

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE
SUBPOPULAÇÕES DE IPÊ-ROXO *Handroanthus heptaphyllus* (VELL.)
MATTOS E SEU SISTEMA REPRODUTIVO**

NEIDE TOMITA MORI

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em
Ciência Florestal.**

**BOTUCATU - SP
Junho - 2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU**

**VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE
SUBPOPULAÇÕES DE IPÊ-ROXO *Handroanthus heptaphyllus*
(VELL.) MATTOS E SEU SISTEMA REPRODUTIVO**

NEIDE TOMITA MORI

Orientador: MÁRIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP –
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre
em Ciência Florestal.**

**BOTUCATU - SP
Junho – 2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO UNESP -FCA - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

M854v Mori, Neide Tomita, 1957-
Variabilidade genética entre e dentro de subpopulações de Ipê-Roxo *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) mattos e seu sistema reprodutivo / Neide Tomita Mori. - Botucatu : [s.n.], 2010.
xiv, 57 f.: il., color., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, 2010.
Orientador: Mario Luis Teixeira de Moraes
Inclui bibliografia.

1. Marcadores moleculares. 2. Microssatélites. 3. Sistema reprodutivo. 4. Alógama. I. Moraes, Mario Luis Teixeira de. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu . III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE SUBPOPULAÇÕES
DE IPÊ-ROXO *Handroanthus heptaphyllus* (VELL.) MATTOS E SEU
SISTEMA REPRODUTIVO.

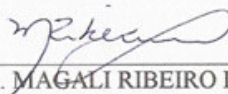
ALUNA: NEIDE TOMITA MORI

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ FERNANDO DE SOUSA LIMA

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. MARIO LUIZ TEIXEIRA DE MORAES



PROFA. DRA. MAGALI RIBEIRO DA SILVA



PROF. DR. CANTÍDIO FERNANDO GOUVÊA

Data da Realização: 17 de junho de 2010.

Dedico

Aos meus queridos pais (in memoriam)

Ofereço

Aos meus queridos filhos e esposo.

Agradecimentos

Ao orientador Prof. Mario Luiz Teixeira de Moraes, pela oportunidade e por ter depositado a sua confiança em mim.

Ao pessoal do viveiro do Departamento de Recursos Naturais e a Professora Magali que sempre está presente para auxiliar.

Ao Cirinho pela ajuda na coleta das sementes e a Caroline pela extração de DNA.

Ao Edson, meu companheiro, por me suportar nesses meses de dificuldades e pela sua ajuda e paciência na dissertação.

Aos meus filhos Otávio e Augusto pela solidariedade e compartilhamento das horas difíceis.

À Gisele, minha filha querida, que embora longe, me apoiou muito.

Às amigas Giselane e Juliana que me apoiaram nas horas de dificuldades.

Ao Professor Cantídio por ter vindo de longe para a defesa.

Ao Cósmico pela energia suficiente e pelo o ânimo nas horas difíceis.

Ao Deus desse grande Cósmico pela distribuição de energia necessitada por todos nós.

“Cada dia a natureza produz o suficiente para nossa carência. Se cada um tomasse o que lhe fosse necessário, não haveria pobreza no mundo e ninguém morreria de fome.”

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
SUMMARY.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Características gerais da <i>Handroanthus heptaphyllus</i>	6
3.2 Aspectos ecológicos.....	7
3.3 Taxonomia.....	7
3.4 Informações botânicas.....	8
3.5 Ocorrência natural, solo e clima.....	9
3.6 Fenologia, sementes e madeira.....	10

3.7 Marcadores moleculares.....	11
3.8 Microsatélite no estudo de plantas.....	12
3.9 Estrutura genética de populações.....	13
3.10 Sistema reprodutivo.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 MATERIAL.....	18
4.2 MÉTODOS.....	20
4.2.1 Extração do material genético.....	20
4.2.2 Quantificação do DNA.....	21
4.2.3 Diluição do DNA.....	21
4.2.4 Oligonucleotídeos.....	21
4.2.5 Análise dos marcadores moleculares.....	22
4.2.6 Visualização do processo de amplificação.....	23
4.2.7 Análise biométrica.....	24
4.2.7.1 Frequências gênicas.....	24
4.2.7.2 Diversidade dentro das subpopulações.....	24
a) Heterozigosidade observada.....	24

b) Heterozigosidade esperada.....	25
c) Número efetivo de alelos por loco.....	25
d) Índice de fixação de Wright.....	25
4.2.7.3 Sistema reprodutivo.....	26
a) Taxa aparente de cruzamento.....	26
b) Sistemas reprodutivos - modelos mistos.....	26
4.2.7.4 Estrutura genética de populações.....	27
a) Análise de variância.....	27
b) Componentes de variância.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÕES.....	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Seis subpopulações estudadas, com 30 progênies e local de coleta de <i>H. heptaphyllus</i>	19
Tabela 2.	Sequências e temperatura de anelamento dos primers microssatélites utilizados na <i>H. heptaphyllus</i> e transferidos da <i>H. aureus</i> (Braga et al., 2007).....	22
Tabela 3.	Esquema da análise de variância de modelo hierárquico desbalanceado, para um alelo de um loco, contendo como fontes de variação subpopulações (P); famílias (F/P); indivíduos (I/F/P) e genes (G/I/F/P), segundo Weir (1996).....	28
Tabela 4.	Identificação dos alelos e seus tamanhos moleculares para cada um dos 8 locos microssatélites estudados em <i>Handroanthus heptaphyllus</i>	30
Tabela 5.	Número de alelos observados e frequências alélicas das seis Subpopulações e oito locos estudados em <i>Handroanthus heptaphyllus</i>	31
Tabela 6.	Estimativas do número de alelos por loco ($\hat{A}$), número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e$), da heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e$), heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$), índice de fixação ($\hat{F}$) e taxa aparente de cruzamento ($\hat{t}$) das seis subpopulações de <i>Handroanthus heptaphyllus</i> ...	34
Tabela 7.	Heterozigosidades esperadas e observadas de algumas espécies arbóreas.....	35

Tabela 8.	Valores de coancestria para as seis subpopulações de <i>Handroanthus heptaphyllus</i>	36
Tabela 9.	Consistência dos nós do dendrograma de coancestria (Figura 1) construído pelo método UPGMA das 6 populações estudadas em <i>Handroanthus heptaphyllus</i>	37
Tabela 10.	Diversidade genética total das seis populações ($\hat{f}_T$), diversidade genética entre as seis populações ($\hat{f}_{ST}$) e diversidade genética dentro das seis subpopulações ($\hat{f}_{IS}$)	39
Tabela 11.	Teste de X^2 para provar o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando loco microssatélite, para as seis subpopulações de <i>Handroanthus heptaphyllus</i> e para a espécie como um todo.....	40
Tabela 12	Sistema Reprodutivo de <i>Handroanthus heptaphyllus</i> utilizando o programa MLTR para modelos mistos de Ritland (2002).	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Flores e folhas de <i>Handroanthus heptaphyllus</i>).....	Página 8
Figura 2	Frutos e sementes de <i>Handroanthus heptaphyllus</i> (Fonte: LORENZI, 2002).....	10
Figura 3	Dendrograma de distância de coancestria das seis subpopulações construído pelo método UPGMA.....	36
Figura 4	Dendrograma com o agrupamento de distâncias de coancestria entre todas as progênies de <i>Handroanthus heptaphyllus</i> , baseado no método UPGMA.....	38
Figura 5	Esquema do sistema reprodutivo misto em <i>Handroanthus heptaphyllus</i>	43

RESUMO

Autor: Neide Tomita Mori

Orientador: Mário Luiz Teixeira de Moraes

Handroanthus heptaphyllus (Vell.) Mattos, sinonímia *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo, popularmente conhecida por ipê-roxo, é uma espécie pertencente a família Bignoneaceae, muito apreciada pela sua beleza, madeira de excelente qualidade, além de algumas espécies dessa família possuírem substâncias as quais são usadas como produtos medicinais. A espécie é polinizada por abelhas, pássaros e outros visitantes que podem se alimentar das flores e dos frutos. Atualmente é utilizada em programas de reflorestamento de áreas degradadas, paisagismo e restauração. Ocorre em grande parte do Brasil, desde o Estado da Bahia até o Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina e São Paulo, compreendendo as latitudes de 13°S (BA) a 30°S (RS). O trabalho teve como objetivos estudar a variabilidade genética entre e dentro das subpopulações de *H. heptaphyllus*, por meio de marcadores microssatélites e conhecer sobre o seu sistema reprodutivo. Para tanto, foram colhidas sementes de 30 árvores, na região de Botucatu, S.P., sendo grande parte na Fazenda Experimental Lageado pertencente a UNESP - Campus de Botucatu. As sementes foram semeadas no viveiro da UNESP e as folhas das mudas produzidas foram coletadas para a extração de DNA e posteriormente analisadas em géis de poliacrilamida. No total, foram estudados oito locos microssatélites polimórficos, que apresentaram desde seis alelos por loco (loco TAU22) a 14 alelos (locos TAU12, TAU30 e TAU31). A média de heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e$) para as seis subpopulações foi de 0,732, sendo que a heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$) foi de 0,618. Os índices médios de fixação variaram de -0,082 (subpopulação 4) a 0,255 (subpopulação 3), com média de 0,152. Os resultados das

subpopulações estudadas mostraram os índices de fixação em níveis aceitáveis, com média de 15,2%, no entanto, a população 4 apresentou maior quantidade de heterozigotos do que o esperado. O valor da diversidade genética ($\hat{f}_{ST}$) entre as seis subpopulações foi de 0,0538, e a diversidade genética total ($\hat{f}_{IT}$) para a *H. heptaphyllus* foi de 0,2229, sendo que a diversidade genética dentro ($\hat{f}_{IS}$) das seis subpopulações foi de 0,1787. Ressalta-se que a maior diversidade genética está dentro das subpopulações. Em programas de coleta de germoplasma seria interessante realizar uma maior amostragem dentro das subpopulações e colher em menor número de subpopulações. Este procedimento seria o suficiente para se obter uma boa representatividade da variabilidade genética da espécie. As taxas de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m$) foi de 0,978, cujo valor significa o total de cruzamentos entre os indivíduos (parentes e não parentes). A taxa de cruzamentos uniloco ($\hat{t}_s$), foi de 0,721, significando que para a espécie, ocorreram mais cruzamentos entre não parentes que entre parentes ($\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,257$). Dos cruzamentos endogâmicos, $0,022 (\hat{s}=1 - \hat{t}_m)$ foi a taxa média referente a autofecundação, que foi muito baixa, podendo-se concluir que a *H. heptaphyllus* é espécie alógama tendo pouca pré-disposição para a autofecundação. As subpopulações estudadas possuem variabilidade genética suficiente para subsidiar programas de melhoramento e conservação de germoplasma da espécie.

PALAVRAS CHAVES: marcadores moleculares, microsatélites, sistema reprodutivo e alógama.

SUMMARY

Author: Neide Tomita Mori

Adviser: Mário Luiz Teixeira de Moraes

Handroanthus heptaphyllus (Vell.) Mattos, sinonímia *Tabebuia heptaphylla* (Velloso) Toledo, known as ipê-roxo, belongs to the Family Bignoniaceae. It is a very important Brazilian forest tree species because of its beautiful flowers, excellent wood quality, and medicinal properties. Its flowers are usually visited by animals, like bees, birds, bats, etc, for feeding and for pollination purposes. The species has also been used in programs of reforestation of degraded areas, landscaping, and restoration. The ipê-roxo is widespread throughout Brazil, from Bahia State to Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Santa Catarina, and São Paulo States, from 13°S (BA) to 30°S (RS) latitudes. The research has as objectives to study the genetic diversity within and between subpopulations of *H. heptaphyllus* by microsatellite molecular markers and to understand its mating system. We collected seeds of 30 trees, through the Botucatu region, Brazil, mostly from the Lageado Experimental Station, São Paulo State University (UNESP) – Botucatu. The seeds were sown in a nursery and the leaves were collected, to extract the DNA, and analyzed through polyacrilamide gels. In a total of eight polymorphic microsatellite loci were analyzed that varied from six alleles (TAU22 locus) to 14 alleles (TAU12, TAU30, and TAU31 loci). The expected heterozygosity mean ($\hat{H}_e$) for the six subpopulations was 0.7318, the observed heterozygosity mean ($\hat{H}_o$) was 0.6183, and the average of fixation index (f) between pairs of the six population varied from -0,082 (subpopulation 4) to 0.255 (subpopulation 3), with an average of 0.152. The results of the studied subpopulations have shown acceptable levels of fixation index, presenting an average of 15.2%, therefore, the subpopulation 4 has shown a higher amount of heterozygous than expected. The total genetic diversity

($\hat{f}_{IT}$) for the six subpopulations was 0.2229 and between subpopulations ($\hat{f}_{ST}$) was 0.00538, and the diversity within subpopulations ($\hat{f}_{IS}$) was 0.1787. The conclusion is that most genetic diversity is within subpopulations and to collect germplasm a bigger sample into the subpopulations, and smaller samples of subpopulations will be interesting. It would be enough to represent the species. The multilocus outcrossing rate ($\hat{t}_m$) was of 0.978, meaning that the total of outcrossing, that can be among relative individuals or not. The singlelocus outcrossing rate ($\hat{t}_s$) was 0.721, meaning that most outcrossing has occurred among non-relative trees than among relative ones ($\hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,257$). From inbred crossings 0,022 ($\hat{s}=1 - \hat{t}_m$) was because of selfing. Therefore, we can conclude that *H. heptaphyllus* is alogamous with low tolerance of selfing. The study of subpopulations has sufficient genetic diversity to support genetic breeding programs and germplasm preservation programs.

KEY WORDS: molecular markers, microsatellite, progenies, mating systems, and genetic diversity

1 INTRODUÇÃO

A fragmentação das florestas como resultado da ação de exploração e da urbanização causou grande impacto à biodiversidade, desequilibrando os ecossistemas, isolando os habitats, mudando o comportamento dos vegetais e dos animais, rompendo o fluxo gênico entre os fragmentos (KAGEYAMA, 2003), e erodindo a variabilidade genética. Em consequência têm despertado o interesse dos pesquisadores pelo estudo da diversidade e fluxo gênico dos ecossistemas florestais naturais.

