
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DAYANE PIRES DA SILVA

**“VARIABILIDADE E DIVERSIDADE
GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Ocotea notata*
(NEES & MART.) MEZ (LAURACEAE)”**

DAYANE PIRES DA SILVA

VARIABILIDADE E DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
Ocotea notata (NEES & MART.) MEZ (LAURACEAE)

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luís Rodrigues de Moraes

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2014

581.15 Silva, Dayane Pires da
S586v Variabilidade e diversidade genética de populações de
Ocotea notata (Nees & Mart.) Mez (Lauracea) / Dayane Pires
da Silva. - Rio Claro, 2014
33 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro

Orientador: Pedro Luís Rodrigues de Moraes

1. Genética vegetal. 2. Ecologia vegetal. 3. Filogenética. 4.
Conservação. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, aos meus pais por tudo que fizeram por mim, por todo carinho e dedicação que tiveram e têm comigo. Agradeço por tudo que eles me ensinaram e que vai além de qualquer aprendizado acadêmico, e que graças ao esforço e incentivo deles eu consegui concluir mais uma etapa na minha, serei eternamente grata aos meus pais, sem eles esses 5 anos de faculdade não seriam possível. Obrigada Mãe Dulce e Pai Toninho, amo vocês! Agradeço a minha irmãzinha caçula, que mesmo com os nossos 5 anos de diferença de idade, aprendi muito com ela, tenho a melhor irmã de todas! Obrigada Dani por todos os nossos momentos juntas durante esses 20 anos, por todas as risadas, todas as conversas, todas as brigas, todos os conselhos e apoio que você sempre me deu. Amo você, “é nós que tá Bili”!

Esse trabalho pode ser finalmente um dia finalizado graças a uma pessoa, que há um pouco mais de um ano faz parte da minha, meu namorado Mateus, agradeço a você pelo seu esforço em entender biologia, pela sua paciência em me explicar óbvio e pelo seu apoio dado nos momentos de desespero. Obrigada por todas as vezes que você leu o meu trabalho, por todas as dicas e ideias para melhorá-lo. Muito obrigada por estar ao meu lado nessa etapa da minha vida, novas etapas virão para enfrentarmos juntos, amo você!

Quero agradecer a toda a minha família, meus avós, minhas tias e tios, primas e primos, por serem pessoas que sempre acreditaram na minha capacidade e sempre me deram incentivo e apoio, agradeço a todos pelo carinho.

Durante esses 5 anos fiz amizades que levarei para a vida toda, e sou muito grata a elas. Obrigada Família/Carioca, pelas risadas, pelas comidas, pela companhia, pelo seu computador para eu transformar os meus arquivos em pdf, obrigada por sempre estar presente no meu dia-a-dia durante esses anos todos, tudo teria sido diferente se não tivesse você por perto, a sua alegria contagia e não poderia ter pessoa melhor para eu dividir os meus momentos, muito obrigada de coração! Nati e Pri, obrigada amigas queridas, se não tivesse conhecido vocês durante todo esse tempo de graduação, não sei como teria sido. Todas as aulas, trabalhos, provas, festas, tudo seria 100% sem graça, agradeço a toda ajuda que vocês sempre me deram, vocês são as melhores, minhas companheiras de todas as horas, amo muito vocês, sinto saudades da graduação por não poder ver vocês todos os dias, mas sei que a nossa amizade é pra sempre, independente onde cada uma esteja. Agradeço a todos os brothers, porque brother é brother e o resto vocês sabem, obrigada Miguxo, Rosca, Socorro, Kendi, Chico Bento, obrigada pelas carona, pelas risadas, por todos os momentos compartilhados, vocês sabem que podem contar sempre comigo, agradeço a amizade de vocês!

Agradeço aos meus queridos da CF'13, por toda companhia durante todo o tempo de comissão de formatura, e ainda não acabou, e a nossa amizade é pra sempre, os amigos de verdade sabem, já os colegas não farão falta.

Agradeço ao Prof. Dr. Pedro L. R. de Moraes por ter coletado todas as populações analisadas, bem como por ter feito as extrações de DNA e testes dos *primers* utilizados, além de fornecer as fotos dos locais e das plantas aqui apresentadas, e também por todas as correções e contribuições feitas neste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Maurício Bacci Jr., por ter disponibilizado a infraestrutura do Laboratório de Evolução Molecular, necessária para os trabalhos laboratoriais, bem como o uso de reagentes para as análises. Ao Prof. Dr. Cassio van den Berg, UEFS, por ter fornecido os *primers* de ISSR. Agradeço a todo pessoal do LEM, Miagui, Milene, Suzana, Carol, Cíntia e Franco.

Agradeço à PROPe- UNESP, pelo financiamento parcial do projeto submetido ao Edital 005/2011, pelo Prof. Dr. Pedro Luís Rodrigues de Moraes, o qual permitiu a realização do presente trabalho.

RESUMO

O presente trabalho analisou os parâmetros genéticos populacionais de variabilidade e diversidade genética de diferentes populações de *Ocotea notata* (Nees & Mart.) Mez, através de marcadores de DNA do tipo ISSR (*Inter Single Sequence Repeats*). Para tanto, foram amostrados 243 indivíduos de 12 populações selecionadas na Bahia e Espírito Santo, que ocorrem em campos rupestres e vegetações de restinga, a saber, morfotipos de *Ocotea glaucina* (Meisn.) Mez: Morro do Chapéu: populações do Tabuleiro dos Guaribas, Ferro Doido, Cria Bode e Lajes; Umburanas; Jacobina; Lençóis: população da Serra das Paridas, e os morfotipos de *O. notata*, Esplanada: população de Baixios; Salvador: população das Dunas do Abaeté, Alcobaça, Mucuri, e Vila Velha, ES: população de Jacarenema. O DNA total já se encontrava extraído e quantificado em gel de agarose. Foram testados 20 *primers* de ISSR (University of British Columbia), dos quais quatro apresentaram resultados adequados para as análises, a saber: *Manny, Mao, John e UBC 844*. A otimização dos protocolos de reações de PCR foi feita no Laboratório de Evolução Molecular, da UNESP de Rio Claro, com a execução das reações de PCR para cada um dos *primers*, para cada população, e subsequentemente foram feitas as análises dos resultados sob o arcabouço teórico-metodológico da genética de populações. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) indicou que 23% da variabilidade ocorre entre populações dentro de regiões e 76% entre indivíduos dentro de populações, com variação significativa de 1% ocorrendo entre regiões (populações de Restinga vs. Campos Rupestres).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Coleta do material e amostragem	10
3.2 Extração do DNA e purificação das amostras	13
3.3 Reação de PCR e eletroforese	14
3.4 Análise dos dados	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5 CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	23

1. INTRODUÇÃO

A família Lauraceae é relativamente grande, englobando ca. 52 gêneros e 2.500-3.500 espécies, predominantemente de árvores e arbustos (VAN DER WERFF & RICHTER, 1996; ROHWER, 1993a, 1993b). Sua distribuição é pantropical, sendo bem representada nas regiões tropicais das Américas e da Ásia, e também com um número bastante grande de espécies na Austrália e Madagascar; porém é pobremente representada na África.

Estima-se que o número de espécies neotropicais existentes de Lauraceae esteja em torno de 700 a 800 (VAN DER WERFF, 1988), distribuídas em 31 gêneros (VAN DER WERFF, 1991). Segundo Quinet *et al.* (2014) aproximadamente 23% das espécies neotropicais ocorrem no Brasil, o que corresponde a um total de 439 espécies pertencentes a 24 gêneros.

No Brasil, as espécies de Lauraceae conhecidas pelos nomes vulgares de canelas, louros, paus-rosa, e embuias são referenciadas por inúmeros autores por apresentarem diversas formas de utilização, tais como: o fornecimento de madeira para os mais variados fins, a extração de óleos essenciais com finalidades diversas, pela existência de princípios medicinais e ação farmacológica, pelo uso por populações indígenas, para reflorestamento, adensamento e enriquecimento vegetal, para cultivo em jardim botânico, alimentação de aves e mamíferos, como inibidores de germinação de sementes, repelentes de insetos, atividade antimicrobiana, e para arborização urbana (MORAES, *com. pess.*; BARBOSA *et al.*, 2012).

Apesar de sua importância, as Lauráceas são em relação à sua classificação e número de espécies ainda pouco conhecidas. A falta de conhecimento do número de espécies e de sua distribuição deve-se ao fato de muitas delas serem árvores altas com flores pequenas, inconspícuas, difíceis de serem localizadas e coletadas (HAMMEL, 1986).

Aliada à dificuldade de se classificar e identificar as espécies de Lauraceae há também uma escassez de trabalhos sobre genética de populações de espécies brasileiras da família, que se assentam praticamente aos desenvolvidos através de isoenzimas para espécies de *Cryptocarya* por Moraes (1997), Moraes & Derbyshire (2002, 2003, 2004), Moraes & Monteiro (2002), e Moraes *et al.* (1999, 2002, 2004); para *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer por Kageyama *et al.* (2003); para *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso por Daros (2006) e Bittencourt (2007); e para *Ocotea catharinensis* Mez por Tarazi (2006), Tarazi *et al.* (2009) e Moraes (dados não publicados).

O gênero *Ocotea* foi descrito por Aublet (1775) tendo como espécie-tipo *Ocotea guianensis* Aubl. Esse gênero é composto por mais de 300 espécies, sendo considerado o

maior no Neotrópico. Estima-se que 120 a 160 espécies ocorram no Brasil (VAN DER WERFF, 1991; BAITELLO, 2001).

Algumas espécies do gênero *Ocotea* vêm sendo intensamente utilizadas como fonte de safrol, que tem atividade antibacteriana. Apesar da grande importância deste gênero, pouco ainda se conhece sobre os constituintes e a atividade biológica de *Ocotea notata*, uma das espécies que têm a presença de safrol (GARRETT *et al.*, 2007b), tornando-a atrativa para novas pesquisas a seu respeito, em particular para fins de conservação.

