones que foram sequenciados na extensão *Forward* e *Reverse*. Destes, 585 clones apresentaram sequências de qualidade para posterior análise. Através do programa Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; EWING & GREEN, 1998), foi possível observar a alta qualidade das bases (Figura 8), obtendo-se o alinhamento das sequências e a fita consenso, a partir da qual foi realizado o desenho dos iniciadores. Foram detectados 85 sequências contendo microssatélites, representando um enriquecimento da biblioteca de 14,52%. Destas 85 sequências contendo os microssatélites, foi possível desenhar os pares de iniciadores (*Forward* e *Reverse*) de 70 sequências, ou seja, 82,35% das sequências contendo microssatélites possibilitaram o desenho dos iniciadores (Figura 9). Não foi possível o desenho dos iniciadores nas demais sequências devido ao não preenchimento de requisitos necessários para construção de iniciadores com qualidade, ou seja, formação de *hairpin*, auto-pareamento, temperatura de *melting* com intervalo maior que 4°C entre os iniciadores F e R, ou por, a sequência repetida encontrar-se próxima ao adaptador (Figura 10).

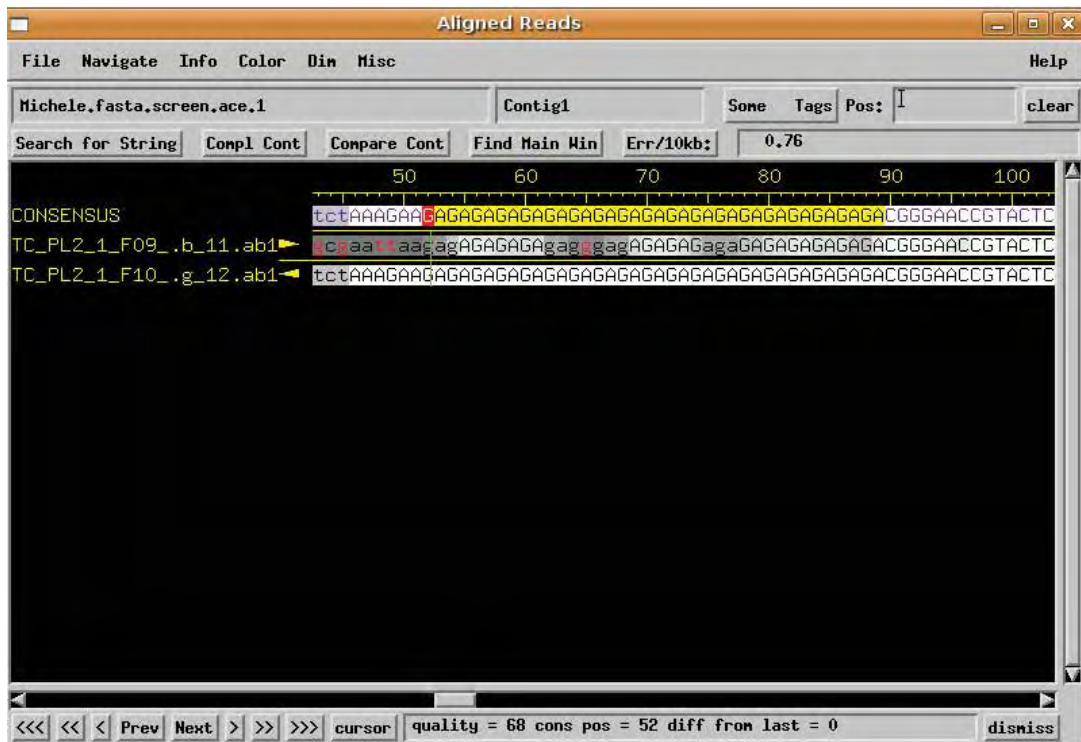


Figura 8: Imagem do Phred/Phrap/Consed. A segunda linha corresponde ao sequenciamento na extensão *Forward*, a terceira linha corresponde ao sequenciamento na extensão *Reverse* e a primeira linha corresponde à fita consenso com detalhe do microssatélite destacado em amarelo.

uma sequência cada (2,27% cada). Os motivos trinucleotídeos TCA e CTT, foram os mais abundantes, seis (42,86%) e três (21,43%) sequências, respectivamente. Os trinucleotídeos CAA, GGA, GGT, TGA, GAA encontraram-se em apenas uma sequência cada (7,14% cada).

Em trabalho de caracterização de marcadores microssatélites em *Musa acuminata*, realizado por Miller et al. (2010), em 41 SSRs identificados, os dinucleotídeos foram os mais abundantes (46,34%), seguido dos trinucleotídeos (29,26%), tetranucleotídeos (12,19%), pentanucleotídeos (7,31%), hexanucleotídeos (2,43%) e nonanucleotídeos (2,43%). Estes resultados mostram que o desenho dos iniciadores para a espécie *P. nitens* foram efetivos e dentro dos padrões encontrados na literatura.

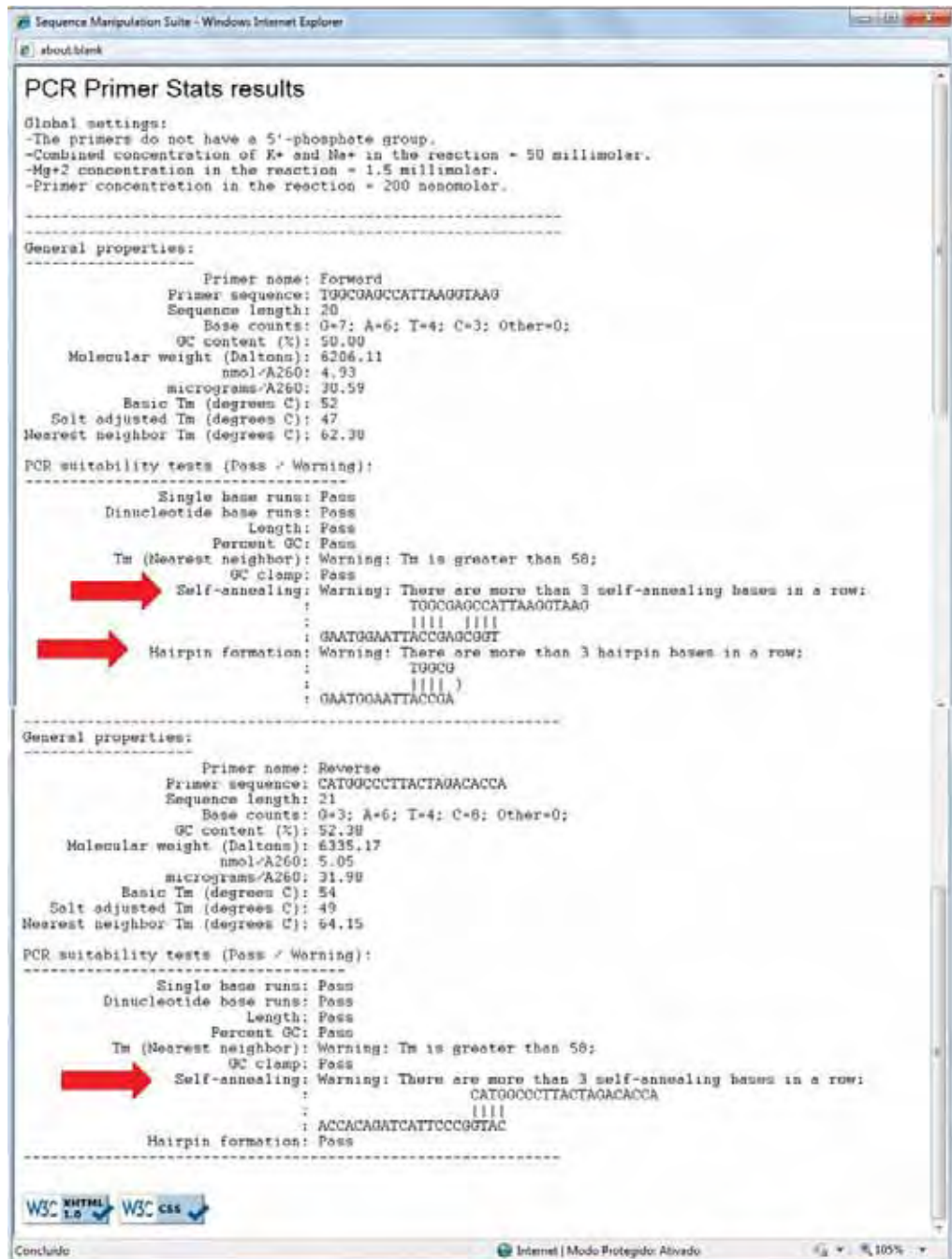


Figura 10: Resultado do Programa Sequence Manipulation Suite de um par de iniciadores que não pode ser utilizado, destacando nas setas vermelhas o auto-anelamento e a formação de hairpin no iniciador *Forward*, e o auto-anelamento no iniciador *Reverse*.

Em relação à classificação dos tipos de SSR, encontrou-se que os microssatélites perfeitos foram os mais abundantes, 55 seqüências, seguidos de 10 seqüências compostas e 5 apresentaram microssatélites interrompidos (Figura 11).

4.6 - Síntese de Oligonucleotídeos e Otimização das temperaturas de amplificação

De um total de 70 pares de iniciadores desenhados, apenas 16 deles foram sintetizados. Como todo o trabalho foi realizado em sequenciador automático de capilar, houve a necessidade de que os iniciadores fossem marcados com fluorescência. Todos os 16 iniciadores escolhidos para a realização do trabalho foram marcados na extensão *forward* com a fluorescência FAM, devido ao menor custo da fluorescência. Assim, não foi possível a montagem de reações multiplex, o que poderia reduzir o tempo das análises no sequenciador. Esta medida foi tomada para que fosse possível a síntese de um maior número de iniciadores, já que a fluorescência FAM tinha um custo menor.

Os iniciadores PN1, PN2, PN6, PN11, PN12, PN17 e PN19 apresentaram sucesso de amplificação no intervalo de temperatura de pareamento entre 55°C e 65,5°C, sendo possível visualizar apenas uma banda consistente no gel (Figuras 12, 13, 16, 17, 18, 22 e 24 respectivamente). As melhores temperaturas de amplificação variaram entre 62°C, 63°C e 65°C.

A amplificação realizada para os iniciadores PN3, PN5, PN13, PN15, PN16, PN21 e PN22 apresentaram bandas espúrias (Figuras 14, 15, 19, 20, 21, 26 e 27). Desta forma optou-se pela temperatura de pareamento que propiciasse melhor amplificação, indicada no gel pelas setas em vermelho, aliado ao melhor perfil observado nos eletroferogramas, após os testes no sequenciador (Figuras 28 a 40).

O iniciador PN18 não apresentou uma boa amplificação, como visualizado no gel de agarose (figura 23), por isso este iniciador foi excluído das análises. O mesmo ocorre com o *iniciador* PN20 (figura 25), onde vários testes de temperatura foram realizados, mas não foi possível obter bons resultados.