Uma das espécies que tem grande importância ecológica e econômica é a *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos, sinonímia *Tabebuia heptaphylla* (Velloso) Toledo, popularmente conhecida como ipê-roxo ocorre em áreas da floresta semidecidual, mas que devido ao constante interesse dos madeireiros e de outros que as utilizam para fins medicinais, associada a dificuldade no armazenamento de suas sementes, tem contribuído para que esteja na lista das espécies, considerada pelo IBAMA, como ameaçada de extinção.

Através de suas flores, que são belas, e que ocorrem em toda a sua copa, atraem grande quantidade de animais visitantes a procura de néctar, flores, folhas, sementes, utilizando-se destes para alimentação, e que também podem utilizar dos troncos dessas árvores para construção dos ninhos, e dentre os animais visitantes ocorrem pássaros em geral, veado, jacutinga e morcegos (ALMEIDA, 1998). Sua casca é muito usada para a confecção de xaropes e sua madeira é muito procurada e de alto valor econômico. O *H. heptaphyllus* também tem sido usado em programas de

recuperação de áreas degradadas e de restauração, uma vez que foi constatada a diminuição desta espécie em áreas de ocorrência natural (ETTORI et al, 1996). É também muito usado como ornamental em praças públicas e na recomposição de matas ciliares, pois se desenvolve bem em solos às margens de rios e córregos (MOREIRA; SOUZA, 1987).

A espécie é utilizada de forma predatória, pois o seu uso em escala comercial é muito pequeno e suas sementes ainda são colhidas em populações naturais. Não existem programas de melhoramento genético quanto ao oferecimento de sementes melhoradas para fins comerciais, ou para se ter um banco de sementes, obedecendo as normas de coletas. Desta forma, as colheitas estão sendo realizadas sem conhecimento prévio de sua biologia floral, reprodutiva e variabilidade genética. É necessário conhecer o habitat natural onde ocorrem as plantas a que se deseja estudar, realizar estudos ecológicos e genéticos, para se estabelecer práticas de conservação sustentável, adquirindo subsídios para os procedimentos de conservação *in situ* e também *ex situ*.

Antes da colheita das sementes necessita-se fazer um planejamento do local onde serão colhidas, buscar informações sobre a localização geográfica, fazer um bom planejamento, monitorar sua floração e então marcar as árvores que farão parte da amostragem a ser colhida. Colheitas em populações naturais não são fáceis de serem realizadas, pois envolvem desde a localização das plantas, que geralmente são de difícil acesso, possuir bons equipamentos para a escalada das árvores, que deve ser feita por profissionais treinados e capacitados, além de se conhecer sua biologia reprodutiva.

Para se capturar genes raros com frequências gênicas entre 1,0 a 1,5% em espécies florestais é necessário colher uma amostragem de germoplasma, via sementes, de 20 a 30 árvores matrizes (MORI, 2003).

De acordo com as recomendações da Embrapa Florestas de Colombo no Paraná, e de acordo com a Lei nº 10.711, de 05 de agosto de 2003 e Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004 - Brasília, DF, 2004, recomenda-se a colheita ao acaso de sementes de 25 a 30 árvores matrizes sadias por população, distanciadas em aproximadamente 100 m entre si, dentro de três a cinco populações.

As sementes podem ser colhidas de uma reserva local, de uma área de preservação permanente, sempre deixando quantias suficientes para manter o equilíbrio do ecossistema local. Portanto, ao se utilizar uma espécie para reflorestamento e mesmo para programas de conservação é primordial estudar a biologia da espécie, conhecer o

seu sistema reprodutivo, sua estrutura genética populacional e a sua variabilidade existente entre os indivíduos na população.

A mudança do enfoque da genética mendeliana para a genômica (BECKMANN, 1988), trouxe vantagens incomparáveis, não só para o estudo dos vegetais, mas, sobretudo, para os humanos e os animais, os quais aconteceram depois do conhecimento de tecnologias avançadas de DNA

Os melhoristas que muito utilizaram os marcadores morfológicos como descritores para as diferentes variedades, mas que muitas vezes sua utilização é menor, devido os marcadores morfológicos terem limitações no uso para descrição de cultivares, como o tempo, principalmente no caso de plantas florestais perenes, pois a avaliação em sua maioria é estudada quando a planta se encontra adulta, levando os autores a buscarem novas alternativas.

Os marcadores baseados em proteínas e enzimas, muito utilizados na década de 70, já possuem outro aliado que é a técnica baseada em DNA, onde se acessa diretamente o genótipo de cada indivíduo, em regiões do genoma ativo ou não, e também com a vantagem de não se ter influências do ambiente.

Hoje, o acesso aos descritores baseados em DNA são muitos e isto facilita em muito o uso desta técnica, permitindo o acesso à variabilidade genética de muitos materiais vegetais, ou seja, a distinção que existe entre eles.

Dentre os marcadores moleculares existem o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), os minissatélites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeat), o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), o SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), os microsatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) e o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

Para o uso de marcadores, a escolha é feita de acordo com os objetivos, a praticidade, os custos e o tempo. Portanto, para o presente trabalho, que objetiva o estudo de populações, o mais adequado foi usar os microsatélites, que são de baixo custo, praticidade e rapidez.

Os marcadores microsatélites podem dar informações sobre a variabilidade genética entre e dentro das populações proporcionando conhecimentos para um manejo adequado, possibilitando colocar em prática as estratégias para os programas de melhoramento e de conservação (BROWN, 1978).

Esses marcadores têm auxiliado nos estudos genéticos, tanto na área da conservação de recursos genéticos, como na área de melhoramento e de domesticação

de plantas, auxiliando também na área de registros de cultivares, de acordo com a Lei de Proteção de Cultivares de n. 9456, sancionada em 25 de abril de 1997, onde se exige que seja comprovada a distinção entre eles, sendo que a Lei é clara no que se refere aos requisitos necessários para a distinção das características entre um cultivar e outro.

Os marcadores microssatélites são muito usados, pois apresentam alto polimorfismo, dando maior segurança na caracterização genética em estudos de população, pois são multialélicos, co-dominantes e apresentam altos níveis de heterozigosidade, facilitando a distinção entre os homozigotos e os heterozigotos, além de permitirem a transferibilidade de uma espécie para outra, ou ainda na utilização de *primers* heterólogos para gêneros, ou seja, para aquelas taxonomicamente próximas (BROWN et al., 1996), Portanto, são considerados ótimos para o mapeamento genético e físico de genomas, para identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

2 OBJETIVOS

Por causa da importância ecológica e econômica da *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos e por estar na lista das espécies ameaçadas de extinção, o presente trabalho tem como objetivos: 1) estudar a variabilidade genética entre e dentro de subpopulações da espécie e 2) entender o seu sistema reprodutivo, por meio de marcadores microssatélites.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características gerais do ipê-roxo *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos.

A madeira do gênero *Handroanthus*, segundo Jankowsky et al. (1990) é dura, pesada, resistente e de baixa retratilidade, cuja densidade é da ordem de 1070 kg/m³; sua coloração é escura e de alburno claro (PAULA; ALVES, 1997). Essas características têm causado o interesse dos madeireiros que levaram a diminuição do *H. heptaphyllus* em quase toda a sua ocorrência. Esta espécie, por sua vez, não se reproduz tão facilmente na natureza e a viabilidade de suas sementes é muito baixa em condições naturais.

As sementes das espécies do gênero *Handroanthus* possuem uma viabilidade muito curta. No estudo de Pinto et al. (1986), o autor relatou que imediatamente após serem colhidas, as sementes germinaram em até 100% no período de seis a nove dias, e os teores de umidade dos lotes de sementes diminuem progressivamente com o passar do tempo de secagem.

A germinação das sementes depende de muitos fatores, tanto bióticos quanto abióticos, além da composição dos gases na natureza, segundo Mayer & Poljakoff-Mayber (1989). Cabral et al. (2003), que testaram a viabilidade das sementes de *Handroanthus aureus*, aos 30, 60 e 90 dias de armazenamento em embalagem de

papel, plástico e algodão, concluíram que após o período de até 120 dias, tiveram cerca de 88% a 98% de germinação, independentemente do tipo de embalagem usada.

Entre as Bignoniáceas, o número cromossômico predominante é 2n igual a 40 cromossomos (PIAZZANO, 1998; GUERRA, 2002) e de acordo com Piazzano (1998) o número de cromossomos da *H. heptaphyllus* é 2n igual a 40 cromossomos; já em outras espécies, como a *Tabebuia chrysotricha*, 2n é igual a 80 cromossomos.

3.2 Aspectos ecológicos

De acordo com Longhi (1995) a *H. heptaphyllus* é encontrado em florestas secundárias tardias passando a clímax, mas segundo Lorenzi (2002) é uma planta característica da mata primária na floresta pluvial atlântica.

Os nomes vulgares do ipê são: cabroé, graraíba, ipê de flor roxa, ipê ipiranga, ipê preto (nos estados do RJ e RS), ipê-roxo anão (em SP), ipê-rosa (em MG), peúva (em MS) e piuva (em MS e MT). Na Argentina é conhecido como Iapacho e no Paraguai como Iapacho negro (LORENZI, 2002).

3.3. Taxonomia

A *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos pertence à Família Bignoniaceae, família esta que compreende aproximadamente 113 gêneros e 800 espécies. A família Bignoniaceae possui grande variedade de usos etnobotânicos e econômicos, esta entre as dez em termos de diversidade de plantas lenhosas das florestas úmidas da região Neotropical (GENTRY, 1980) e no Cerrado é amplamente representada pelos gêneros *Handroanthus*, *Tecoma* e *Jacaranda*. Assim, a classificação botânica aceita atualmente é: Reino: Plantae; Divisão: Magnoliophyta; Classe: Magnoliopsida; Ordem: Lamiales; Família: Bignoniaceae; Gênero: *Handroanthus*; Espécie: *Handroanthus heptaphyllus*.

Há relatos de 36 gêneros de Bignoniaceae que são utilizados na medicina popular, sendo 27 gêneros de lianas e nove de espécies arbóreas (GENTRY, 1992). Só no Brasil ocorrem cerca de 60 gêneros e 338 espécies, sendo que o gênero *Handroanthus* compreende cerca de 100 espécies que ocorrem desde o México e

Antilhas até o Sul da Argentina (RIZZINI, 1985) apresentando diferenças na tonalidade e cores das flores.

A família Bignoneaceae possui lindas flores que podem ser dispostas solitariamente ou reunidas em inflorescências, constituídas de plantas arbóreas, arbustivas, trepadeiras e raramente herbáceas (LORENZI, 2002).

3.4. Informações botânicas

A *H. heptaphyllus* é uma árvore longeva, comum na vegetação secundária (capoeiras e capoeirões). É uma espécie arbórea caducifólia, com 8 a 20 m de altura e 30 a 60 cm de DAP, podendo atingir 35 m de altura e 150 cm de DAP (CARVALHO, 1994). Seu tronco é ereto e cilíndrico, de casca espessa e escura, de coloração pardo-cinza, e fissurada longitudinalmente (GOEDERT, 2002). 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 (Figura 1).

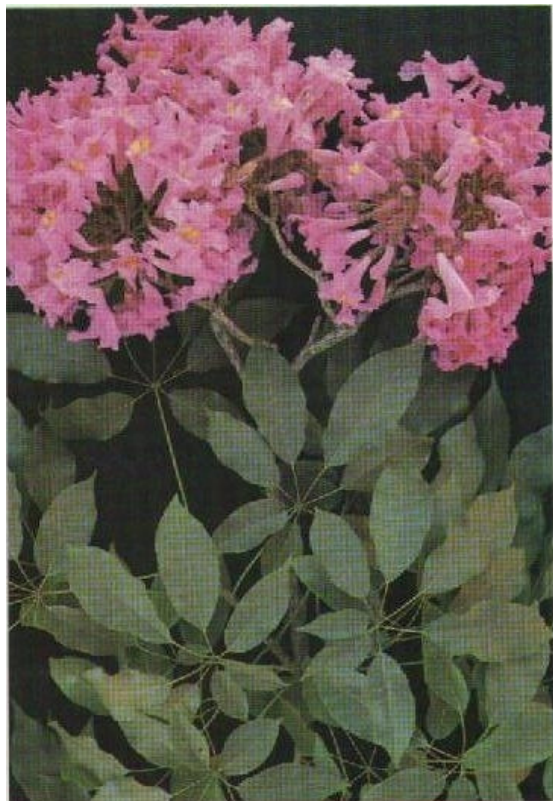


Figura 1. Flores e folhas de *Handroanthus heptaphyllus* (Fonte: LORENZI, 2002).

As flores de coloração roxo-violácea aparecem antes das folhas e estão reunidas em tirso curto multi-floral (CARVALHO, 2003). O fruto é seco e deiscente, tipo cápsula linear (BARROSO; PEIXOTO, 1999), de coloração bege. Possui 20 a 30 cm de comprimento e 1,5 cm de largura. As cápsulas são bivalvares do tipo síliqua, semelhante a uma vagem estreita e comprida, atenuada para dentro (GOEDERT, 2002).

As sementes são abundantes e aladas, medindo de 2,5 a 3 cm de comprimento e cuja largura é de 6 a 7 mm, são acastanhadas e membranáceas mais ou menos brilhantes (LONGHI, 1995). As raízes são vigorosas e profundas, dificultando sua derrubada pelo vento. O tronco é reto e cilíndrico, possuindo coloração de casca parda acinzentada.

3.5. Ocorrência natural, solo e clima

Ocorre naturalmente no sul e oeste da Bahia, 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, 1994). Compreendendo as latitudes de 13°S (BA) a 30°S (RS). Segundo Rizzini (1977) a espécie ocorre da Bahia ao Rio de Janeiro, sobre a Serra do Mar.