Ocotea notata é uma espécie conhecida vulgarmente como “canela”, podendo ser encontrada principalmente nas regiões de restinga arbórea ao longo do litoral brasileiro (QUINET & ANDREATA, 2002). É uma árvore que pode chegar a 15 metros de altura, com período de floração entre fevereiro e março e de frutificação nos meses de maio, junho e novembro. Pode ser encontrada ao longo da costa atlântica brasileira, desde Sergipe até o Paraná, ocorrendo com maior frequência nas áreas de restingas, mas também nas Florestas de Tabuleiro e na Floresta Pluvial Atlântica Montana e Baixo Montana (QUINET, 2002).

Na literatura, informações sobre *Ocotea notata*, ou de seus sinônimos, são relativamente escassas, destacando-se as relacionadas à anatomia foliar (COUTINHO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007), anatomia de sementes (RIBEIRO, 2006), formação de galhas nas folhas por Hemíptera (BREGONCI *et al.*, 2010), experimentos de germinação de sementes (BRAZ & MATTOS, 2010), e os trabalhos relacionados a aspectos ecológicos e/ou fitoquímicos (SILVEIRA *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2006; VIANA *et al.*, 2006; GATTI *et al.*, 2006a, b; GARRETT *et al.*, 2007a, b, 2009, 2010; BOTELHO *et al.* 2009; GOMES *et al.*, 2008a, b, 2010).

Os indivíduos, que na maioria das vezes são únicos geneticamente, formam populações que têm como uma de suas principais características a variabilidade. Uma população vista sob um contexto genético (população mendeliana) é um grupo de indivíduos da mesma espécie que interage reprodutivamente, ou seja, têm possibilidade real e potencial de troca de genes. Da mesma forma, vista sob um contexto ecológico, seria um grupo de indivíduos da mesma espécie que interage ecologicamente, normalmente ocupando um mesmo hábitat, competindo por espaço, recursos, etc. (SNAYDON, 1987).

O conhecimento da estrutura genética de populações de espécies arbóreas tropicais pode ajudar na explicação da evolução da alta diversidade encontrada nos trópicos e na elaboração de estratégias adequadas de conservação e manejo das florestas (EGUIARTE *et al.*, 1992; MORAES *et al.*, 1999). No entanto, a diversidade genética dessas espécies vem

sendo ameaçada pelo desmatamento, pela atividade madeireira e pela ocupação humana. As consequências do desmatamento sobre a perda da biodiversidade ao nível específico são bem conhecidas e têm recebido atenção considerável (CHASE *et al.*, 1995). Porém, pouco se sabe sobre a perda de diversidade genética dentro das espécies, em decorrência dos efeitos do desmatamento, uma vez que este pode reduzir o tamanho populacional ou eliminar populações locais (HALL *et al.*, 1994; YOUNG *et al.*, 1996).

Sob um ponto de vista evolutivo básico, os estudos sobre a distribuição da variabilidade genética em espécies tropicais podem elucidar como os mecanismos de polinização, dispersão de sementes e fecundidade, e outras características da história vital interagem na moldagem da estrutura genética dessas populações (SCHIERENBECK *et al.*, 1997; MASSEY & HAMRICK, 1998; ROCHA & LOBO, 1998; SONG *et al.*, 1998; MORAES *et al.*, 1999, 2002; MORAES & MONTEIRO, 2002; MORAES & DERBYSHIRE, 2002, 2003, 2004). A importância da estrutura genética na promoção e direcionamento de modificações evolutivas é claramente evidenciada através dos correntes esforços destinados à conservação genética (FOSTER & SORK, 1997). De forma a se ter decisões satisfatórias sobre os procedimentos de amostragem visando à preservação de níveis máximos de diversidade genética, os pesquisadores devem conhecer como está distribuída a variabilidade genética de uma espécie, assim como devem estimar sua estrutura genética (LOVELESS & HAMRICK, 1984; MAHY *et al.*, 1997; POLAK & SABOR, 1997, 1998; SONG *et al.*, 1998).

Em revisão sobre o padrão de diversidade genética em populações naturais de plantas, a partir de análises disponíveis de 30 anos, Gray (1996) concluiu que a diversidade genética, na maioria das plantas, relaciona-se com a variabilidade ambiental, especificamente o hábitat. Esta predominância de correlações encontradas entre genótipo-ambiente faz com que as estratégias para a conservação da diversidade genética envolvam amostragem ou esquemas de proteção que sejam estratificados ao longo dos ambientes ou tipos de hábitat. A resposta genética das populações das espécies aos seus ambientes é afetada, ou compelida, por uma série de propriedades biológicas intrínsecas, tais como o sistema reprodutivo, e processos externos, tais como aqueles que causam flutuações no tamanho populacional.

O estudo da diversidade genética em populações compreende a descrição dos níveis de variabilidade genética mantida dentro das populações e como esta se encontra dividida entre e dentro das mesmas (HAMRICK, 1983). Com o passar do tempo, a estrutura genética é resultado da constante reprodução, da dispersão e da sobrevivência dos indivíduos de uma população. Por isso, é importante mesclar o conhecimento do sistema de cruzamento e

reprodução, a história de vida e os fatores ecológicos das populações (LOVELESS *et al.*, 1998).

Os estudos da estrutura genética são fundamentados no teorema de Hardy-Weinberg. Este teorema considera que, em uma população de tamanho muito grande (infinito), na qual ocorrem cruzamentos ao acaso, as frequências gênicas são genotípicas e permanecem constantes de geração em geração, isto é, considerando a ausência de migração, seleção e deriva. Seguindo este princípio, é possível o cálculo teórico da frequência de um determinado genótipo (FUTUYMA, 2002).

A variação genética é um dos fatores fundamentais para que ocorra evolução, pois a seleção natural atua nas diferenças que ocorrem dentro das populações (TORGGLER *et al.*, 1995). Quanto maior a variabilidade genética na população, maiores serão as chances de sucesso com relação às mudanças no ambiente (FLEISHMAN *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2001).

A quantificação da variabilidade genética pode ser feita a partir de medidas de diversidade intrapopulacional e interpopulacional, que poderão ser estimadas a partir de dados de marcadores moleculares, como a porcentagem de locos polimórficos e a heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg (BERG & HAMRICK, 1997; CAVALLARINETO, 2004).

De acordo com Bornet & Branchard (2001), desde meados dos anos 1980, a identificação e seleção genômica progrediu rapidamente com o auxílio da tecnologia de amplificação em cadeia utilizando-se uma DNA polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). Um grande número de protocolos de marcadores que são rápidos e que requerem apenas quantidades mínimas de DNA foi desenvolvido. A escolha por um marcador molecular depende de sua reprodutibilidade e simplicidade. Desde 1994, uma nova técnica de marcador molecular chamada de *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) está disponível (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994). ISSRs são marcadores semiarbitrários, amplificados por PCR na presença de um iniciador (*primer*) complementar a um microssatélite marcado. A amplificação na presença de *primers* não ancorados também tem sido chamada de *Microsatellite-primed PCR*, ou MP-PCR (MEYER *et al.*, 1993). Tal amplificação não requer informação de sequência genômica e leva a padrões multilocos e altamente polimórficos (ZIETKIEWICZ *et al.*, 1994; TSUMARA *et al.*, 1996; NAGAOKA & OGIHARA, 1997). Cada banda corresponde a uma sequência de DNA delimitada por dois microssatélites invertidos. Como RAPDs, marcadores ISSRs são rápidos e fáceis de trabalhar, mas parecem ter a reprodutibilidade de marcadores SSRs devido ao maior comprimento de seus *primers*

(amplificação de regiões entre 100-3000 pb) (GUASMI *et al.*, 2006). Com tais características, ISSR é um dos melhores marcadores moleculares para se investigar a variabilidade genética entre indivíduos estreitamente relacionados (NYBOM, 2004; DJÉ *et al.*, 2006).

Rohwer (1986) sinonimizou *Ocotea glaucina* (Meisn.) Mez em *O. notata*. Tal sinonimização baseou-se principalmente na semelhança morfológica das flores desses táxons, que apresentam distribuição respectivamente em áreas de campos rupestres e em restingas. No presente trabalho, além da descrição dos parâmetros básicos de variabilidade genética populacional de *Ocotea notata* sensu Rohwer (1986), verificou-se a pertinência, ou não, da sinonímia proposta, através da Análise de Variância Molecular para as populações amostradas em Campo Rupestre (*O. glaucina*) e em Restinga (*O. notata*).

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é estudar a estrutura genética de populações de *Ocotea notata* (Nees & Mart.) Mez, por ser uma espécie de ampla distribuição geográfica e abundância em diferentes ecossistemas. Também, objetivou-se a verificação da sinonímia proposta de *Ocotea glaucina* e *O. notata* como sendo um mesmo táxon, a partir de amostragem respectiva às mesmas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta do material e Amostragem:

O material utilizado neste trabalho consta de folhas de árvores adultas de populações de *Ocotea notata* (Nees & Mart.) Mez sensu Rohwer (1986), que foram coletadas de um ramo foliar portador de folhas maduras e saudáveis (Figura 1).

As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos com sílica-gel, e em microtubos com gel de CTAB (35% NaCl e 3% CTAB). Testes preliminares foram feitos para a extração de DNA total a partir das folhas desidratadas em sílica-gel, ou conservadas em gel de CTAB (protocolo adaptado de DOYLE & DOYLE, 1987, 1990). Esse último procedimento apresentou melhores resultados (qualitativa e quantitativamente) do que os obtidos para folhas desidratadas em sílica-gel, passando, portanto, a ser o material utilizado nas extrações.

A amostragem populacional foi de 243 indivíduos de 12 populações selecionadas na Bahia e Espírito Santo, com cerca de 20 indivíduos de cada população, a saber: 1) Morfótipos de *Ocotea glaucina* (Meisn.) Mez: Morro do Chapéu: populações do Tabuleiro dos Guaribas (N=20), Ferro Doido (N=20), Cria Bode (N=20), e Lajes (N=20); Umburanas (N=17); Jacobina (N=20); Lençóis: população da Serra das Paridas (N=20); Morfótipos de *O. notata*: Esplanada: população de Baixios (N=26); Salvador: população das Dunas do Abaeté (N=20); Alcobaça (N=20); Mucuri (N=18); e Vila Velha, ES: população de Jacarenema (N=22). Vouchers das populações estão depositados em HUEFS. Na Figura 2, apresenta-se o mapa das populações amostradas, bem como fotos da maior parte dos locais.