As temperaturas de pareamento (TM) encontradas como ideais para cada iniciador SSR foram descritas na tabela 1, assim como o tamanho dos fragmentos (pb) observados na genotipagem em sequenciador. Foram excluídos desta tabela os iniciadores PN5, PN18 e PN20, por não apresentarem qualidade de amplificação.

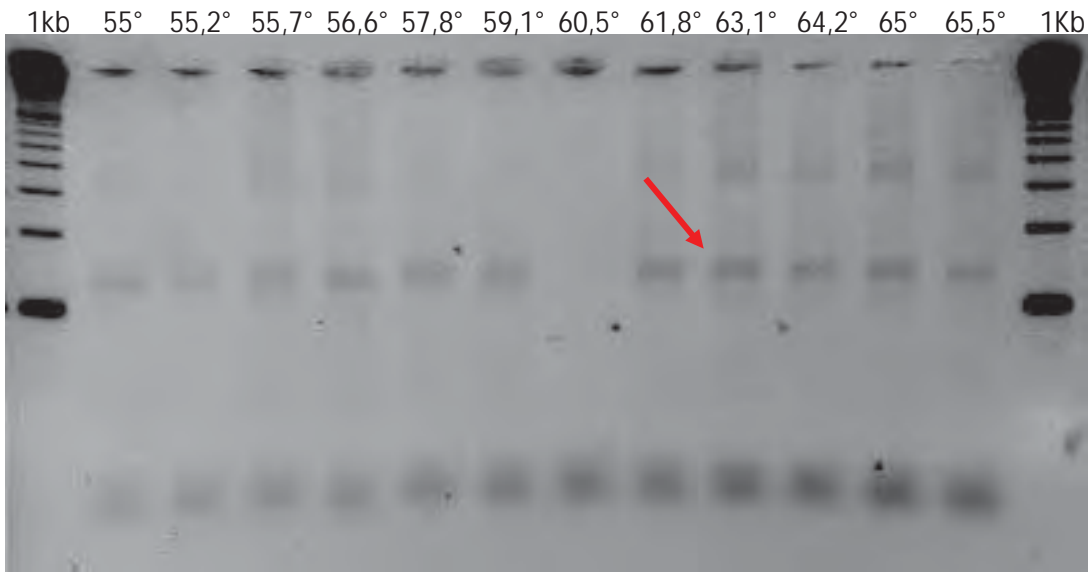


Figura 12: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN1** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

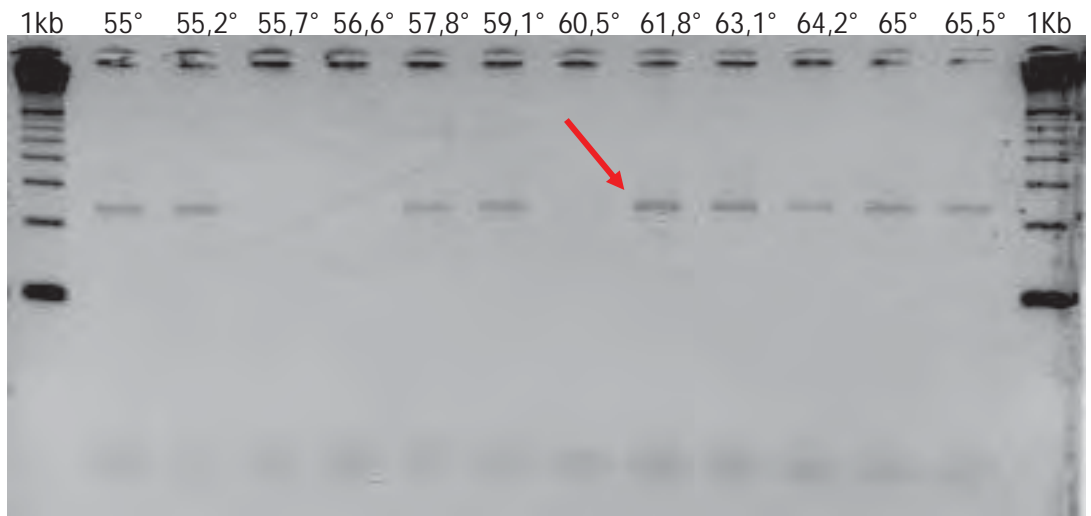


Figura 13: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN2** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

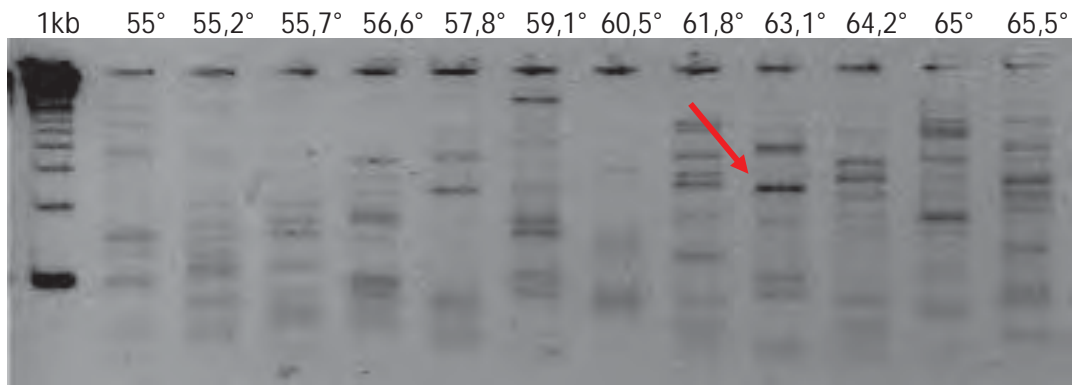


Figura 14: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN3** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

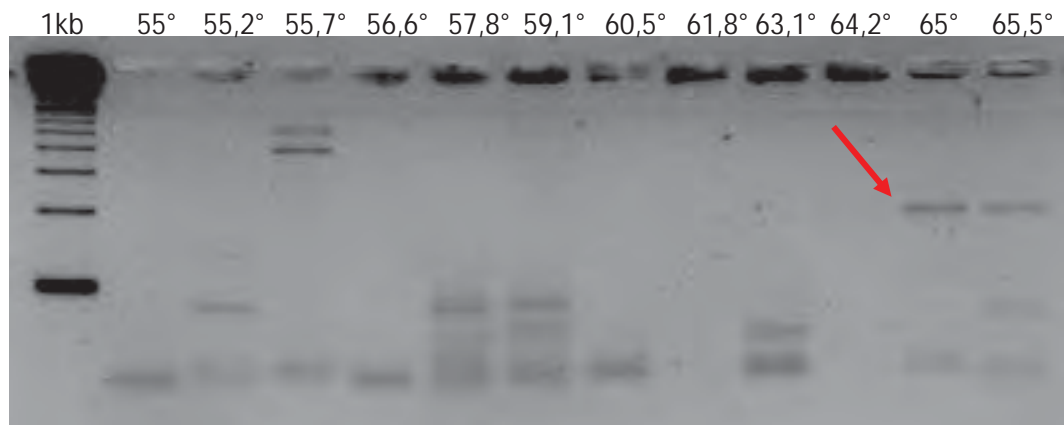


Figura 15: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN5** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

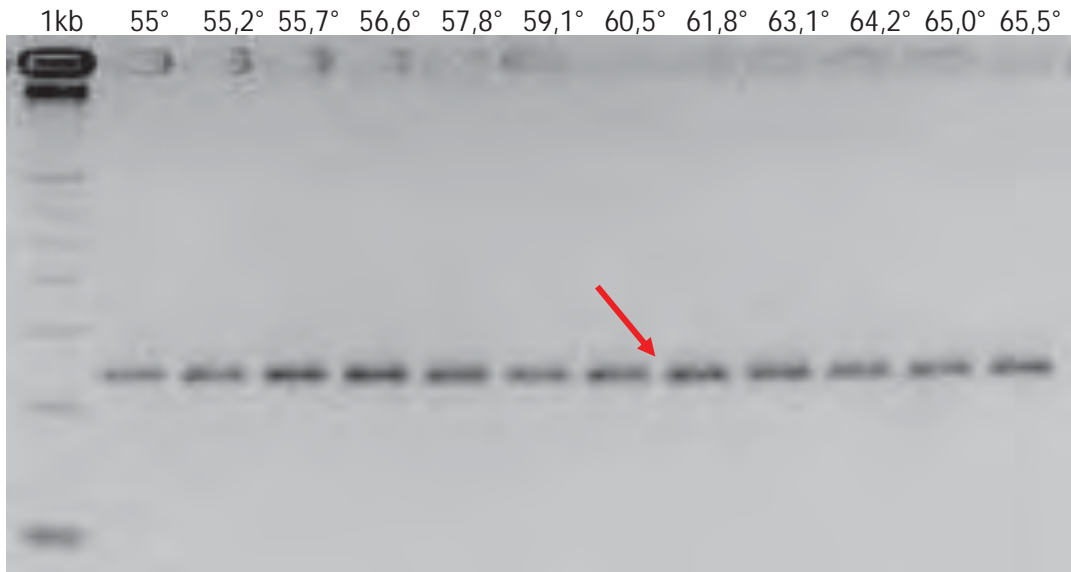


Figura 16: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN6** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

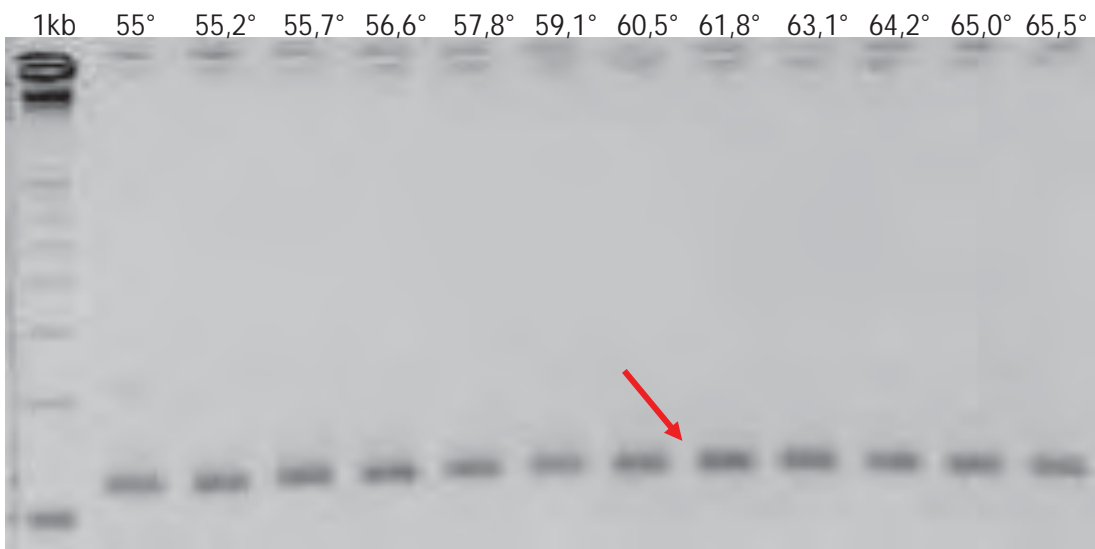


Figura 17: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN11** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

