

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

DIVERSIDADE GENÉTICA POR MARCADORES
MICROSSATÉLITES DE PROGÊNIES DE *Tabebuia*
heptaphylla DA REGIÃO DA BACIA DO MÉDIO TIETÊ

CAROLINE MIDORI MORITA

Orientador: Prof. Dr. Edson Seizo Mori

Botucatu – SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

DIVERSIDADE GENÉTICA POR MARCADORES
MICROSSATÉLITES DE PROGÊNIES DE *Tabebuia*
heptaphylla DA REGIÃO DA BACIA DO MÉDIO TIETÊ

CAROLINE MIDORI MORITA

Orientador: Prof. Dr. Edson Seizo Mori

Monografia apresentada ao
Departamento de Genética do Instituto de
Biotecnologia, como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas

Botucatu – SP

2008

Dedico aos meus pais, Jorge e Tereza,
que são as pessoas mais importantes,
não somente para a realização deste trabalho,
mas por toda a minha criação. Admiro-os muito,
pelo esforço, dedicação e sacrifícios
em prol de seus filhos.

Ofereço ao Adilson, antes
que namorado, amigo e
companheiro, sempre ao
meu lado mesmo distante.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Edson Seizo Mori, pela oportunidade, fornecimento do laboratório e materiais, pela orientação, apoio, paciência, e, principalmente pelas palavras de sabedoria e conselhos de mestre oferecidos nos momentos de desespero.

Ao Prof. Dr. Leo Zimback, pela ajuda na parte laboratorial e de informática e no fornecimento dos programas estatísticos.

Ao Prof. Dr. Celso Luis Marino, por ter me oferecido, apesar do pouco tempo de convivência e orientação, oportunidades de crescimento profissional e a sua amizade.

A todos os funcionários do departamento que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas dos outros laboratórios pelo fornecimento de seus equipamentos e materiais quando necessários, bem como sua ajuda.

Aos meus colegas de laboratório pela paciência e compreensão estabelecidas durante nossos meses de convivência.

Às meninas da graduação do IB, pela paciência e inconveniências.

Às minhas amigas de república: Burra, Ktotinha e Yodô pelos momentos felizes e de estresse que passamos juntas, mas principalmente, por aturarem minhas crises de mau humor.

Aos meus amigos de turma (XL), por me acolherem e oferecerem sua amizade e companheirismo, em especial à: Borboletinha, Já-Dei!, Legorne, Será?, Tainha, Urucubaka.

Aos meus amigos: Tatiana, Juliana, Amanda, Aurélio, Carolina, por me mostrarem, mesmo sem saberem, que a amizade resiste a tudo e o quão ela é importante para a estabilidade pessoal.

Aos meus colegas da IBBJr., por me ensinarem que mesmo perante as dificuldades, há outros caminhos para seguir.

Aos professores que contribuíram para o nascimento da IBBJr. e, acima de tudo, acreditaram nesta realização.

A todos meus familiares que torceram e me apoiaram durante esta etapa da minha formação.

RESUMO

Os recursos genéticos existentes, atualmente, são de suma importância para garantir a preservação de espécies florestais, uma vez que parte delas vem sofrendo excessiva exploração por se tratar de espécies economicamente importantes ou simplesmente devido à ação antrópica. Tendo em vista este panorama, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de fornecer subsídios genéticos para a conservação da espécie ipê-roxo. Analisou-se 31 progênies de *Tabebuia heptaphylla* da região da Bacia do Médio Tiête. Utilizaram-se três locos, sendo um dos primers desenvolvido para o gênero *Tabebuia* e os outros para outros gêneros. O parâmetro F_{st} analisado mostrou haver uma menor diversidade entre progênies (21,47%) que dentro delas (78,53%). O coeficiente médio de endogamia, F_{is} , para a espécie, apresentou um valor relativamente alto (0,276) quando comparado com a literatura para espécies florestais. A taxa de cruzamento foi de 0,808, revelou que a espécie tem sistema reprodutivo misto, com tendência para a alogamia. As autofecundações foram de 19,2%, a percentagem de irmãos completos foi de 11,23%, de meios-irmãos foi igual a 69,57% e o coeficiente de coancestria (θ_{xy}) foi de 0,1776.

Palavras-chave: ipê-roxo, coeficiente de coancestria, taxa de cruzamento multilocos, e progênies.

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO.....	6
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1 – Características gerais do Ipê-roxo.....	8
2.2 – Marcadores Moleculares.....	9
2.2.1 – Microssatélite no estudo de plantas.....	10
2.3 – Genética de população.....	11
2.4 – Sistema de reprodução.....	12
3 – MATERIAL E MÉTODO.....	14
3.1 – Material.....	14
3.1.1 – Material vegetal.....	14
3.1.2 – Oligonucleotídeos.....	14
3.2 – Métodos.....	15
3.2.1 – Extração do DNA.....	15
3.2.2 – Quantificação do DNA.....	16
3.2.3 – Diluição da amostra de DNA.....	16
3.2.4 – Análise dos marcadores moleculares.....	16
3.2.5 – Visualização do processo de amplificação.....	17
3.2.6 – Análise dos dados.....	18
3.2.7 – Sistema de reprodução.....	19
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 – Extração a quantificação do DNA.....	20
4.2 – Amplificação do DNA.....	20
4.3 – Análise estatística.....	21
4.3.1 – Frequências alélicas.....	22
4.3.2 – Diversidade genética.....	23
4.3.3 – Distância e similaridade genética.....	26
4.3.4 – Sistema de reprodução.....	29
5 – CONCLUSÃO.....	31
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
7 – ANEXOS.....	37

1 – INTRODUÇÃO

A *Tabebuia heptaphylla* (Velloso) Toledo é uma espécie arbórea muito utilizada na ornamentação de ruas, praças, bosques e parques, devido à exuberância e coloração que exhibe na época do seu florescimento. Infelizmente, não é somente pelo seu aspecto paisagístico que o ipê-roxo, como é popularmente conhecido, torna-se atrativo. Por possuir uma madeira muito dura, pesada, que possui alta resistência mecânica, baixa retratibilidade volumétrica (Jankowsky *et al.*, 1990) e baixo custo na comercialização, teve seu tronco largamente explorado, realidade que perdura até os dias atuais. Além disto, de sua casca são extraídos diversos ácidos, corantes para tingimento de tecidos e outras substâncias, que se acredita possuírem ações medicinais. Em reflorestamentos esta espécie é utilizada na recomposição de mata ciliar para locais sem inundações (Carvalho, 2003).

Assim, como a super exploração dos recursos biológicos, outros fatores como a substituição de variedades locais por modernas, a pressão da ação antrópica sobre os ecossistemas naturais e programas e políticas de desenvolvimento que não calculam possíveis impactos ambientais, podem ser considerados os responsáveis pela perda de muitos dos recursos genéticos, de vital importância para o futuro, incluindo espécies agronômicas (Goedert, 2002).

A fragmentação de uma vegetação é consequência direta da interferência humana sobre as florestas nativas e do advento de centros urbanos, que pode causar impacto à biodiversidade e equilíbrio de ecossistemas. A ocorrência deste fenômeno pode acarretar sérias consequências, como, o isolamento de habitat, mudanças nos padrões de dispersão e migração das espécies (Soulé e Kohm, 1989), redução da disponibilidade de locais de colonização, além de, muitas vezes, ocasionar ruptura dos fluxos gênicos entre populações presentes nestes ambientes (Kageyama *et al.*, 2003). Espera-se, ainda, que a fragmentação de habitats diminua a variabilidade genética dentro das populações e aumente a diferenciação genética entre elas, afetando a viabilidade de cada uma a curto e a longo prazo (Young *et al.*, 1996).

Tento em vista este quadro, e sabendo-se que a espécie foco deste estudo, *T. heptaphylla*, está incluída na lista de plantas ameaçadas de extinção (Carvalho, 2003), fica evidente a importância dos programas que visam à conservação e melhoramento das espécies envolvidas nestas situações.

Um dos fatores importantes nestes estudos é a conservação do germoplasma, local onde estão armazenados os recursos genéticos de uma espécie e que maneja a variabilidade genética entre e dentro das espécies, com fins de utilização para a pesquisa em geral, especialmente para o melhoramento genético, inclusive a biotecnologia (Goedert, 2002).

As etapas fundamentais em programas de melhoramento vegetal consistem em obtenção da variabilidade genética, seleção de indivíduos superiores e avaliação de materiais genéticos promissores para lançamento comercial. Por esta razão, os melhoristas têm buscado formas de obter ganhos genéticos na seleção de características de interesse, tornando cada vez mais eficiente cada uma das etapas desses programas.

O presente trabalho tem como objetivo estudar a diversidade genética entre e dentro das populações de *Tabebuia heptaphylla*, por marcadores microssatélites, fornecer dados genéticos e do sistema de reprodução que subsidiem programas de conservação que visam à preservação de germoplasma da espécie estudada.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Características gerais do Ipê-roxo

A *Tabebuia heptaphylla* pertencente à Família Bignoniaceae. É uma árvore longeva, podendo atingir 800anos, comum na vegetação secundária (capoeiras e capoeirões). Na sucessão ecológica é uma espécie secundária tardia (Carvalho, 2003).

O Ipê-roxo, como é popularmente conhecido, é uma espécie arbórea caducifólia, que apresenta geralmente 10 a 20 metros de altura e 30 a 60 centímetros de DAP, sendo utilizada com sucesso em reflorestamentos mistos (Carvalho, 2003). Sua madeira é de excelente qualidade, possui alta densidade e dureza, com grande resistência e maleabilidade, produz carvão de boa qualidade e é amplamente empregada na construção civil, como vigas, caibros e assoalhos. Sendo ainda utilizada em obras externas como mourões, pontes e dormentes e na confecção de carrocerias e bengalas (Carvalho, 1994; Lorenzi, 1998).

As folhas têm coloração verde-escura, são opostas e compostas de 5 a 7 folíolos obovados, serreados, glabros, de 3 a 10 cm de comprimento por 2 a 6 cm de largura. As flores de coloração roxo-violácea aparecem antes das folhas e estão reunidas em tirso curto multi-floral (Carvalho, 2003). O fruto é tipo cápsula linear (Barroso et al., 1999), de coloração bege. Possui 20 a 30 cm de comprimento e 1,5 cm de largura (Carvalho, 2003). As cápsulas são bivalvares do tipo sílica, semelhante a uma vagem estreita e comprida, atenuada para dentro.

As sementes aparecem em quantidades elevadas, são grandes e aladas. Medem de 2,5 a 3,0 cm de comprimento e cerca de 6 a 7mm de largura. São acastanhadas e membranáceas mais ou menos brilhantes (Longhi, 1995).

Ocorre naturalmente no sul e oeste da Bahia, no Espírito Santo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo e no nordeste da Argentina, sul da Bolívia, leste do Paraguai e Uruguai (Carvalho, 2003). Compreende a latitude de 13°S (BA) a 30°S (RS). Segundo Rizzini (1971), a espécie ocorre da Bahia à Guanabara, sobre a Serra do mar (Carvalho, 2003).

A *Tabebuia heptaphylla* ocorre naturalmente em vários tipos de solo, em relevos planos a pouco ondulados e em plantios experimentais, tem crescido melhor em solos de fertilidade média a alta, profundos, com boa drenagem e de textura que varia de franca a argilosa (Carvalho, 2003). Os tipos climáticos são o tropical, o subtropical de

altitude e o subtropical úmido. Esta espécie tolera sombreamento moderado no estágio jovem (Engel & Poggiani, 1990) e medianamente tolerante a baixas temperaturas (Carvalho, 2003).

2.2 - Marcadores Moleculares

Antes da utilização de marcadores moleculares, os estudos de genética e melhoramento eram realizados com uso de marcadores morfológicos controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, cor de pétala ou morfologia foliar. Estes marcadores contribuíram significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos (Borba, 2002).