A *Handroanthus heptaphyllus* ocorre naturalmente em vários tipos de solo, cujos relevos podem ser desde planos a pouco ondulados. Seu melhor crescimento tem sido verificado em solos de fertilidade média a alta, profundos, com boa drenagem e de textura que varia de franca a argilosa (CARVALHO, 2003). A ocorrência em argissolos é de altitudes até 400m, em cambissolos, de 400 a 800m e em latossolos as altitudes podem variar de 800 a 1500m.

Os tipos climáticos são o tropical, o subtropical de altitude e o subtropical úmido. Esta espécie tolera sombreamento moderado no estágio jovem, segundo Engel et al (1990) e medianamente tolerante a baixas temperaturas (CARVALHO, 2003), com precipitações que podem variar de 1000 mm a 1900 mm, e temperaturas médias anuais de 18 a 26°C.

3.6 Fenologia, sementes e madeira

Segundo Lorenzi (2002), a floração ocorre de julho a setembro, onde a planta já se encontra totalmente despida de suas folhagens, sendo que a maturação dos frutos ocorre no início de outubro, com ampla produção de sementes.

A colheita das sementes é feita diretamente na árvore com as primeiras aberturas dos frutos. Depois de colhidos os frutos, estes devem ficar secando ao sol para se ter a abertura total dos mesmos. A taxa de germinação das sementes de *H. heptaphyllus* é de 60%, por isso recomenda-se colocá-la na câmara fria e seca, em que atinge viabilidade entre 3 a 15 meses se armazenadas adequadamente, segundo Kano et al. (1978), podendo também as sementes serem crioconservadas no nitrogênio líquido, de acordo com Tresena et al. (2009). Os frutos e as sementes de *H. heptaphyllus* são ilustrados na Figura 2.

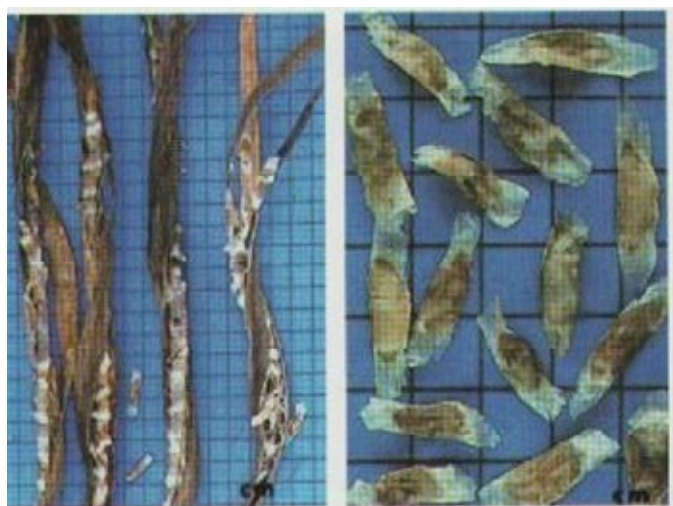


Figura 2. Frutos e sementes de *Handroanthus heptaphyllus* (Fonte: LORENZI, 2002)

O Estado de São Paulo foi o que lançou o programa para estímulo de plantações de florestas de espécies nativas, e isso se deu devido ao fato de que o Estado consome cerca de 60% de madeiras tiradas da Amazônia (TRESENA et al., 2009), e que elas poderiam ser repostas ao longo do programa. Com isso, além de oferecer um programa onde haja sustentabilidade, também reporiaram as árvores ameaçadas de extinção, como é o caso da *H. heptaphyllus*.

Seu uso pode ser destinado, tanto para a construção civil (LORENZI, 2002) como para a área moveleira. Seu crescimento não é dos mais rápidos, mas se comparar com outras espécies florestais, a *H. heptaphyllus* tem bom desempenho e de acordo com Paiva et al (2000), seu crescimento é intermediário.

3.7. Marcadores moleculares

Os estudos de genética, tradicionalmente, eram realizados em genes associados a características morfológicas, em geral, fenótipos de fácil visualização como o nanismo, cor de pétalas, cor de olhos, etc. Isto contribuiu significativamente para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e construção das primeiras versões de mapas genéticos. Esta revolução iniciou-se com o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos, no qual se baseava no uso de eletroforese no gel de amido e na visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos. Estudos clássicos de

genética de populações na década de 60 tiveram efeito significativo na difusão da técnica e foram aplicados em grande número de organismos, para entender a estrutura da variabilidade genética de populações naturais, fluxo gênico e processos de hibridação natural entre outras aplicações (FERREIRA, 2003).

Uma das primeiras técnicas para análise de DNA utilizando enzimas de restrição foi a RFLP usada até hoje para determinação de polimorfismo. Esta técnica, atualmente, é pouco usada por causa das novas tecnologias que geram maior número de informações. Hoje são utilizados os marcadores moleculares baseados na técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction), cujo processo foi proposto por Kary Mullis no início da década de 1980 e posteriormente patenteada por Hoffman La Roche & Perkin-Elmer Corporation, o qual utilizando-se uma DNA polimerase amplifica sequências de DNA dos organismos. Esta técnica causou revolução na biologia, tanto na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos, melhoramento genético de plantas, animais domésticos, etc. A técnica consiste na amplificação de fragmentos de DNA com a utilização de *primers* específicos e uma enzima denominada de Taq DNA polimerase (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Na área vegetal, esses marcadores moleculares são utilizados em programas de conservação de germoplasma, melhoramento vegetal e sistemas reprodutivos (CLEGG, 1980), enfim são usados para a compreensão da dinâmica de alelos nas populações, fornecendo subsídios para a área de evolução, da diferenciação das populações (AVISE, 2000) e interação entre as populações.

Em termos de variabilidade genética, os marcadores moleculares são de suma importância uma vez que permitem a compreensão e a 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. Quando se trabalha com o objetivo de conservação e melhoramento de espécies importantes pode-se basear na distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, com dados obtidos por marcadores moleculares. Quando, por outro lado, o interesse for a domesticação de uma espécie e sua utilização econômica, estes marcadores podem auxiliar na definição de programas de coleta, visando a seleção de apenas parte da variabilidade que seja de interesse para o melhorista (BORÉM, 1999). Quando se usa os marcadores moleculares, muitas vezes a quantidade de cruzamentos para os testes de avaliação, com posteriores combinações

híbridas podem ser diminuídos, como no caso das espécies alógamas, em que os marcadores podem ainda auxiliar no estabelecimento de grupos heteróticos (HONGTRAKUL et al., 1997).

3.8 Microssatélite no estudo de plantas

Microssatélites, também conhecidos como SSR (Simple Sequence Repeats), são regiões do DNA constituídos de trechos pequenos e repetidos de nucleotídeos, dispersos por todo o genoma nuclear e nos plastídeos dos eucariotos. Podem variar de um a seis pares de bases repetidas continuamente. Essas regiões, ou sítios, exibem alto grau de polimorfismo, multialelismo, devido à diferença no número de unidades simples repetidas, levando diversos pesquisadores a especularem sobre seu potencial evolutivo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; MOXON; WILLS, 1999).

O uso de marcadores moleculares tem auxiliado no melhoramento de plantas, no desenvolvimento de mapas de ligação, constituindo-se numa ferramenta muito importante para as pesquisas; isto ocorre devido ao grande volume dos marcadores moleculares disponíveis, e também por eles segregarem em proporções mendelianas e não interferindo na segregação de outros genes, disponibilizando a construção de mapas de ligação de alta resolução representando um avanço na realização de mapeamentos genéticos de alta qualidade, no caso de espécies arbóreas florestais (SMITH; DEVEY, 1994) e seleção de plantas assistida por marcadores. Outra grande ajuda ocorreu com a vinda dos marcadores moleculares microssatélites.

Marcadores baseados em microssatélites estão sendo desenvolvidos para aplicações em mapeamento genético de algumas culturas, tais como a soja, o arroz e o trigo (BORBA, 2002).

Os marcadores microssatélites em plantas não são tão abundantes como acontece com os humanos. O dinucleotídeo AT/TA é o mais comum, seguido de AA/TT e GA/CT. O motivo GT/CA é significativamente menos abundante nas plantas. Em plantas, sequências de DNA armazenadas em banco de dados revelaram que os sítios de microssatélites são largamente distribuídos com uma frequência de uma a cada 50 mil pares de bases.

Segundo Brondani et al. (1998) há uma série de vantagens sobre esses marcadores como é a propriedade de co-dominância e multialelismo, com um valor de

heterozigosidade esperada maior que 0,7; seu alto polimorfismo, sua abundância e dispersão uniforme dentro dos genomas vegetais e a possibilidade de virem a ser analisados pela técnica de PCR.

3.9. Estrutura genética de populações

A estrutura genética de populações ocorre nas mais diferentes populações geográficas, dentro de um determinado grupo de indivíduos, ou dentre vários grupos de indivíduos e significa as interações que ocorrem entre eles, como ocorre a distribuição dos genes entre eles, levando-se em consideração a distribuição dos organismos de um determinado espaço, tipos de reprodução, as interações do complexo de fatores evolutivos, os quais se podem quantificar a partir da variabilidade genética, quais são os fatores determinantes para certas características. Esses fatores que determinam a estrutura genética de uma população estão estritamente ligados ao número efetivo de tal população, a seleção que está atuando na população, o tipo de reprodução e no caso das plantas a maneira de dispersar o pólen e as sementes (FRANKHAM et al., 2004).

Os níveis de variação genética dentro de populações podem ser quantificados em dados baseados nos marcadores moleculares e pode utilizar as metodologias que são as de Nei (1978), onde se calcula a variabilidade genética encontrada entre e dentro das populações e os níveis de heterozigosidade esperados para o total e para a média das populações, segundo Sebbenn (2000), assim como também se usa as estatísticas F que fornecem os índices de fixação de alelos para o total das populações, dando a média dentro e entre as populações, cujos valores se baseiam em medidas de probabilidade de identidade por descendência (NEI, 1977).

As populações pequenas e isoladas, rapidamente, têm endogamia acelerada perdendo a variabilidade e diminuindo em muito a habilidade para a evolução das populações (FRANKHAM et al., 2004).

A variabilidade genética está estritamente correlacionada ao tamanho efetivo de uma população (N_e), e depende principalmente dos níveis de endogamia ou do parentesco nela existente. O N_e representa o tamanho de uma população, ou seja, do número de indivíduos que estão contribuindo com os genes através da reprodução e com a variabilidade genética das próximas gerações. Quanto maior é o parentesco, menor é a representatividade da amostra (VENCOVSKY, 1987).

A endogamia acontece em uma população, quando o cruzamento entre indivíduos aparentados ocorre a uma taxa maior do que deveria ocorrer se fosse por cruzamentos aleatórios, quer seja na autofertilização ou cruzamento entre indivíduos aparentados. Neste caso, a frequência de heterozigotos é reduzida e de homozigotos aumentada, em relação às expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (FRANKHAM et al., 2004). A consequência prática da endogamia é que os homozigotos para os alelos recessivos deletérios tornam-se mais frequentes, causando desastres nas gerações posteriores, por isso deve-se manter os altos níveis de variação genética dentro das populações ou espécies (HAMRICK, 1983).

Segundo Sebbenn et al. (2000), quando estudaram os efeitos do manejo na estrutura genética de caixeta (*Tabebuia cassinoides*), encontraram altos níveis de endogamia, tanto para as populações naturais (0,192), quanto para as populações manejadas (0,346). Com base nesse estudo, os autores sugeriram que isto acontece devido ao baixo número de indivíduos (N_e) na população, tendo-se que aumentar para diminuir a endogamia. No caso de 20 indivíduos estarem contribuindo com os gametas na população, este número teria que ser aumentado para 60 por hectare.

Lee et al. (2002) estudando uma espécie da Malásia, a *Intsia palembanica* (Leguminosae), observou uma diversidade genética ($\hat{H}_e$) média de 0,242. Para a *Tabebuia cassinoides* os níveis de diversidade genética ($\hat{H}_e$) encontrados por Sebbenn et al. (2000) foram altos, quando comparados com outras espécies arbóreas. O valor encontrado pelos autores para as populações naturais foi de 0,314 e para as populações manejadas foi de 0,266.

Loveless; Hamrick (1987) estudaram oito espécies arbóreas tropicais e estimaram a $\hat{H}_e$ média em 0,241. Murawski & Hamrick (1991) estudando diversas espécies arbóreas obtiveram uma diversidade média ($\hat{H}_e$) de 0,146 e para as espécies mais raras uma média de 0,136.

Telles et al (2003) estudou a diversidade genética ($\hat{H}_e$) em populações naturais de araticum (*Annona crassiflora*) e obteve uma média de 0,357, indicando ser valor alto quando comparadas a outras espécies arbóreas (DIAS; KAGEYAMA, 1991).

Gaino (2009), trabalhando com uma população natural de *Myracrodruon urundeuva*, proveniente da Estação Ecológica do Instituto Florestal em Paulo de Faria-

SP, encontrou uma heterozigosidade esperada de 0,662 e um índice de fixação que variou de -0,348 a 0,215, proporcionando uma média de -0,076, sugerindo dessa forma, um excesso de heterozigotos na população de *M. urundeuva* com pouca perturbação antrópica. Mendes (2009) também encontrou estimativa similar para a média da heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e = 0,646$) em 10 populações de *Cedrela fissilis* no Centro-Sul do Brasil. Em duas populações de *Hymenaea courbaril* foram observadas estimativas de heterozigosiidade esperada média em quatro populações de 0,768 (GUIDUGLI, 2007) e de 0,575 para uma população de progênies provenientes de Itirapina-SP e de 0,784 em adultos de *H. stigonocarpa* (MORENO, 2009), em Assis-SP. Estimativas ainda maiores para a heterozigozidade média ($\hat{H}_e = 0,878$) foram encontradas por Carvalho (2009) em árvores adultas e sub-adultas de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* em uma pequena população da espécie em um fragmento de 4,8 ha na região de São José do Rio Preto-SP.