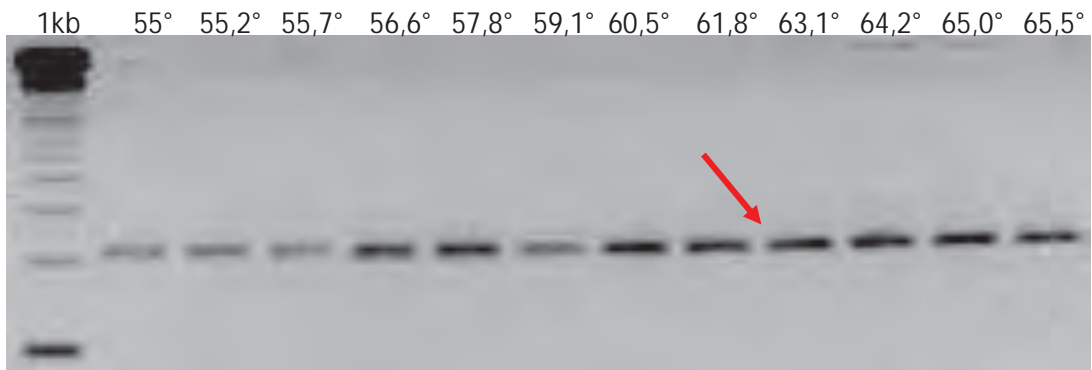


Figura 18: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN12** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

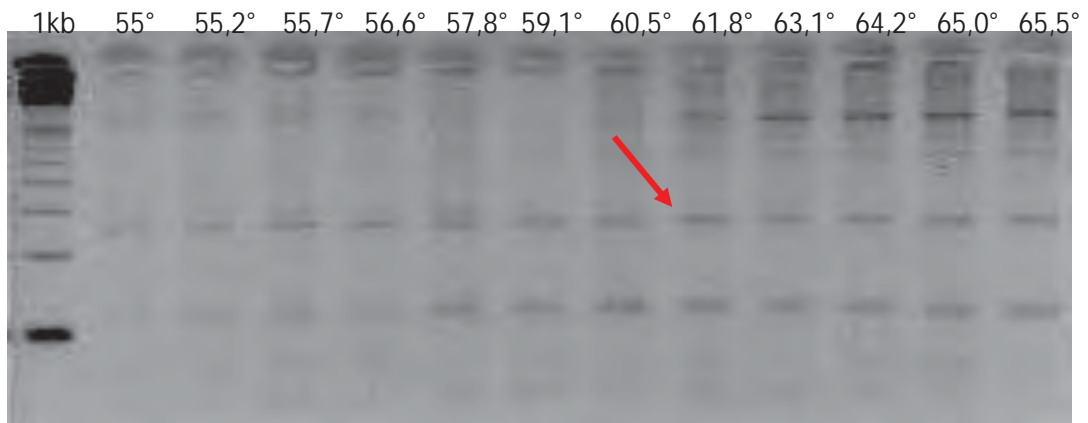


Figura 19: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN13** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

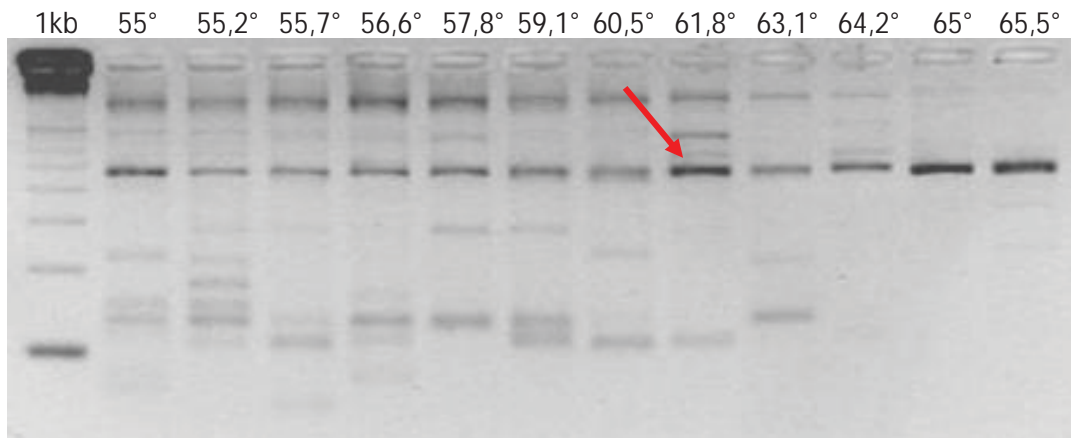


Figura 20: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN15** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

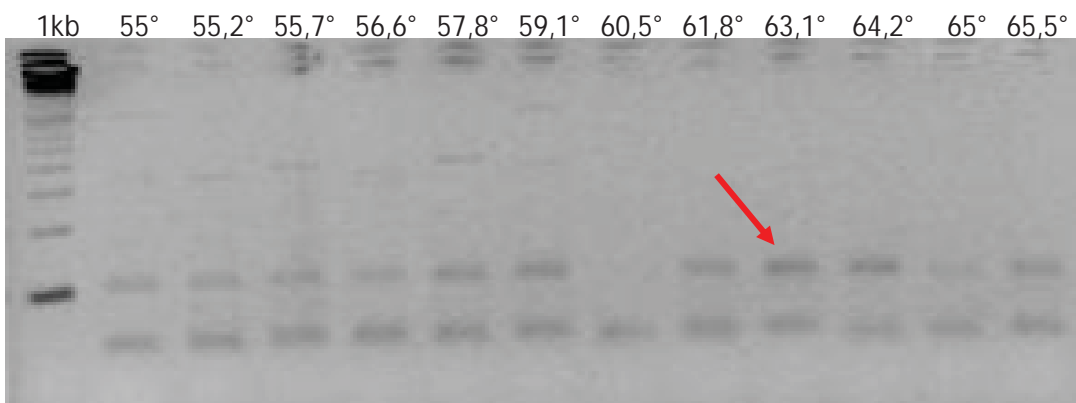


Figura 21: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN16** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

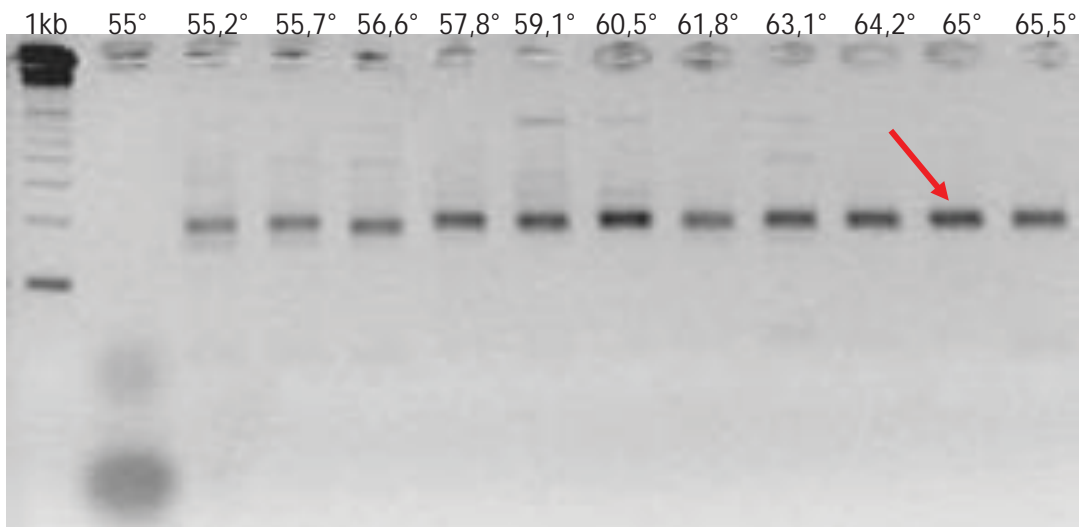


Figura 22: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN17** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)



Figura 23: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN18** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

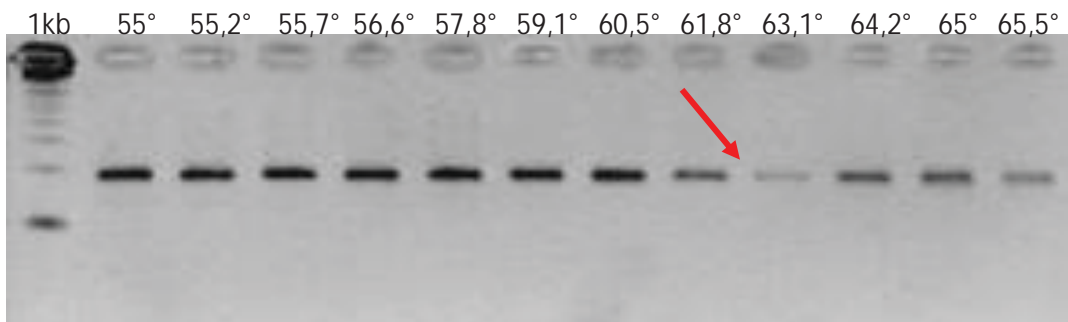


Figura 24: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN19** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

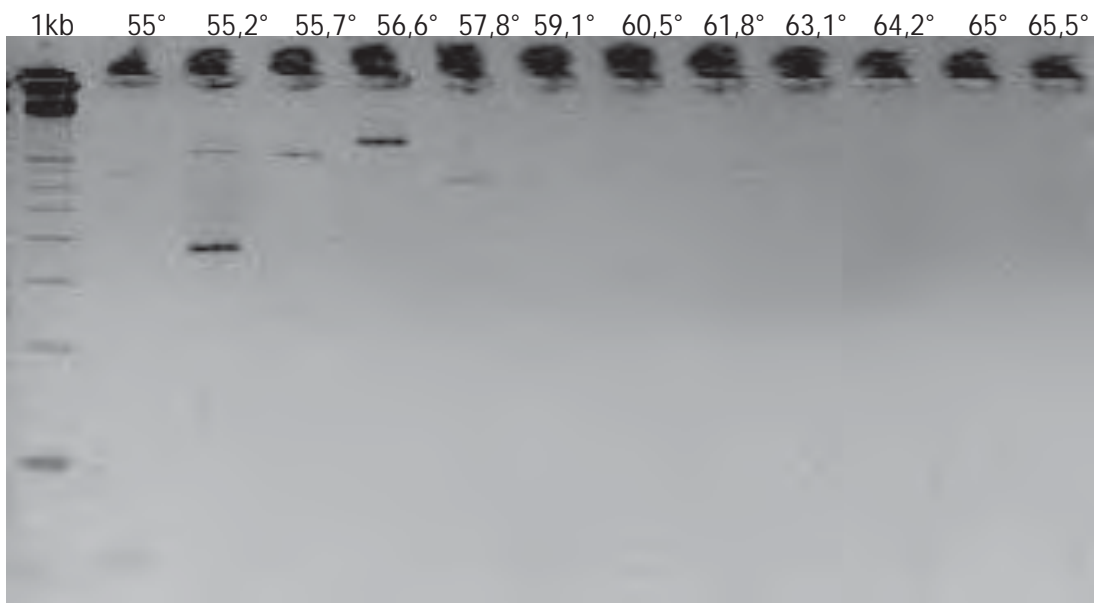


Figura 25: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN20** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