Marcadores moleculares são conhecidos como sendo todos os fenótipos expressos por genes, como no caso de isoenzimas ou de segmentos específicos de DNA que correspondam a regiões expressas ou não do genoma (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Existem diversas técnicas que utilizam esses marcadores para diferentes finalidades, como a de detecção do polimorfismo genético (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Em termos de variabilidade genética, marcadores moleculares são de suma importância, uma vez que, permite a compreensão e organização da variabilidade genética. Como consequência, muitas vezes é possível identificar o padrão molecular (ou fingerprinting) de genótipos de interesse, que podem ser posteriormente utilizados para a proteção do germoplasma. Em espécies alógamas como milho e girassol, os marcadores podem ainda auxiliar no estabelecimento de grupos heteróticos (Hongtrakul *et al.*, 1997), diminuindo substancialmente o número de cruzamentos-testes a serem avaliados e posteriores combinações híbridas.

As técnicas de marcadores moleculares mais utilizadas, atualmente, são isoenzimas, RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados), minissatélites e microssatélites. Estes marcadores podem ser aplicados para diversos fins, como em estudo de estrutura genética de populações, análise de filogenias, identificação de variedades, avaliação do germoplasma, seleção indireta de características agronômicas, dentre outros. Pesquisas nesta área estão sendo

desenvolvidas e o emprego das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações e no melhoramento de plantas, tem sido comprovado (Ferreira, 2003).

2.2.1 – Microsatélite no estudo de plantas

O uso de marcadores moleculares tem auxiliado no melhoramento de plantas, à medida que, possibilita acessar diretamente o genótipo de um indivíduo. Entre as principais aplicações de marcadores de DNA nesses programas, estão o monitoramento e organização da variabilidade genética, seleção assistida por marcadores moleculares e a proteção de cultivares (Lee, 1995).

Microsatélites são seqüências repetidas em série, em número variável encontradas no genoma de plantas que apresentam um alto grau de polimorfismo (Akkaya *et al.*, 1992; Morgante & Olivieri, 1993). Podem variar de um a seis pares de bases repetidas continuamente (Litt & Luty, 1989). O alto grau de polimorfismo que essas regiões ou sítios exibem é devido à diferença no número de unidades simples repetidas, levando diversos pesquisadores a especularem sobre seu potencial evolutivo (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Moxon & Wills, 1999).

Marcadores microsatélites têm sido utilizados para estudos em diversos organismos como em seres humanos, baleias, *Drosophila*, camundongos, bovinos e caprinos, entre outros. Marcadores baseados em microsatélites estão sendo desenvolvidos para aplicações de mapeamento genético para algumas culturas de maior expressão, tais como soja, arroz e trigo (Akkaya *et al.*, 1992; Roder *et al.*, 1995), além de espécies florestais como pinus (Smith & Devey, 1994) e frutíferas citrus (Kijas *et al.*, 1995) e banana (Jarret *et al.*, 1993).

Há uma série de vantagens sobre esses marcadores como sua co-dominância que permite a visualização no gel de ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto, são suficientemente estáveis para serem utilizados para análise genética e ideal também para a aplicação evolução em populações naturais (Slatkin, 1995), especialmente em espécies arbóreas como vem sendo demonstrado em espécies tropicais (Chase *et al.*, 1996; Ferreira & Grattapaglia, 1995) e em temperadas (Steinkellner *et al.*, 1997). Contudo, a maior vantagem de marcadores microsatélites é a possibilidade de caracterização de forças evolutiva, sem a influência da seleção, permitindo uma maior compreensão do comportamento das populações naturais, em termos da deriva genética e migração.

Em estudos de evolução e conservação genética utilizando marcadores microssatélite, Hedrick (1999) relaciona pontos de suma importância. Por se tratarem marcadores neutros, diferenças estatísticas significativas, não se relacionam necessariamente com diferenças biológicas expressivas, a heterozigosidade tende a ser alta dentro das populações, acarretando baixa diferenciação entre elas. Além disso, como esses locos são extremamente sensíveis à redução populacional, em um curto espaço de tempo pode gerar grandes distâncias genéticas.

2.3 – Genética de população

Estrutura genética é definida como a distribuição não aleatória de alelos e genótipos dentro de espécie (Hamrick, 1982), ou ainda, a forma como a variabilidade genética é distribuída entre e dentro dos níveis hierárquicos de subdivisão de uma espécie (Brown, 1978).

A manutenção e modificação da estrutura genética dependem das interações de um conjunto complexo de fatores ontogenéticos e evolutivos que atuam sobre a variação do conjunto gênico. Fatores tais como o sistema de reprodução, capacidade de dispersão de semente e pólen, seleção, mutação entre outros. Em geral, a diferenciação entre as populações é aumentada pela deriva genética e plantas com fluxo gênico restrito e, por outro lado, em espécies que têm intenso movimento de pólen e sementes tende a ter menor diferenciação (Hamrick, 1983).

O conhecimento da variabilidade genética tanto dentro como entre as populações e a necessidade de entender como a variação encontra-se distribuída e quais fatores ambientais e características da espécie influenciam nessa distribuição são importantes para dar suporte à conservação dos recursos genéticos (Hamrick, 1983).

Estudos da estruturas intrapopulacional em espécies arbóreas mostram que a distribuição de alelos e genótipos não é aleatória nessas populações. Tal estrutura pode ser determinada pela dispersão do pólen e semente e, pelo habitat, tanto na seleção quanto na distribuição deste (Hamrick, 1983), uma vez que a frequência alélica na próxima geração será influenciada pelo número de indivíduos que trocaram alelos efetivamente, principalmente em populações pouco numerosas, nas quais a taxa de homozigotos tende a crescer devido à autofecundação e cruzamentos parentais. Além disso, existe uma limitação física que não permite o cruzamento de todos com todos na mesma proporção, prevalecendo cruzamentos entre indivíduos próximos, acarretando

também em uma diminuição dos heterozigotos e influenciando a formação da estrutura populacional (Futuyma, 1992).

A análise da estrutura genética de populações tem fundamental importância, uma vez que, fornece subsídios para o entendimento da dinâmica evolutiva das espécies, essenciais para programas de conservação e melhoramento genético, manejo de populações resultadas de fragmentações florestais e também populações naturais (Sebbenn *et al.*, 2000).

2.4 – Sistema de reprodução

O estudo do sistema reprodutivo tem extrema importância para programas de conservação e melhoramento de uma espécie, pois é a partir dele, que se tem o conhecimento dos padrões de fluxo gênico (movimentação do pólen e semente) e da distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações (Oliveira *et al.*, 2002; Sebbenn *et al.*, 2000).

Espécies arbóreas tropicais geralmente apresentam sistema misto de reprodução, com predomínio de cruzamentos. Espécies arbóreas folhosas, geralmente apresentam uma taxa de cruzamento média alta (0,88), mesmo que parte dos cruzamentos ocorra entre aparentados (cruzamentos endogâmicos) e entre os mesmos indivíduos (cruzamentos biparentais), gerando progênies compostas por meios-irmãos, irmãos-completos e irmãos de autofecundação (Sebbenn, 2002; Sebbenn, 2003).

O fluxo gênico restrito define a variação das populações em resposta à seleção natural local ou deriva genética, enquanto o fluxo gênico sobre longa distância promove a uniformidade genética entre as populações (Slatkin, 1985; Ellstrand, 1992).

Uma das principais mudanças causadas pelo homem é a fragmentação e degradação de florestas contínuas (Saunders *et al.*, 1991). Para as espécies vegetais, as consequências afetam diretamente o sistema de reprodução, uma vez que, interfere na atividade de polinizadores, alteram a movimentação dos ventos, além de outras mudanças no microclima que atingem potencialmente os níveis de produção de sementes (Saunders *et al.*, 1991; Menges, 1991).

Dessa forma, a fragmentação de florestas é refletida no fluxo gênico, pois afeta diretamente na taxa de cruzamento por alterar o tamanho populacional das espécies e indiretamente por influenciar na ação dos polinizadores (Karron, 1995). Como consequência desse processo, há uma tendência em aumentar a frequência de

cruzamentos endogâmicos nas populações remanescentes, podendo resultar em uma depressão por endogamia, sendo mais severas em populações predominantemente alógamas (Nason & Hamrick, 1997).

3 - MATERIAL E MÉTODO

Os procedimentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho foram realizados nas dependências do Departamento de Produção Vegetal, principalmente no Laboratório de Melhoramento Vegetal, localizado na Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP - Botucatu.

3.1 - Material

3.1.1 - Material Vegetal

Foram estudados 240 indivíduos de 31 progênies de *Tabebuia heptaphylla* provenientes de locais pertencentes à Bacia do Médio Tietê, conforme descrito na tabela 1, do anexo, e mantidas em casa de vegetação ou plantadas em teste de progênies, ambos localizados na Fazenda Experimental do Lageado, na Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

3.1.2 - Oligonucleotídeos

Neste trabalho foram utilizados os seguintes primers: Tau 15 (Collevatti *et al.*, 2006), EE2 e EE54 (Gaiotto, 2001), descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos primers utilizados

Primer	Par de seqüência do primer	Peso (pb)	Temperatura (°C)
Tau 15	F: TTTGAGGGGTTGAAGCATTT R: CATTGTGGTCCCTCAACA	151	52
EE54	F: CATGTATCTAAGGAACAAGG R: CTGTGCTCTCTCATTCTCA	150	49
EE2	F: CCAAGGACGCAATCTCAA R: AGCGAGGCAGAACACGTA	100	49

3.2 – Métodos

3.2.1 – Extração do DNA

De cada indivíduo foram coletados, 3 folíolos maduros de plântulas, com 3 a 8 meses de idade, e armazenados, em local seco, a temperatura ambiente. Para a extração foi utilizado cerca 150mg do material foliar para cada amostra. Na realização desta etapa foi utilizado o protocolo proposto por Ferreira & Grattapaglia (1995).

O tecido foi triturado no moinho de maceração com, aproximadamente, 1000µL de tampão de extração CTAB 2%. As amostras foram levadas para o banho-maria a uma temperatura de 65°C por 45 a 60 minutos para facilitar a digestão do tecido, não houve necessidade da adição de 2-mercaptoetanol nas amostras. Em seguida, adicionou-se 600µL de clorofórmio e álcool isoamílico (CIA 24:1) e misturou-se no vórtex. As amostras foram centrifugadas a 12000rpm, a 10°C por 6 minutos. Observou-se a formação de três fases. Pipetou-se, aproximadamente, 3 x 180µL da fase sobrenadante para um eppendorf novo. Adicionou-se 50µL de CTAB 10% e agitou-se levemente. Em seguida, foram adicionados 400µL de CIA 24:1 e misturou-se no vórtex. Centrifugou-se nas condições anteriormente citadas. Retirou-se o sobrenadante para outro eppendorf novo e acrescentou-se 400µL de cloreto de sódio 5M. Centrifugou-se novamente nas condições anteriores. O sobrenadante foi pipetado para um eppendorf novo e colocou-se 400µL de álcool isopropílico gelado. As amostras foram incubadas a -20°C por 30 minutos ou “over-night”. O DNA foi precipitado à 12000rpm, 10°C por 6 minutos e observado pela formação do “pellet”, que foi isolado retirando-se o sobrenadante. Utilizou-se, aproximadamente, 1mL de álcool etílico 70% por 5 a 10 minutos e em seguida, 700µL de álcool etílico absoluto por 2 a 3 minutos para lavar o material genético, sempre descartando o sobrenadante entre as etapas. O pellet foi colocado em um fluxo de ar até secar. Após a secagem completa do “pellet”, utilizou-se de 40 a 70µL de RNase para digestão do RNA a 37°C em banho-maria, por pelo menos 40 minutos.

3.2.2 – Quantificação do DNA

Para a realização desta etapa, utilizou-se um aparelho que utiliza o princípio da espectrofotometria. Para a preparação das amostras para a medição, diluíram-se duas partes do DNA de cada indivíduo, para noventa e oito de água destilada, a mesma utilizada para calibrar o aparelho. A leitura era realizada em nanograma de material genético por microlitro de solução. Além de concentração de DNA, também eram fornecidos dados sobre a pureza das amostras em relação à quantidade de material genético. O mínimo valor considerado para utilização do material era acima de 1,7; isto é, quando a quantidade de DNA estivesse próximo do dobro de impurezas, pois, valores muito altos de proteínas ou outras substâncias poderiam interferir nas reações de PCR (Polymerase Chain Reaction), que foram realizadas posteriormente.