Populações de autofecundação, ou aquelas clonadas devem possuir alta variabilidade entre populações e baixa variabilidade dentre as populações; já aquelas que possuem sistema misto de reprodução, ou alógamas, devem possuir alta variabilidade dentro da população e baixa variabilidade entre populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

3.10. Sistema Reprodutivo

Nos trabalhos de pesquisa em melhoramento genético, é de suma importância saber inicialmente, sobre o tipo de reprodução da planta estudada, como ocorre a transferência do fluxo gênico e como as informações genéticas são transferidas de uma planta a outra (WRIGHT, 1922). As espécies arbóreas apresentam vários tipos de sistemas de reprodução, com diferentes taxas de autofecundações, cruzamentos, apomixia e mistas. Esses sistemas, além da dispersão de pólen e das sementes determinam a estrutura genética das populações (HAMRICK, 1983).

Sebbenn (2006) colocou que o uso de marcadores genéticos para o estudo do sistema de reprodução requer a utilização de modelos genéticos para descrever padrões de reprodução, como o modelo misto de reprodução (RITLAND; JAIN, 1981) e modelo de cruzamentos correlacionados (RITLAND, 1990). Nesse sentido, Sebbenn (2006) fazendo uma compilação de vários estudos com espécies arbóreas, colocou que a estimativa da taxa de cruzamento média aproxima-se de 0,9.

Estudos mais recentes, em algumas espécies arbóreas brasileira, da análise do sistema de cruzamento ($\hat{t}_m$) tem apontado para altas estimativas deste parâmetro, como em Feres (2009), que trabalhou com duas populações de *Tabebuia roseo-alba*: a primeira de Ribeirão Preto-SP ($\hat{t}_m = 0,84$) e a segunda de Selvíria-MS ($\hat{t}_m = 0,96$). Viegas (2009), trabalhando com duas populações de *Myracrodruon urundeuva*: Aramina-SP ($\hat{t}_s = 0,989$) e Selvíria-MS ($\hat{t}_s = 0,999$), também encontrou altas estimativas para a taxa de cruzamento uniloco. Tarazi (2009), que trabalhou com uma população de *Copaifera langsdorffii* da região de Assis-SP, encontrou uma taxa de cruzamento multiloco ($\hat{t}_m$) de 0,859, no interior e de 0,759, na borda do fragmento estudado.

Os estudos do sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais têm mostrado que na maioria das plantas, o sistema de reprodução se dá por alogamia, e uma pequena porcentagem pelo sistema misto. Os tipos de polinização direta, ou seja, transferindo o pólen da antera para o estigma na mesma flor, geram muita endogamia, diminuindo o vigor das sementes, causando muitos defeitos nas sementes e dificultando a germinação. Isto se dá devido ao problema da autoincompatibilidade, onde a especificidade do pólen que é gerado pelo alelo S do genoma haplóide do grão de pólen (gametofítica), ou esporofítica onde a especificidade é gerada pelo alelo diplóide da planta adulta (esporófito), que deu origem ao grão de pólen, dificulta a fecundação.

Esses mecanismos de autofecundação evoluíram com o passar dos tempos, a própria natureza se encarregou de diminuir as espécies de plantas com autoincompatibilidade, forçando o cruzamento, dando condições de recombinações e manutenções da variabilidade genética, ou seja, dando condições para a continuidade da evolução das espécies (FRANKEL, 1984).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Foram utilizadas 192 progênies de 30 árvores matrizes de ipê-roxo *Handroanthus heptaphyllus* provenientes de seis subpopulações oriundas de fragmentos florestais naturais da região de Botucatu, pertencente a bacia do Médio Tietê (Tabela 1). Para a colheita das sementes foram necessários três anos consecutivos de estudos sobre a dispersão, o armazenamento das sementes e a produção de mudas.

As árvores foram marcadas nos fragmentos florestais quando estavam floridas, período em que os indivíduos são fáceis de serem visualizados no campo, por causa de seu intenso florescimento e com copas totalmente floridas. Observou-se que nem todas as árvores que floresciam produziam sementes, dificultando o processo de colheita da espécie. Com a exploração predatória da espécie na região de ocorrência natural, muitos indivíduos estão isolados nos fragmentos a distâncias que dificultam o cruzamento. Alguns indivíduos não produzem sementes quando isolados, sugerindo algum mecanismo contrário à produção de sementes por autofertilização.

No primeiro ano de colheita, houve a perda total do material, em função do número insuficiente de progênies e também devido a dificuldade em produzir as mudas por causa da rápida perda de germinação das sementes. No segundo ano, logo após a floração, as árvores também foram marcadas, coletadas as sementes, e postas para germinar, no entanto, naquele ano a produção de sementes foi irregular e não se conseguiu o número de progênies suficientes para o estudo. Finalmente, no terceiro ano,

as árvores foram marcadas e as sementes colhidas e semeadas. Das plântulas produzidas foram extraídos os DNAs.

Tabela 1. Seis subpopulações estudadas, com 30 progênie, médias das subpopulações e locais de colheita de *Handroanthus heptaphyllus*.

Subpopulação	Progênie	Nº de plantas por progênie	Localidade
<u>1</u>	3	8	Lageado
	4	8	
	5	5	
	6	8	
	8	8	
	9	8	
	10	8	
	11	8	
	12	8	
	13	7	
	16	8	
	17	7	
	18	8	
	20	8	
	32	8	
Nº de plantas da subpopulação <u>1</u>		115	
<u>2</u>	7	5	Lageado
	14	5	
	15	5	
	19	8	
	31	4	
Nº de plantas da subpopulação <u>2</u>		27	
<u>3</u>	2	5	Lageado
	30	5	
Nº de plantas da subpopulação <u>3</u>		10	
<u>4</u>	21	5	Lageado
	22	5	
Nº de plantas da subpopulação <u>4</u>		10	
<u>5</u>	23	5	Véu da Noiva
	24	5	
	26	5	
	27	5	
Nº de plantas da subpopulação <u>5</u>		20	
<u>6</u>	28	5	Usina Indiana
	29	5	
Nº de plantas da subpopulação <u>6</u>		10	
TOTAL DE PLANTAS		192	

4.2 Métodos

4.2.1 Extração do material genético

Foram coletados de um a três folíolos de folhas adultas para cada planta e armazenados a temperatura ambiente e em local seco. Para a extração de DNA foram utilizadas de 100 mg a 150mg do material vegetal por cada amostra. Para a etapa posterior foi utilizado o protocolo proposto por Ferreira; Grattapaglia (1998), onde os tecidos foliares foram macerados em moinho de maceração utilizando-se 1000 μ L de tampão de extração CTAB (Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) 2%.

As amostras ficaram em banho-maria a uma temperatura de 65°C, por 45 a 60 minutos, para quebra dos tecidos foliares, não houve necessidade da adição de β -mercaptoetanol nas amostras. Em seguida, adicionou-se 600 μ L de (CIA 24:1) clorofórmio e álcool isoamílico e misturou-se no vórtex. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, a 10°C, por 6 minutos. Observou-se a formação de três fases. Pipetou-se, aproximadamente, 3 x 180 μ L da fase sobrenadante para um tubo novo tipo eppendorf. Adicionou-se 50 μ L de CTAB 10% e agitou-se levemente. Em seguida, foram adicionados 400 μ L de CIA 24:1 e misturou-se no vórtex. Centrifugou-se nas condições anteriormente citadas. Retirou-se o sobrenadante para outro tubo eppendorf e acrescentou-se 400 μ L de cloreto de sódio 5 M. Centrifugou-se novamente nas condições anteriores. O sobrenadante foi pipetado para um novo tubo eppendorf e colocou-se 400 μ L de álcool isopropílico gelado. As amostras foram incubadas a -20°C por 30 minutos ou *overnight*. O DNA foi precipitado à 12.000 rpm, 10°C por 6 minutos e observado pela formação do *pellet*, que foi isolado retirando-se o sobrenadante. Utilizou-se, aproximadamente, 1 mL de álcool etílico 70%, por 5 a 10 minutos, e em seguida, 700 μ L 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 70 μ L de RNase para a digestão do RNA, a 37°C, em banho-maria, por pelo menos 40 minutos.

4.2.2 Quantificação do DNA

Para a realização da quantificação de DNA, utilizou-se o aparelho GeneQuant, desenvolvido pela Biochrom Ltda, 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 foi realizada em nanogramas de material genético por microlitro de solução. Além de concentração de DNA, também foram fornecidos os dados sobre a pureza das amostras em relação à quantidade de material genético. O mínimo valor considerado para utilização do material foi acima de 1,7, isto é, quando a quantidade de DNA estivesse próximo do dobro de impurezas, pois, valores muito altos de presença de proteínas ou outras substâncias poderiam interferir nas reações de PCR (Polymerase Chain Reaction).

4.2.3 Diluição do DNA

A diluição do DNA foi feita de acordo com a concentração das leituras realizadas no aparelho Gene Quant. A diluição utilizada para as reações de PCR, utilizando os marcadores microsatélites, foi de 4µL de DNA genômico para 0,2 mL de solução tampão TE contendo (10mM Tris-Cl- PH 8.0 + 1 mM EDTA-PH 8.0) e com adição de tartrazina.

4.2.4 Oligonucleotídeos

Os *primers* utilizados foram transferidos de *Handroanthus aureus* (Tabela 2) que foram desenvolvidos por Braga et al. (2007).

Tabela 2. Sequências e temperatura de anelamento dos *primers* microsatélites utilizados em *Handroanthus heptaphyllus* e transferidos da *Handroanthus aureus* (BRAGA et al., 2007).

<i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i>	Temperatura de anelamento (°C)
Tau 12	F: CATCATCAACGTCAAGATCA R: CATTCTAGTCTTCCATAATAAGT	56
Tau 14	F: GGTAACGGATTGCTGGTTGT R: CATTGCGAATGGCCTATGGT	56
Tau 15	F: TTTGAGGGGTGAAGCATTT R: CATTGTGGTCCCTCAACA	56
Tau 21	F: CTTTTGGGGGTCTTTGGAAT R: TGAAAGAGACAGAGACAAAGATACA	56
Tau 22	F: TATCTCTCCGCCGTACACCT R: CCAATCGAAGAGCCCATTTA	56
Tau 27	F: GGTAATCATCTTCCGCTTCC R: ACTGCAGAATCGCCTTTTGT	56
Tau 30	F: TAGTTTAAGGGTGCCGTTGG R: CGAACATAAAGAGGCAACCCA	55
Tau 31	F: TCGTGCAGCTTTTGAGTCTG R: CTGCAAAACACAAAGCGAAA	57

4.2.5 Análise dos marcadores moleculares

Foi utilizada uma placa, com capacidade para 96 amostras. Em cada reação foram amplificadas 96 amostras. A preparação das amostras na placa, por indivíduo, foi feita utilizando-se:

2 µL de DNA (4 ng/mL);

4,5 µL de água destilada;

0,96 µL de tampão (10 Mm tris HCL e 50 mM EDTA, pH 7,5);

0,72 μL de MgCl_2 ; 2,6 μL de dNTPs (2,5 mM de cada – dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 0,4 μL de Taq DNA polimerase e 2 μL de *primer*.

Para evitar a evaporação do material, nos procedimentos de PCR, foi colocada uma gota de óleo mineral, em cada poço da placa. A reação foi levada para a um aparelho termociclador MJ Research PTC-100, previamente programado com as temperaturas ideais para cada *primer* de acordo com Braga et al. (2007).

Os procedimentos de PCR foram os seguintes:

- 1) 92°C por 2 minutos (desnaturação);
- 2) 94°C por 1 minuto;
- 3) 55 ou 56 ou 57°C por 1 minuto (anelamento);
- 4) 72°C por 1 minuto (extensão);
- 5) 30 repetições do ciclo (passos de 2 a 4);
- 6) 72°C por 5 minutos (para garantir o termino da duplicação) e mantido a 4°C até a retirada da placa.

4.2.6 Visualização do processo de amplificação

Após o processo de amplificação, foi feito o preparo das placas de corrida de eletroforese. Para esta etapa foram preparados geis de acrilamida/bis na concentração de 6%, utilizando-se 90 mL de acrilamida, 90 μL de temed e 900 μL de APS 10% (Persulfato de Amônio).

Colocada a mistura nas placas, foram deixadas para descanso por 2 a 3 horas, até completa polimerização.

Depois de decorrido esse tempo, as amostras foram aplicadas no gel, e colocadas para correr por 12 horas, numa voltagem de 150 V, 50 mA e 3 W. A coloração foi feita com ficoll 400 e 0,25 g de xylene cyanole para 100 mL de água e corante (0,25 g de azul de bromofenol) para permitir a visualização.

A separação dos fragmentos de DNA, por eletroforese foi feita utilizando solução tampão de tris-borato TBE 0,5% (pH 8,0), a mesma utilizada no preparo dos geis. O gel foi revelado com nitrato de prata, numa solução contendo: etanol (50 mL), ácido acético glacial (8,3 mL) e água destilada (441 mL). Os géis foram mergulhados na solução por 10 minutos, sob agitação suave, com isso ocorrendo-se a fase da fixação das bandas no gel. Depois, deixados durante 15 minutos na solução de 0,8 g de nitrato de

prata em 500 ml de água. Por fim, descartou-se a solução, lavando-se o gel com água destilada por várias vezes, e aplicando-se a solução de hidróxido de sódio (16,7 g), formaldeído 37% (1,7 mL) e água destilada (500 mL). Os géis foram mergulhados na solução sob leve agitação, por 10 minutos. Posteriormente foram lavados, fotografados e genotipados.

4.2.7 Análise biométrica

Os parâmetros de variabilidade genética, sistemas reprodutivos e fluxo gênico foram estimados utilizando-se os programas de computação BIOSYS-2 (SWOFFORD; SELANDER, 1997).

Após a visualização dos géis, os genótipos foram anotados e os dados foram analisados pelos programas de computador TFPGA (Tool for Population and Genetic Analysis) de Miller (1997), POPGENE (YEH et al., 1997), SAS (SAS, 1990) e o MLTR (RITLAND; JAIN, 1981).