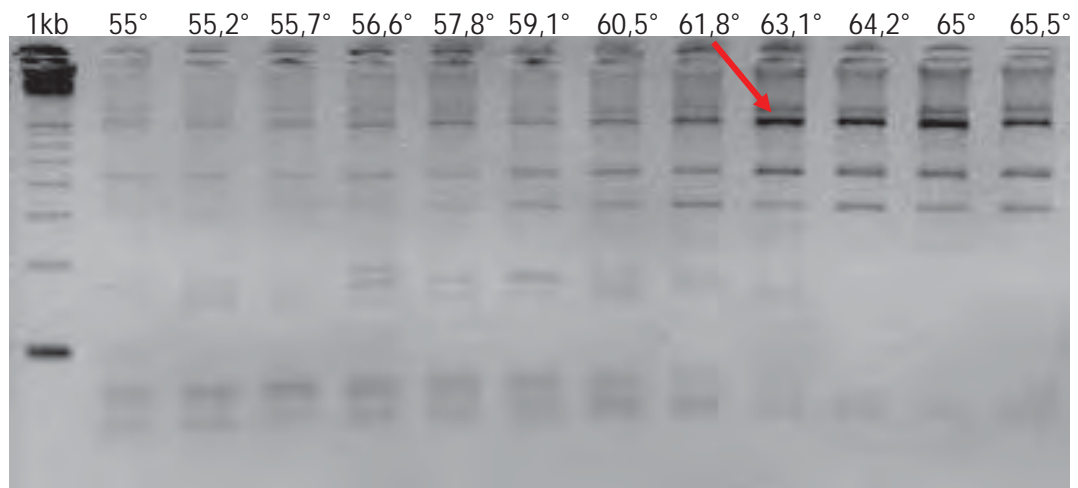


Figura 26: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN21** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

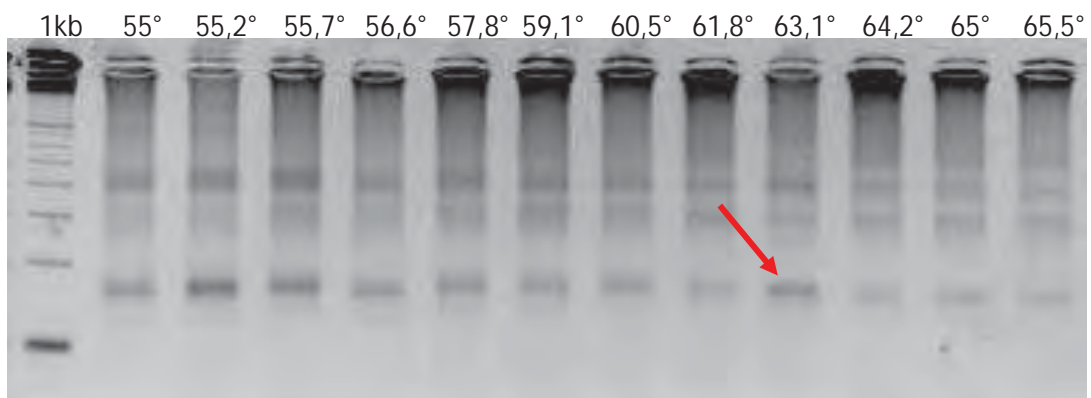


Figura 27: Perfil eletroforético do teste de otimização de temperatura de pareamento do iniciador **PN22** com DNA genômico de *Pterogyne nitens* em PCR-SSR. (Os números nas canaletas indicam as temperaturas em °C)

Tabela 1: Condições de amplificação dos iniciadores SSR para *Pterogyne nitens*.

Iniciador SSR	Temperatura de pareamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
PN1	63	120-140
PN2	62	220-240
PN3	63	100-120
PN6	62	220-240
PN11	62	150-210
PN12	63	200-210
PN13	62	100-130
PN15	62	110-130
PN16	63	100-120
PN17	65	170-200
PN19	63	170-200
PN21	63	140-190
PN22	63	130-170

4.7 - Genotipagem dos locos SSR

Os testes de genotipagem dos locos SSR foram realizados com quatro amostras de DNA escolhidos aleatoriamente. Os eletroferogramas gerados no ABI 3100, foram inicialmente tratados pelo *software GeneScan* (Applied Biosystem versão 3.7), que tem a função de detectar e estimar o tamanho de alelos em pares de base. Em seguida os valores foram importados para o *software Genotyper* (Applied Biosystem versão 3.7) para filtragem de picos, interpretação e compilação final dos dados, definindo o genótipo de cada indivíduo.

Os eletroferogramas proporcionaram a identificação dos alelos, e os resultados da visualização são apresentados nas figuras 28 a 40. Os locos amplificados foram chamados com o mesmo nome dos iniciadores, e os alelos foram descritos em função de seus tamanhos em pb.

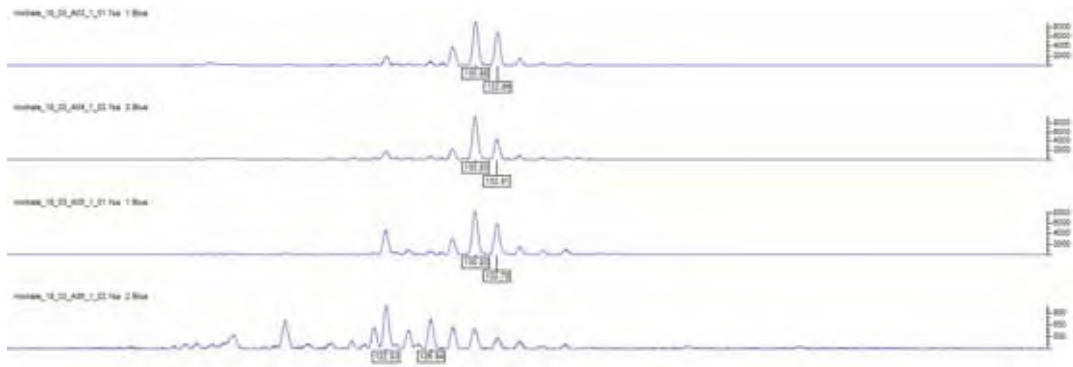


Figura 28: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN1.

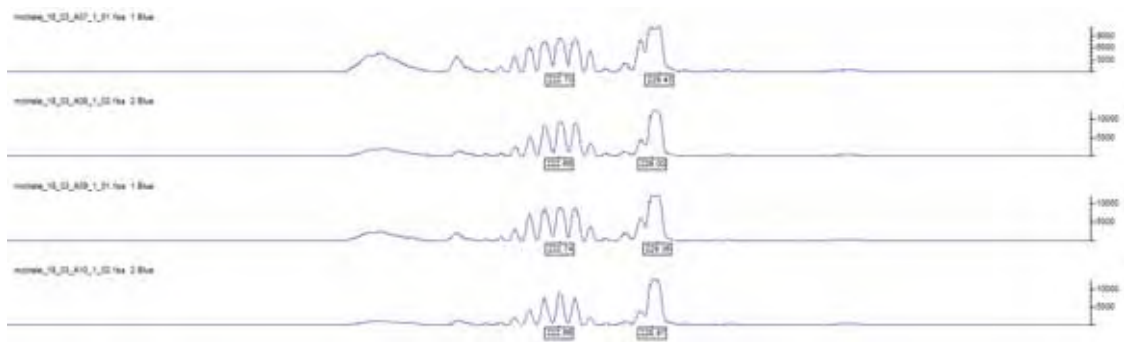


Figura 29: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN2.

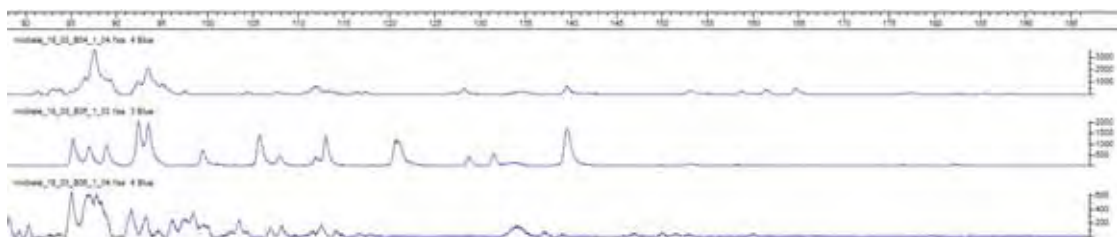


Figura 30: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN3.

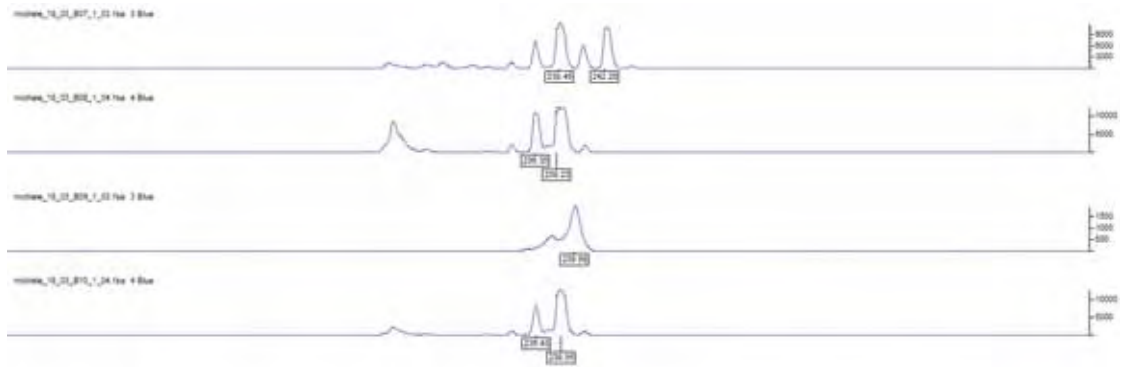


Figura 31: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN6.