Figura 1: Fotos de ramos foliares, flores e frutos de *Ocotea notata* (Nees & Mart.). Mez.



Detalhe de indivíduo com folhas jovens. Cria Bode, Morro do Chapéu, Bahia



Detalhe de flores na antese. Guaribas, Morro do Chapéu, Bahia



Detalhe de indivíduo com inflorescências. Lajes, Morro do Chapéu, Bahia



Detalhe de inflorescência. Jacarenema, Vila Velha, Espírito Santo

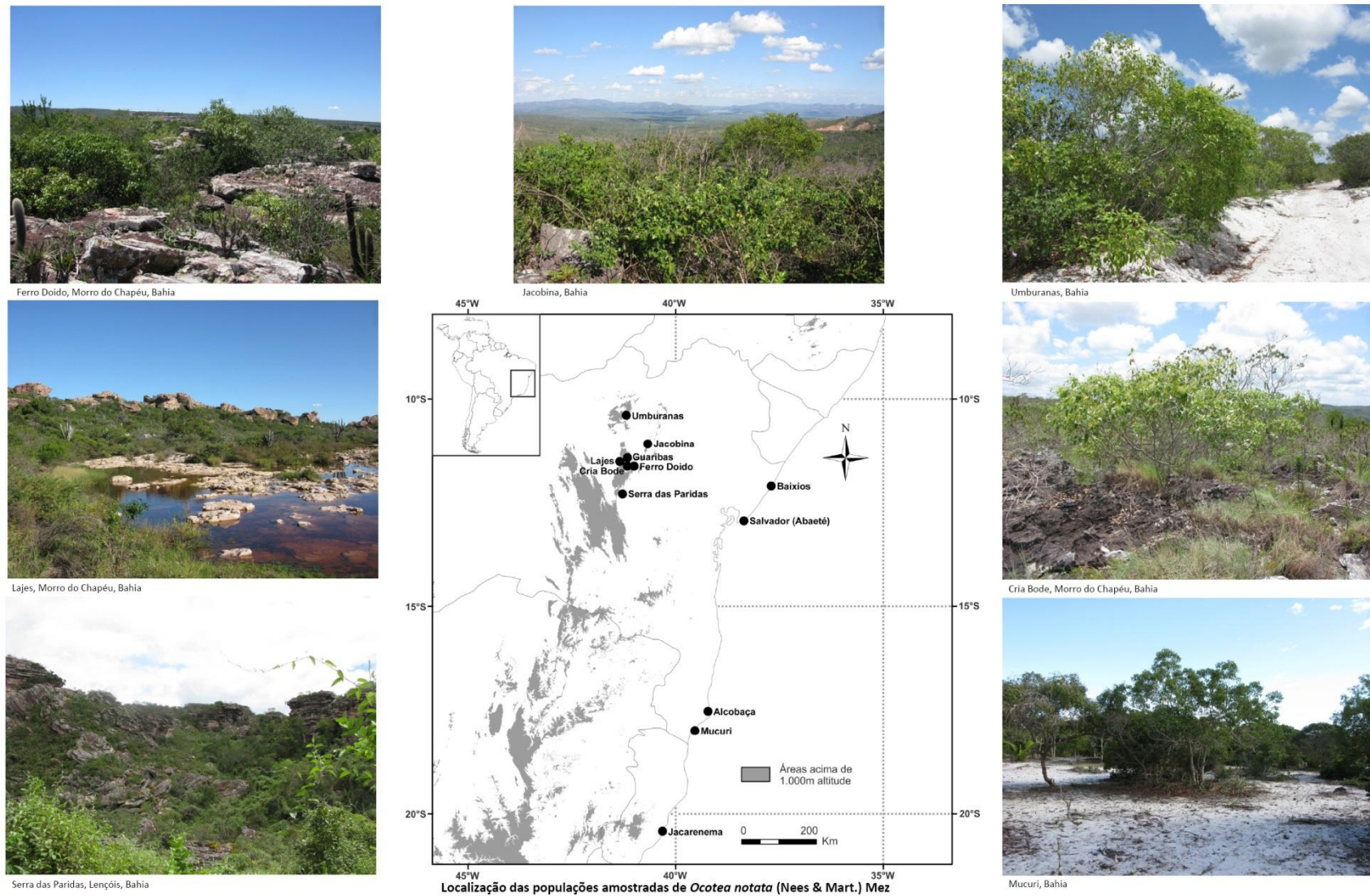


Detalhe de indivíduo com frutos jovens. Baixios, Esplanada, Bahia



Detalhe de frutos dispersando. Ferro Doido, Morro do Chapéu, Bahia

Figura 2: Mapa das populações amostradas de *Ocotea notata* (Nees & Mart.) Mez, com fotos de alguns dos locais (Fotos: P. Moraes).



3.2. Extração do DNA e purificação das amostras:

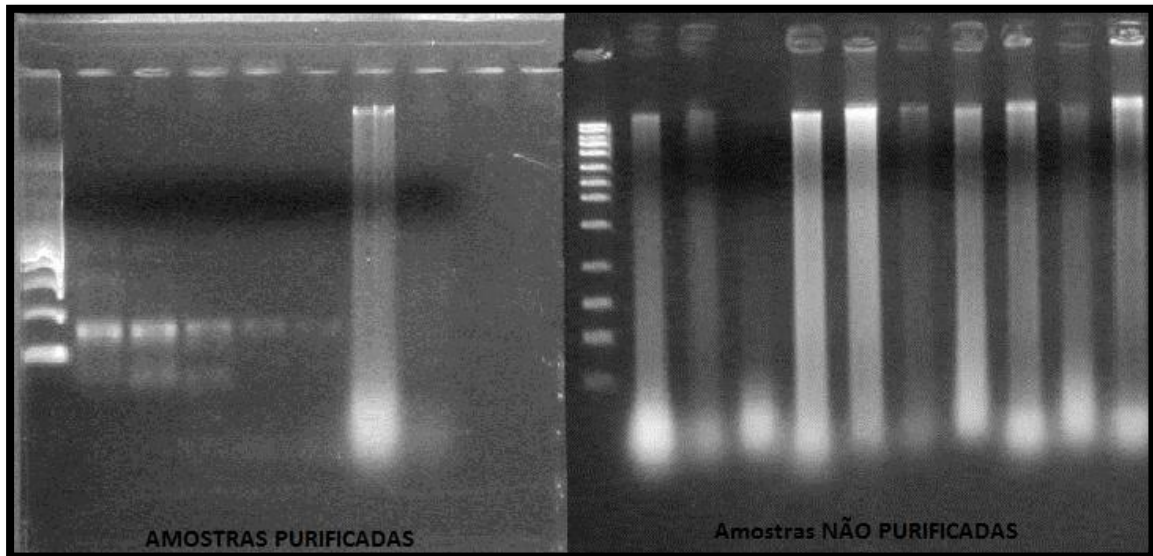
O DNA total já havia sido extraído e quantificado através de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão borato de sódio (SB) (BRODY & KERN, 2004), corado com brometo de etídio na presença do marcador *Lambda Hind III*, posteriormente fotografado com o sistema Kodak EDAS 1D 3.6., no Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas (LAMOL), da Universidade Estadual de Feira de Santana (MORAES, *com. pess.*).

As amostras do DNA total que se encontravam extraídas e quantificadas tinham aspecto viscoso e com coloração escura, devido a grande concentração de mucilagem, o que dificultava a pipetagem e diluição das amostras para serem posteriormente amplificadas. Com isso foi realizado um teste para purificação do DNA. O protocolo de purificação se resumiu em lavar a amostra com 1 volume de fenol, agitadas por inversão por 15 minutos e depois centrifugadas a 12480g por 7 minutos; depois da centrifugação, o sobrenadante era transferido para um tubo novo e então era acrescentado 1 volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (24:24:1) e novamente centrifugado. O sobrenadante então era transferido para outro tubo, onde era adicionado 0,1 volume de Acetato de Sódio 3M (pH 5,2) e 2 volumes de Isopropanol 100%, gelado, ficando armazenado *overnight* à -20°C. Depois disso, os sobrenadantes eram descartados e os *pellets* eram lavados com 500 ml de Isopropanol 100%, gelado em que, após a centrifugação, os sobrenadantes eram descartados e as amostras eram deixadas para secar a temperatura ambiente.

Foram testadas 10 amostras com o protocolo de purificação. Comparando-se as reações de PCR das 10 amostras purificadas com as mesmas não purificadas, verificou-se que as primeiras apresentavam uma melhor amplificação. Na figura 3, apresentam-se fotos de dois dos géis dos testes de purificação das amostras, em que é possível visualizar as diferenças entre as purificadas e não purificadas, pela diminuição dos arrastos.

Depois de verificado que com as amostras purificadas se obtém um melhor resultado, decidiu-se que todas elas passariam por esta mesma purificação. Desse modo, todas as amostras de todas as populações utilizadas neste trabalho foram purificadas de acordo com o protocolo mencionado anteriormente.

Figura 3: Fotos de géis das reações de PCR comparando as amplificações das amostras purificadas com as não purificadas.



3.3. Reações de PCR e Eletroforese:

O DNA genômico total utilizado foi amplificado através de reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), seguindo-se o protocolo modificado de Wolfe *et al.* (1998). As reações foram preparadas em microplacas para PCR (PCR-96-MARCA), sendo adicionado, em cada poço, um volume de 1 μ l do DNA genômico diluído 1:100. Às amostras de DNA foram acrescentadas 17 μ l de um Mix de reagentes contendo, 2,0 μ l de solução tampão 10x; 1,8 μ l de dNTPs (2 mM); 0,5 μ l *primer* (10 pM/ μ l); 0,2 μ l de *Taq* DNA polimerase (5U/ μ l) com MgCl₂ (50mM) e 12,50 μ l de água ultrapura autoclavada.