3.2.3 – Diluição da amostra de DNA

A diluição do DNA foi feito de acordo com a concentração lida pelo fluorômetro. A diluição utilizada para as reações de PCR utilizando marcadores microssatélites foi de 4,0µL de DNA genômico para 0,2mL de solução de tampão com tartrazina (corante de cor amarelada). Para facilitar, os cálculos foram realizados utilizando uma planilha do Excel, que além do fator de diluição, fornecia dados sobre o potencial de uso do DNA.

3.2.4 – Análise dos marcadores moleculares

Para a análise de microssatélites foi utilizada uma placa virgem de material descartável, com capacidade para 96 amostras. Em cada reação foram amplificadas 48 amostras (meia placa), para evitar desperdício de material, caso ocorresse algum problema durante o processo.

Inicialmente foram testados 6 primers de microssatélite sintetizados para o gênero *Tabebuia*, porém somente para o Tau 15 foi encontrado a temperatura ideal de anelamento (52° C). Os outros primers (EE2 e EE54) foram sintetizados para *Euterpe edulis* e *Euterpe oleraceae* e foram resultados de diversos testes. A preparação das reações foi realizada com proporções distintas e foram usados dois coquetéis diferentes conforme se observa na Tabela 02.

Tabela 02. Coquetéis usados para as reações de PCR.

Coquetel (µL)	Primers	
	Tau 15	EE2 e EE54
Água	3,7	8,4
Tampão 10x buffer minus Mg	1,3	1,8
dNTP	1,04	4,3
MgCl ₂	0,5	1,4
Taq DNA polimerase	0,2	0,18
TOTAL	6,74	16,08

À reação com Tau 15 foram adicionados 2,0µL deste primer e 2,0µL da amostra de DNA diluído e nas reações com EE2 e EE54, 1,0µL destes primer e 1,0µL de DNA. As concentrações das soluções de dNTPs, também foram preparadas em concentrações diferentes. 25µL de cada uma (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) para 900µL de água mili-Q para Tau 15 e 5µL de cada para 980µL de água mili-Q. Para evitar a evaporação do material durante a amplificação, foi adicionado uma gota de óleo mineral em cada poço. A reação foi levada para a um aparelho de termociclador, previamente programado com as temperaturas para a duplicação do material genético “*in vitro*”.

1. 92°C por 2 minutos (desnaturação);
2. 92°C por 1 minuto;
3. 52°C (Tau 15) ou 49°C (EE2 e EE54) por 1 minuto (anelamento);
4. 72°C por 2 minutos (extensão);
5. 40 repetições do ciclo (passos de 2 a 4);
6. 72°C por 5 minutos (para garantir o termino da duplicação).

Cada primer adequou-se a uma temperatura de anelamento.

3.2.5 – Visualização do processo de amplificação

Para esta etapa foi preparado um gel de agarose 1,5% utilizando 1,8g de agarose pura dissolvida em 120mL de solução TBE 0,5%, preparada com 5,41g de base Tris, 2,76g de ácido bórico e 2,0mL de EDTA 0,5M (pH 8), completando o volume para 1,0 litro de solução e levada ao microondas para coser durante, aproximadamente, 3 minutos. Após o esfriamento, o gel foi colocado na cuba de eletroforese, como capacidade para 48 amostras, até endurecer. Às amostras foram adicionados 1,0µL de tampão de carregamento (15g de ficoll 400 e 0,25g de xylene cyanole para 100mL de

água) com corante (0,25g de azul de bromofenol) para permitir a visualização. As amostras foram depositadas nos poços do gel e submetidas a uma corrente elétrica de 100V, por 3 horas para a separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em solução de tris-borato TBE 0,5% (pH 8), a mesma utilizada no gel. Transcorrido este período, o gel foi mergulhado numa solução de brometo de etídio 3µL/100mL de água por, aproximadamente, 40 minutos para a coloração. A visualização foi feita sob luz ultravioleta utilizando o programa I Quanti Capture 100.

3.2.6 – Análise dos dados

Para quantificar a estrutura genética das progênies estudadas foi calculada, além das frequências alélicas, a estatística F (Wright, 1965), a heterozigosidade esperada e observada e o coeficiente de coancestria.

A determinação dos genótipos foi obtida através da leitura dos géis. Após a realização desta etapa, as frequências alélicas foram estimadas pela contagem do número de vezes que um dos alelos aparece numa população e dividindo-o pelo número total de alelos nessa população. Este cálculo foi realizado para todos os alelos das populações.

A partir das frequências alélicas foi possível calcular os outros parâmetros importantes para a análise estatística. Pela expressão, $H_o = 1 - \sum P_{ii}$, calculou-se a quantidade de heterozigosidade observada, onde P_{ii} é a frequência observada do homozigoto para o alelo i e $H_e = 1 - \sum P_i^2$; onde P_i^2 é a frequência estimada do i-ésimo alelo, calculou-se a quantidade de heterozigose esperada de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As estatísticas F de Wright podem ser estimadas através dos valores de H_o e H_e . Esses parâmetros são bastante relevantes, uma vez que revelam a diversidade dentro e entre as populações.

$F_{is} = (H_e - H_o) / H_e$; onde F_{is} representa a endogamia.

A diversidade entre as progênies é dada pelo valor de coancestria (θ_{xy}), calculado como sendo $\theta_{xy} = 1/2 r_{xy}$, onde r_{xy} representa o coeficiente de parentesco entre as progênies, calculado no sistema de reprodução.

Para estimar os parâmetros genéticos foi utilizado o software TFPGA (Miller, 1997).

3.2.7 – Sistema de reprodução

A análise do sistema reprodutivo foi realizada com o auxílio do programa MLTR (Ritland 2002).

Foram estimados o t_m , que consiste na taxa de cruzamentos multilocos, o t_s , taxa de cruzamento unilocos, a diferença entre elas ($t_m - t_s$) que representa a taxa de cruzamentos que ocorre entre indivíduos aparentados. Foram determinadas ainda, a correlação de autofecundação (r_s), a correlação de paternidade (r_p) e a diferença entre elas ($r_s - r_p$). O coeficiente de parentesco entre as progênes foi calculado segundo a expressão $r_{xy} = \frac{1}{4} (1 + f_p) [4s + (t^2 + s t r_s) (1 + r_p)]$, onde f_p é o coeficiente de endogamia na geração parental, s é a taxa de autofecundação e t a taxa de cruzamento.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Extração e quantificação do DNA

Com base em um protocolo adaptado de Ferreira & Grattapaglia (1995), foi realizado a extração do DNA genômico e os resultados obtidos foram satisfatórios quanto à concentração e qualidade do material, segundo a leitura aferida pelo Gene Quant.

As concentrações obtidas tiveram variações significativas quando comparadas entre si, este resultado pode ser explicado pela diferença na maturidade das folhas utilizadas na extração, uma vez que, os indivíduos encontravam-se em estágios distintos do desenvolvimento, de 3 a 8 meses de idade. Além disso, devem-se levar em consideração, as diferenças nas condições das folhas quando foram coletadas, sendo que, algumas apresentaram manchas, ferrugem ou sinais de predação.

Os dados sobre a pureza do material após a extração e quantificação deste foram anotados na tabela 2, do anexo.

4.2 – Amplificação do DNA

A figura 1 mostra o resultado das reações de amplificação do material genético.

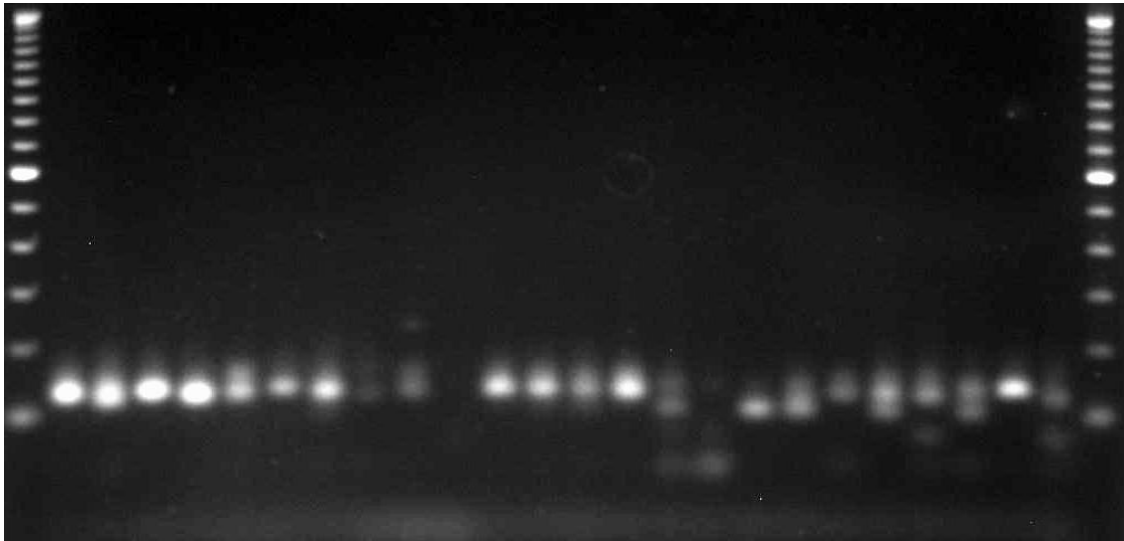


Figura 1 – Amplificação do DNA utilizando o primer Tau 15, com a reação realizada a 52 °C e ladder 100bp nas laterais.

Apesar de a corrida ter sido realizada em agarose, não houve grandes problemas para a visualização dos alelos, uma vez que, o gel apresentou uma separação nítida deles, na maioria dos casos.

4.2 – Análises estatísticas

Para facilitar os cálculos, a numeração original relativa às progênes (NO), que foram utilizados até então, tiveram que ser substituídos por uma numeração com números consecutivos (NA), para a leitura dos arquivos de entrada dos programas (tabela 03).

Tabela 03- Renumeração dos dados de coleta, para facilitar os cálculos, onde NO corresponde à numeração original e NA à numeração utilizada nas análises.

NO	NA	NO	NA
2P	1	18P	17
3P	2	19P	18
4P	3	20P	19
5P	4	21P	20
6P	5	22P	21
7P	6	23P	22
8P	7	24P	23
9P	8	26P	24
10P	9	27P	25
11P	10	28P	26
12P	11	29P	27
13P	12	30P	28
14P	13	31P	29
15P	14	32P	30
16P	15	33P	31
17P	16		

4.2.1 – Frequências alélicas

A tabela 04 mostra as frequências alélicas das progênies estudadas

Tabela 04 - Frequências alélicas das progênies nos locos.