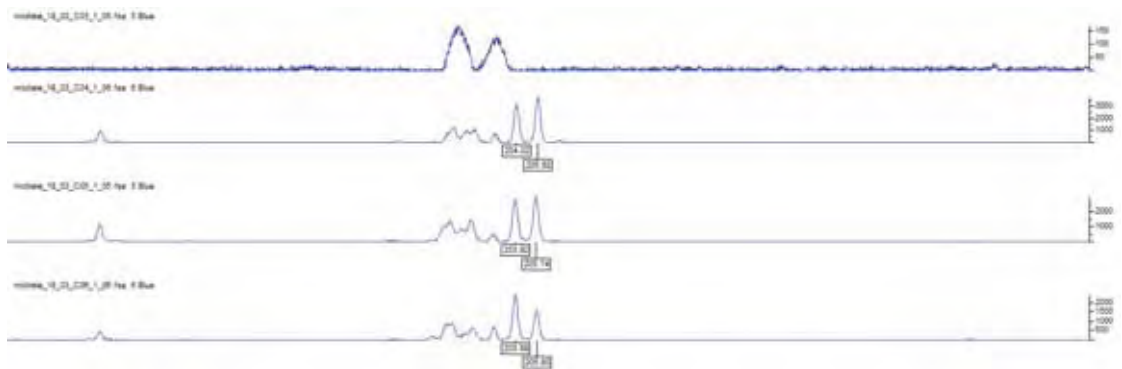


Figura 32: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN11.

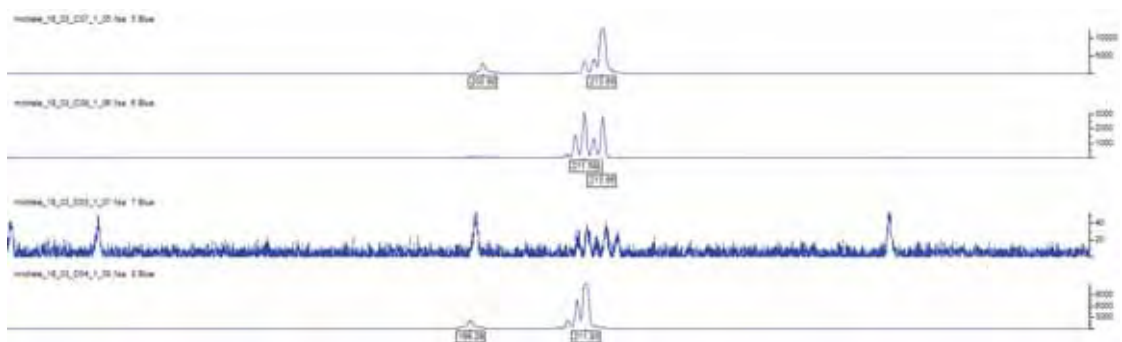


Figura 33: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN12.

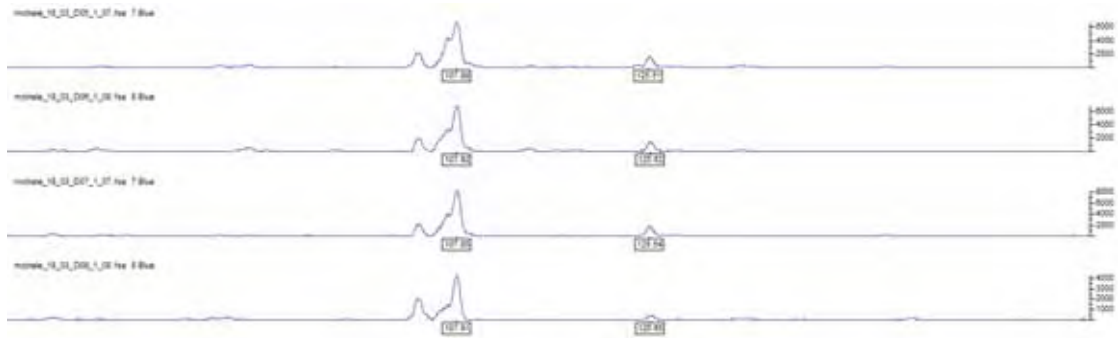


Figura 34: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN13.

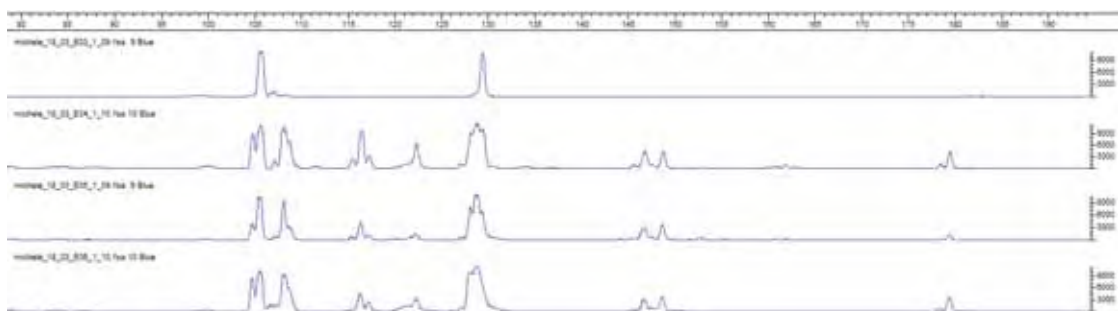


Figura 35: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN15.

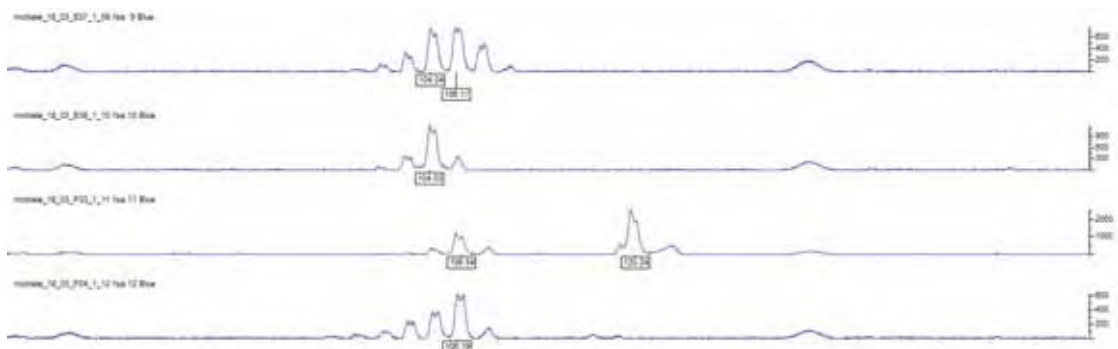


Figura 36: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN16.

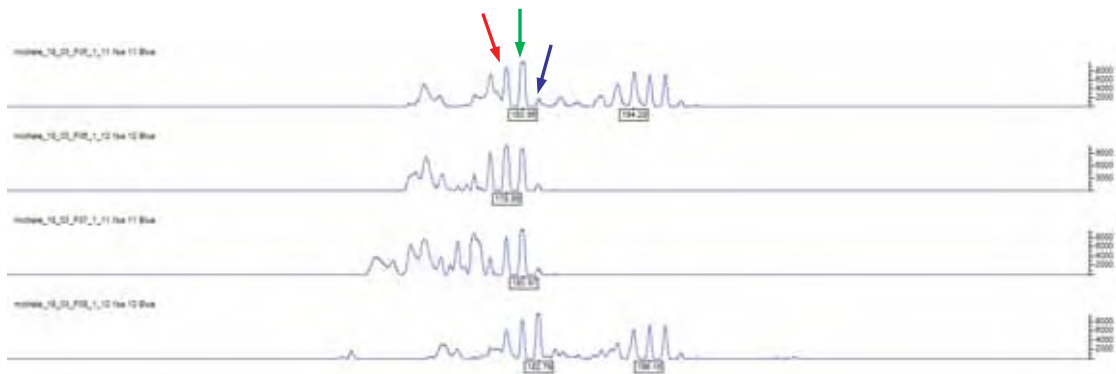


Figura 37: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN17. Seta verde: alelos principais. Seta vermelha: picos *stutters*. Seta azul: picos *plus A*.



Figura 38: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN19.

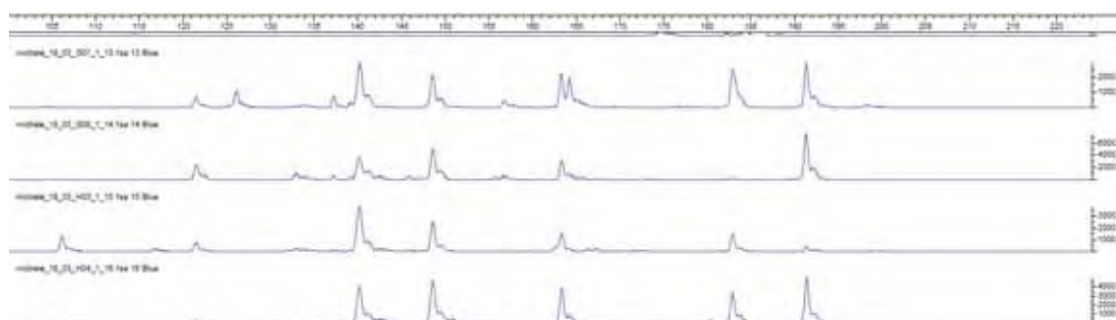


Figura 39: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN21.

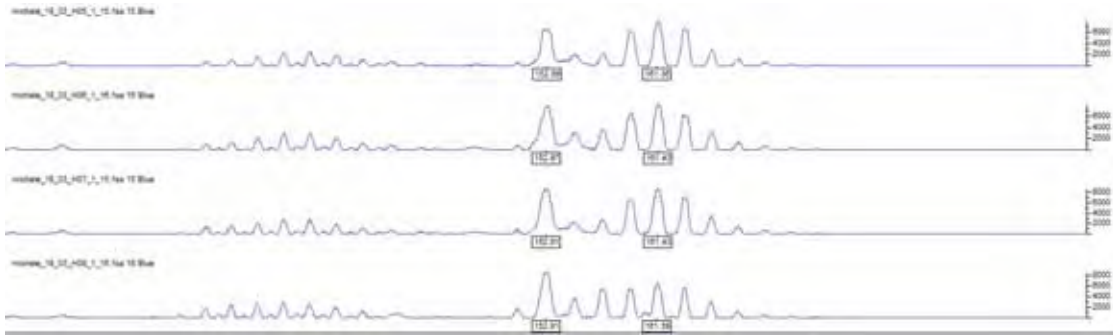


Figura 40: Eletroferogramas de alelos observados em indivíduos de *Pterogyne nitens* no loco PN22.