O protocolo foi ajustado a partir de alguns testes: primeiro foi realizado um teste de diluição do DNA das amostras, com as amostras diluídas em 01h10min, 01h50min e 01h10min, sendo o último valor o que apresentou o melhor resultado.

Foram testados no Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas (LAMOL), da UEFS, 20 *primers* de ISSR, dos quais nove apresentaram resultados adequados para as análises, a saber: *John*, *Manny*, *Mao*, *R7*, *UBC 814*, *UBC 844*, *UBC 898*, *UBC 899* e *UBC 901* (obtidos da University of British Columbia, Canadá) (Moraes, *com. pess.*). Desses últimos, apenas os *primers John*, *Manny*, *Mao* e *UBC 844* (Tabela 1) apresentaram resultados positivos sob as condições do Laboratório de Evolução Molecular, da UNESP de Rio Claro.

Foram testadas duas marcas de *Taq* DNA polimerase: a *Taq* da Phoeutria, que necessita da adição de 1 μ l de MgCl₂ (25mM), e a *Taq* da DreamTaq, que em sua composição

já se encontra o $MgCl_2$. Após o teste ficou definido que a DreamTaq seria a utilizada, pois o resultado da amplificação foi positivo para todos os quatro *primers* utilizados, diferente da Taq da Phoeutria, que não funcionou para alguns deles.

As reações de PCR foram feitas em um termociclador, começando com um ciclo de desnaturação de 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 45°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Após os ciclos, outras duas variações foram acrescentadas: a primeira de 94°C e a segunda de 44°C, ambas por 45 segundos, seguidas por uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos das reações de PCR foram separados e submetidos à eletroforese, em cuba horizontal através de gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-Borato EDTA), a uma voltagem de 95V, por uma hora e meia. Foi utilizado *GelRed* [1:500] como corante de DNA, junto com o tampão de amostra (*Loading Buffer*), composto por glicerol (50%), azul de bromofenol (0.125%), xileno cianol (0.125%) e TE pH8,0. Foram aplicados no gel, 2 μ l do produto da PCR juntamente com mais 2 μ l de *GelRed* mais *Loading Buffer*, na presença de marcador *ladder* de 100 pares de bases. As bandas foram visualizadas em transluminador UV (Ultra-Lum – Electronic MultiWaveTM Translluminator) e documentadas com câmera fotográfica Canon G15.

3.4. Análise dos Dados:

A partir da leitura das fotografias dos géis, foram considerados apenas os fragmentos intensos e evidentes (bandas), sendo descartados aqueles com baixa definição. Deste modo, os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e a ausência (0) de fragmentos, gerando uma matriz binária.

A variabilidade genética dentro e entre populações foi estimada através dos parâmetros: número de alelos observados (N_a), número efetivo de alelos (N_e) (KIMURA & CROW, 1964), heterozigosidade esperada (H_e) (NEI, 1973), índice de Shannon (I) (LEWONTIN, 1972); percentual de locos polimórficos (P). Também foi calculado Φ_{pt} via AMOVA (Análise de Variância Molecular; WEIR & COCKERHAM, 1984; EXCOFFIER *et al.*, 1992; PEAKALL *et al.*, 1995; MICHALAKIS & EXCOFFIER, 1996; WEIR, 1996; MAGUIRE *et al.*, 2002).

Esses parâmetros foram calculados através do programa *Genetic Analysis in Excel - GenAIEx 6.5* (FLANAGAN, 2005; PEAKALL & SMOUSE, 2006, 2007). As análises foram

feitas para as 12 populações, incluindo aquelas que não apresentaram resultados para alguns locos. Através do programa POPGENE versão 1.32 (YEH & BOYLE, 1997; YEH *et al.*, 1997, 1999; LABATE, 2000), foi computada a distância genética de Nei (1978) e gerado um dendrograma.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 4 *primers* utilizados geraram um total de 105 locos, para serem analisados em 243 indivíduos, pertencentes às 12 populações. Porém, após uma análise inicial da matriz de dados, foi verificado que um dos *primers*, o *John* continha uma grande quantidade de dados perdidos (x%). Com isso, foi descartado o primer John, a partir de então foram analisados 79 locos. A tabela 1 mostra as sequências de cada um dos *primers* que foram analisados e a quantidade de locos que cada um apresentou.

Tabela 1: Nomes dos *primers* e as suas respectivas sequências e número de bandas.

Nome do <i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Número de Bandas
MANNY (CAC)4- RC	CAC CAC CAC CAC RC	28
MAO (CTC)4- RC	CTC CTC CTC CTC RC	27
UBC 844 (CT)8- RC	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	24
TOTAL		79

Os géis feitos a partir dos produtos das reações de PCR foram visualizados em transluminador UV e documentados por fotografias. As Figuras 4, 5, 6 e 7, mostram os resultados de um dos géis que foram feitos para cada *primer*.

Na Tabela 2, são apresentadas as estimativas dos parâmetros básicos populacionais para as 12 populações. O número de alelos observados (N_a) e o número efetivo de alelos (N_e) variaram de 0,73 (Mucuri) a 1,65 (Abaeté), e de 1,15 (Alcobaça) a 1,49 (Abaeté), respectivamente, com uma média total de 1,19 para (N_a) e 1,35 para (N_e).

Figura 4: Foto do gel mostrando o resultado da amplificação feita com o *primer Manny* para a população de Baixios.

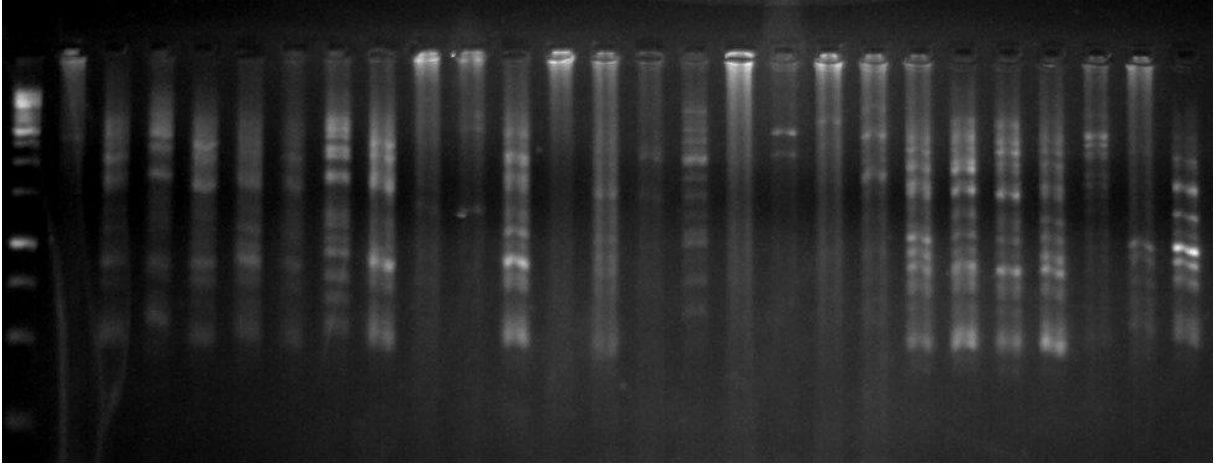


Figura 5: Foto mostrando o resultado da amplificação feita com o *primer Mao* para a população de Lajes.

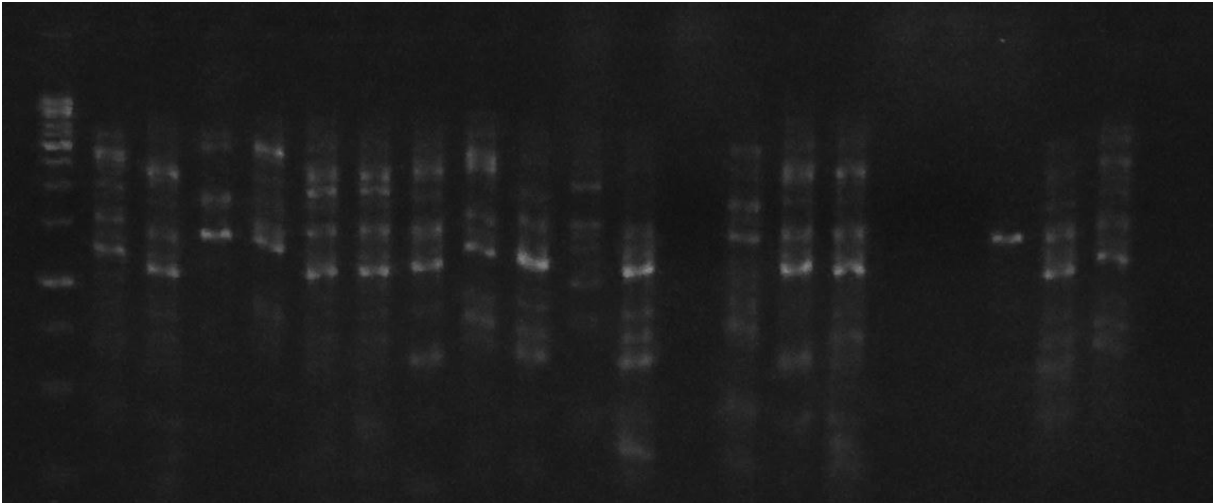


Figura 6: Foto mostrando o resultado da amplificação feita com o *primer John* para a população de Lajes.