4.2.7.1 Frequências gênicas

As frequências dos alelos foram obtidas pela leitura dos géis revelados, contando-se diretamente o número de alelos por loco e dividindo-os pelo número total de alelos no loco. As frequências alélicas esperadas foram estimadas a partir das frequências observadas, obedecendo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O número médio de alelos por loco (A) foi estimado pela média aritmética dos locos estudados.

4.2.7.2 Diversidade dentro das subpopulações

a) Heterozigosidade observada (H_o)

A quantidade de heterozigose de um determinado loco seguiu os procedimentos de Brown & Weir (1996):

$$H_o = 1 - \sum P_{ii};$$

em que: P_{ii} é a frequência observada de genótipos homozigotos do alelo i .

A heterozigosidade média observada foi obtida pela soma dos valores de cada loco dividindo-se pelo número total de locos estudados.

b) Heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e$)

A quantidade de heterozigose esperada teve como base Nei (1978):

$$\hat{H}_e = 1 - \sum p_i^2;$$

Em que: p_i é a frequência estimada do i ésimo alelo.

A heterozigosidade média esperada foi obtida pela média aritmética de todos os locos estudados.

c) Número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e$)

A estimativa do número de alelos por loco ($\hat{A}_e$) foi obtida com base em Nei (1978):

$$\hat{A}_e = \frac{1}{1 - \hat{H}_e}; \text{ em que } \hat{H}_e \text{ é a heterozigosidade esperada.}$$

d) Índice de fixação de Wright ($\hat{F}$)

O índice de fixação de Wright (1922) ou o coeficiente de endogamia foi estimado com base nas heterozigosidades observada ($\hat{H}_o$) e esperada ($\hat{H}_e$). A fórmula utilizada foi:

$$\hat{F} = 1 - \frac{\hat{H}_o}{\hat{H}_e}$$

4.2.7.3 Sistema reprodutivo

a) Taxa aparente de cruzamento ($\hat{t}$)

A taxa aparente de cruzamento foi apresentada por Wright (1922) e por Weir (1996) e mostrada a seguir:

$$\hat{t} = \frac{1 - \hat{f}}{1 + \hat{f}}; \text{ em que: } \hat{f} \text{ é a estimativa do coeficiente de endogamia, sendo } \hat{f} = \hat{F}, \text{ quando } 0 \leq \hat{F} \leq 1.$$

b) Sistemas Reprodutivos - Modelos Mistos (RITLAND; JAIN, 1981)

O sistema reprodutivo foi analisado baseando-se em Ritland; Jain (1981) pelo método da máxima verossimilhança com o auxílio do programa computacional multilocos MLTR (RITLAND, 2002). O coeficiente de parentesco ($\hat{r}_{xy}$) foi estimado por meio da expressão:

$$\hat{r}_{xy} = \frac{1}{4} \left(1 + \hat{f}_p \left[4\hat{s} + (\hat{t}_m^2 + \hat{s}_m \hat{t}_s) \right] (1 + \hat{r}_p) \right);$$

em que:

$\hat{f}_p$ = coeficiente de endogamia das mães;

$\hat{s}$ = taxa de autofecundação;

$\hat{t}_m$ = taxa de cruzamentos multilocos;

$\hat{r}_s$ = correlação de autofecundação entre progênies;

$\hat{r}_p$ = correlação de paternidade.

O modelo de Ritland (2002) permite estimar também:

$\hat{t}_m$ = taxa de cruzamentos multilocos;

$\hat{t}_s$ = taxa de cruzamentos unilocos;

$\hat{t}_p = (\hat{t}_m - \hat{t}_s)$ = taxa de cruzamentos entre indivíduos aparentados.

4.2.7.4 Estrutura genética de populações

a) Análise de variância

Para a estimativa dos parâmetros genéticos variância entre subpopulações (σ_p^2), variância entre famílias/subpopulação (σ_F^2), variância entre indivíduos/família/subpopulação (σ_I^2), variância entre genes/indivíduo/família/subpopulação (σ_G^2), variância total (σ_T^2), utilizou-se a análise de variância em esquema hierárquico desbalanceado, conforme modelo desenvolvido por Weir (1996). Este procedimento baseia-se em realizar uma análise de variância para cada alelo identificado nas leituras dos zimogramas. Dessa forma, o modelo matemático empregado, contendo três níveis hierárquicos foi:

$$Y_{ijkl} = m + p_i + f_{j(i)} + h_{k(ij)} + g_{l(ijk)};$$

em que: Y_{ijkl} é a frequência do gene l, dentro do indivíduo k, da família j, da população i; m é a média geral; p_i é o efeito da subpopulação i, com $i=1,2,...,a$; $f_{j(i)}$ é o efeito da família j dentro da subpopulação i, com $j=1,2,...,b_i$; $h_{k(ij)}$ é o efeito do indivíduo k dentro

da família j e da subpopulação i , com $k=1,2,\dots,c_{ij}$; $g_{l(ijk)}$ é o efeito do gene l , dentro do indivíduo k , na família j , da subpopulação i , com $l=1,2,\dots,n_{ijk}$.

O esquema de análise de variância está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Esquema da análise de variância de modelo hierárquico desbalanceado, para um alelo de um loco, contendo como fontes de variação subpopulações (P); famílias (F/P); indivíduos (I/F/P) e genes (G/I/F/P), segundo Weir (1996).

FV	GL	QM	E(QM)
Subpopulações	$a-1$	QM_P	$\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2 + k_2\sigma_F^2 + k_3\sigma_P^2$
Famílias	$\sum_{i=1}^a b_i - a$	QM_F	$\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2 + k_1\sigma_F^2$
Indivíduos	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} c_{ij} - \sum_{i=1}^a b_i$	QM_I	$\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2$
Genes	$n \dots - \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^{b_i} c_{ij}$	QM_G	σ_G^2
Total			

b) Componentes de variância

As estimativas dos componentes de variância foram obtidas segundo a metodologia de Weir (1996) e desdobradas a partir da Tabela 3, conforme se segue:

$$\begin{aligned}\hat{\sigma}_G^2 &= QM_G; & \hat{\sigma}_I^2 &= \frac{(QM_I - QM_G)}{2}; & \hat{\sigma}_F^2 &= \frac{(QM_F - QM_I)}{k_1}; \\ \hat{\sigma}_P^2 &= \frac{(QM_P - QM_I - k_2 \hat{\sigma}_F^2)}{k_3} & \hat{\sigma}_T^2 &= \hat{\sigma}_G^2 + \hat{\sigma}_I^2 + \hat{\sigma}_F^2 + \hat{\sigma}_P^2 = p(p-1)\end{aligned}$$

1)

Para a análise de variâncias, o procedimento adotado seguiu o proposto por Weir (1996), onde os dados de entrada de frequências alélicas foram $x = 1$, se o alelo em análise está presente, e $x = 0$ quando ausente no indivíduo em questão. Portanto, o conteúdo genético de determinado gene é:

$$\begin{aligned}\hat{\sigma}_G^2 &= p(1-p)(1 - \hat{f}_{IT}); \\ \hat{\sigma}_I^2 &= p(1-p)(\hat{f}_{IT} - \hat{\theta}); \\ \hat{\sigma}_F^2 &= p(1-p)(\hat{\theta} - \hat{f}_{ST}); \\ \hat{\sigma}_P^2 &= p(1-p)\hat{f}_{ST}; \\ \hat{\sigma}_T^2 &= p(1-p);\end{aligned}$$

em que: p é a frequência do alelo em questão; $\hat{f}_{ST}$ é a medida do grau de associação ou correlação das frequências gênicas dentro das subpopulações; é, também, uma medida de quantificação das distâncias genéticas entre subpopulações; $\hat{\theta}$ é o coeficiente de coancestralidade; $\hat{f}_{IT}$ é o coeficiente de endogamia para toda a espécie, descrita por Wright.

Os coeficientes de coancestralidade ($\hat{\theta}$), correlação das frequências gênicas dentro de subpopulações ($\hat{f}_{ST}$), o coeficiente de endogamia de Wright para a espécie ($\hat{f}_{IT}$), o coeficiente de endogamia dentro de subpopulação ($\hat{f}_{IS}$) e a taxa de fertilização cruzada da espécie ($\hat{t}$), para cada alelo foram obtidos a partir das seguintes expressões:

$$\hat{\theta} = \frac{(\hat{\sigma}_P^2 + \hat{\sigma}_F^2)}{\hat{\sigma}_T^2} \qquad \hat{f}_{ST} = \frac{\hat{\sigma}_P^2}{\hat{\sigma}_T^2} \qquad \hat{f}_{IT} = 1 - \left(\frac{\hat{\sigma}_G^2}{\hat{\sigma}_T^2} \right)$$

$$\hat{f}_{IS} = \frac{(\hat{f}_{IT} - \hat{f}_{ST})}{(1 - \hat{f}_{ST})} \qquad \hat{t} = \frac{(1 - \hat{f}_{IS})}{(1 + \hat{f}_{IS})}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oito locos microssatélites foram transferidos de *Handroanthus aureus* (BRAGA et al., 2007) para a *Handroanthus heptaphyllus* com sucesso, e seus pesos moleculares são apresentados na Tabela 4. Suas frequências alélicas e número de alelos observados para cada subpopulação são apresentados na Tabela 5.

Tabela 4. Identificação dos alelos e seus tamanhos moleculares para cada um dos 8 locos microssatélites estudados em *Handroanthus heptaphyllus*.

Alelo	Tamanho molecular dos alelos por loco (pb)							
	TAU 12	TAU 14	TAU 15	TAU 21	TAU 22	TAU 27	TAU 30	TAU 31
1	120	120	125	180	128	206	144	190
2	126	126	130	186	130	210	156	200
3	130	128	136	190	134	216	158	206
4	134	130	140	194	140	218	160	210
5	136	136	146	196	144	220	164	216
6	140	140	150	198	146	226	166	220
7	148	146	156	200	-	230	168	226
8	154	150	-	204	-	236	170	230
9	158	154	-	206	-	246	174	236
10	160	156	-	208	-	250	176	240
11	164	-	-	210	-	256	178	246
12	166	-	-	-	-	-	180	250
13	168	-	-	-	-	-	190	256
14	170	-	-	-	-	-	200	260

Observou-se uma riqueza de alelos nas subpopulações estudadas, variando desde 6 alelos para o loco TAU 22 a 14 alelos para os locos TAU 12, TAU 30 e TAU 31. Os pesos moleculares variaram de 120 pares de bases para os alelos dos locos TAU 12 e TAU 14 a 260 pares de bases no loco TAU 31. O número médio de alelos por loco, considerando os oito locos estudados foi de 10,9.

Para *Handroanthus aureus*, Braga et al. (2007) encontraram uma variação de nove a 26 alelos por loco, com uma média de 18,7 alelos por loco. Todos os 8 locos selecionados foram transferidos de *Handroanthus aureus* para a *Handroanthus heptaphyllus*, com grande sucesso.

Tabela 5 Frequências alélicas e número de alelos *observados* das seis subpopulações e oito locos estudados em *Handroanthus heptaphyllus*.

Alelos (pb)	Subpopulação											
	1		2		3		4		5		6	
Loco TAU 12												
120	1	0,005	0	---	0	---	0	---	1	0,039	0	---
126	1	0,005	3	0,065	0	---	6	0,375	0	---	0	---
130	33	0,160	2	0,044	4	0,200	0	---	2	0,077	1	0,071
134	6	0,029	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
136	1	0,005	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
140	9	0,044	7	0,152	0	---	8	0,500	3	0,115	0	---
148	0	---	1	0,022	0	---	0	---	0	---	3	0,214
154	53	0,257	5	0,109	2	0,100	2	0,125	7	0,269	5	0,357
158	20	0,097	6	0,130	4	0,200	0	---	6	0,231	0	---
160	53	0,257	19	0,413	8	0,400	0	---	7	0,269	5	0,357
164	5	0,024	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
166	5	0,024	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
168	3	0,015	2	0,044	2	0,100	0	---	0	---	0	---
170	16	0,078	1	0,022	0	---	0	---	0	---	0	---
Loco TAU 14												
120	8	0,040	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
126	14	0,069	6	0,125	4	0,222	0	---	0	---	0	---
128	4	0,020	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
130	9	0,045	5	0,104	0	---	0	---	2	0,053	0	---
136	48	0,238	3	0,063	3	0,167	0	---	4	0,105	0	---
140	9	0,045	15	0,313	0	---	10	0,500	5	0,132	1	0,250
146	47	0,233	7	0,146	7	0,389	0	---	6	0,158	0	---
150	35	0,173	8	0,167	4	0,222	2	0,100	18	0,474	3	0,750
154	20	0,099	1	0,021	0	---	0	---	0	---	0	---
156	8	0,040	3	0,063	0	---	8	0,400	3	0,079	0	---

Tabela 5 (continuação). Número de alelos observados e frequências alélicas das seis subpopulações e oito locos estudados em *Handroanthus heptaphyllus*.