É interessante notar que cada loco apresenta um perfil característico (Figuras 28 a 40) exigindo atenção nas análises visuais de interpretação dos mesmos. Os locos PN2, PN17 e PN22 apresentam além de picos referentes aos alelos principais (seta verde), picos *stutters* (seta vermelha) e *plus A* (seta azul), de acordo com a figura 37. Em todos os iniciadores desenhados para análise foram utilizados locos com repetições dinucleotídicas, sendo assim os picos *stutters* se apresentam com tamanho de 2pb inferior ao alelo principal, podendo também ocorrer *stutters* com tamanhos de 4 e 6 pb inferior ao alelo principal (LITT et al. 1993).

Esta banda adicional, geralmente menor que o alelo original, ocorre durante a polimerização realizada pela Taq polimerase e diferem no comprimento por diferença nas unidades de repetição (AZEVEDO, 2007). Isto significa que durante a síntese da fita filha, a DNA polimerase momentaneamente paralisa sua atividade, fazendo com que as fitas afastem-se e quando retornam ao pareamento, ocorre à formação de um “loop out” deixando uma repetição fora do evento de amplificação. Walsh et al. (1996) relatam que há uma correlação positiva entre o tamanho do alelo e a frequência de ocorrência de bandas *stutters*. Este fenômeno é semelhante ao escorregamento do DNA (*slippage*) *in vivo*, fenômeno este tido como principal responsável pela evolução de microssatélites. Estes picos *stutters in vitro* tendem a ser mais frequentes em unidades de dinucleotídeos (AZEVEDO, 2007).

Os picos *plus A* observados são resultantes da incorporação pela DNA polimerase de uma adenina no final do amplificado.

Em relação aos locos PN2, PN3, PN 11, PN15, PN16, PN21 e PN22 (figuras 29, 30, 32, 35, 36, 39 e 40 respectivamente), passaram por novos testes para tentar

uma padronização na amplificação e determinar com maior precisão quais são os alelos principais referentes a estes locos. Destes, apenas para o loco PN2 foi possível obter sucesso na padronização das reações, reduzindo o número de picos tornando o iniciador mais específico. Os outros locos foram descartados das análises.

Quanto aos iniciadores PN5, PN18 e PN20 não houve sucesso na amplificação. Em relação ao iniciadores PN5 foi observado amplificação no teste de temperatura, por isso foram feitas reações utilizando as temperaturas de pareamento de 63°C e 65°C. Estes amplificados foram testados no sequenciador, mas não houve resultado satisfatório. Para os iniciadores PN18 e PN20 não foi observado amplificação no teste de temperatura, mas com base na fórmula de Newton e Graham's (1997), foram realizados testes de temperatura de pareamento de 62°C, 63°C e 65°C, mas nenhuma das temperaturas foi ideal para gerar eletroferogramas que proporcionasse a visualização dos alelos. Assim, foi necessária a exclusão destes.

Os locos que apresentaram melhores perfis para uma boa amplificação dos alelos foram PN1, PN2, PN6, PN12, PN13 e PN19. Nestes locos foi possível observar altas taxas de polimorfismo para a espécie *P. nitens*.

4.8 – Diversidade genética

A estimativa dos índices de diversidade genética em *Pterogyne nitens* indicou a existência de diversidade genética nas populações. Os locos analisados apresentaram-se polimórficos para as duas populações. Os locos que apresentaram maior polimorfismo para a Pop. JB foi o PN1 e para a Pop. PB foi o loco PN2. Os locos que apresentaram menor polimorfismo para as duas populações estudadas foram o PN12 e PN13. A Pop. JB apresentou um total de 21 alelos nas matrizes (10 indivíduos amostrados), com média de 3,5 alelos e 48 alelos nas progênes (300 indivíduos amostrados), média de 8 alelos, já a Pop. PB apresentou 16 alelos nas matrizes (10 indivíduos amostrados) e média de 2,66 alelos por loco e 41 alelos nas progênes (300 indivíduos amostrados), média de 6,83 alelos por loco (Tabela 2). O número médio de alelos efetivos, observados nas matrizes da Pop. JB foi de 2,73, e

nas progênies de 2,95 alelos efetivos. Na Pop. PB a média do número efetivo de alelos foi de 2,17 nas matrizes e de 2,65 alelos efetivos nas progênies.

A heterozigosidade observada (\hat{H}_o) variou de 0,500 a 1,000 com média de 0,710 nas matrizes e de 0,303 a 0,933 com média de 0,695 nas progênies da Pop. JB. Na Pop PB a \hat{H}_o variou nas matrizes de 0,100 a 1,000 com média de 0,700 e de 0,440 a 0,916 com média de 0,651 nas progênies.

A diversidade gênica (\hat{H}_e) nas matrizes da Pop. JB variou de 0,510 a 0,742 com média de 0,617 e nas progênies a \hat{H}_e variou de 0,581 a 0,719 com média de 0,548. Na Pop. PB a diversidade gênica encontrada foi de 0,100 a 0,721 com média de 0,483 nas matrizes e de 0,557 a 0,669, com média de 0,620 nas progênies.

Tabela 2: Estimativa de parâmetros genéticos em seis locos para as duas populações e as duas gerações de *Pterogyne nitens*: n é o número total de indivíduos analisados; \hat{A} é o número de alelos por loco; \hat{A}_e é o número efetivo de alelos por loco; \hat{H}_o é a heterozigosidade observada; \hat{H}_e é a heterozigosidade esperada; $\hat{H}_{máx}$ é a máxima diversidade para cada loco; $\hat{H}_e / \hat{H}_{máx}$ é a proporção da diversidade máxima.

Pop JB														
n		\hat{A}		\hat{A}_e		\hat{H}_o		\hat{H}_e		$\hat{H}_{máx}$		$\hat{H}_e / \hat{H}_{máx}$		
Locos	Mat.	Prog.	Mat.	Prog.	Mat.	Prog.	Mat.	Prog.	Mat.	Prog.	Mat.	Prog.	Mat.	Prog.
PN1	10	300	4	11	2,91	2,84	0,900	0,933	0,657	0,648	0,750	0,909	0,876	0,712
PN2	10	300	3	10	2,04	2,38	0,500	0,303	0,510	0,581	0,666	0,900	0,75	0,645
PN6	10	300	3	10	2,74	2,82	1,000	0,873	0,636	0,646	0,666	0,900	0,954	0,717
PN12	10	300	3	5	2,04	2,82	0,500	0,806	0,510	0,646	0,666	0,800	0,765	0,807
PN13	10	300	4	4	3,87	3,55	0,500	0,620	0,742	0,719	0,750	0,750	0,989	0,958
PN19	10	300	4	8	2,83	3,33	0,900	0,638	0,647	0,700	0,750	0,875	0,862	0,800
Média	10	300	3,5	8	2,73	2,95	0,710	0,695	0,617	0,548	0,708	0,855	0,868	0,773

Pop. PB														
n		\hat{A}		\hat{A}_e		\hat{H}_o		\hat{H}_e		$\hat{H}_{máx}$		$\hat{H}_e / \hat{H}_{máx}$		
Locos	Mat.	Prog.	Mat.	Prog.	Mat.	Prog.	Mat.	Prog.	Mat.	Prog.	Mat.	Prog.	Mat.	Prog.
PN1	10	300	3	8	2,34	3,02	1,000	0,916	0,573	0,669	0,666	0,875	0,860	0,764
PN2	10	300	2	11	1,11	2,37	0,100	0,440	0,100	0,579	0,500	0,909	0,200	0,636
PN6	10	300	2	5	2,10	2,25	1,000	0,926	0,526	0,557	0,500	0,800	1,052	0,696
PN12	10	300	2	4	2,02	2,68	0,400	0,746	0,505	0,627	0,500	0,750	1,010	0,836
PN13	10	300	2	4	1,91	2,86	0,700	0,753	0,478	0,651	0,500	0,750	0,956	0,868
PN19	10	300	5	9	3,58	2,76	1,000	0,800	0,721	0,638	0,800	0,888	0,901	0,718
Média	10	300	2,66	6,83	2,17	2,65	0,700	0,651	0,483	0,620	0,577	0,828	0,829	0,753

Para a Pop. JB as estimativas de \hat{H}_e e \hat{H}_o foram semelhantes, estas informações sugerem que não houve endogamia na população estudada. Diferentemente da Pop. PB que apresenta estimativas de \hat{H}_e e \hat{H}_o diferentes.

A diversidade genética máxima ($\hat{H}_{máx}$) representa o valor máximo teoricamente esperado da diversidade gênica (\hat{H}_e), de acordo com o número máximo observado de alelos. Nas análises realizadas foi possível observar que os marcadores SSR apresentaram uma diversidade máxima possível de 70,8% nas matrizes da Pop. JB e 85,5% nas progênie. Já na Pop. PB a diversidade máxima possível foi de 57,7% nas matrizes e 82,8% nas progênie. Com estes resultados é possível constatar que na Pop. JB a frequência de alelos raros nas matrizes foi baixa, já nas progênie foi observado uma frequência maior de alelos raros. Na Pop. PB a frequência de alelos raros também foi baixa nas matrizes e maior nas progênie. Isso é observado considerando a maneira como os parâmetros \hat{H}_e e $\hat{H}_{máx}$ são calculados, pois considera-se apenas o número de alelos observados em comparação a \hat{H}_e que considera a frequência alélica. Assim se uma população apresentar valores de $\hat{H}_{máx}$ e \hat{H}_e próximos, possivelmente, não deve possuir muitos alelos em baixa frequência. Entretanto, se ela apresentar valores elevados de $\hat{H}_{máx}$ e valores relativamente mais baixo de \hat{H}_e , conseqüentemente, ela terá menos porcentagem da máxima diversidade possível, indicando que a população apresenta maior número de alelos em baixa frequência (alelos raros).

Assim a comparação entre $\hat{H}_{máx}$ e \hat{H}_e permite determinar indiretamente se estão ocorrendo alelos raros nas populações, pois quanto mais próximos forem os valores estimados destes dois parâmetros menor a quantidade de alelos em baixa frequência a população irá apresentar.

Estes resultados observados levam a supor que as matrizes das duas populações possuem diversidade genética, com quantidades baixas de alelos raros.

Já as progênies das populações possuem um maior número de alelos raros ou em baixa frequência levando a hipótese de que a troca gênica entre as matrizes foi menor, principalmente na Pop. JB, possivelmente devido à localização das árvores matrizes por se encontrarem em locais distantes uma das outras.

Analisando o índice de diversidade genética para cada geração de cada população, pode-se observar que houve pouca variação no número médio de alelos por loco e no número efetivo de alelos por loco (Tabela 3) para as matrizes da Pop. JB ($\hat{A} = 3,5$) e ($\hat{A}_e = 2,61$). Nas progênies a variação foi relativamente maior ($\hat{A} = 8$) e ($\hat{A}_e = 2,91$). Na Pop. PB a variação no número médio de alelos e no número efetivo de alelos por loco nas matrizes também foi baixo ($\hat{A} = 2,66$) e ($\hat{A}_e = 1,93$) e nas progênies foi observado uma variação mais significativa ($\hat{A} = 6,83$) e ($\hat{A}_e = 2,63$). Essa maior diferença encontrada nas progênies se deve ao maior número de indivíduos amostrados, pois quanto maior o número de indivíduos na amostra maior a probabilidade de observar alelos em baixa frequência ou alelos raros (RAPOSO et al., 2007).