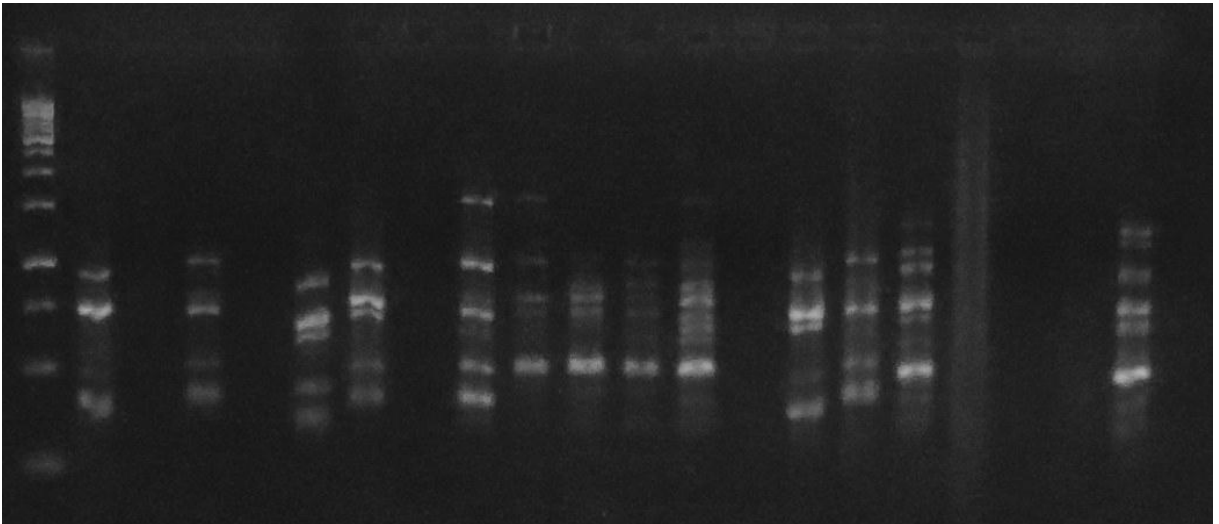


Figura 7: Foto mostrando o resultado da amplificação feita com o *primer* UBC-844 para a população de Baixios.

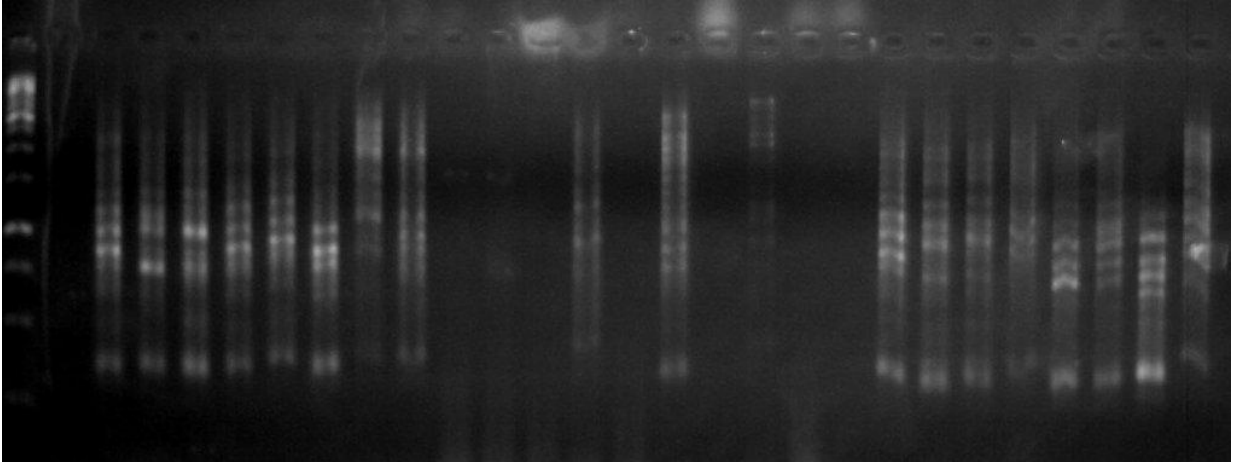


Tabela 2: Estimativa de parâmetros populacionais de *Ocotea notata*.

Populações	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>He</i>	<i>I</i>	<i>P</i> %
Abaeté	19,66(0,05)	1,65(0,09)	1,49(0,04)	0,29(0,02)	0,43(0,03)	82,28%
Jacarenema	17,18(0,41)	1,57(0,09)	1,42(0,04)	0,25(0,02)	0,39(0,03)	78,48%
Ferro Doido	16,71(0,27)	0,78(0,11)	1,25(0,04)	0,14(0,02)	0,21(0,03)	37,97%
Mucuri	15,82(0,29)	0,73(0,11)	1,26(0,04)	0,14(0,02)	0,21(0,03)	36,71%
Cria Bode	16,29(0,28)	1,05(0,11)	1,36(0,05)	0,20(0,02)	0,30(0,03)	51,90%
S. Paridas	15,10(0,76)	0,91(0,11)	1,26(0,04)	0,16(0,02)	0,23(0,03)	45,57%
Guaribas	15,48(0,38)	1,23(0,11)	1,34(0,04)	0,20(0,02)	0,31(0,03)	60,76%
Umburanas	11,97(0,17)	1,39(0,10)	1,47(0,05)	0,26(0,02)	0,39(0,03)	69,62%
Lajes	16,01(0,10)	1,44(0,10)	1,36(0,04)	0,22(0,02)	0,34(0,03)	72,15%
Jacobina	13,49(0,28)	1,37(0,11)	1,38(0,04)	0,23(0,02)	0,35(0,03)	68,35%
Alcobaça	18,97(0,16)	0,78(0,11)	1,15(0,03)	0,10(0,02)	0,16(0,03)	39,24%
Baixios	20,38(0,57)	1,34(0,11)	1,48(0,04)	0,27(0,02)	0,40(0,03)	67,09%
TOTAL	16,42(0,13)	1,19(0,03)	1,35(0,01)	0,21(0,01)	0,31(0,01)	59,18%(4,7%)

(): Erro Padrão

N: Tamanho amostral; *Na* = Número de alelos observados; *Ne* = Número efetivo de alelos = $1/(\hat{p}^2 + \hat{q}^2)$; *I* = Índice de Shannon = $-1 * (p * \ln(p) + q * \ln(q))$; *He*: Heterozigosidade esperada = $2 * p * q$; *P*: porcentagem de locos polimórficos. Onde para os dados binários diploides, assumiu-se o Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O tamanho amostral médio total (N) foi de 16,42, com uma porcentagem média de locos polimórficos de 59,18%. A porcentagem de locos polimórficos (P) foi relativamente baixa, variando de 36,71% (Mucuri) a 82,28% (Abaeté). Em alguns trabalhos com populações naturais (GE & SUN, 2001; ALEXANDER et al., 2004; XIA et al., 2007), a porcentagem de locos polimórficos foi utilizada como medida de diversidade genética. Também utilizando marcadores dominantes, Lacerda *et al.* (2002) obtiveram 64,9% de locos polimórficos para *Plathymenia foliolosa* Benth. Ainda com marcadores dominantes Brandão (2002) obteve 77% e 65%, para *Hymenaea courbarile* *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne, respectivamente.

Com relação aos valores de heterozigiosidade esperada, o menor valor foi o de 0,10 para a população de Alcobaça, que possuía muitos dados perdidos, e os maiores valores foram encontrados nas populações de Abaeté e Baixios, 0,29 e 0,27, respectivamente.

O índice de Shanon varia de 0 a 1 e considera-se que quanto mais próximo a 0, mais baixa é a diversidade. A população de Alcobaça apresentou o menor valor do Índice de Shannon, 0,16 indicando ter a de menor diversidade genética. Por outro lado, as populações de Abaeté e Baixios foram as de maior diversidade, com valores do Índice de 0,43 e 0,40 respectivamente.

Foi também analisado o padrão de bandas totais, a partir da matriz binária, por população. Verificou-se o número total de bandas que apareceram em cada população, e também o número total de bandas com frequência maior que 5%. Além disso, também foi contabilizada a quantidade de bandas comuns, com frequência menor que 25% e 50%, para cada população. A tabela 3 mostra os resultados encontrados para cada uma das análises mencionadas.

Na Tabela 3, verifica-se que o número de bandas totais de cada população é o mesmo que o número de bandas com frequência maior que 5%, logo não apareceram bandas com uma frequência menor que 5%. A população de Abaeté foi a única que apresentou bandas exclusivas, no caso apenas uma banda exclusiva.

Na figura 8, apresenta-se em forma de gráfico as informações contidas na Tabela 3 e a heterozigiosidade média esperada, informada na Tabela 2.

Como mencionado em Material e Métodos, foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) para as 12 populações. Na Tabela 4, apresentam-se os resultados da AMOVA para cada população, e na Figura 9 a variância molecular é apresentada em forma de gráfico.

Tabela 3: Padrão total de bandas por população.

Populações	Abaeté	Jacarenema	Ferro Doido	Mucuri	Cria Bode	Serra Paridas	Guaribas	Umburanas	Lajes	Jacobina	Alcobaça	Baixios
Nº Bandas	65	62	32	29	42	36	49	55	57	54	31	53
Nº Bandas Freq. $\geq 5\%$	65	61	32	29	42	36	49	55	57	54	31	53
Nº de Bandas exclusivas	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº Bandas comuns ($\leq 25\%$)	6	3	1	2	0	1	1	1	4	3	1	0
Nº Bandas comuns ($\leq 50\%$)	21	19	6	7	4	4	10	12	19	17	9	11

Figura 8: Gráfico com os padrões das bandas e a heterozigidade média, por população.