Alelos	Subpopulação											
		1	2	3	4	5	6					
Loco TAU 15												
126	2	0,012	0	---	0	---	3	0,167	0	---	0	---
130	47	0,273	10	0,200	8	0,500	1	0,056	7	0,175	4	0,222
136	48	0,279	14	0,280	2	0,125	0	---	8	0,200	2	0,111
140	48	0,279	9	0,180	3	0,188	2	0,111	10	0,250	4	0,222
146	13	0,076	6	0,120	2	0,125	0	---	13	0,325	3	0,167
150	1	0,006	2	0,040	1	0,063	3	0,167	0	---	4	0,222
156	13	0,076	9	0,180	0	---	9	0,500	2	0,050	1	0,056
Loco TAU 21												
180	0	---	0	---	0	---	0	---	1	0,026	0	---
186	1	0,005	0	---	0	---	0	---	0	---	1	0,050
190	0	---	0	---	1	0,050	0	---	1	0,026	0	---
194	6	0,028	0	---	0	---	0	---	0	---	3	0,150
196	53	0,245	12	0,231	6	0,300	4	0,200	10	0,263	6	0,300
198	83	0,384	33	0,635	10	0,500	10	0,500	13	0,342	6	0,300
200	62	0,287	6	0,115	3	0,150	5	0,250	12	0,316	4	0,200
204	7	0,032	0	---	0	---	1	0,050	1	0,026	0	---
206	2	0,009	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
208	2	0,009	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
210	0	---	1	0,019	0	---	0	---	0	---	0	---
Loco TAU 22												
128	30	0,147	4	0,100	4	0,250	1	0,050	7	0,250	2	0,111
130	80	0,392	22	0,550	7	0,438	2	0,100	4	0,143	9	0,500
134	50	0,245	4	0,100	0	---	3	0,150	4	0,143	1	0,056
140	17	0,083	6	0,150	0	---	1	0,050	3	0,107	5	0,278
144	21	0,103	4	0,100	4	0,250	1	0,050	9	0,321	0	---
146	6	0,029	0	---	1	0,063	12	0,600	1	0,036	1	0,056
Loco TAU 27												
206	4	0,019	0	---	0	---	1	0,056	0	---	1	0,050
210	22	0,102	3	0,071	1	0,056	0	---	0	---	0	---
216	7	0,032	2	0,048	7	0,389	1	0,056	0	---	1	0,050
218	9	0,042	1	0,024	0	---	0	---	0	---	0	---
220	71	0,329	13	0,310	4	0,222	8	0,444	8	0,235	1	0,050
226	58	0,269	15	0,357	4	0,222	4	0,222	12	0,353	6	0,300
230	24	0,111	7	0,167	2	0,111	0	---	4	0,118	9	0,450
236	0	---	0	---	0	---	1	0,056	0	---	0	---
246	19	0,088	1	0,024	0	---	3	0,167	10	0,294	2	0,100
250	1	0,005	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
256	1	0,005	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---

Tabela 5 (continuação). Número de alelos observados e frequências alélicas das seis subpopulações e oito locos estudados em *Handroanthus heptaphyllus*.

Alelos	Subpopulação											
	1		2		3		4		5		6	
Loco TAU 30												
144	0	---	0	---	0	---	11	0,550	0	---	0	---
156	1	0,005	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
158	1	0,005	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
160	0	---	0	---	1	0,056	0	---	0	---	1	0,056
164	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---	2	0,111
166	35	0,170	3	0,063	0	---	0	---	2	0,053	5	0,278
168	104	0,505	25	0,521	14	0,778	9	0,450	19	0,500	8	0,444
170	35	0,170	8	0,167	2	0,111	0	---	2	0,053	2	0,111
174	1	0,005	4	0,083	0	---	0	---	9	0,237	0	---
176	9	0,044	7	0,146	1	0,056	0	---	1	0,026	0	---
178	9	0,044	1	0,021	0	---	0	---	5	0,132	0	---
180	3	0,015	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
190	5	0,024	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
200	3	0,015	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---
Loco TAU 31												
190	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---	2	0,167
200	0	---	1	0,022	0	---	0	---	0	---	0	---
206	0	---	0	---	1	0,083	0	---	5	0,132	0	---
210	1	0,005	0	---	1	0,083	0	---	0	---	1	0,083
216	7	0,036	3	0,065	0	---	1	0,071	3	0,079	0	---
220	9	0,046	5	0,109	0	---	1	0,071	2	0,053	3	0,250
226	18	0,093	13	0,283	3	0,250	2	0,143	0	---	0	---
230	47	0,242	4	0,087	0	---	0	---	9	0,237	0	---
236	31	0,160	14	0,304	0	---	5	0,357	2	0,053	4	0,333
240	56	0,289	3	0,065	4	0,333	3	0,214	14	0,368	1	0,083
246	19	0,098	1	0,022	0	---	1	0,071	2	0,053	1	0,083
250	0	---	2	0,044	3	0,250	1	0,071	0	---	0	---
256	2	0,010	0	---	0	---	0	---	1	0,026	0	---
260	4	0,021	0	---	0	---	0	---	0	---	0	---

A presença e a ausência de diferentes alelos para cada loco ocorreu para as diferentes subpopulações. No geral, os alelos mais frequentes nos diferentes locos aparecem em praticamente todas as subpopulações.

Para o loco TAU 12 os alelos mais frequentes foram o 154 e o 160, para o loco TAU 14 os mais frequentes foram os alelos 136 e o 146. Os alelos 130, 136 e 140 foram os mais frequentes no loco TAU 15 e o alelo 198 foi o mais frequente no loco

TAU 21. No loco TAU 22 o alelo mais frequente foi o alelo 130 e no TAU 27 foi o alelo 220. Para o loco TAU 30 o alelo mais frequente foi o 168 e para o TAU 31 o mais frequente foi o alelo 240.

A diversidade genética, o índice de fixação e a taxa aparente de cruzamento para cada uma das subpopulações de *H. heptaphyllus* estudadas são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Estimativas do número de alelos por loco ($\hat{A}$), número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e$), da heterozigosidade esperada ($\hat{H}_e$), heterozigosidade observada ($\hat{H}_o$), índice de fixação ($\hat{F}$) e taxa aparente de cruzamento ($\hat{t}$) das seis subpopulações de *Handroanthus heptaphyllus*.

Subpopulação	$\hat{A}$	$\hat{A}_e$	$\hat{H}_e$	$\hat{H}_o$	$\hat{F}$	$\hat{t}$
1	9,4	4,4	0,7726	0,6249	0,1911	0,6791
2	6,8	3,8	0,7371	0,6119	0,1698	0,7097
3	4,5	3,4	0,7071	0,5271	0,2546	0,5941
4	4,5	3,1	0,6748	0,7301	-0,0819	1,0000
5	5,9	4,2	0,7613	0,6108	0,1977	0,6699
6	4,9	3,8	0,7380	0,6048	0,1805	0,6942
Média	6,0	3,8	0,7318	0,6183	0,1520	0,7245
Todas as Subpopulações	10,9	4,7	0,7858	0,6246	0,2051	0,6596

A participação do número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e$) foi de 46,8% (subpopulação 1) a 77,6% (subpopulação 6) em relação ao número de alelo por loco ($\hat{A}$), indicando que a maior participação dos alelos nas estimativas dos parâmetros genéticos ocorreu na subpopulação 6.

A quantidade de heterozigose esperada variou de 0,6748 (subpopulação 4) a 0,7726 (subpopulação 1) com média de 0,7318. Para a espécie, 0,7858 foi o valor da heterozigosidade esperada. A quantidade de heterozigosidade observada foi menor que a esperada em praticamente todas as subpopulações. A exceção ocorreu somente para a subpopulação 4 onde o valor observado foi maior que o esperado. A quantidade média de heterosigose observada foi de 0,6183 e quando se considerou a espécie como um todo, a quantidade de heterozigose foi de 0,6246.

Observando os índices de fixação ($\hat{F}$) da Tabela 6, constata-se que praticamente todas as subpopulações apresentam endogamia, pois mostram valores positivo com média de 0,1520; a exceção é a subpopulação 4, que apresentou valor negativo (-0,0819), significando excesso de heterozigotos naquela subpopulação. Para a população de *H. heptaphyllus* a endogamia foi de 0,2051. A taxa aparente média de cruzamentos ($\hat{t}$) foi de 0,7245 mostrando estar havendo certa taxa de endocruzamentos nas subpopulações. Quando se considerou a população como um todo, a taxa aparente de cruzamentos baixou para 0,6596.

Na Tabela 7 são apresentadas as heterozigosidades esperadas e observadas de algumas espécies arbóreas. Nota-se que os valores diferem entre eles, e indica também haver alta diversidade genética para tais espécies

Tabela 7. Heterozigosidades esperadas e observadas de algumas espécies arbóreas

Espécies Arbóreas	H _e	H _o	Marcadores	Fontes
<i>Chorisia speciosa</i>	0,245	0,284	isoenzimas	Souza, 1997
<i>Couratani guianensis</i>	0,203	0,429	isoenzimas	Lepsch-Cunha, 1996
<i>Cedrella fissilis</i>	0,380	0,330	isoenzimas	Póvoa, 2002
<i>Couratani multiflora</i>	0,359	0,432	isoenzimas	Lepsch-Cunha, 1996
<i>Tabebuia cassioides</i>	0,198	0,224	isoenzimas	Sebbenn, 2005
<i>Handroanthus aureus</i>	0,913	0,587	microsatélites	Braga et al., 2007
<i>Acrocomia aculeata</i>	0,397	0,268	microsatélites	Nucci, 2007
<i>Handroanthus heptaphyllus</i>	0,786	0,624	microsatélites	Presente trabalho

Diferentes marcadores moleculares apresentam diferentes resultados de diversidade genética. Na Tabela 7 observa-se que os marcadores isoenzimáticos tem a tendência de apresentar valores de heterozigosidades, tanto as esperadas como a observadas, inferiores às encontradas para os microsatélites. Normalmente os microsatélites apresentam maiores polimorfismos alélicos que as isoenzimas (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

A distância por coancestria entre as subpopulações de *H. heptaphyllus* é apresentada na Tabela 8. A maior distância por coancestria (0,2078) ocorreu entre as subpopulações 3 e 4 e a menor distância (0,0319) entre as subpopulações 1 e 5. No geral, os valores de coancestria entre as subpopulações não foram tão elevados mostrando uma baixa coancestria entre elas, com uma média igual a 0,0881.

Tabela 8. Valores de coancestria para as seis subpopulações de *Handroanthus heptaphyllus*.

Subpopulação	1	2	3	4	5	6
1	*****	0,0335	0,0342	0,1527	0,0319	0,0432
2		*****	0,0430	0,1322	0,0644	0,0423
3			*****	0,2078	0,0576	0,0855
4				*****	0,1581	0,1765
5					*****	0,0584
6						*****

Um dendrograma, construído a partir do método UPGMA, de coancestria entre as seis subpopulações estudadas de *Handroanthus heptaphyllus* é apresentado na Figura 3.

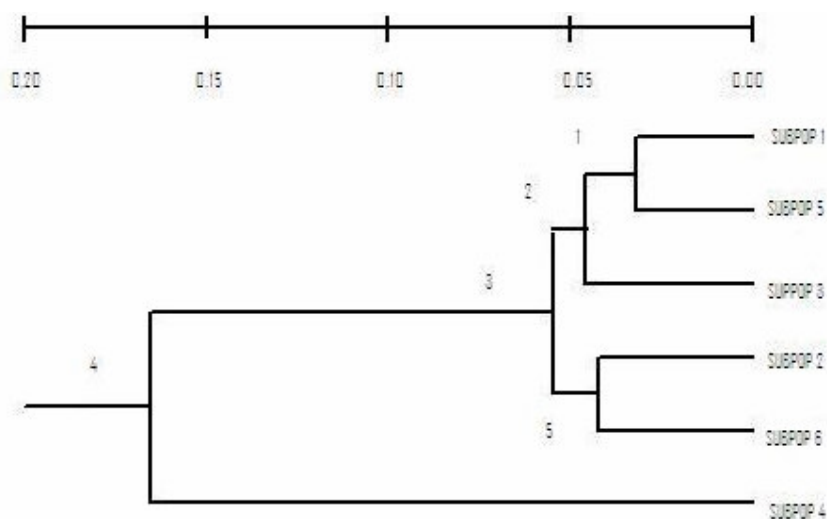


Figura 3. Dendrograma de coancestria das seis subpopulações construído pelo método UPGMA.

O dendrograma mostra as coancestrias médias entre subpopulações. Observa-se que a subpopulação 4 mostra a maior coancestria em relação as demais e as outras subpopulações possuem uma pequena coancestria entre elas. A consistência dos nós no dendrograma da Figura 3 é apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Consistência dos nós do dendrograma de coancestria (Figura 1) construído pelo método UPGMA das 6 populações estudadas em *Handroanthus heptaphyllus*.

Nó	Proporção de repetições similares	Índice de Consistência de cada nó	
		Nº de locos	% total de locos
		suportando o nó	suportando o nó
1	0,3670	2	25,0
2	0,2664	1	12,5
3	0,3019	1	12,5
4	0,9758	5	62,5
5	1,0000	8	100,0

Os nós 1, 2 e 3, estatisticamente, mostraram baixas consistências, significando que os grupamentos entre as subpopulações 1, 2 e 3 podem haver outras alternativas de grupamentos próximas as apresentadas no dendrograma. No entanto, a boa consistência do nó entre as subpopulações 2 e 6 demonstra que estatisticamente apresentam as menores coancestrias. A melhor consistência ocorreu entre a subpopulação 4 e todas as demais, com uma consistência de 100% dos locos. Naturalmente isso demonstra que a subpopulação 4 estatisticamente apresenta a maior coancestria quando comparadas com todas as outras.

As coancestrias entre as progênies, considerando a população de *Handroanthus heptaphyllus* como uma única população é apresentada na Figura 4. O dendrograma da Figura 4 mostra que as progênies estudadas são geneticamente distintas por apresentarem baixas coancestrias entre elas e, portanto, podem ser consideradas em programas de conservação genética da espécie.