O índice de fixação ($\hat{f}_{(IS)}$) foi maior nas matrizes da Pop. JB e Pop. PB, ($\hat{f}_{(IS)} = 0,139$) e ($\hat{f}_{(IS)} = 0,309$) respectivamente, quando comparado com as progênies que apresentaram ($\hat{f}_{(IS)} = 0,091$) e ($\hat{f}_{(IS)} = 0,214$) para Pop. JB e Pop. PB respectivamente.

As estimativas de tamanho efetivo populacional foram próximas do número de indivíduos amostrados na Pop. JB para as matrizes e progênies. Para a Pop. PB o tamanho efetivo populacional nas matrizes foi praticamente metade do número de indivíduos amostrados confirmando que existe uma taxa significativa de cruzamentos entre indivíduos aparentados. Nas progênies o tamanho efetivo também foi menor que os observados nas progênies da Pop. JB, confirmando uma maior diversidade na população.

O entendimento da relação entre o tamanho efetivo e o tamanho real de uma população é de fundamental importância para o planejamento de estratégias de

conservação. Segundo Loveless e Hamrick (1984), quando existe equilíbrio entre os eventos demográficos tais como flutuações temporais no tamanho da população, presença de estruturação e endogamia dentro das populações, diferenças na fertilidade, assincronismo no florescimento, entre outros, os valores de \hat{N}_e são muito próximos do número de indivíduos coletados. Comparando os dados obtidos com outros autores, pode-se observar que existe uma tendência de os valores estimados de \hat{N}_e serem próximos ao número de indivíduos amostrados, levando a conclusão que as populações desta espécie apresentam certo equilíbrio nos mecanismos de manutenção da diversidade para a Pop. JB e na Pop. PB observou-se que há uma porcentagem de endogamia quando analisado os valores de \hat{N}_e sendo menores que o número de indivíduos amostrados. Esta ocorrência de endogamia se deve certamente ao isolamento da Pop. PB que contribui para a baixa frequência gênica aumentando a endogamia na espécie.

Tabela 3: Estimativas de índices de diversidade genética, obtidas para as Pop. JB e Pop. PB de *Pterogyne nitens*, em que: \hat{n} é o número médio de indivíduos analisados, \hat{A} é o número médio de alelos por loco; \hat{A}_e é o número efetivo de alelos por loco; \hat{H}_o é a heterozigosidade observada; \hat{H}_e é a heterozigosidade esperada; $\hat{f}_{(IS)}$ é o índice de fixação; \hat{N}_e é o tamanho efetivo populacional; \hat{N}_e/\hat{n} é a relação entre o tamanho efetivo e o tamanho amostral.

Amostras	\hat{n}	\hat{A}	\hat{A}_e	\hat{H}_o	\hat{H}_e	$\hat{f}_{(IS)}$	\hat{N}_e	\hat{N}_e/\hat{n}
Matrizes Pop. JB	10	3,5	2,61	0,716	0,617	0,139	8,3	0,83
Progênies da Pop. JB	300	8	2,91	0,722	0,657	0,091	270	0,9
Matrizes Pop. PB	10	2,66	1,93	0,700	0,484	0,309	5,18	0,518
Progênies da Pop. PB	300	6,83	2,63	0,788	0,620	0,214	219	0,73

4.9 - Sistema reprodutivo

A estimativa da taxa de cruzamento multiloco (\hat{t}_m) foi alta para as duas populações, Pop. JB ($\hat{t}_m = 1,000$) e Pop. PB ($\hat{t}_m = 1,000$) (Tabela 4). A estimativa da taxa de cruzamento uniloco (\hat{t}_s) foi igualmente alta para a Pop. JB ($\hat{t}_s = 1,000$) e Pop. PB ($\hat{t}_s = 0,996$). As altas taxas de cruzamentos detectadas nas duas populações indicam que a espécie é alógama. As estimativas das diferenças entre as taxas de cruzamento multiloco e uniloco ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$) foi nula para a Pop. JB ($\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,000$), indicando que não houve cruzamentos entre indivíduos aparentados, e baixa para a Pop. PB ($\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,004$), indicando pouco cruzamento entre indivíduos aparentados. As espécies arbóreas geralmente apresentam alta taxa de cruzamento. Resultados semelhantes foram observados por Neto et al. (2005) quando estudou duas populações de *Eschweilera ovata* e obteve $\hat{t}_m = 0,999$ para Pop. de Camarugipe e $\hat{t}_m = 0,985$ para a Pop. Itaparica.

As estimativas da correlação multiloco de paternidade ($\hat{r}_{p(m)}$) foi baixa e significativamente diferente de zero, sendo que a Pop. JB apresentou ($\hat{r}_{p(m)} = 0,162$) e a Pop. PB apresentou ($\hat{r}_{p(m)} = 0,117$). Resultados iguais foram observados na correlação uniloco de paternidade para a Pop. JB ($\hat{r}_{p(s)} = 0,162$) e baixa ($\hat{r}_{p(s)}$) para a Pop. PB ($\hat{r}_{p(s)} = 0,121$). Assim, a diferença entre a correlação uniloco e multiloco de paternidade ($\hat{r}_{p(s)} - \hat{r}_{p(m)}$) foi nula para Pop. JB ($\hat{r}_{p(s)} - \hat{r}_{p(m)} = 0,000$) e muito baixa para a Pop. PB ($\hat{r}_{p(s)} - \hat{r}_{p(m)} = 0,004$), sugerindo que as poucas árvores que polinizam as árvores matrizes da Pop. PB apresentavam certo grau de parentesco.

A estimativa de número de árvores que doaram pólen as árvores matrizes da Pop. JB foi de 6,17 e da Pop. PB foi de 8,26. Estes valores de árvores polinizadoras observado foi alto quando comparado com os resultados observados por Barreira et al. (2006) que de um total de 27 matrizes antes da exploração e 24 após a exploração da área, obteve uma média de 2,56 árvores polinizadoras. Estes valores confirmam que para as duas populações de *P. nitens* houve um alto índice de árvores polinizando as populações em estudo, isso ajuda a manter a estrutura populacional e a diversidade da espécie.

Tabela 4: Estimativas do sistema de reprodução e taxa de cruzamento para as duas populações de *Pterogyne nitens*.

Parâmetros	Populações	
	JB	PB
Número total de árvores matrizes (m)	10	10
Número total de progênies (n)	300	300
Taxa de cruzamentos multilocos: (\hat{t}_m)	1,000 (0,001)	1,000 (0,000)
Taxa de cruzamentos uniloco: (\hat{t}_s)	1,000 (0,000)	0,996 (0,001)
Taxa de cruzamento entre parentes: ($\hat{t}_m - \hat{t}_s$)	0,000 (0,001)	0,004 (0,001)
Correlação de paternidade multiloco: ($\hat{r}_{p(m)}$)	0,162 (0,028)	0,117 (0,020)
Correlação de paternidade uniloco: ($\hat{r}_{p(s)}$)	0,162 (0,019)	0,121 (0,010)
Cruzamento entre árvores doadoras de pólen parentes: ($\hat{r}_{p(s)} - \hat{r}_{p(m)}$)	0,000 (0,013)	0,004 (0,012)
Número médio de árvores doadoras de pólen: $\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_{p(s)}$	6,17	8,26
Proporção de irmãos-completos: $\hat{P}_{IC} = \hat{r}_{p(s)} \hat{t}_m$	0,162	0,121
Proporção de meios-irmãos: $\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m (1 - \hat{r}_{p(s)})$	0,838	0,879
Proporção de irmãos de autofecundação: $\hat{P}_{IA} = 1 - \hat{t}_m$	0,0	0,0

(entre parênteses esta o erro padrão da estimativa)

A proporção de irmãos completos na Pop. JB foi de 16,2% e de 12,1% na Pop. PB. Já a proporção de meios-irmãos na Pop. JB foi de 83,8% e de 87,9% na Pop. PB. Com estes resultados observou-se que não houve proporção de irmãos de autofecundação em nenhuma das populações podendo desta forma concluir que não ocorreu cruzamentos de autofecundação entre os indivíduos. Com estas estimativas pode-se confirmar que a espécie *P. nitens* é de reprodução mista, predominantemente alógama, confirmando com o sistema informado por Nogueira et al. (1986). Resultados semelhantes foram observados por Viegas (2009) nos estudos com *Myracrodruon urundeuva* que constatou na população de Aramina 15,7% das progênes eram parentes no grau de irmãos completos e 84,3% meios irmãos e na população de Selvíria a proporção de irmãos completos foi de 25% e 75% de meios-irmãos.

5 – CONCLUSÃO

- Os iniciadores SSR desenvolvidos para *P. nitens* com melhores perfis apresentados foram PN1, PN2, PN6, PN12, PN13 e PN19.
- Os locos apresentaram-se polimórficos para as duas populações.
- O índice de diversidade genética foi alto para as duas gerações das duas populações, embora exista endogamia na Pop. PB.
- As altas taxas de cruzamento multiloco e uniloco indicam que a espécie é de sistema misto de reprodução, predominantemente alógama.
- As árvores doadoras de pólen da Pop. PB apresentam certo grau de parentesco.
- Os iniciadores desenvolvidos contribuirão para novos estudos de análise de diversidade da espécie e auxiliarão em programas de conservação e melhoramento genético da espécie.

6 – REFERÊNCIAS

- ARAGAKI, S. **Florística e estrutura de trecho remanescente de floresta no planalto paulistano**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
- ARENS, P., DURKA, W., WERNKE-LENTING, J.H., SMULDERS, M.J.M. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Geum urbanum* (Rosaceae) and their transferability within the genus *Geum* **Molecular Ecology Notes**, v.4 , p.209 –212, 2004.
- AZEVEDO, V.C.R. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçaranduba – *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae**. 1992. 215f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- AZEVEDO, V.C.R.; KANASHIRO, M.; GRATTAPAGLIA, D.; CIAMPI, A.Y. Variabilidade no cpDNA em *Manilkara huberi*, espécie sob manejo sustentável na Amazônia brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.7, p.859-867, 2008.
- BARREIRA, S.; SEBBENN, A.M.; SCOLFORO, J.R.S.; KAGEYAMA, P.Y. Diversidade genética e sistema de reprodução em população nativa de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish sob exploração. **Scientia Forestalis**, n.71, p.119-130, 2006.
- BOLZANI, V.S.; GUNATILAKA, A.A.L.; KINGSTON, D.G.I. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **J. Nat. Prod.**, v.58, p.1683-1688, 1995.
- CAETANO, S.; SILVEIRA, P.; SPICHIGER, R.; NACIRI-GRAVEN, Y. Identification of microsatellite markers in a neotropical seasonally dry Forest tree, *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, n.1, p.21-23, 2005.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso de madeira**. Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1994. 640p.
- CAVERS, S.; NAVARRO, C.; LOWE, A.J. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. **Molecular Ecology**, v.12, p.1451-1460, 2003.