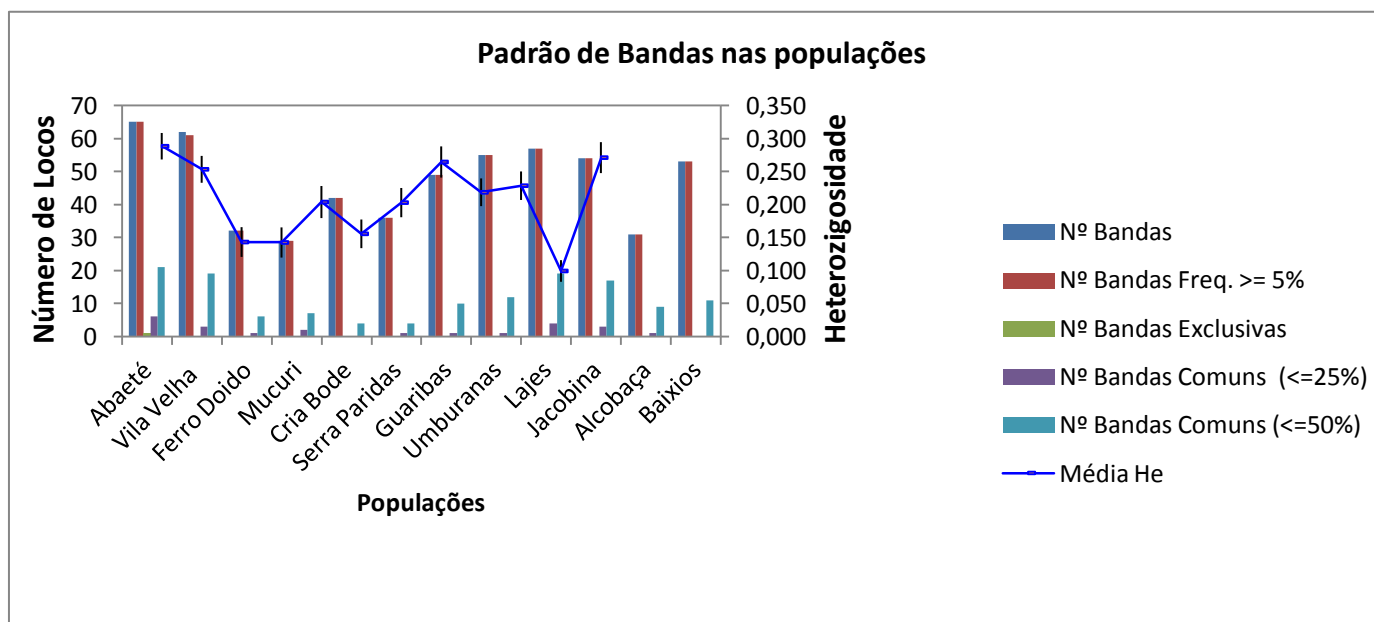
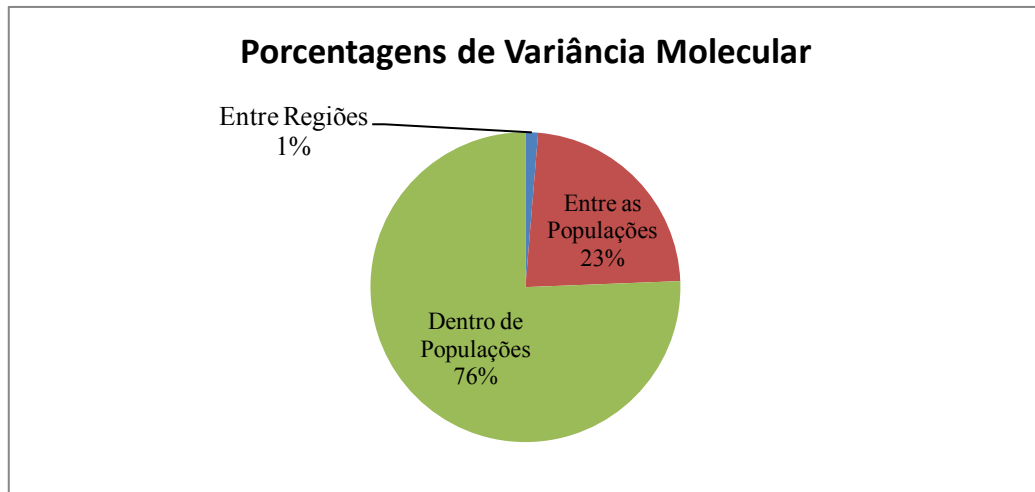


Tabela 4: Análise de Variância Molecular (AMOVA) para nove populações de *Ocotea notata*. GL: graus de liberdade, SQ: soma de quadrados, QM: quadrados médios. Estimativa de Variância e porcentagem de variação total.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Est. Var.	%
Entre as Regiões	1	155,662	155,662	0,288	1%
Entre as Populações	10	1186,077	118,608	5,056	23%
Dentro das Populações	231	3828,813	16,575	16,575	76%
Total	242	5170,551	-	21,918	100%

Figura 9: Gráfico representando a porcentagem de variância molecular, entre as regiões, entre as populações e dentro das populações.



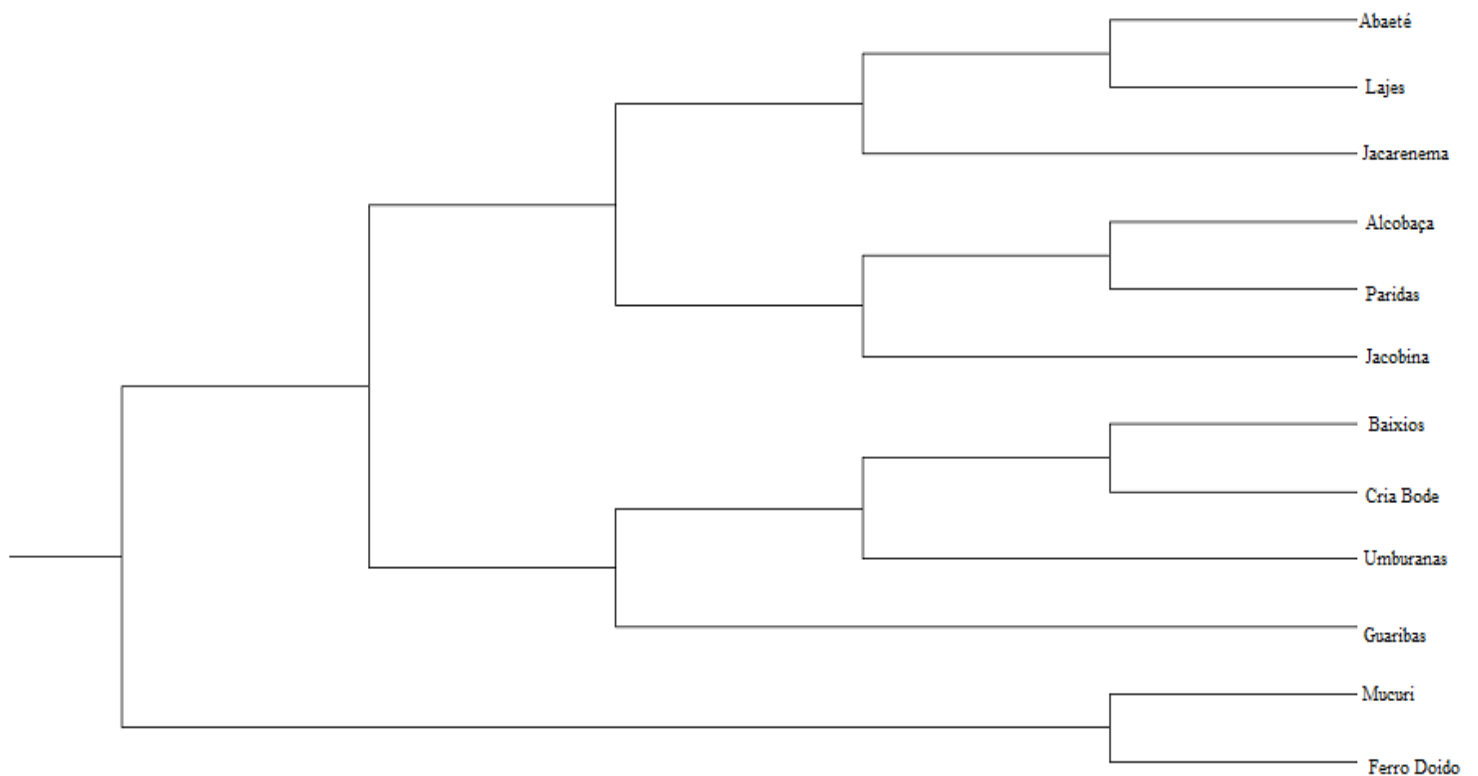
A partir da Tabela 4 e Figura 9, verifica-se que a AMOVA, estruturada entre as duas regiões (campos rupestres e restingas), apresentou uma estrutura hierarquia significativa ao nível de região, que demonstrou ser responsável por ca. de 1% da variação ($\Phi_{rt} = 0,013$, $p = 0,005$). O restante da variação (99%) ficou dividido entre as populações dentro de regiões (23%, com $\Phi_{pr} = 0,234$ e $p = 0,001$), e dentro das populações (76%, com $\Phi_{pt} = 0,244$ e $p = 0,001$). Apesar do valor baixo de variação entre regiões, sua significância indica que as populações de campos rupestres são diferentes das de restinga.

Segundo Nybom & Bartish (2000), estimativas de diferenciação genética entre populações, cuja fecundação é cruzada, são em média, 28% obtidas a partir de marcadores dominantes e calculadas via AMOVA. A análise das estatísticas Φ via AMOVA estima a diferenciação genética entre populações, em que $\Phi_{pt} = 0$ representa a situação onde não há nenhuma diferenciação genética, com $0 \leq \Phi_{pt} \leq 1$. Em *Plathyenia reticulata* Benth., Lacerda *et al.* (2001) encontraram 12,3% de variabilidade entre as populações. Goulart *et al.* (2005), em estudo realizado com duas populações de *Mabea fistulifera* Mart., encontraram 8,97% de

variabilidade entre as populações. Por outro lado, Vieira (2005) e Vieira & Carvalho (2008), em estudos com a espécie *Protium spruceanum* (Benth.) Engl., encontraram variabilidade de 97% ocorrendo dentro das populações. Estes resultados estão de acordo com os observados em outras espécies arbóreas tropicais, com o uso de marcador dominante, ou seja, a maior proporção da variabilidade genética está presente dentro das populações (LOVELESS & HAMRICK, 1984; WHITE *et al.*, 1999; NYBOM, 2004; APTE *et al.*, 2006).

Na Figura 10, apresenta-se o dendrograma obtido a partir das distâncias genéticas de Nei (1978), pelo método de agrupamento UPGMA, para as 12 populações estudadas. Observa-se que as populações Mucuri e Ferro Doido foram as que mais se diferenciaram das demais. Observa-se também que não houve agrupamento associado à proximidade geográfica, nem devido aos diferentes morfotipos de *O. glaucina* e *O. notata*.