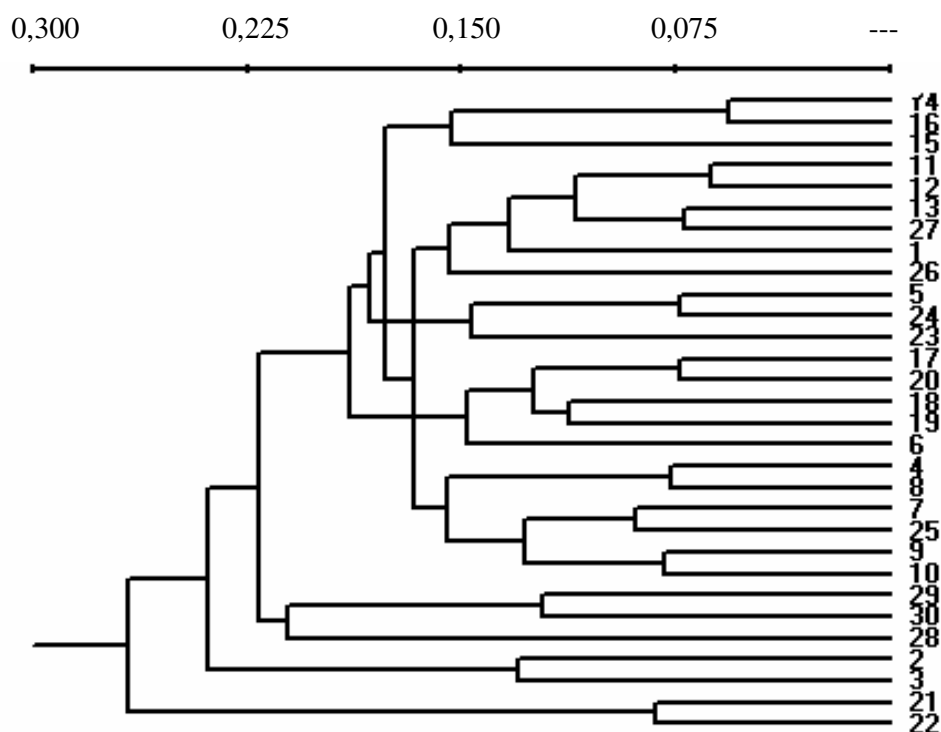


Figura 4. Dendrograma com o agrupamento de coancestria entre todas as progênies de *Handroanthus heptaphyllus*, baseado no método UPGMA.

Na Figura 4 observa-se que a maior parte dos indivíduos analisada mostrou valores baixos de coancestria, significando a não existência de parentesco entre eles, ou ainda um grau de parentesco muito distante, mostrando que o material estudado possui variabilidade genética e podendo compor os bancos de germoplasma da espécie.

A diversidade genética total, entre e dentro de populações, baseada em Weir (1996), foi apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Diversidade genética total das seis populações ($\hat{f}_{IT}$), diversidade genética entre as seis populações ($\hat{f}_{ST}$) e diversidade genética dentro das seis populações ($\hat{f}_{IS}$).

LOCO	$\hat{f}_{IT}$	$\hat{f}_{ST}$	$\hat{f}_{IS}$
1	0,1990	0,0536	0,1536
2	0,2200	0,0859	0,1467
3	0,3041	0,0447	0,2715
4	0,1490	0,0127	0,1381
5	0,3085	0,0779	0,2501
6	0,1790	0,0338	0,1503
7	0,2155	0,0617	0,1639
8	0,2006	0,0528	0,1561
Todos locos	0,2229 $\pm$ 0,0195	0,0538 $\pm$ 0,0081	0,1787 $\pm$ 0,0183
IC superior	0,2610	0,0686	0,2157
IC inferior	0,1887	0,0382	0,1498

Com base na estimativa da diversidade genética entre as seis subpopulações ($\hat{f}_{ST} = 0,0538$) nota-se que, do total de diversidade genética ($\hat{f}_{IT}$) para a *Handroanthus heptaphyllus*, somente 5,38% está entre populações. A maior parte da diversidade está dentro das subpopulações estudadas (94,62%). A diversidade genética total ($\hat{f}_{IT} = 0,2229$) encontrada nas subpopulações é um valor próximo à média encontrada na literatura para as espécies florestais. Hamrick (1983) mostrou que a diversidade total média para 38 espécies foi de 0,2600, muito próximo ao encontrado para o *H. heptaphyllus*.

Estes resultados mostram que em programas de conservação de germoplasma de *H. heptaphyllus* é importante colher uma grande quantidade de indivíduos dentro de subpopulações e poderia ser em poucas subpopulações. Esse procedimento já garantiria boa representatividade genética da espécie, pois a maior diversidade se encontra dentro das subpopulações.

Os testes de χ^2 para as seis subpopulações estudadas estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Teste de χ^2 para provar o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando loco microssatélite, para as seis subpopulações de *Handroanthus heptaphyllus* e para a espécie como um todo.

Análise por subpopulação	Loco	Qui-quadrado	Probabilidade
Subpopulação 1	1	7,1400	0,0075
	2	8,4650	0,0036
	3	3,1328	0,0767
	4	0,6973	0,4037
	5	0,2978	0,5853
	6	0,3369	0,5616
	7	5,1326	0,0235
	8	8,5621	0,0034
Subpopulação 2	1	0,8566	0,3547
	2	0,1067	0,7440
	3	0,9070	0,3409
	4	0,2001	0,6547
	5	7,1034	0,0077
	6	1,5774	0,2091
	7	1,4844	0,2231
	8	0,0165	0,8978
Subpopulação 3	1	3,4028	0,0651
	2	0,8030	0,3702
	3	---	1,0000
	4	0,4000	0,5271
	5	4,4525	0,0349
	6	0,8030	0,3702
	7	0,7347	0,3914
	8	6,0000	0,0143
Subpopulação 4	1	---	1,0000
	2	3,6000	0,0578
	3	0,1111	0,7389
	4	0,4000	0,5271
	5	0,2778	0,5982
	6	1,1025	0,2937
	7	1,7151	0,1903
	8	0,0311	0,8600
Subpopulação 5	1	8,4141	0,0037
	2	2,5544	0,1100
	3	3,7014	0,0544
	4	0,6262	0,4288
	5	0,2992	0,5844
	6	0,0156	0,9006
	7	2,5789	0,1083
	8	0,3258	0,5681
Subpopulação 6	1	0,0311	0,8600
	2	0,2222	0,6374
	3	0,7347	0,3914
	4	2,7438	0,0976
	5	0,1111	0,7389
	6	0,0010	0,9745
	7	2,7225	0,0989
	8	0,3750	0,5403
Análise para a espécie			
	1	7,5417	0,0060
	2	4,5431	0,0331
	3	0,0362	0,8492
	4	2,4588	0,1169
	5	7,8247	0,0052
	6	1,2924	0,2556
	7	3,2762	0,0703
	8	10,1098	0,0015

Observando os valores de probabilidade (p) do teste de χ^2 , verifica-se que, no geral, as populações não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com valores de probabilidade variando de loco a loco. Alguns locos estão próximos do equilíbrio, embora a grande maioria não esteja no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este fato já era o esperado, pois diversos são os fatores que influenciam as frequências gênicas em populações naturais.

Os resultados do sistema de reprodução da *Handroanthus heptaphyllus*, utilizando o programa MLTR de Ritland (2002), estão discriminados na Tabela 12.

Tabela 12. Sistema Reprodutivo de *Handroanthus heptaphyllus*, utilizando o programa MLTR para Modelos Mistos de Ritland (2002).

Progênie	$\hat{t}_m$	$\hat{t}_s$	$\hat{t}_p$	$\hat{r}_{(p)m}$	$\hat{r}_{(p)s}$
1	0,980 (0,004)	0,853 (0,040)	0,127 (0,041)	0,196 (0,107)	-0,999 (0,458)
2	0,989 (0,001)	0,861 (0,032)	0,127 (0,032)	0,237 (0,118)	0,167 (0,044)
3	0,989 (0,001)	0,853 (0,029)	0,135 (0,029)	0,232 (0,133)	0,155 (0,043)
4	0,989 (0,001)	0,902 (0,025)	0,087 (0,025)	0,267 (0,154)	0,143 (0,048)
5	0,985 (---)	0,836 (0,030)	0,149 (0,030)	0,023 (0,002)	0,078 (0,005)
6	0,989 (0,001)	0,838 (0,027)	0,151 (0,027)	0,023 (0,002)	0,096 (0,024)
7	0,886 (0,105)	0,789 (0,048)	0,096 (0,091)	0,209 (0,134)	0,121 (0,016)
8	0,989 (0,001)	0,838 (0,045)	0,150 (0,045)	0,108 (0,086)	0,130 (0,026)
9	0,985 (---)	0,874 (0,013)	0,111 (0,013)	0,193 (0,134)	0,128 (0,027)
10	0,671 (0,147)	0,788 (0,064)	-0,117 (0,108)	0,265 (0,134)	0,124 (0,017)
11	0,865 (0,107)	0,871 (0,052)	-0,006 (0,085)	0,084 (0,071)	0,085 (0,015)
12	0,906 (0,025)	0,906 (0,025)	0,100 (0,084)	0,119 (0,042)	0,019 (0,056)
13	0,989 (0,001)	0,917 (0,019)	0,071 (0,019)	0,066 (0,067)	0,094 (0,029)
14	0,989 (0,001)	0,886 (0,027)	0,103 (0,027)	0,073 (0,094)	0,095 (0,023)
15	0,514 (0,022)	0,783 (0,058)	-0,269 (0,047)	0,125 (0,104)	0,100 (0,012)
16	0,974 (---)	0,860 (0,027)	0,113 (0,027)	0,061 (0,008)	0,100 (0,008)
17	0,974 (---)	0,859 (0,028)	0,115 (0,028)	0,065 (0,023)	0,095 (0,011)
18	0,974 (---)	0,880 (0,018)	0,094 (0,018)	0,092 (0,038)	0,110 (0,015)
19	0,974 (---)	0,883 (0,026)	0,091 (0,026)	0,045 (0,003)	0,094 (0,009)
20	0,974 (---)	0,848 (0,043)	0,126 (0,043)	0,075 (0,050)	0,092 (0,008)
21	0,974 (---)	0,782 (0,039)	0,192 (0,039)	0,167 (0,096)	0,104 (0,006)
22	0,974 (---)	0,697 (0,041)	0,277 (0,041)	0,323 (0,108)	0,107 (0,007)
23	0,974 (---)	0,876 (0,034)	0,097 (0,034)	0,055 (0,012)	0,099 (0,011)
24	0,974 (---)	0,867 (0,028)	0,107 (0,028)	0,050 (0,006)	0,088 (0,007)
25	0,974 (---)	0,875 (0,037)	0,099 (0,037)	0,111 (0,078)	0,120 (0,019)
26	0,974 (---)	0,820 (0,030)	0,154 (0,030)	0,107 (0,078)	0,097 (0,005)
27	0,974 (---)	0,925 (0,012)	0,049 (0,012)	0,089 (0,064)	0,093 (0,016)
28	0,974 (---)	0,757 (0,026)	0,217 (0,026)	0,084 (0,034)	0,100 (0,004)
29	0,974 (---)	0,837 (0,044)	0,137 (0,044)	0,066 (0,017)	0,102 (0,008)
30	0,819 (0,138)	0,822 (0,012)	-0,004 (0,130)	0,100 (0,020)	0,099 (0,003)
Média das 30 prog	0,939	0,846	0,096	0,124	0,068
Para todas as 30 prog	0,978 (0,035)	0,721 (0,025)	0,257 (0,041)	0,175 (0,033)	0,071 (0,046)
Média da Subpop 1*	0,921	0,822	0,098	0,146	0,043
Para a Subpop 1*	0,963 (0,046)	0,744 (0,028)	0,219 (0,049)	0,232 (0,043)	0,076 (0,067)

*Subpopulação 1 compreende as progênies de 1 a 15.

SISTEMA REPRODUTIVO POR RITLAND (2002)

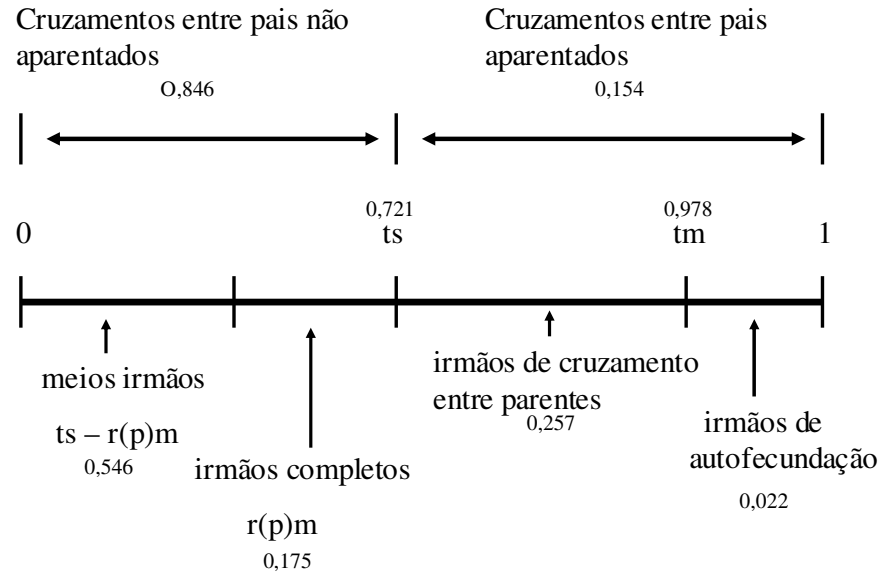


Figura 5. Esquema do Sistema Reprodutivo Misto em *Handroanthus heptaphyllus*.

As altas taxas de cruzamento multilocos ($\hat{t}_m = 0,978$), cujo valor significa o total de cruzamentos entre os indivíduos (considerando os parentes e não parentes), mostram que o *H. heptaphyllus* é uma espécie alógama. Dentre os cruzamentos existentes, a taxa de cruzamento uniloco ($\hat{t}_s = 0,721$), mostra que a maior parte dos cruzamentos está ocorrendo entre os indivíduos não aparentados. A taxa referente aos cruzamentos entre os indivíduos aparentados ($\hat{t}_p = \hat{t}_m - \hat{t}_s = 0,257$), ou seja 25,7% é bem menor, mostrando que os cruzamentos entre indivíduos parentes é baixo. A correlação da estimativa de p ($\hat{r}_{(p)m}$), ou a probabilidade de se achar indivíduos que sejam irmãos completos é da ordem de 17,5% para o conjunto das 30 progênes. No caso da macaúba (*Acrocomia aculeata*), a taxa aparente média de cruzamento, segundo Nucci (2007), foi de 0,471, sugerindo que o sistema reprodutivo é misto para a espécie. No entanto, Lacerda et al. (1999) estudando *Myracrodruon urundeuva* encontrou uma

taxa de cruzamentos multilocos de 1,050 em uma população do Rio Grande do Norte e de 0,815 em outra população na Paraíba, mostrando taxas próximas às obtidas para a *Handroanthus heptaphyllus*, no presente trabalho, que foi de 0,978. Tanto o *Myracrodruon urundeuva* como a espécie estudada tratam-se de plantas alógamas.