Progênie	Tau 15					EE 54					EE 2			
	A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4
1	0,0625	0,125	0,125	0,6875	0	0	0,185	0,25	0,5625	0	0,125	0,8125	0	0,0625
2	0,0625	0,375	0,0625	0,125	0,375	0	0,4282	0,2857	0,2857	0	0,0625	0,75	0,1875	0
3	0	0,0625	0,4375	0,375	0,125	0,0714	0	0,1429	0,7857	0	0	0,8571	0,0714	0,0714
4	0,0714	0,2143	0	0,7143	0	0,125	0	0	0,25	0,625	0,0625	0,9375	0	0
5	0	0	0,1667	0,8333	0	0	0,0714	0,2857	0,5	0,1429	0	0,8571	0,0714	0,0714
6	0,3571	0	0,3571	0,2143	0,0715	0,125	0,375	0,125	0,375	0	0	1	0	0
7	0,0833	0	0,25	0,4167	0,25	0	0	0,214	0,6429	0,1431	0	0,9375	0,0625	0
8	0,25	0,0625	0	0,25	0,4375	0	0	0	0,75	0,25	0	1	0	0
9	0,3333	0	0,1667	0,5	0	0	0,1875	0,0625	0,5625	0,1875	0	1	0	0
10	0	0	0,3571	0,5	0,1429	0	0	0	0,625	0,375	0	1	0	0
11	0,3571	0	0	0,6429	0	0	0,0714	0	0,9286	0	0,0714	0,9286	0	0
12	0,0556	0,0556	0	0,8889	0	0	0	0,2222	0,7778	0	0,0556	0,9444	0	0
13	0,125	0,1875	0,125	0,185	0,3775	0	0	0,5625	0,3125	0,125	0	1	0	0
14	0,0625	0,1875	0,0625	0,125	0,5625	0	0,0625	0,125	0,125	0,6875	0	1	0	0
15	0	0,4167	0,0833	0,5	0	0,0625	0	0	0,1875	0,75	0	1	0	0
16	0,0714	0,2143	0	0,7143	0	0,1429	0,0714	0,0714	0	0,7143	0	1	0	0
17	0,0833	0,3333	0	0,3333	0,2501	0	0	0	0,625	0,375	0	1	0	0
18	0	0,1429	0,0714	0,7857	0	0	0,125	0	0,875	0	0,0625	0,9375	0	0
19	0,125	0,3125	0,0625	0,4375	0,0625	0	0,2143	0	0,6429	0,1428	0,3125	0,6875	0	0
20	0,125	0,125	0,0625	0,4375	0,25	0	0	0	0,5	0,5	0,0625	0,9375	0	0
21	0,1667	0	0,25	0,4167	0,1666	0	0,0625	0,0625	0,625	0,25	0	1	0	0
22	0,0714	0,2857	0	0,6429	0	0	0	0	1	0	0,1875	0,8125	0	0
23	0	0,3571	0,0714	0,5	0,0715	0	0	0	1	0	0,125	0,875	0	0
24	0	0,375	0	0,5625	0,0625	0	0,125	0,125	0,75	0	0,0625	0,8125	0,0625	0,0625
25	0,125	0,25	0	0,0625	0,5625	0	0,25	0,0833	0,5833	0,0834	0	0,9375	0,0625	0
26	0	0	0,1429	0,5	0,3571	0,0714	0,2857	0	0,4286	0,2143	0	1	0	0
27	0	0	0,0625	0,4375	0,5	0	0,1875	0	0,125	0,6875	0	1	0	0
28	0	0	0	0,8333	0,1667	0	0	0	0,8571	0,1429	0	1	0	0
29	0	0	0,3333	0,3333	0,3334	0	0	0,5	0,5	0	0	1	0	0
30	0,25	0	0	0,25	0,5	0	0	0	0,4	0,6	0	1	0	0
31	0,1667	0,25	0	0,1667	0,4166	0	0	0	1	0	0,1667	0,8333	0	0
Média	0,0969	0,1398	0,1048	0,4636	0,1949	0,0193	0,0872	0,1006	0,5672	0,2257	0,0437	0,9309	0,0167	0,0086

Pela observação desta tabela, nota-se uma diferença na quantidade de alelos encontrados em cada loco, sendo cinco no Tau 15 e no EE54 e quatro no EE2. Outra consideração que pode ser feita é que o alelo A4 é o mais freqüente, tanto no primeiro, quanto no segundo loco. Já no terceiro loco, o A2 tem uma freqüência maior que os outros, sendo

fixado em quase metade das progênies. No loco Tau 15, não há a ocorrência de alelos fixados em nenhuma das progênies. No EE54, as progênies 22, 23 e 31, apresentaram fixação do alelo A4.

4.2.2 – Diversidade genética

A estimativa dos parâmetros para a análise foi baseada em WRIGTH (1978) e estão apresentados na tabela 05.

Tabela 05 – Quantidade de heterozigose esperada (H_e), quantidade de heterozigose observada (H_o) e coeficiente de endogamia (F_{is}).

Progênie	H_e	H_o	F_{is}
1	0,538	0,5238	0,026394
2	0,3862	0,2202	0,429829
3	0,365	0,3016	0,173699
4	0,3138	0,131	0,582537
5	0,3266	0,2937	0,100735
6	0,4017	0,3254	0,189943
7	0,1296	0,1369	-0,05633
8	0,2542	0,1429	0,437844
9	0,4459	0,181	0,594079
10	0,291	0,0833	0,713746
11	0,0778	0,0833	-0,07069
12	0,1435	0,1508	-0,05087
13	0,4122	0,2619	0,364629
14	0,381	0,3512	0,078215
15	0,2805	0,1786	0,36328
16	0,3297	0,3333	-0,01092
17	0,3694	0,2083	0,436113
18	0,349	0,3869	-0,1086
19	0,5071	0,3889	0,23309
20	0,4483	0,1845	0,588445
21	0,3093	0,2143	0,307145
22	0,2833	0,25	0,117543
23	0,3122	0,25	0,199231
24	0,4365	0,4702	-0,07721
25	0,5056	0,4583	0,093552
26	0,4249	0,2857	0,327606
27	0,2111	0,0833	0,6054
28	0,3018	0,0833	0,723989
29	0,2262	0,1667	0,263042
30	0,4759	0,475	0,001891
31	0,3586	0,3889	-0,0845
MÉDIA	0,390794	0,282807	0,276328

A diferença entre as médias das heterozigosidades esperada e a observada, deve-se ao fato de haver mais homozigotos observados que o esperado, devido a uma certa endogamia que está ocorrendo nas progênies; além disso, é um indicativo que as populações não estão no equilíbrio de HW. Na comparação entre os F_{is} , as progênies 10 e 28 foram aquelas que apresentaram maiores valores de endogamia (0,7137 e 0,7239, respectivamente), ao passo que, a 30 apresentou a menor endogamia (0,00189) dentre as progênies estudadas. O valor do F_{is} médio de 0,276, mostrou que pode estar ocorrendo uma alta endogamia, quando comparado com valores encontrados em outros trabalhos na literatura. É o caso do cupuaçuzeiro (Alves, 2002) que apresentou valores de 0,194 em populações naturais e 0,202 em populações de Banco de Germoplasma Ativos. Em um estudo com outra espécie florestal, a *Melaleuca alternifolia* (Rossetto, 1999), apresentou um coeficiente de endogamia muito inferior (0,073).

Pela análise da estatística F, foram calculados os valores de F_{it} (índice de fixação para a espécie), F_{st} ou θ_p (divergência genética entre as progênies) e F_{is} ou f (coeficiente de endogamia).

Os valores da tabela 06 mostram os cálculos gerais, que permite uma análise da diversidade para a espécie como um todo.

Tabela 06 – Estimativa dos parâmetros da Estatísticas F de segundo Wright (1978).

F_{it}	F_{st}	F_{is}
0,4205	0,2147	0,2621

Observa-se que, do total, a diversidade genética entre as progênies (F_{st}), que foi de 21,47%, é menor que entre as progênies e 78,53%. O F_{is} indica a ocorrência de uma elevada endogamia dentro das progênies.

Para a análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizou-se os cálculos de qui-quadrado, representados na tabela 07.

Tabela 07 – Valores de Qui-quadrado (χ^2) e probabilidade exata (p).

Progênie	Tau 15		EE54		EE2	
	χ^2	p	χ^2	p	χ^2	p
1	3,322	0,0684	1,6529	0,1986	0,426	0,5139
2	0,0816	0,7751	0,63	0,4274	8	0,0047
3	0,375	0,5403	0,1944	0,6592	0,1944	0,6592
4	7	0,0082	8	0,0047	0,0356	0,8504
5	0,0496	0,8238	0,0311	0,86	0,1944	0,6592
6	3,322	0,1944	3,0612	0,0802	*	*
7	0,1944	0,6592	*	*	0,0356	0,8504
8	0,5207	0,4706	8	0,0047	*	*
9	3,5714	0,0588	5	0,0253	*	*
10	8	0,0047	7	0,0082	*	*
11	*	*	*	*	0,1633	0,6862
12	0,1944	0,6592	0,0496	8238	*	*
13	7	0,0082	0,0049	0,9442	*	*
14	0,4535	0,5007	0,5207	0,4706	*	*
15	1,7422	0,1869	0,1944	0,6592	*	*
16	0,63	0,4274	1,12	0,2899	*	*
17	0,0356	0,8504	5	0,0253	*	*
18	0,5825	0,4453	0,1944	0,06592	0,0356	0,8504
19	0,8889	0,3458	2,591	0,1075	1,6529	0,1986
20	3,5714	0,0588	7	0,0082	0,0356	0,8504
21	0,8889	0,3458	3,322	0,0684	*	*
22	0,4535	0,5007	*	*	0,426	0,5139
23	7	0,0082	0,6667	0,4142	0,1633	0,6862
24	2,3205	0,1277	0,5825	0,4453	0,426	0,5139
25	0,4535	0,5007	0,0356	0,8504	0,0356	0,8504
26	3,322	0,0684	0,1944	0,6592	*	*
27	0,0356	0,8504	4,0225	0,0449	*	*
28	4,4525	0,0349	7	0,0082	*	*
29	*	*	0	1	*	*
30	0,4535	0,5007	0,1389	0,7094	*	*
31	*	*	0,0049	0,9442	0,24	0,6242

Pela análise da tabela 07, pode-se concluir que as progênies não estão em equilíbrio de H-W. Os valores de p variaram de 0,0047 até 1. Os asteriscos (*) indicam locais onde não foi possível realizar os cálculos, pois havia fixação alélica no loco.

4.2.3 – Distância e Similaridade Genética

A distância genética foi calculada baseada na coancestria (Reynolds *et al.*,1983), pelo método de UPGMA. Os valores de distância e similaridade entre as progênies estão contidos na tabela 4, do anexo. O dendrograma da figura 2 mostra o agrupamento de distância entre as progênies.

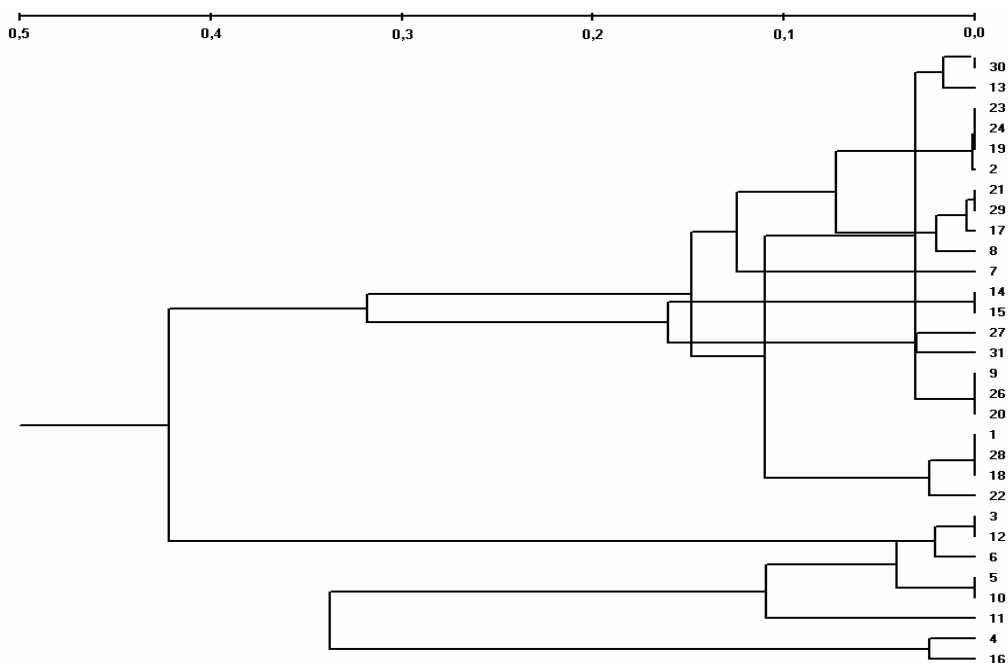


Figura 2 – Dendrograma representativo das distâncias entre as progênies, baseado na coancestria (Reynolds *et al.*,1983), pelo método UPGMA, com intervalo de confiança por reamostragem de 1000.

A total similaridade existente entre algumas progênies é devido ao fato de que poucos locos foram analisados no presente trabalho. É o caso, por exemplo, das progênies 25 e 30.