Figura 10: Dendrograma baseado na distância genética de Nei (1978), método UPGMA, para doze populações de *Ocotea notata*.



5. CONCLUSÃO

- Apesar de pequena, há variabilidade genética significativa entre as regiões analisadas, região 1 de Restinga e região 2 de Campo Rupestre, indicando que as populações podem pertencer a diferentes táxons.
- A variabilidade presente entre as populações dentro de regiões é menor do que a encontrada entre os indivíduos dentro de populações.
- As populações analisadas de *Ocotea notata sensu* Rohwer (1986) apresentam níveis de variabilidade genética populacional compatíveis com os valores obtidos para outras espécies arbóreas tropicais analisadas.
- A sinonimização de *Ocotea glaucina* em *Ocotea notata* não foi corroborada pelos resultados populacionais aqui apresentados.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J. A.; LISTON, A.; POPOVICH, S. J. Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v.91, n. 12, p. 2004-2012, 2004.
- APTE, G. S.; BAHULIKAR, R. A. ; KULKARNI, R. S. ; LAGU, M. D.; KULKARNI, B. G.; SURESH, H. S.; RAO, P. S. N.; GUPTA, V. S. Genetic diversity analysis in *Gaultheria fragrantissima* Wall. (Ericaceae) from the two biodiversity hotspots in India using ISSR makers. **Current Science**, Bangalore, v. 91, n. 12, 2006.
- AUBLET. J. B. C. F. Histoire des Plantes de la Guiane. **Françoise**, v.2, t.51. Paris, Chez P. F. Ditot. P. 133-136. 1775.
- BAITELLO, J.B. Novas espécies de Lauraceae para a Flora brasileira. **Acta Bot. Bras.** 15(3):445-450. 2001.
- BARBOSA, T. D. M.; BAITELLO, J. B. & MORAES, P. L. R. A família Lauraceae Juss. no município de Santa Teresa, Espírito Santo. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão** (Nova Série), 30:5-178, 2012.
- BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantifications of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal Forest Research**, Ottawa, v. 27, n. 3, p. 415-424, Mar. 1997.
- BITTENCOURT, R. **Caracterização da estrutura genética interna e de aspectos da autoecologia de *Ocotea porosa* em Santa Catarina**. (Dissertação de Mestrado), Centro de Ciências Agrárias, UFSC-Florianópolis, 83 p, 2007.

BORNET, B. & BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Mol. Biol. Report.** 19: 209-215, 2001.

BOTELHO, P. S., MORAES, M. M., NEVES, I. A., NEVES, R. C. S., RIBEIRO, N. C., BORN, F. S. & CAMARA, C. A. G. Composição química e ação repelente do óleo essencial *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez. sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* Koch. **Resumos. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX 2009:** R0451-1.

BRANDÃO, R. L. **Variabilidade genética de duas espécies vicariantes, *Hymenaea courbaril* (jatobá da mata) e *H. stigonocarpa* (jatobá do cerrado).** 55 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

BRAZ, M. I. G. & MATTOS, E. A. Seed dispersal phenology and germination characteristics of a drought-prone vegetation in southeastern Brazil. **Biotropica** 42(3): 327-335, 2010.

BREGONCI, J. M., POLYCARPO, P. V. & MAIA, V. C. Galhas de insetos no Parque Estadual Paulo César Vinha (Guarapari, ES, Brasil). **Biota Neotrop.** 10(1): 265-274. 2010.

BRODY, J. R. & KERN, S. E. Sodium boric acid: a tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **Biotechniques** 36: 2-4, 2004.

CAVALLARI-NETO, M. M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação.** 92f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2004.

CHASE, M. R., BOSHIER, D. H. & BAWA, K. S. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1. Genetic variation in natural populations. **American Journal of Botany.** 82(4): 468-475, 1995

COUTINHO, D. F., AGRA, M. F. & BARBOSA-FILHO, J. M. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroideae). **Rev. Bras. Farmacogn.** 16(2): 178-184, 2006.

DAROS, T. L. **Sistema reprodutivo e estrutura genética de uma população de imbuia (*Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso – Lauraceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), UFPR-Curitiba, 69 p. 2006.

DIAS, C. S., COUTINHO, D. F., MARTINS, R. M., SILVA, T. M. S., CRAVEIRO, A. A., AGRA, M. F. & BARBOSA FILHO, J. M. Análise por CG-EM e atividade moluscicida do óleo essencial das folhas de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae). In: **29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.** Águas de Lindóia, 2 p. 2006.

DJÉ, Y., TAHI, G. C., ZORO BI, I. A., MALICE, M., BAUDOIN, J. P. & BERTIN, P. Optimization of ISSR marker for African edible-seeded *Cucurbitaceae* species' genetic diversity analysis. **African J. Biotechnol.** 5(2): 83-87, 2006.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.** 19: 11-15, 1987.

DOYLE, J. J. T. & DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15, 1990.

EGUIARTE, L. E., PEREZ-NASSER, L. & PIÑERO, D. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity** 69: 217-228, 1992.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. & QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131: 479-491, 1992.

FLANAGAN, N. S. **Aguide to GenAIEx 6[©]. Genetic Analysis in Excel**. The Australian National University, Canberra, 94 p. 2005.

FLEISHMAN, E.; LAUNER, A. E.; SWITKY, K. R. Rules and exceptions in conservation genetics: genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. **Biological Conservations**, Essex, v. 98, p 45-53, 2001.

FOSTER, P. F. & SORK, V. L. Population and genetic structure of the West African rain forest liana *Ancistrocladus korupensis* (Ancistrocladaceae). **Am. J. Bot.** 84(8): 1078-1091, 1997.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2. Ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 631 p. 2002.

GARRETT, R., CRUZ, R. A. S., GUERRA, M. S., GATTUSO, M. & ROCHA, L. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ocotea notata* guiada pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemiasalina* Leach. **Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas** 6(6): 344-345, 2007a.

GARRET, R., CRUZ, R. A. S., PINHEIRO, L. S., GUERRA, M. S. & ROCHA, L. Chemical composition and biological activities of the essential oil from *Ocotea notata* (Nees) Mez (Lauraceae). Poster Session Abstracts. **1st Brazilian Conference on Natural Products**: RPS-15. 2007b

GARRETT, R., BORGES, R. M., SANTOS, M. G., ROCHA, L. & SILVA, A. J. R. Flavonóides de *Ocotea notata* (Nees) Mez. Resumos. **32^a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**: PN-371 (T1926-1). 2009.

GARRETT, R., CRUZ, R. A. S., ROCHA, L., SANTOS, M. G. & DA SILVA, A. J. R. Chemical composition and toxicity of *Ocotea notata* (Nees) Mez essential oil. **Journal of Essential Oil-bearing Plants** 13(4): 455-459, 2010.

GATTI, A., BIANCHI, R., ROSA, C. R. X. & MENDES, S. L. Diet of two sympatric carnivores, *Cerdocyon thous* and *Procyon cancrivorus*, in a restinga area of Espírito Santo State, Brazil. **J. Trop. Ecol.** 22: 227-230, 2006a.

GATTI, A., BIANCHI, R., ROSA, C. R. X. & MENDES, S. L. Diet of the crab-eating fox,

Cerdocyon thous (Carnivora, Canidae) in Paulo Cesar Vinha State Park, Espírito Santo state, Brazil. **Mammalia** p. 153-155, 2006b.

GOMES, V. S. M., LOISELLE, B. A. & ALVES, M. A. S. Birds foraging for fruits and insects in shrubby restinga vegetation, southeastern Brazil. **Biota Neotrop.** 8(4): p. 21-31, 2008a.

GOMES, V. S. M., CORREIA, M. C. R., LIMA, H. A. & ALVES, M. A. S. Potential role of frugivorous birds (Passeriformes) on seed dispersal of six plant species in a restinga habitat, southeastern Brazil. **Rev. Biol. Trop.** 56(1): 205-216, 2008b.

GOMES, V. S. M., BUCKERIDGE, M. S., SILVA, C. O., SCARANO, F. R., ARAUJO, D. S. D. & ALVES, M. A. S. Availability peak of caloric fruits coincides with energy-demanding seasons for resident and non-breeding birds in restinga, an ecosystem related to the Atlantic forest, Brazil. **Flora** 205: 647-655, 2010.

GRAY, A. Genetic diversity and its conservation in natural populations of plants. **Biodivers. Lett.** 3(3): 71-80, 1996.

GUASMI, F., FERCHICHI, A., FARÉS, K. & TOUIL, L. 2006. Identification and differentiation of *Ficus carica* L. cultivars using inter simple sequence repeat markers. **African J. Biotechnol.** 5(15): 1370-1374, 2006.

GOULART, M. F.; RIBEIRO, S. P.; LOVATO, M. B. Genetic, morphological and spatial characterization of two populations of *Maebea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), in different successional stages. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 2, p. 275-284, Mar. 2005.

GE, X. J.; SUN, M. Population genetic structure of *Ceriops tagal* (Rhizophoraceae) in Thailand and China. **Wetlands Ecology and Management**, v. 9, p. 203-209, 2001.

HALL, P., ORRELL, L. C. & BAWA, K. S. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Am. J. Bot.** 81(9): 1104-1111, 1994.

HAMMEL, B. E. New species and notes on Lauraceae from the caribbean lowlands of Costa Rica. **J. Arnold Arbor.** 67: 123-136. 1986

HAMRICK, J. L. The distribution of Genetic Variation within and among Natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M.; CAHAMBERS, S. H.; MacBYDE, B.; THOMAS, L. **Genetic and conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, P. 335-348. 1983.

JONES, B.; GLIDDON, C.; GOOD, J. E. G. The conservation of variation in geographically peripheral populations: *Lloydia serotina* (Liliaceae) in Britain. **Biological Conservation**, Essex, v. 101, p. 147-156, 2001

KAGEYAMA, P. Y., CUNHA, G. C. DA, BARRETO, K. D., GANDARA, F. B., CAMARGO, F. R. A. & SEBBENN, A. M. Diversidade e autocorrelação genética espacial em populações de *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Sci. For.** 64: 108-119, 2003.