Povoa (2002), estudando a distribuição da variação genética de *Cedrela fissilis* encontrou uma taxa média de cruzamento multilocos de 0,99, cujo valor indica um sistema de reprodução mista, com predominância de cruzamentos.

A taxa de autofecundação da *Handroanthus heptaphyllus* ($\hat{s} = 0,022$) foi muito baixa, de 2,2%. Portanto, pode-se concluir que a espécie é alógama não tendo predisposição para a autofecundação. Talvez a autoincompatibilidade seja o mecanismo adotado pela espécie para evitar a autofecundação, pois se observou na vegetação natural, que as árvores isoladas floresciam, mas em sua grande maioria, não produziam sementes.

6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente trabalho, para o *Handroanthus heptaphyllus*, permitem concluir que:

- a) Os oito locos microsatélites estudados mostraram alto polimorfismo alélico (média = 10,9 alelos/loco);
- b) Houve boa transferibilidade de *primers* da *Handroanthus aureus* para a *H. heptaphyllus* estudada;
- c) As subpopulações apresentam pequenos valores de coancestria entre elas ($\theta_{xy} = 0,0881$);
- d) A maior parte da diversidade genética está dentro das subpopulações de ipê-roxo *Handroanthus heptaphyllus* (94,62%);
- e) O sistema reprodutivo do ipê-roxo *Handroanthus heptaphyllus* é a alogamia ($\hat{t}_m = 0,978$), sendo que destes, apenas 25,7 % referem-se a cruzamentos entre parentes.
- f) A autofecundação média da espécie é muito baixa ($\hat{s} = 0,022$).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P.P.; SANO S.M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: **Espécies Vegetais Úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. p.48-54, 1998.

AVISE, J.C; Abandon all species concepts? A response. **Conservation Genetics**. U.S.A; GA. n.1, p.77-80, 2000.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A.L.C.F. Frutos e Sementes: Morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999, 443p.

BECKMANN, J.S. Oligonucleotide polymorphisms: a new tool for genomic genetics. **Nature Biotechnology Technology** 6, p.1061-1064, 1988.

BORBA, V.S. Marcadores moleculares: classificação e aplicação. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p.166, 2002.

BOREM, A.O Melhoramento de Plantas na Virada do Milênio. ***Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento***, n.7, p.68-72, 1999.

BRAGA A.C., REIS A.M.M., LEOI T.L., PEREIRA R.W., COLLEVATTI R.G. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). ***Molecular Ecology Notes***, v.7, n.1, p.53-56, 2007.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. ***Theoretical and Applied Genetics***, v.97, n.5, p.816-827, 1998.

BROWN, A.H.D. Isozymes, plant population genetics structure and genetic conservation. ***Theoretical and Applied Genetics***, Berlin, v.52, n.4, p.145-157, 1978.

BROWN, S. M.; HOPKINS, M.S.; MITCHELL, S.E.; SENIOR, M.L.; WANG, T.Y.; DUNCAN, R.R.; GONZALES-CANDELAS, F.; KRESOVICH, S. Multiple method for the identification of polymorphic simple sequence repeat (SSR) in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). ***Theoretical and Applied Genetics***, v.93, n.1, p.190-198. 1996.

CABRAL, E.L.; BARBOSA, D.C.A.; SIMABUKURO, E.A. Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. F. ex. S. Moore. ***Acta Botânica Brasilica***, Porto Alegre, v.17, n.4, p.609-617, 2003.

CARVALHO, A.C.M. **Fluxo de pólen e sementes em população isolada de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae) em um fragmento florestal localizado em área urbana.** Ilha Solteira, 2009, 72f. (Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira).

CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras.** Curitiba: **EMBRAPA, CNPF**; Brasília, **EMBRAPA**, SPI.1 ed., v.1, p.155-176, 2003.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: **EMBRAPA, CNPF**; Brasília: **EMBRAPA, SPI**, 1994. 640p.

CLEGG, M.T. Measuring plant mating systems. **Bioscience**, v.30, n.12, p.818, 1980.

DIAS, L.A.S.; KAGEYAMA, P.Y. Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. **Agrotrópica**, Ihéus, v.3, n.3, p.119-127, 1991.

EMBRAPA FLORESTAS. Circular Técnica, 126, 1 edição, 2006.

ENGEL, V.L.; POGGIANI, F. Influência do sombreamento sobre o crescimento de mudas de algumas espécies nativas e suas implicações ecológicas e silviculturais. **IPEF**, Piracicaba, v.43/44, p.1-10, 1990.

ETTORI, L.C.; SIQUEIRA, A.C.M., CAMPOS, O.R. Variabilidade genética em populações de Ipê-roxo – *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Tol. – para conservação *ex situ*. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.8, n.1, p.61-70, 1996.

FERES, J.M. **Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand.: Implicações para a conservação.** Ribeirão Preto, 2009, 142f. (Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto).

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.

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

FRANKHAM, R. **A primer of conservation genetics**. Cambridge: Smithsonian Institutum, 2004. 220p.

FRANKEL, O.H. 1984. **Genetic perspectives of germplasm conservation**. In: Arber, W., Limensee, K., Peacock, W.J. & Starlinger, P. Genetic manipulation: Impact on man and society. Cambridge Univ. Press., Cambridge, p.161-170.

GAINO, A.P.S.C. **Diversidade genética, sistema de reprodução e fluxo de pólen e sementes em uma população fragmentada de *Myracrodruon urundeuva* (F.F. & M.F. Allemão) para fins de conservação genética**. Ilha Solteira, 2009, 134f. (Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira).

GENTRY, A.H. **Bignoniaceae – Part I (Crescentieae and Tourrettieae)**. *Flora Neotropica, Monograph 25*. New York Botanical Garden. 1980.

GENTRY, A.H. **Flora Neotropica: Bignoniaceae - Part II (tribe Tecomeae)**. *Flora Neotropica Monograph*, v.25, n.2, p.1-130, 1992.

GOEDERT, C. Germoplasma: o que é isso? **Seednews**, Pelotas, v.9, n.3, p.16-21, 2002.

GUERRA, N.A. Cariologia de espécies do gênero *Tabebuia* Gomes (Bignoniaceae). **Revista Científica UDO Agrícola**, v.2, p.14-21, 2002

GUIDUGLI, M.C. **Estudos de estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de *Hymenaea courbaril* L. utilizando marcadores moleculares SSR e RAPD**. Ribeirão Preto, 2007, 91f. (Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto).

HAMRICK, J.L. **The distribution of genetic variation within and among natural plant population: genetics and conservation**. Menlo Park, California; Benjamin Cummings, 1983, p.335-348.

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**, Berlim, v.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, vol. 1, 1990. 172p.

KAGEYAMA, P.Y. **Restauração ecológica de ecossistemas naturais**. Piracicaba: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, 2003. 340p.

KAGEYAMA, P.Y.; MARQUEZ, F.C.M. **Comportamento de espécies de curta longevidade armazenada com diferentes teores de umidade inicial (gênero *Tabebuia*)**. Piracicaba: IPEF, 1981. (Circular técnica, 126).

KANO, N.K.; MÁRQUEZ, F.C.M.; KAGEYAMA, P.Y. – **Armazenamento de sementes de Ipê dourado (*Tabebuia* sp.)**. IPEF, Piracicaba, n.17, p.13-23, 1978.

LACERDA, C.M.B.; KAGEYAMA, P.Y. ; FERRAZ, E.M. Diversidade genética em *Myracrodruon urundeuva* em duas situações antrópicas no semi-árido. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.55, p.89-96, 1999.

LEE, S.L.; SAW, L.; NORWATI, A.; SALWANA, M.H.S.; LEE, C.T.; NORWATI, M. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virgin Jungle Reserves in Peninsular Malaysia. **American Journal of Botany**, Saint Louis, v.89, n.3, p.447-459, 2002.

LEPSCH-CUNHA, N. **Estrutura genética e Fenologia de espécies raras de *Couratari* spp.(Lecythydaceae) na Amazônia Central**. Piracicaba, 1996. 147 p. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1996.

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. 4. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2002. v.1, 381p.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinantes of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, n.1, p.65-95, 1984

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Distribución de la variación en espécies de arboles tropicales. **Revista Biología Tropicales**, v.35, n.1, p.175-175, 1987.

MAYER, A.M.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. New York: Pergamon, 1989. 270p.

MENDES, F.B.G. **Diversidade genética de populações de cedro (*Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)) no Centro-Sul do Brasil**. Piracicaba, 2009, 87f. (Doutorado – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”).

MILLER, M. **Tools for population genetic analyses (TFPGA) (software)**, version 1.3: a windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data, 1997, <http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm>.

MOREIRA, T.; SOUZA, E.D. Mata ciliar: vamos abrir os olhos? **Revista Globo Rural**, São Paulo, v.2, n.20, p.96-102, 1987.

MORENO, M.A. **Estrutura genética e diversidade clonal de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne) em duas populações no cerrado do Estado de São Paulo**. Piracicaba, 2009, 114f. (Mestrado – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”).

MORI, E. S. Genética de Populações Arbóreas: Orientações Básicas para Seleção e Marcação de Matrizes. **Revista do Instituto Florestal**, p.35 - 44, 2003.

MOXON, E.R.; WILLS, C. DNA microsatellites: agents of evolution? **Scientific American**, New York, v.280-1, p.72-77, 1999.

MURAWSKI, D.A., HAMRICK, J.L. The effect of density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity**, v.67, p. 167-174, 1991.

NEI, M. F-statistics and analyses of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, New York, v.41, n.10, p.1-17, 1977.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York. Columbia University Press, 1978, 512p.

NUCCI, S.M. **Desenvolvimento, caracterização e análise da utilidade de marcadores microssatélites em genética de população de macaúba**. Campinas, 2007. 84f. (Mestrado I.A.C.)

PAIVA, A.V.; POGGIANI, F. Crescimento de mudas de espécies arbóreas nativas plantadas no sub-bosque de um fragmento florestal. **Scientia Florestalis**, Piracicaba, n.57, p.141-51, 2000.

PAULA, J.E.; ALVES, J.L.H. **Madeiras nativas**: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção, uso. Brasília: Fundação Mokiti Okada, 1997. 541p.

PIAZZANO, M. Números cromosômicos en Bignoniaceae de Argentina. **Kurtziana**, Cordoba, v.26, p.179-189, 1998

PINTO, M.M.; SADER, R.; BARBOSA, J.M. Influência do tempo de secagem e do armazenamento sobre a viabilidade das sementes de ipê-rosa. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.8, n.1, p.37-47, 1986.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: MA/AGIPLAN, 1985. 289p.

PÓVOA, J.S.R. **Distribuição da variação genética de *Cedrela fissilis* Vell, em fragmentos florestais, no sul de Minas Gerais por meio de isoenzimas**. Lavras, 2002. 106f. (Mestrado - UFLA)

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Journal of Heredity**, London, v.88, p.221-228, 2002.

RITLAND, K. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems. **Journal of Heredity**, London, v.81, p.235-237, 1990.

RITLAND, K.; JAIN, S.K. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Journal of Heredity**, London, v.47, n.1, p.35-52, 1981.

RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. 2.ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1985. 269p.

RIZZINI, C.T. Sistematização terminológica da folha. **Rodriguésia**, v.29, n.42, p.103-125, 1977.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**: version 6. 4 ed. Cary, 1990.

SEBBENN, A.M. Sistemas de reprodução em espécies tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamento ambientais. In: HIGA, A.R.; SILVA, L.D. **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF, p.93-138, 2006.

SEBBENN, A.M.; SEONE, C.E.; KAGEYAMA, P.Y. & VENCovsky, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*) no vale do Ribeira, S.P. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.58, p.127-143, 2000.

SEBBENN, A.M.; GUSSON, E.; KAGEYAMA, P.Y. Consequências do manejo florestal no sistema de reprodução de *Tabebuia cassinoides* (Lamarck) A. P. de Candolle. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo, v.17, n.2, p.129-141, 2005.

SMITH, D.N.; DEVEY, M.E. Occurrence and inheritance of microsattellites in *Pinus radiata*. **Genome**, Ottawa, v.37, p.977-983, 1994.

SOUZA, L.M.F.I. **Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* St. Hil. em fragmentos florestais na região de Bauru (S.P.), Brasil.** Piracicaba, 1997, 76 p.. (Tese Mestrado- Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz).

SWOFFORD, D.L.; SELANDER, R.B. Biosys-2. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. University of Illinois, 1997.

TARAZI, R. **Diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. no cerrado.** Piracicaba, 2009, 139p. (Doutorado – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz).

TELLES, M.P.C.; VALVA, F.D.; BANDEIRA, L.F., COELHO, A.S.G. Genetic characterization of natural populations of "araticunzeiro" (*Annona crassiflora* Mart. - Annonaceae) collected in the State of Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.26, n.1, p.123-129, 2003.

TRESENA, N.L. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v11, n.1, p.87-93, 2009.

VENCOVSKY, R. Tamanho efetivo populacional na coleta e preservação de germoplasmas de espécies alógamas. **IPEF**, Piracicaba, n. 35, p. 79-84, 1987.

VIEGAS, M.P. **Diversidade genética em populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob diferentes tipos de perturbação antrópica.** Ilha Solteira, 2009, 69f. (Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira).

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

WRIGHT, S. System of mating. **Genetics**, Chicago, v.6, p.111-178, 1922.

YEH, F.C., Yang, R.C, BOILEY, T., MAO, J.X., YE, Z.H. Popgene, the user-friendly freeware for population Genetics analysis. **Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta**, Canada, 1997.