- CIAMPI, A.Y.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. 2000. Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites para *Copaifera Langsdorffii* Desf. (Copaíba)-Leguminosae-Caesalpinioideae e Otimização de Sistemas Fluorescentes de Genotipagem Multiloco. **Boletim de Pesquisa 16, Embrapa Cenargen**, Brasília DF, 2000. 40p.
- CIAMPI, A.Y.; AZEVEDO, V.C.R.; GAIOTTO, F.A.; RAMOS, A.C.S Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.1074-1077, 2008.
- CLOUTIER, D.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, v.16, p.797-809, 2007.
- COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v.83, p. 748-756, 1999.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, v.86, p.60- 67, 2001.
- CRIVOS, M.; MARTINEZ, M. R.; POCHETTINO, M. L.; REMORINI, C.; SY, A.; TEVES, L. Pathways as “signatures in landscape”: towards an ethnography of mobility among the *Mbya-Guaraní* (Northeastern Argentina) **J. Ethnobiology Ethnomedicine**, v.3, p.1-12, 2007.
- DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, J.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, v.8, p.1585-1592, 1999.
- EWING, B. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.**, v.8, p.186–194, 1998.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M.C., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research.**, v.8, p.175–185, 1998.
- FERREIRA, C.B.B.; LOPES, M.T.G; LOPES, R.; CUNHA, R.N.V.; MOREIRA, D.A.; BARROS, W.S.; MATIELLO, R.R. Diversidade genética molecular de progênies de dendezeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.3, p.378-384, 2012.

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed., Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, p.220, 1998.
- GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R.P.V. Microsatellite markers for Heart of Palm – *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Palmae). **Molecular Ecology**, v.1, n. 1-2, p. 86-92, 2000.
- GOLDSTEIN, B.D.; SCHLOTTERED, C. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, 2001, 352p.
- GRANDO, C. **Aspectos da demografia do cajueiro-do-campo (*Anacardium humile*) em áreas de Cerrado do Estado de São Paulo e construção de bibliotecas enriquecidas de microssatélites para a espécie**. 2009. 77f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- ISHIHATA, L. **Bases para seleção de áreas prioritárias para a implantação de unidades de conservação em regiões fragmentadas**. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- ITOMAN, M.K.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; CAVASSAN, O. Descrição de quinze espécies arbóreas de mata mesófila do estado de São Paulo ameaçadas de extinção. **Salusvita**, v.11, n.1, p.1-38, 1992.
- JACOB, H.J.; LINDPAINTNER, K.; LINCOLN, S.E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R.K.; MAO, Y.P.; GANTEN, D.; DZAU, V.J.; LANDER, E.S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, v.67, p. 213-224, 1991.
- KAGEYAMA, P.Y. Conservação “in situ” de recursos genéticos de plantas. **IPEF**, Piracicaba, v.1, n.35, p.7-37, 1987.
- LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, v.12, p.2875-2883, 2003.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. 2001. **Genetic data analysis: computer program for the analysis of allelic data**. Versão 1.0 Disponível em: <http://Lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.htm> Acesso em 09 fev 2010.
- LITT, M., HAUGE, X.; SHARMA, V. Shadows bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. **BioTechniques**, v.15, p.280–284, 1993.

- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992. 368p.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.15, n.3, p.65-95, 1984.
- MILLER, R.N.G.; PASSOS, M.A.N.; MENEZES, N.N.P.; SOUZA JR, M.T.; COSTA, M.M.C.C.; AZEVEDO, V.C.R.; AMORIM, E.P.; PAPAS JR. G.J.; CIAMPI, A.Y. Characterization of novel microsatellite markers in *Musa acuminata* subsp. *burmannicoides*, var.Calcutta. **BMC Research Notes**, v.3, 148-154, 2010.
- NEWTON, C.R.; GRAHAM, A. *PCR*. BIOS Scientific Publishers, **Oxford**, 2nd ed, p. 75–84, 1997.
- NOGUEIRA, J.C.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; MORAIS, E.; IWANE, M.S.S. Estudo de progênies e procedências de *Pterogyne nitens* Tul. **Boletim técnico do Instituto Florestal**, v.40, n.2, p.357-366, 1986.
- OLIVEIRA C.A.M.; SILVA E.F.; MOLICA S.G.; FERREIRA R.L.C.; LIRA D.A.S.; BARROS JÚNIOR J.A.B. Diversidade e estrutura genética em populações de *Caesalpinia echinata* (Lam.) na Estação Ecológica do Tapacurá, PE, **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.70, p.77-83, 2006.
- OLIVEIRA, L.M.T. et al. Diagnóstico de fragmentos florestais nativos, em nível de paisagem, Eunápolis-BA. **Revista Árvore**, Viçosa, v.21, n.4, p.511-520, 1997.
- OSTRANDER, E.A.; JONG, P.M.; RINE, J.; DUYK, G. Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequence. **Proceedings of the National Academy of the USA**, v.89, p. 3419-3423, 1992.
- PAETKAU, D. Microsatellites obtained using strand extension: Na enriched protocol. **Biotechniques**, v.26, p.690-697, 1999.
- PAULA, R.C. **Repetibilidade e divergência genética entre matrizes de *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae – Caesalpinioideae) por caracteres biométricos de frutos e de sementes e parâmetros da qualidade fisiológica de sementes**. Tese (Livre-Docente em Silvicultura), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 2007.
- PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina: E. Rodrigues, 2001. 328p.
- RAFALSKI, J.A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C. TINGEY, S.V. (1996) **Generating and using DNA markers in plants**. In: Non Mammalian Genomic Analysis: a Practical Guide (eds Birren B, Lai E), pp. 75–134, Academic Press, New York.

- RAPOSO A.; MARTINS K.; CIAMPI A.Y.; WADT L.H.O.; VEASEY E.A. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.9, n.42, p.1291-1298, 2007.
- REGASINI, L.O.; FERNANDES, D.C.; GAMBOA, I.C.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; BOLZANI, V.S. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Nova Química**, v.31, n.4, p. 802-806, 2008.
- REGASINI, L.O.; LOPES, A.A.; SILVA, D.H.S.; FURLAN, M.; YOUNG, M.C.M.; MARIA, D.A.; BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Antiproliferative affect of *Pterogyne nitens* on melanoma cells. **Revista Ciências Farmacológica Aplicada**, v.28, n.3, p.335-340, 2007.
- REIS, M.S. **Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitero (*Euterpe edulis* M.)**. Piracicaba, 1996. 210p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz . Universidade de São Paulo.
- RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, v.43, n. 4, p.848-859, 1989.
- RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR**. Version 3.1. University of British Columbia, Canada. Free program distributed by the authors from <<http://kritland@interchange.ubc.ca>>. 2002.
- RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, v.47, p.35-52, 1981.
- RODRIGUES, E. **Ecologia de fragmentos florestais no gradiente de urbano de Londrina**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.
- RODRIGUES, E.; CAMARA, C.D.; DIAS. A.T. Comparação entre os padrões espaciais de remanescentes florestais no gradiente urbano de Londrina. **Semina**, Londrina, v.16, n.1, p.34-39, 1995.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. *Iniciador3* on the for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ S, MISENER S (Eds) **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. New Jersey: Humana Press, p. 365-386, 2000.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- SEBBENN A.M.; ETTORI L.C. Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênes misto. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.22, n.13, p.201-211, 2001.

- SEBBENN, A.M.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; KAGEYAMA, P.Y.; JUNIOR, O.J.D.; Variação genética entre e dentro de populações de amendoim – *Pterogyne nitens*. **Scientia Forestalis**, n.56, p. 29-40, 1999.
- SILVA, E. Diagnóstico de fragmentos florestais nativos, em nível de paisagem, Itabira-MG. **Revista Árvore**, Viçosa, v.21, n.4, p.521-526, 1997.
- SILVA, M.B.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; THOMPSON, I.; SEBBENN, A.M. Genetic effects of selective logging and pollen gene flow in a low-density population of the dioecious tropical tree *Bagassa guianensis* in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, v.255, p.1548-1558, 2008.
- SIQUEIRA, A.C.M.F.; NOGUEIRA, J.C.B. Essências brasileiras e sua conservação genética no Instituto Florestal de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, v.4, p.1187, 1992.
- STOTHARD, P. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **Biotechniques**, v.28, p.1102-1104, 2000.
- TABANEZ, A.A.J.; VIANA, V.M.; DIAS, A.S. Conseqüências da fragmentação e do efeito de borda sobre a estrutura, diversidade e sustentabilidade de um fragmento de floresta de planalto de Piracicaba, SP. **Revista Brasileira de Biologia**, Piracicaba, v.57, n.1, p.47-60, 1997.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.** v.17, p.6463–6471, 1989.
- TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatélites in diferente eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v.10, p. 967-81, 2000.
- VENCOVSKY R. Variance of an estimate of the outcrossing rate. **Brazilian Journal of Genetics**, v.17, p.349-351, 1994.
- VENCOVSKY R.; CROSSA J. Measurements of representativeness used in genetic resources conservation and plant breeding. **Crop Science**, Madison, v.43, p.1912-1921, 2003.
- VIANA, V.M. Biologia de manejo de fragmentos de florestas naturais. In: **CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO**, 1990, Campos do Jordão. *Anais...* Campos do Jordão: Sociedade Brasileira de Silvicultura/Sociedade Brasileira de Engenheiros Florestais, p.155, 1990.
- VIANA, V.M.; TABANEZ, A.A.J.; MARTINEZ, J.L.A. Restauração e manejo de fragmentos florestais. In: **CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS**, 2, 1992, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Instituto Florestal de São Paulo, p.400-407, 1992.

- VIEGAS, M.P. **Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* fr. All., sob diferentes tipos de perturbação antrópica.** 2009, 69f. (Dissertação) Faculdade de Engenharia de Ilha solteira – UNESP – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Ilha Solteira-SP, 2009.
- WALSH, P. S., FILDES, N. J.; REYNOLDS, R. Sequence analysis and characterization of stutter at the tetranucleotide repeat locus vWA, **Nucleic Acids Research**, v.43, p.854-870, 1996.
- WEBER, Z.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **Annual Journal of Human Genetics**, v.44, p.388-396, 1989.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis II – Methods for discrete Population Genetic Data.** 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.
- YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, v.11, p.413-418, 1996.
- YOUNG, A.G.; BOYLE, T.J. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest conservation genetics: principles and practice.** Oxford: Csiro, p.123-134, 2001.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p. 1-16, 2002.