KIMURA, M. & CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics** 49: 725-738, 1964.

LABATE, J. A. Software for population genetic analyses of molecular marker data. **Crop Science** 40(6): 1521-1528, 2000.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Planthymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 10, n. 5, p. 1143-1152, 2001.

LACERDA, D. R.; LEMOS FILHO, J. P.; ACEDO, M. D. P.; LOVATO, M. B. Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Planthymenia foliosa* and *P. reticulata* (Mimosoideae), inferred using RAPD markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 235, p. 67-77, 2002.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**. 6: 381-398, 1972.

LOVELESS, M. D. & HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**. 15: 65-95, 1984.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L.; FOSTER, R. B. Population structure and mating system in *Tachigali versicolor*, a monocarpic neotropical tree. **Heredity**, Essex, v.81, p. 134-143, 1998.

MAGUIRE, T. L., PEAKALL, R. & SAENGER, P. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. **Theor. Appl. Genet.** 104: 388-398, 2002.

MAHY, G., VEKEMANS, X., JACQUEMART, A. & SLOOVER, J. Allozyme diversity and genetic structure in south-western populations of heather, *Calluna vulgaris*. **New Phytol.** 137(2): 325-334, 1997.

MASSEY, L. K. & HAMRICK, J. L. Genetic diversity and population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae). **Am. J. Bot.** 85(3): 340-345, 1998.

MEYER, W., MICHELL, T. G., FREEDMAN, E. Z. & VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **J. Clin. Microbiol.** 31(9): 2274-2280, 1993.

MICHALAKIS, Y. & EXCOFFIER, L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. **Genetics** 142: 1061-1064, 1996.

MORAES, P. L. R. **Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees & Martius ex Nees (Lauraceae)**. Dissertação de Doutorado, Instituto de Biociências, UNESP-Rio Claro, 197 p, 1997.

MORAES, P. L. R. & DERBYSHIRE, M. T. V. C. Estrutura genética de populações naturais

de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae) através de marcadores isoenzimáticos. **Biota Neotrop.** 2(2): 183-201, 2002.

MORAES, P. L. R. & DERBYSHIRE, M. T. V. C. Diferenciação genética e diversidade em populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Biota Neotrop.** 3(1): 85-94, 2003.

MORAES, P. L. R. & DERBYSHIRE, M. T. V. C. Genetic structure of natural populations of *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) from southeastern Brazilian Atlantic rain forest. **Biota Neotrop.** 4(1): 29-44, 2004

MORAES, P. L. R. & MONTEIRO, R. Taxas de cruzamento em uma população natural de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). **Biota Neotrop.** 2(2): 29-38, 2002.

MORAES, P. L. R., MONTEIRO, R. & VENCOVSKY, R. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Bot.** 22(2): 237-248, 1999.

MORAES, P. L. R. DE, MONTEIRO, R. & VENCOVSKY, R. Genetic differentiation and diversity of natural populations of *Cryptocarya* spp. (Lauraceae) from the Brazilian Atlantic rain forest. **Lundiana** 3(2): 99-109, 2002.

MORAES, P. L. R., MONTEIRO, R. & VENCOVSKY, R. Estrutura genética intrapopulacional em *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). **Rev. Bras. Bot.** 27(3): 475-487, 2004.

NAGAOKA, T. & OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.** 94(5): 597-602, 1997.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **PNAS** 70, p. 3321-3323. 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Madison, v. 89, n.3, p. 586-590, 1978.

NYBOM, H.; BARTISH, I. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD makers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 3/2, p. 93-114, 2000.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 13, p. 1143-1155, 2004.

PEAKALL, R., SMOUSE, P. E. & HUFF, D. R. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloë dactyloides*. **Molecular Ecology**, 4: 135-147, 1995.

PEAKALL, R. & SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Mol. Ecol. Notes.** 6: 288-295, 2006.

PEAKALL, R. & SMOUSE, P. E. **Appendix 1 – Methods and Statistics in GenAlEx 6.1.**

School of Botany and Zoology, The Australian National University, Canberra, 27 p, 2007.

POLAK, M. & SABOR, J. Isoenzyme markers in investigations on genetic variation of forest tree populations: Part I. Techniques and uses. *Sylwan* 141(11): 49-57, 1997.

QUINET, A. Lauraceae. In: Barroso, G. M.; Guimarães, E. F.; Ichaso, C. L. F.; Costa, C. G. & Peixoto, A. L. (org.). **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Vol. 1. 2a ed. rev. Ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Pp. 59-64, 2002.

QUINET, A. & ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** 53(82): 59-121, 2002.

QUINET, A.; BAITELLO, J.B.; MORAES, P.L.R. DE; ALVES, F.M.; ASSIS, L. Lauraceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB143>>. Acesso em: 01 April 2014

RIBEIRO, V. K. **Análise das reservas de sementes de espécies arbóreas da restinga do município de Ipojuca – PE**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, 117 p, 2006.

ROCHA, O. J. & LOBO, J. A. Genetic diversity and outcrossing rates in the guanacaste tree (*Enterolobium cyclocarpum* Jacq.) in the dry forests of Costa Rica. Pp. 65-81, in: **Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management, Proceedings of an IFS Workshop**. International Foundation for Science, Stockholm, 1998

ROHWER, J. G. Prodrömus einer Monographie der Gattung *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) sensu lato. **Mitt. Inst. Allg. Bot.** Hamburg 20: 1-278, 1986.

ROHWER, J. G. Lauraceae. Pp. 366-391, in: K. KUBITZKI, J. G. ROHWER & V. BITTRICH (eds.), **The families and genera of vascular plants. Flowering plants. Dicotyledons**. Springer-Verlag, Berlin, v. 2. 1993a

ROHWER, J. G. LAURACEAE: Nectandra. Fl. Neotrop. **Monogr.** 60: 1-333. 1993b.

SCHIERENBECK, K. A., SKUPSKI, M., LIEBERMAN, D., LIEBERMAN, M. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. **Molecular Ecology**, 6(2): 137-144. 1997.

SILVA, M. D., CHAGAS, M. G. S. & PIMENTEL, R. M. M. Anatomia foliar de espécies lenhosas dominantes numa área de restinga. **R. Bras. Bioci.** 5(Supl. 1): 543-545, 2007.

SILVEIRA, F. A., MELO, G. A. MELO, G. A. R. & ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras**. Sistemática e identificação. Fundação Araucária, Belo Horizonte, 253 p, 2002.

SNAYDON, R. W. Population responses to environmental disturbance. Pp. 15-31, in: J. VAN ANDEL *et al.* (eds.), **Disturbance in grasslands**. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, 1987.

SONG, G., HONG, D. Y., WANG, H. Q., LIU, Z. Y. & ZHANG, C. M. Population genetic structure and conservation of an endangered conifer, *Cathaya argyrophylla* (Pinaceae). **Int. J.**

Pl. Se. 159(2): 351-357, 1998.

TARAZI, R. **Caracterização da estrutura genética e conservação de populações naturais de canela-preta (*Ocotea catharinensis* Mez) no Estado de Santa Catarina.** (Dissertação de Mestrado), Centro de Ciências Agrárias, UFSC-Florianópolis, 117 p, 2006.

TARAZI, R., MANTOVANI, A. & REIS, M.S. Fine-scale spatial genetic structure and allozymic diversity in natural populations of *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae). **Conserv. Genet.** 11(3): 965-976, 2009.

TORGGLER, M. G. F. ; CONTEL, E. P. B. ; TORGGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas.** Ribeirão Preto: SBG, 1995, 186P.

TSUMURA, Y., OHBA, K. & STRAUSS, S. H. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). **Theor. Appl. Genet.** 92(1): 40-45, 1996.

VAN DER WERFF, H. Eight new species and one new combination of neotropical Lauraceae. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 75: 402-419, 1988.

VAN DER WERFF, H. A key to the genera of Lauraceae in the New World. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 78: 377-387, 1991.

VAN DER WERFF, H. & RICHTER, H. G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Ann. Missouri Bot. Gard.** 83: 409-418, 1996.

VIANA, B. F., SILVA, F. O. & KLEINERT, A. DE M. P. A flora apícola de uma área restrita de dunas litorâneas, Abaeté, Salvador, Bahia. **Rev. Bras. Bot.** 29(1): 13-25, 2006.

VIEIRA, F. de A. **Diversidade e estrutura genética de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler em remanescentes e corredores de vegetação na região do Alto Rio Grande-MG.** 2005. 100p. Dissertação (Mestrado Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIEIRA, F. de A.; CARVALHO, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, 2008.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data.** Sinauer Associates, Sunderland, 445 p, 1996.

WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** 38: 1358-1370, 1984.

WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, Oxford, v.8, n.11, p. 1899-1909, Nov. 1999.

WOLFE, A. D., XIANG, Q.-Y. & KEPHART, S. R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence

repeat markers. **Molecular Ecology**, 7: 1107-1125, 1998.

XIA, T. ; CHEN, S. ; CHEN, S. ; ZHANG, D. ; ZHANG, D. ; GAO, Q. ; GE, X. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, p. 209-214, 2007.

YEH, F.C. & BOYLE, T.J.B. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian J. Bot.** 129: 157, 1997.

YEH, F.C., YANG, R.-C., BOYLE, T.J.B., YE, Z.-H. & MAO, J.X. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis**. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada, 1997.

YEH, F.C., YANG, R.-C. & BOYLE, T.J.B. **POPGENE Version 1.31: Microsoft Window-based freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide**. Edmonton: University of Alberta. 28p, 1999.

YOUNG, A., BOYLE, T. & BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Tr. Ecol. Evol.** 11(10): 413-418, 1996.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A. & LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20(2): 176-183, 1994.

ASSINATURAS

Aluna: Dayane Pires da Silva

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luís Rodrigues de Moraes

Rio Claro
2014