Como no dendrograma da figura 2, não mostra grandes esclarecimentos a respeito das distâncias entre as progênies, elas foram agrupadas em cinco populações, seguindo o critério de proximidade de coleta das sementes, para facilitar a visualização e compreensão da distância entre elas.

A tabela 08 mostra os agrupamentos das progênies em populações e a figura 3 o dendrograma entre populações.

Tabela 08 – Agrupamento por proximidade das progênies em cinco populações

População	Progênie	Local
1	1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 e 19	Região Sul da FCA
2	2, 3, 5, 12, 13, 15, 16, 17, 29, 30, 31	Região Norte da FCA
3	20 e 21	Região Leste
4	22, 23, 24 e 25	Véu da noiva
5	26, 27, 28, 29	Usina Indiana

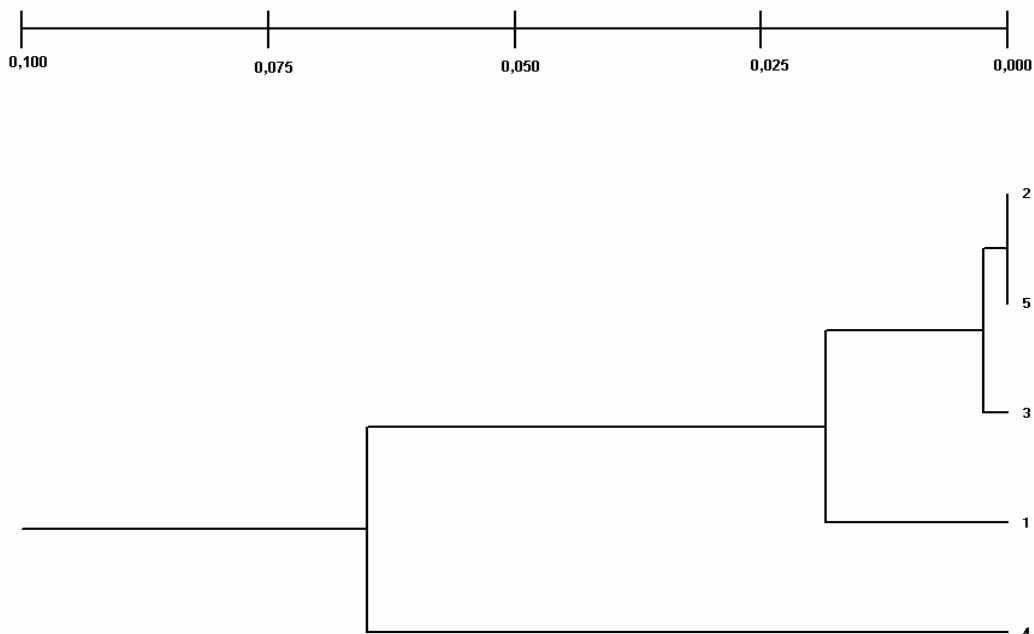


Figura 3 – Dendrograma das cinco populações. Baseado na coancestria (Reynolds *et al.*,1983), pelo método UPGMA, com intervalo de confiança de por amostragem 1000 bootstrapping.

O dendrograma da figura 3 mostra que população 4 é a mais distante das demais. Esta distância corresponde também à distância física em que ela se encontra (estrada Véu da Noiva) em relação as outras populações, que estão localizadas no Lageado e ou nas proximidades.

As distâncias e similaridades estão representadas na tabela 5, do anexo.

A tabela 09 mostra os valores de quantidade de heterozigose esperada (H_e), quantidade de heterozigose observada (H_o) e coeficiente de endogamia (F_{is}).

Tabela 09 - Valores de quantidade de heterozigose esperada (H_e), quantidade de heterozigose observada (H_o) e coeficiente de endogamia (F_{is}).

População	Progênie	He	Ho	Fis
1	1	0,538	0,5238	0,0264
	4	0,3138	0,131	0,5825
	6	0,4017	0,3254	0,1899
	7	0,1296	0,1369	-0,0563
	8	0,2542	0,1429	0,4378
	9	0,4459	0,181	0,5941
	10	0,291	0,0833	0,7137
	11	0,0778	0,0833	-0,0707
	14	0,381	0,3512	0,0782
	18	0,349	0,3869	-0,1086
Média		0,4312	0,2398	0,4439
2	2	0,349	0,3869	-0,1086
	3	0,365	0,3016	0,1737
	5	0,3266	0,3266	0,0000
	12	0,1435	0,1508	-0,0509
	13	0,4122	0,2619	0,3646
	15	0,2805	0,1786	0,3633
	16	0,3297	0,3333	-0,0109
	17	0,3694	0,2083	0,4361
	19	0,5071	0,3889	0,2331
	29	0,2262	0,1667	0,2630
	30	0,4759	0,475	0,0019
	31	0,3586	0,3886	-0,0837
Média		0,4711	0,2876	0,3895
3	20	0,4483	0,1845	0,5884
	21	0,3093	0,2143	0,3071
Média		0,4127	0,2002	0,5149
4	22	0,2833	0,25	0,1175
	23	0,3122	0,25	0,1992
	24	0,4365	0,4702	-0,0772
	25	0,5056	0,4583	0,0936
Média		0,4195	0,3665	0,1263
5	25	0,4249	0,2857	0,3276
	27	0,211	0,08333	0,6051
	28	0,3018	0,08333	0,7239
Média		0,4061	0,1489	0,6333

Observa-se na tabela 09 que a população quatro possui um menor coeficiente de endogamia. Em contraposição, a população cinco foi a que apresentou maior endogamia.

4.2.4 – Sistema de reprodução

Os parâmetros genéticos referentes ao sistema reprodutivo do ipê-roxo são apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Parâmetros do sistema de reprodução em *Tabebuia heptaphylla*

Parâmetro	Valores	Intervalo de confiança (95% de probabilidade)
F_m : Índice de fixação nas árvores maternas	- 0,008	0,01
t_m : Taxa de cruzamentos multilocos	0,808	0,066
t_s : Taxa de cruzamento uniloco	0,703	0,063
t_m-t_s : Taxa de cruzamentos aparentados	0,105	0,019
$r_{p(m)}$: Correlação de paternidade multilocos	0,139	0,045
$r_{p(s)}$: Correlação de paternidade uniloco	0,07	0,039
$[r_{p(s)} - r_{p(m)}]$: diferença das correlações	- 0,069	0,019

- Como, $r_{xy} = \frac{1}{4} (1+f_p) [4 s + (t_m^2 + s t_m r_s)(1 + r_p)]$;

Onde: r_{xy} é o coeficiente de parentesco entre as progênie, f_p é o coeficiente de endogamia na geração parental, t a taxa de cruzamento e r_s a relação de autofecundação. Como não é possível determinar f_p , r_s e r_p , assume-se estes valores como nulos; logo:

$$r_{xy} = \frac{1}{4} (1+0) [4 s + (t_m^2 + s t_m 0)(1 + 0)]$$

$$r_{xy} = \frac{1}{4} (4 s + t_m^2)$$

- Se, $t_m (1-r_{p(m)}) + t_m (r_{p(m)}) + s = 1$ (total de cruzamentos);

onde s representa os cruzamentos por autofecundação, então:

$$0,808 (1 - 0,139) + 0,808 (0,139) + s = 1$$

$$s = 0,192$$

deste valor tem-se:

$$r_{xy} = \frac{1}{4} (4 \cdot 0,192 + 0,808^2)$$

$$r_{xy} = 0,3552$$

- Tem-se ainda, $\theta_{xy} = \frac{1}{2} r_{xy}$;

em que θ_{xy} é o coeficiente de coancestria, portanto:

$$\theta_{xy} = 0,1776$$

Então, dos valores calculados pode-se dizer que 19,2% dos cruzamentos são por autofecundação; 11,23% ($t_m \cdot r_{p(m)}$) são cruzamentos entre irmãos completos e ($t_m - 0,1123$), resultam em cruzamentos de meios-irmãos (69,57%).

O coeficiente de coancestria θ_{xy} estimado é valor intermediário entre meios-irmãos (0,125) e irmãos-completos (0,25).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

a) para *Tabebuia heptaphylla* a grande diversidade genética está dentro das progênies (78,53%), pois a diversidade genética entre as progênies (F_{st}) foi de 21,47%.

b) Com relação ao sistema de reprodução da espécie, pode-se concluir que 19,2% dos cruzamentos são devidos a autofecundação, 11,23% são cruzamentos de meio-irmãos e 69,57% de irmãos-completos.

c) O ipê-roxo tem sistema de reprodução misto com tendência a alogamia ($t_m=0,808$).

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., CREGAN P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, p.1131-9, 1992.
- ALVES, R.M.. Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélite e descritores botânico-agronômicos. Piracicaba, 2002. 146f. Tese (Doutorado) - ESALQ/USP.
- BARROSO, G. M., MORIM, M.P., PEIXOTO, A.L., ICHASO, C.L.F. Frutos e Semente: Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 443p.
- BORBA, V.S. Marcadores Moleculares: classificação e aplicação. Universidade Federal de Viçosa, 2002. <<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL005.htm>> Acesso em: 14 abril 2007.
- BRAGA, A.C., REIS, A.M.M., LEOI, L.T., PEREIRA, R.W., COLLEVATTI, R.G. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). Brasília, 2006. Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia - Universidade Católica de Brasília.
- BROWN, A.H.D. Isozymes, plant population genetics structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 52, p. 145-157, 1978.
- CARVALHO, P.E.R. Espécies Arbóreas Brasileiras. 1 ed. Curitiba - S.C. Vol. 1, 2003, p. 155-176.
- CARVALHO, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: Embrapa - CNPF, Brasília, D.F.: Embrapa-SPI, 1994, p.639.
- CHASE, M.R., MOLLER, C., KESSELI, R., BAWA, K.S. Long distance gene flow in a fragmented tropical tree population. **Nature**, v. 123, p. 127-132, 1996.

- ELLSTRAND, N.C. Gene flow among seed plant population. **New Forests**, v.6, p.241-256, 1992.
- ENGEL, V.L., POGGIANI, F. Influência do sombreamento sobre o crescimento de mudas de algumas espécies nativas e suas implicações ecológicas e silviculturais. IPEF. Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, v. 43/44, p. 1-10, 1990.
- FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ed. Brasília, EMBRAPA – CENARGEN, 1995, 220p.
- FERREIRA, M.A.J.F. Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2003, 63p.
- FREITAS, M.L.M. Caracterização genética por marcadores fAFLP e caracteres quantitativos em uma população de Myracrodruon urundeuva F.F. & M.F. Allemão. Jaboticabal, 2003. 88f. Tese (Doutorado) – UNESP.
- FUTUYMA, D.J. Biologia Evolutiva. 2 ed. Ribeirão Preto: SBG. 1992, 646p.
- GAIOTTO, F.A. Inferências sobre herança quantitativa em populações naturais de Euterpe edulis Mart. utilizando marcadores microssatélites. Piracicaba, 2001. Tese (Doutorado) - ESALQ/USP.
- GOEDERT, C. Germoplasma: o que é isso? **Seednews**, v.9, n.3, p.16-21, 2002.
- HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v.69, n. 10, p. 1685- 93, 1982.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetics variation withing end among natural plant population. In: C.M.SCHONE – WALD – COX, S.H. CHAMBERRS, B. Mac BYDE & L. THOMAS. Genetics and Conservation. Menlo Park Cumming, 1983, p. 335-48.
- HEDRICK, P.W. Genetics of population. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1999, 552p.

- HONGTRAKUL, V., HUESTIS, G.M., KNAPP, S.J. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. **Theoretical and Applied Genetics**: 95, p.400-407, 1997.
- JANKOWSKY, I.P., CHIMELO, J.P., CAVALCANTE, A.A., GALINA I.C.M., NAGAMURA, J.C.S. Madeiras Brasileiras Caxias do Sul: SPECTRUM, V1, 1990. In MARTO, G.B.T.. Instituto de pesquisa de estudos florestais. Piracicaba / SP. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/tabebuia.heptaphylla.asp>> Acesso em: 20 março 2007.
- JARRET, R.L., VUYLSTEKE, D.R., GAWEL, N.J., PIMENTEL, R.B., DUNBAR, L.J. Detecting genetics diversity in diploid bananas using PCR and primers from a highly repetitive DNA sequence. **Euphytica**, v. 68, p.69-76, 1993.
- KAGEYAMA, P.Y., OLIVEIRA R.E., MORAES L.F.D., ENGEL V.L., GANDARA F.B. Restauração Ecológica de Ecossistemas Naturais. Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais. 2003. 340p.
- KARRON, J.D., THUMSER.N.N, TUCKER, R., HESSENAUER, A.J. The influence of population density on outcrossing rates in *Mimulus ringens*. **Heredity**, v.75, p.175-180, 1995.
- KIJAS, J.M.H., FOWLER, J.C.S., THOMAS, M.R. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. p.349-55, 1995.
- LEE, M. DNA markers and plant breeding program. **Advances in Agronomy**. New York, v.55, p.265-344, 1995.
- LITT, M., LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal Human Genetic**, v.44, p.397-400, 1989.
- LONGHI, R.A. Livro das árvores: árvores e arvoretas do Sul. Porto Alegre: L&PM, 1995. 176p.

- LORENZI, H.. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, v.1, 1998, 368p.
- MENGES, E.D.. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. **Conservation Biology**, v.5, p.158-64, 1991.
- MILLER, M.P.. TFGGA – Analytical Software Page, 1997. Disponível em: <<http://bioweb.usu.edu/mpmbio/tfpga.htm>>. Acesso em: 15 dezembro 2007.
- MORGANTE, M., OLIVIERI, A.M. PCR amplified microsattelites as markers in plants genetics. **The plant Journal**, v.3, p.175-82, 1993.
- MOXON, E.R., WILLS, C. DNA microsattelites: agents of evolution? **Scientific American**, v.280-1, p.72-7, 1999.
- NASON, J.D., HAMRICK, J.L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case of neotropical canopy trees. **Journal of Heredity**, v.88, p.264-76, 1997.
- OLIVEIRA, A.F., CARVALHO, D., ROSADO, S.C.S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Rev. bras. Bot.**, vol.25, n.3, p.331-8, 2002.
- RITLAND, K. **Multilocus mating system program MLTR**. Version 3.0. Disponível em: <<http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs>>. Acesso em: 14 jun 2008.
- RIZZINI, C.T. Árvores e madeiras úteis do Brasil, manual de dendrologia brasileira. 2ª ed. São Paulo. Blucher, 1985, 269p.
- RODER, M.S., PLASCHKE, J., KONIG, S.U., BORNER, A., SORRELLS, M.A., TANKSLEY, S.D., GANAL, M.W. Abundance, variability and chromosomal location of microssatellite in wheat. **Molecular & Genetic**, v. 246, p.327-33, 1995.

- ROSSETTO, M., SLADE, R.W., BAVERSTOCK, P.R., HENRY, R. J., LEE, L.S. Microsatellite variation and assessment of genetic structure in tea tree (*Melaleuca alternifolia* - Myrtaceae). **Molecular Ecology**, v.8, p. 633-43, 1999.
- SAUNDERS, D.A.Jr., HOBBS, R.J., MARGULES, C.R. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology**, v.5, p.18-32, 1991.
- SEBBENN, A.M., SEOANE, C.E.S., KAGEYAMA, P.Y., LACERTA, C.M. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*) **Scientia Florestalis**, n.58, p.127-43, 2000.
- SEBBENN, A.M., KAGEYAMA, P.Y., SIQUEIRA, A.C.M.F., ZANATTO, A.C.S. Sistema de cruzamento de populações de *Cariniana legalis* Mart. O. Ktze.: implicações para a conservação e melhoramento genético. **Scientia Florestalis**, v.58, p.25-40, 2000.
- SEBBENN, A.M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, v.14, n.2, p.115-32, 2002.
- SEBBENN, A.M.. Tamanho amostral para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal**, v.15, n.2, p.147-62, 2003.
- SLATKIN, M. Gene flow in natural population. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.16, p.393-430, 1985.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, n.139, p. 457-62, 1995.
- SMITH, D.N., DEVEY, M.E. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*. **Genome**, v.37, p. 977-83, 1994.
- SOULÉ, M.E., KOHM, K.A. Research priorities for conservation biology. Washington, Island Press, 1989.

STEINKELLNER, H., FLUCH, S., TURETSCHKEK, E., LEXER, C., STREIFF, R.,
KREMER, A. Identification and characterization of (GA/CT) (n)-microsatellite loci from
Quercus petraea. Plant Molecular Biology, 1997, 33p.

7 – ANEXOS

Tabela 1 – Localidade das progênies

PROGÊNIE	LOCALIZAÇÃO (utm)
1	7471353
2	7469662
3	7471244
4	7471170
5	7471095
6	7471244
7	7471321
8	7471179
9	7471244
10	7471287
11	7471291
12	7471295
13	7471247
14	7471373
15	7471393
16	7471230
17	7471260
18	7471163
19	7471321
20	7471230
21	7467783
22	7467739
23	7457580
24	7457623
25	7465058
26	7457580
27	7457580
28	7465058
29	7465058
30	7469032
31	7471369
32	7471244
33	7471696

Tabela 2 - Dados de concentração e qualidade obtidos após a extração do DNA

Progênie/ Indivíduo	Concentração (ng/ul)	260/230	262/280	7P6	2628	2,231	1,936
				7P7	1983	2,221	1,911
2P1	1435	2,324	2,158	7P8	2085	2,183	1,922
2P2	1213	2,137	2,127	8P	2395	2,202	2,129
2P3	1585	2,225	2,135	8P1	363	1,908	2,014
2P4	928	235	2,145	8P2	4455	2,242	1,939
2P5	935	2,323	2,174	8P3	1198	2,259	2,021
2P6	1805	2,081	1,842	8P4	3715	2,258	1,973
2P7	498	1,73	1,826	8P5	2715	2,316	1,996
2P8	2060	2,168	1,93	8P6	2713	2,256	1,984
3P	1943	1,807	1,972	8P7	3170	2,285	1,991
3P1	963	2,104	2,104	9P1	855	2,138	2,098
3P2	1553	2,088	1,828	9P2	608	1,855	2,024
3P3	2350	2,363	2,022	9P3	4245	2,155	1,828
3P4	785	2,196	2	9P4	2133	2,216	1,846
3P5	6193	2,146	1,892	9P5	1675	2,168	1,846
3P6	3288	1,934	1,753	9P6	2013	2,152	1,917
3P7	2045	2,279	1,972	9P7	2653	2,296	1,95
4P1	1250	2,262	2,129	9P8	2063	2,279	1,964
4P2	673	2,152	2,135	10P1	768	1,968	1,806
4P3	615	2,103	2,085	10P2	788	1,74	1,74
4P4	1018	1,929	2,131	10P3	733	1,831	1,776
4P5	1183	2,252	2,075	10P4	1553	2,194	2,063
4P6	2400	2,238	1,975	10P5	623	1,858	1,804
4P7	2723	2,283	1,991	10P6	370	1,644	1,786
4P8	2478	2,305	2,002	10P7	3273	2,129	2,037
5P	1644	1,808	1,947	10P8	1165	2,017	1,808
5P1	955	2,1	1,863	11P1	678	2,053	2,085
5P2	825	2,11	1,83	11P2	725	1,959	2,071
5P3	2410	2,128	2,017	11P3	855	1,727	1,988
5P4	1080	1,923	1,75	11P4	605	1,875	1,868
5P5	3513	2,182	1,834	11P5	2350	2,265	1,946
5P6	2785	2,335	1,972	11P6	335	1,7	1,863
5P7	3253	2,267	1,93	11P7	4610	2,191	1,875
6P1	1125	2,217	2,045	11P8	2208	1,867	1,879
6P2	610	1,968	1,937	12P1	2923	2,288	1,99
6P3	565	2,073	2,018	12P2	2720	2,402	2,007
6P4	1210	2,22	2,034	12P3	3245	2,306	2,003
6P5	1535	2,266	2,054	12P4	2443	2,394	2,014
6P6	2220	1,7	1,745	12P5	2875	2,386	2,018
6P7	2933	2,217	2,08	12P6	2675	2,415	2,011
6P8	2973	2,291	1,864	12P7	4878	2,293	1,975
7P1	1170	2,218	1,958	12P8	3360	2,341	1,994
7P2	693	2,022	2,067	13PT	2433	2,345	2,006
7P3	1350	2,122	1,953	13P1	2488	2,231	1,947
7P4	1225	2,178	1,899	13P2	2348	2,274	1,952
7P5	3908	2,171	1,895	13P	4323	2,217	1,908

13P4	1765	2,227	1,956	19P8	2325	2,263	1,871
13P5	2458	2,313	1,966	20P1	3808	2,148	1,79
13P6	1933	2,307	1,957	20P2	2818	2,163	1,824
13P7	1813	2,262	1,967	20P3	3728	2,121	1,803
14P1	685	2,228	1,95	20P4	1558	2,054	1,809
14P2	1140	2,246	2,092	20P5	1325	2,054	1,809
14P3	1688	2,192	1,912	20P6	968	2,138	1,852
14P4	2248	2,231	1,946	20P7	1803	2,165	1,829
14P5	2160	2,182	1,933	20P8	1338	2,149	1,838
14P6	4973	2,212	1,855	21P1	823	2,069	2,043
14P7	3305	2,129	1,91	21P2	650	1,769	2,016
14P8	5795	1,986	1,735	21P3	1270	2,171	1,861
15P1	2540	2,145	2,044	21P4	435	2,148	1,851
15P2	388	1,703	1,914	21P5	698	2,197	2,163
15P3	725	2,132	2,101	21P6	953	2,105	1,859
15P4	830	2,049	2,037	21P7	1858	2,238	1,866
15P5	2315	2,246	1,935	21P8	868	2,129	1,866
15P6	2685	2,242	1,932	22P1	2845	2,193	1,813
15P7	2048	1,959	1,853	22P2	1433	2,146	1,831
15P8	1700	2,237	1,94	22P3	1783	2,18	1,833
16P1	1953	2,169	1,943	22P4	1305	2,231	1,851
16P2	978	2,08	1,955	22P5	1358	2,225	1,847
16P3	2153	2,174	1,93	22P6	1595	2,17	1,833
16P4	475	2,021	1,959	22P7	1068	1,991	1,798
16P5	913	1,931	1,911	22P8	1918	2,152	1,877
16P6	1413	2,14	1,952	23P1	1455	2,159	2,035
16P7	5148	2,172	1,857	23P2	870	1,994	1,983
16P8	5285	2,191	1,858	23P3	1690	2,209	2,067
17P1	1235	2,033	1,83	23P4	1808	2,177	2,036
17P2	5035	2,228	1,831	23P5	643	1,836	1,977
17P3	1010	2,03	1,845	23P6	2423	2,285	1,849
17P4	2560	2,301	1,886	23P7	1683	2,254	1,844
17P5	2365	2,342	1,911	23P8	1685	2,254	1,867
17P6	1583	1,942	1,933	24P1	955	2,021	1,828
17P7	1730	2,225	1,875	24P2	373	1,817	1,733
18P	2670	2,255	1,98	24P3	498	1,707	1,737
18P1	868	1,983	2,017	24P4	903	1,814	1,761
18P2	428	1,988	2,111	24P5	2365	2,13	1,837
18P3	3405	2,224	1,908	24P6	2570	2,247	2,077
18P4	3275	2,03	1,808	24P7	3583	2,242	2,057
18P5	3620	2,3	1,87	24P8	3163	2,215	1,833
18P6	4825	2,117	1,77	26P1	973	2,223	2,103
18P7	4263	2,12	1,793	26P2	1268	1,928	1,973
19P1	1125	1,797	1,741	26P3	313	1,603	1,866
19P2	578	1,805	1,75	26P4	3335	2,212	1,942
19P3	1415	2,036	1,808	26P5	2510	2,258	1,94
19P4	1540	2,067	1,833	26P6	1468	2,166	1,957
19P5	775	1,925	1,782	26P7	1033	2,151	1,957
19P6	1930	1,7	1,708	26P8	743	2,106	1,967
19P7	1573	2,029	1,792	27P1	645	2,016	2,031

27P2	1268	2,243	2,053	30P1	545	1,607	1,722
27P3	785	2,093	2,039	30P2	2735	2,165	1,91
27P4	1183	2,2	2,048	30P3	395	1,717	1,859
27P5	4390	2,203	1,82	30P4	1240	2,083	1,946
27P6	2105	2,173	1,886	30P5	1128	1,895	1,856
27P7	6000	2,09	2,05	30P6	1390	2,068	1,865
27P8	3115	2,178	2,06	30P7	848	1,753	1,78
28P2	1908	2,105	1,924	30P8	1218	1,94	1,852
28P3	998	2,134	1,975	32P	1648	2,135	1,95
28P4	1190	2,174	1,983	32P1	498	2,01	2,031
28P5	3098	2,265	1,973	32P2	788	2,143	2,006
28P6	1120	1,723	1,814	32P3	958	2,152	2,016
28P7	4840	2,219	1,812	32P4	1113	2,225	2,014
28P8	2475	2,143	2,029	32P6	760	2,18	1,962
29P1	1648	1,991	1,73	32P7	1438	2,264	1,962
29P2	3415	2,158	1,788	32P8	2605	2,321	1,959
29P3	493	1,759	1,913	33P1	1485	2,267	2,027
29P4	848	1,842	1,904	33P2	1603	2,32	1,918
29P5	733	1,89	1,809	33P3	1145	1,897	1,786
29P6	690	1,816	1,828	33P4	4095	2,114	1,882
29P7	2173	2,167	1,931	33P5	5423	2,123	1,877
29P8	1043	2,054	1,896	33P6	1258	2,061	1,988

Tabela 3 - Distância genética (REYNOLDS ET AL. 1983)

Populações comparadas			Populações comparadas		
	Similaridade	Distancia		Similaridade	Distancia
1 vs. 2	0,0793	0,0826	2 vs. 18	0,0292	0,0296
1 vs. 3	0,0043	0,0043	2 vs. 19	0,0037	0,0037
1 vs. 4	0,2372	0,2708	2 vs. 20	0,2546	0,2938
1 vs. 5	0,1325	0,1421	2 vs. 21	0,0650	0,0672
1 vs. 6	-,0031	-,0031	2 vs. 22	0,1274	0,1363
1 vs. 7	0,1738	0,1909	2 vs. 23	-,0330	-,0325
1 vs. 8	0,1364	0,1466	2 vs. 24	-,0045	-,0045
1 vs. 9	0,0503	0,0516	2 vs. 25	0,0773	0,0805
1 vs. 10	0,0970	0,1020	2 vs. 26	0,2400	0,2745
1 vs. 11	0,2250	0,2549	2 vs. 27	0,3263	0,3950
1 vs. 12	0,1356	0,1457	2 vs. 28	0,1555	0,1690
1 vs. 13	0,0104	0,0104	2 vs. 29	0,0764	0,0795
1 vs. 14	0,2706	0,3156	2 vs. 30	0,1652	0,1806
1 vs. 15	0,3220	0,3886	2 vs. 31	0,1717	0,1884
1 vs. 16	0,2932	0,3470	3 vs. 4	0,2427	0,2779
1 vs. 17	0,0783	0,0816	3 vs. 5	0,0386	0,0394
1 vs. 18	-,0087	-,0087	3 vs. 6	-,0084	-,0084
1 vs. 19	0,0514	0,0528	3 vs. 7	0,3753	0,4705
1 vs. 20	0,0920	0,0965	3 vs. 8	0,3254	0,3937
1 vs. 21	0,1364	0,1467	3 vs. 9	0,1548	0,1681
1 vs. 22	0,0299	0,0303	3 vs. 10	0,0290	0,0294
1 vs. 23	0,0688	0,0712	3 vs. 11	0,0798	0,0832
1 vs. 24	0,0616	0,0636	3 vs. 12	-,0059	-,0058
1 vs. 25	0,0218	0,0220	3 vs. 13	0,1336	0,1434
1 vs. 26	0,0467	0,0478	3 vs. 14	0,4064	0,5215
1 vs. 27	0,3595	0,4455	3 vs. 15	0,4683	0,6317
1 vs. 28	-,0011	-,0011	3 vs. 16	0,3564	0,4407
1 vs. 29	0,1932	0,2147	3 vs. 17	0,2432	0,2786
1 vs. 30	0,0428	0,0438	3 vs. 18	0,1220	0,1301
1 vs. 31	0,2459	0,2822	3 vs. 19	0,2431	0,2786
2 vs. 3	0,2699	0,3145	3 vs. 20	0,1510	0,1637
2 vs. 4	0,4645	0,6246	3 vs. 21	0,3141	0,3771
2 vs. 5	0,4232	0,5503	3 vs. 22	0,0830	0,0866
2 vs. 6	0,2199	0,2484	3 vs. 23	0,2602	0,3014
2 vs. 7	0,0278	0,0282	3 vs. 24	0,2518	0,2901
2 vs. 8	0,0388	0,0396	3 vs. 25	0,1650	0,1803
2 vs. 9	0,1544	0,1677	3 vs. 26	0,0849	0,0887
2 vs. 10	0,3467	0,4257	3 vs. 27	0,5507	0,8001
2 vs. 11	0,5484	0,7949	3 vs. 28	0,0222	0,0225
2 vs. 12	0,4384	0,5770	3 vs. 29	0,4173	0,5401
2 vs. 13	0,0547	0,0563	3 vs. 30	0,1505	0,1631
2 vs. 14	0,3539	0,4368	3 vs. 31	0,4540	0,6051
2 vs. 15	0,3829	0,4827	4 vs. 5	0,0686	0,0710
2 vs. 16	0,4880	0,6694	4 vs. 6	0,1436	0,1551
2 vs. 17	0,1011	0,1066			

4 vs. 7	0,5927	0,8981	5 vs. 31	0,5009	0,6949
4 vs. 8	0,4676	0,6304	6 vs. 7	0,3425	0,4193
4 vs. 9	0,1174	0,1248	6 vs. 8	0,2607	0,3020
4 vs. 10	0,0909	0,0953	6 vs. 9	0,0149	0,0150
4 vs. 11	0,3537	0,4364	6 vs. 10	0,0044	0,0044
4 vs. 12	0,3208	0,3869	6 vs. 11	0,1727	0,1896
4 vs. 13	0,2666	0,3100	6 vs. 12	0,0486	0,0498
4 vs. 14	0,2033	0,2273	6 vs. 13	0,0289	0,0294
4 vs. 15	0,2706	0,3155	6 vs. 14	0,2737	0,3198
4 vs. 16	0,0239	0,0242	6 vs. 15	0,3405	0,4163
4 vs. 17	0,3306	0,4014	6 vs. 16	0,2291	0,2602
4 vs. 18	0,3867	0,4889	6 vs. 17	0,1603	0,1747
4 vs. 19	0,3655	0,4550	6 vs. 18	0,1090	0,1154
4 vs. 20	0,0205	0,0207	6 vs. 19	0,1860	0,2058
4 vs. 21	0,4046	0,5185	6 vs. 20	0,0608	0,0628
4 vs. 22	0,3933	0,4997	6 vs. 21	0,2305	0,2621
4 vs. 23	0,4632	0,6221	6 vs. 22	0,1219	0,1300
4 vs. 24	0,4083	0,5248	6 vs. 23	0,1906	0,2115
4 vs. 25	0,2423	0,2775	6 vs. 24	0,1875	0,2076
4 vs. 26	0,0873	0,0914	6 vs. 25	0,0615	0,0635
4 vs. 27	0,4839	0,6615	6 vs. 26	-,0273	-,0269
4 vs. 28	0,2825	0,3320	6 vs. 27	0,4301	0,5623
4 vs. 29	0,4888	0,6710	6 vs. 28	0,0185	0,0187
4 vs. 30	0,1409	0,1519	6 vs. 29	0,2831	0,3329
4 vs. 31	0,4528	0,6029	6 vs. 30	0,0438	0,0448
5 vs. 6	0,0439	0,0448	6 vs. 31	0,3346	0,4073
5 vs. 7	0,5411	0,7789	7 vs. 8	0,0357	0,0364
5 vs. 8	0,4537	0,6045	7 vs. 9	0,2946	0,3490
5 vs. 9	0,1587	0,1729	7 vs. 10	0,4652	0,6258
5 vs. 10	-,0149	-,0148	7 vs. 11	0,7363	1,3331
5 vs. 11	0,0902	0,0945	7 vs. 12	0,5948	0,9034
5 vs. 12	0,0787	0,0820	7 vs. 13	0,1514	0,1642
5 vs. 13	0,2386	0,2726	7 vs. 14	0,5188	0,7315
5 vs. 14	0,3582	0,4435	7 vs. 15	0,5523	0,8036
5 vs. 15	0,4317	0,5651	7 vs. 16	0,6375	1,0148
5 vs. 16	0,2198	0,2481	7 vs. 17	0,1890	0,2095
5 vs. 17	0,3273	0,3965	7 vs. 18	0,0506	0,0519
5 vs. 18	0,2917	0,3449	7 vs. 19	0,1381	0,1486
5 vs. 19	0,3348	0,4077	7 vs. 20	0,3753	0,4704
5 vs. 20	0,0981	0,1033	7 vs. 21	0,1136	0,1206
5 vs. 21	0,4073	0,5230	7 vs. 22	0,1772	0,1951
5 vs. 22	0,2640	0,3066	7 vs. 23	0,0399	0,0407
5 vs. 23	0,4082	0,5246	7 vs. 24	0,1265	0,1352
5 vs. 24	0,3644	0,4531	7 vs. 25	0,2121	0,2384
5 vs. 25	0,2248	0,2546	7 vs. 26	0,3731	0,4670
5 vs. 26	0,0551	0,0567	7 vs. 27	0,5090	0,7114
5 vs. 27	0,5669	0,8367	7 vs. 28	0,2067	0,2315
5 vs. 28	0,1648	0,1801	7 vs. 29	0,2428	0,2781
5 vs. 29	0,5145	0,7226	7 vs. 30	0,2850	0,3355
5 vs. 30	0,1778	0,1958			

7 vs. 31	0,3732	0,4672	10 vs. 13	0,1471	0,1591
8 vs. 9	0,1296	0,1388	10 vs. 14	0,3359	0,4093
8 vs. 10	0,3546	0,4379	10 vs. 15	0,3976	0,5068
8 vs. 11	0,6141	0,9521	10 vs. 16	0,2571	0,2971
8 vs. 12	0,4968	0,6868	10 vs. 17	0,2619	0,3036
8 vs. 13	0,0431	0,0440	10 vs. 18	0,2155	0,2427
8 vs. 14	0,3308	0,4017	10 vs. 19	0,2981	0,3539
8 vs. 15	0,3354	0,4086	10 vs. 20	0,0493	0,0505
8 vs. 16	0,5051	0,7033	10 vs. 21	0,3227	0,3897
8 vs. 17	0,0277	0,0281	10 vs. 22	0,1985	0,2213
8 vs. 18	0,0457	0,0467	10 vs. 23	0,3402	0,4158
8 vs. 19	0,0750	0,0780	10 vs. 24	0,3229	0,3900
8 vs. 20	0,2167	0,2442	10 vs. 25	0,1923	0,2136
8 vs. 21	-,0402	-,0394	10 vs. 26	0,0296	0,0301
8 vs. 22	0,1842	0,2036	10 vs. 27	0,5256	0,7457
8 vs. 23	0,0451	0,0461	10 vs. 28	0,0778	0,0810
8 vs. 24	0,0852	0,0891	10 vs. 29	0,4273	0,5573
8 vs. 25	0,1165	0,1239	10 vs. 30	0,1232	0,1315
8 vs. 26	0,2681	0,3121	10 vs. 31	0,4594	0,6151
8 vs. 27	0,2946	0,3489	11 vs. 12	0,0436	0,0446
8 vs. 28	0,1431	0,1544	11 vs. 13	0,3897	0,4938
8 vs. 29	0,0326	0,0332	11 vs. 14	0,5963	0,9071
8 vs. 30	0,1254	0,1340	11 vs. 15	0,6718	1,1140
8 vs. 31	0,2120	0,2382	11 vs. 16	0,5216	0,7373
9 vs. 10	0,0914	0,0959	11 vs. 17	0,5193	0,7326
9 vs. 11	0,3762	0,4720	11 vs. 18	0,4077	0,5237
9 vs. 12	0,2640	0,3065	11 vs. 19	0,4625	0,6207
9 vs. 13	-,0237	-,0234	11 vs. 20	0,3314	0,4025
9 vs. 14	0,0704	0,0730	11 vs. 21	0,5756	0,8570
9 vs. 15	0,0995	0,1048	11 vs. 22	0,3358	0,4092
9 vs. 16	0,1483	0,1605	11 vs. 23	0,5397	0,7759
9 vs. 17	0,0298	0,0303	11 vs. 24	0,5030	0,6991
9 vs. 18	0,1132	0,1201	11 vs. 25	0,3904	0,4949
9 vs. 19	0,0980	0,1031	11 vs. 26	0,2400	0,2744
9 vs. 20	-,0335	-,0329	11 vs. 27	0,7505	1,3883
9 vs. 21	0,0745	0,0775	11 vs. 28	0,2876	0,3391
9 vs. 22	0,1847	0,2042	11 vs. 29	0,6954	1,1888
9 vs. 23	0,1353	0,1454	11 vs. 30	0,3872	0,4897
9 vs. 24	0,1073	0,1135	11 vs. 31	0,6616	1,0836
9 vs. 25	-,0114	-,0113	12 vs. 13	0,2544	0,2936
9 vs. 26	-,0117	-,0116	12 vs. 14	0,5309	0,7568
9 vs. 27	0,1816	0,2004	12 vs. 15	0,6038	0,9258
9 vs. 28	0,0667	0,0691	12 vs. 16	0,4763	0,6468
9 vs. 29	0,0851	0,0890	12 vs. 17	0,4147	0,5357
9 vs. 30	-,0456	-,0446	12 vs. 18	0,2802	0,3287
9 vs. 31	0,1425	0,1537	12 vs. 19	0,3943	0,5013
10 vs. 11	0,1271	0,1359	12 vs. 20	0,2554	0,2949
10 vs. 12	0,0434	0,0444	12 vs. 21	0,4709	0,6366
			12 vs. 22	0,2141	0,2409

12 vs. 23	0,4236	0,5509	15 vs. 20	0,1054	0,1114
12 vs. 24	0,4104	0,5283	15 vs. 21	0,2397	0,2741
12 vs. 25	0,2977	0,3534	15 vs. 22	0,4890	0,6715
12 vs. 26	0,1534	0,1666	15 vs. 23	0,4058	0,5206
12 vs. 27	0,6881	1,1652	15 vs. 24	0,3168	0,3810
12 vs. 28	0,1346	0,1445	15 vs. 25	0,1866	0,2065
12 vs. 29	0,6046	0,9279	15 vs. 26	0,2613	0,3029
12 vs. 30	0,2908	0,3436	15 vs. 27	0,0855	0,0894
12 vs. 31	0,6019	0,9212	15 vs. 28	0,3907	0,4955
			15 vs. 29	0,2395	0,2737
13 vs. 14	0,2046	0,2289	15 vs. 30	0,1023	0,1079
13 vs. 15	0,2451	0,2812	15 vs. 31	0,1743	0,1915
13 vs. 16	0,3135	0,3762			
13 vs. 17	0,0292	0,0296	16 vs. 17	0,3391	0,4142
13 vs. 18	0,0257	0,0260	16 vs. 18	0,4503	0,5983
13 vs. 19	0,0749	0,0778	16 vs. 19	0,3885	0,4919
13 vs. 20	0,0724	0,0751	16 vs. 20	0,0780	0,0812
13 vs. 21	0,0347	0,0353	16 vs. 21	0,4308	0,5635
13 vs. 22	0,1047	0,1106	16 vs. 22	0,4956	0,6844
13 vs. 23	0,0436	0,0446	16 vs. 23	0,5017	0,6965
13 vs. 24	0,0775	0,0807	16 vs. 24	0,4184	0,5419
13 vs. 25	0,0179	0,0181	16 vs. 25	0,2356	0,2687
13 vs. 26	0,0741	0,0770	16 vs. 26	0,1533	0,1664
13 vs. 27	0,2697	0,3144	16 vs. 27	0,4367	0,5740
13 vs. 28	0,0296	0,0301	16 vs. 28	0,3824	0,4819
13 vs. 29	0,0601	0,0620	16 vs. 29	0,4790	0,6519
13 vs. 30	0,0147	0,0148	16 vs. 30	0,1423	0,1535
13 vs. 31	0,1901	0,2108	16 vs. 31	0,4131	0,5329
14 vs. 15	-,0176	-,0175	17 vs. 18	0,0692	0,0717
14 vs. 16	0,1066	0,1127	17 vs. 19	0,0549	0,0565
14 vs. 17	0,1812	0,2000	17 vs. 20	0,0927	0,0973
14 vs. 18	0,3692	0,4608	17 vs. 21	-,0219	-,0217
14 vs. 19	0,2633	0,3056	17 vs. 22	0,2016	0,2251
14 vs. 20	0,0724	0,0752	17 vs. 23	0,0944	0,0992
14 vs. 21	0,2387	0,2727	17 vs. 24	0,0621	0,0641
14 vs. 22	0,4561	0,6090	17 vs. 25	0,0217	0,0219
14 vs. 23	0,3805	0,4789	17 vs. 26	0,1690	0,1851
14 vs. 24	0,2911	0,3441	17 vs. 27	0,1819	0,2008
14 vs. 25	0,1469	0,1589	17 vs. 28	0,0871	0,0911
14 vs. 26	0,2016	0,2251	17 vs. 29	0,0082	0,0082
14 vs. 27	0,1356	0,1458	17 vs. 30	-,0063	-,0062
14 vs. 28	0,3514	0,4330	17 vs. 31	0,1363	0,1466
14 vs. 29	0,2433	0,2788			
14 vs. 30	0,0829	0,0865	18 vs. 19	0,0460	0,0471
14 vs. 31	0,1938	0,2154	18 vs. 20	0,1862	0,2060
			18 vs. 21	0,0806	0,0840
15 vs. 16	0,2061	0,2309	18 vs. 22	0,0231	0,0234
15 vs. 17	0,1972	0,2196	18 vs. 23	0,0038	0,0038
15 vs. 18	0,4051	0,5194	18 vs. 24	0,0357	0,0363
15 vs. 19	0,2807	0,3295	18 vs. 25	0,0605	0,0624

18 vs. 26	0,1474	0,1594	22 vs. 28	0,0170	0,0171
18 vs. 27	0,3936	0,5003	22 vs. 29	0,3076	0,3675
18 vs. 28	0,0079	0,0080	22 vs. 30	0,2017	0,2252
18 vs. 29	0,1733	0,1903	22 vs. 31	0,3823	0,4817
18 vs. 30	0,1111	0,1178	23 vs. 24	-,0103	-,0102
18 vs. 31	0,2735	0,3196	23 vs. 25	0,0673	0,0697
19 vs. 20	0,1725	0,1893	23 vs. 26	0,2167	0,2442
19 vs. 21	0,0645	0,0667	23 vs. 27	0,3423	0,4191
19 vs. 22	0,1266	0,1354	23 vs. 28	0,1172	0,1247
19 vs. 23	-,0010	-,0010	23 vs. 29	0,0748	0,0777
19 vs. 24	-,0268	-,0264	23 vs. 30	0,1586	0,1727
19 vs. 25	0,0297	0,0301	23 vs. 31	0,1792	0,1974
19 vs. 26	0,1731	0,1901	24 vs. 25	-,0045	-,0045
19 vs. 27	0,2158	0,2431	24 vs. 26	0,1685	0,1845
19 vs. 28	0,1471	0,1591	24 vs. 27	0,2361	0,2693
19 vs. 29	0,0653	0,0676	24 vs. 28	0,1464	0,1582
19 vs. 30	0,1004	0,1058	24 vs. 29	0,0752	0,0782
19 vs. 31	0,0637	0,0658	24 vs. 30	0,1141	0,1211
20 vs. 21	0,1603	0,1747	24 vs. 31	0,0910	0,0954
20 vs. 22	0,2282	0,2590	25 vs. 26	0,0341	0,0347
20 vs. 23	0,2555	0,2951	25 vs. 27	0,1736	0,1906
20 vs. 24	0,2130	0,2395	25 vs. 28	0,0901	0,0944
20 vs. 25	0,0786	0,0818	25 vs. 29	0,0816	0,0851
20 vs. 26	0,0243	0,0246	25 vs. 30	-,0062	-,0062
20 vs. 27	0,2671	0,3108	25 vs. 31	0,0866	0,0906
20 vs. 28	0,1083	0,1146	26 vs. 27	0,3593	0,4452
20 vs. 29	0,2231	0,2524	26 vs. 28	0,0880	0,0921
20 vs. 30	-,0183	-,0181	26 vs. 29	0,2856	0,3363
20 vs. 31	0,2490	0,2864	26 vs. 30	0,0329	0,0334
21 vs. 22	0,2083	0,2335	26 vs. 31	0,2801	0,3286
21 vs. 23	0,0662	0,0685	27 vs. 28	0,4409	0,5814
21 vs. 24	0,0779	0,0811	27 vs. 29	0,1193	0,1270
21 vs. 25	0,0813	0,0848	27 vs. 30	0,1915	0,2125
21 vs. 26	0,2275	0,2582	27 vs. 31	0,0298	0,0303
21 vs. 27	0,1892	0,2097	28 vs. 29	0,2459	0,2822
21 vs. 28	0,1432	0,1546	28 vs. 30	0,0711	0,0737
21 vs. 29	-,0222	-,0220	28 vs. 31	0,3500	0,4307
21 vs. 30	0,0727	0,0754	29 vs. 30	0,0936	0,0983
21 vs. 31	0,1375	0,1479	29 vs. 31	0,0478	0,0490
22 vs. 23	0,0821	0,0856	30 vs. 31	0,1369	0,1473
22 vs. 24	0,1590	0,1732			
22 vs. 25	0,1711	0,1877			
22 vs. 26	0,1911	0,2121			
22 vs. 27	0,5096	0,7126			

Tabela 4 – Distâncias dos nós e progênes incluídas em cada um.

Nó	Distância	Progênes incluídas no nó	Proporção de similaridade
1	0	25 30	0,3540
2	0,0164	13 25 30	0,2210
3	0	23 24	0,6220
4	0	19 23 24	0,3900
5	0,0012	2 19 23 24	0,4980
6	0	21 29	0,3150
7	0,0041	17 21 29	0,4480
8	0,0204	8 17 21 29	0,3150
9	0,0729	2 8 17 19 21 23 24 29	0,2210
10	0,1247	2 7 8 17 19 21 23 24 29	0,3540
11	0	14 15	0,4840
12	0,0303	27 31	0,4480
13	0,1605	14 15 27 31	0,4480
14	0	9 26	0,4480
15	0	9 20 26	0,3540
16	0,031	9 13 20 25 26 30	0,2210
17	0	1 28	0,3150
18	0	1 18 28	0,2210
19	0,0236	1 18 22 28	0,2210
20	0,1099	1 9 13 18 20 22 25 26 28 30	0,2210
21	0,1485	1 2 7 8 9 13 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 28 29 30	0,2210
22	0,318	1 2 7 8 9 13 14 15 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31	0,2210
23	0	3 12	0,4480
24	0,0207	3 6 12	0,2210
25	0	5 10	0,4480
26	0,4218	1 2 3 6 7 8 9 12 13 14 15 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31	0,2210
27	0,0407	3 5 6 10 12	0,2210
28	0,1096	3 5 6 10 11 12	0,2210
29	0,0242	4 16	0,4480
30	0,3377	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31	1,000

Tabela 5- Distâncias dos nós

Nó	Distância	Populações Íncluídas	Proporção de similaridade
1	0	2 5	0,4884
2	0,0025	2 3 5	0,9663
3	0,0185	1 2 3 5	0,9610
4	0,0649	1 2 3 4 5	1,000