

Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcador AFLP

Intrapopulational genetic variability of
Myracrodruon urundeuva Fr. All. per AFLP marker

Miguel Luiz Menezes Freitas
Ana Paula de Andrade Aukar
Alexandre Magno Sebbenn
Mario Luiz Teixeira de Moraes
Elia Gertrudes Macedo Lemos

RESUMO: Estimaram-se os níveis de variabilidade genética em uma população de *Myracrodruon urundeuva*, para a conservação genética *in situ* e *ex situ*, utilizando-se da técnica da PCR (reação de polimerase em cadeia) com o marcador genético AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados). As sementes para os testes de progênies foram coletadas em 30 árvores (matrizes) de polinização livre na Estação Ecológica de Paulo de Faria – SP. A partir deste material genético, foram instalados três testes de progênies na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, localizada em Selvíria – MS. A análise por marcador genético foi realizada por três diferentes combinações de iniciadores EcoRI-MseI, resultando num total de 137 bandas polimórficas, formando uma tabela de dados binários. Esses dados foram utilizados para análise da divergência genética e distância entre progênies. Foram detectados altos níveis de divergência genética entre progênies, sendo que 16,2% da variabilidade genética encontrava-se entre progênies e 83,8%, dentro de progênies, indicando desvios de cruzamentos aleatórios. O agrupamento das progênies, a partir das distâncias genéticas, sugere que progênies derivadas de árvores próximas tendem a ser mais similar entre si. Isto mostra a possibilidade da população de origem das sementes estar geneticamente estruturada.

PALAVRAS-CHAVE: Aroeira, Variabilidade genética, Marcadores genéticos, AFLP

ABSTRACT: Levels of genetic variability for *in situ* and *ex situ* genetic conservation were estimated in a population of *Myracrodruon urundeuva* using the PCR (polymerase chain reaction) technique with the AFLP (Amplified fragment-length polymorphism) genetic marker. Seeds for progeny tests were collected from 30 open-pollination trees (matrices) at Paulo de Faria Ecological Station – SP. From this genetic material, three progeny tests were installed on the Teaching and Research Farm of Ilha Solteira Faculty of Engineering – University of São Paulo State (UNESP), which is located in Selvíria – MS, Brazil. The analysis by genetic marker was conducted with three combinations of different starters EcoRI-MseI, resulting in a total number of 137 polymorphic bands, thus forming a table of binary data. These data were used for the analysis of genetic divergence and distance between progenies. High levels of genetic divergence were observed among families. Based on the Analysis of Molecular Variance (AMOVA), it was shown that 16.2% of genetic diversity is found among progenies and 83.8% within progenies, which suggests deviances of random matings. The grouping of progenies, based on genetic distances, suggests that progenies deriving from trees which are close to each other tend to be more similar. This, in turn, indicates that the population originating the seeds may be genetically structured.

KEYWORDS: Aroeira, Genetic variability, Genetic marker, AFLP

INTRODUÇÃO

Myracrodruon urundeuva Fr. All. (Anacardiaceae) é uma espécie dióica polinizada por insetos. Popularmente, é conhecida como aroeira, sendo encontrada em diversos biomas do Brasil, com exceção da Região Amazônica e estados mais ao sul do Brasil. Também há ocorrência de populações na Bolívia, Paraguai e Argentina, nas formações do Chaco (RIZZINI, 1971; LORENZI, 1992). A exploração de sua madeira deve-se à excelente qualidade, marcada pela dureza e imputrescibilidade em contato com o solo (SANTIN e LEITÃO FILHO, 1991). Desse modo, o seu uso ocorre na maior parte dos cercados e construções rurais instaladas pelo interior de todo o País. Também foi muito utilizada na rede de transmissão elétrica brasileira, antes do uso de postes de concreto.

Devido as suas qualidades, a procura pela madeira levou à redução do tamanho das populações naturais e, em muitos casos, dizimando-as totalmente. Novas perspectivas quanto a sua utilização vêm sendo realizadas, como a sua capacitação medicinal. Com isso, novas diretrizes quanto a sua extração podem ser desenhadas.

Estrategicamente, a sustentabilidade das florestas combina a conservação da biovariabilidade e variabilidade com interesses econômicos e fins sociais. Para a sobrevivência das populações naturais de uma espécie, pressupõe-se a manutenção do dinamismo demográfico e de sua estrutura genética, assim como das interações com outras espécies do ecossistema. Para isso, os estudos sobre a ecologia das espécies são necessários, especialmente quando tratam de aspectos de dinâmica e movimento de alelos (TORIBIO e CELESTINO, 2000). A caracterização dos níveis de variabilidade e estrutura genética e o conhecimento da dinâmica do movimento dos alelos proporcionam as bases necessárias para a execução de estratégias que tratam de maximizar o aproveitamento em programas de melhoramento e conservação genética (RAJORA, 1999).

Estudos da variabilidade genética em populações naturais de plantas em regiões tropicais demonstram que estas preservam grandes quantidades de variabilidade dentro das populações, comparando-se com as existentes em outros ambientes, e a distribuição da variabilidade genética natural é influenciada por fatores como modo de reprodução das espécies, sistema de cruzamento, tamanho efetivo da população, distribuição geográfica e fluxo gênico (PAIVA, 1998).

Na área de conservação genética, estudos vêm demonstrando que a redução das populações naturais tem levado a uma perda de genes adaptados a ambientes específicos de ocorrência das espécies arbóreas. A redução contínua no tamanho das populações as submete a perdas de variabilidade genética, por deriva genética (SEBENN e ETTORI, 2001). A deriva pode causar a depressão por endogamia e conseqüentemente, reduzir a capacidade adaptativa, fertilidade, vigor, porte e produtividade, entre outras coisas (ALLARD, 1971; RITLAND, 1996).

A variabilidade genética é a base da biodiversidade e pode ser acessada por meio de marcadores genéticos. A utilização de marcadores genéticos em estudos populacionais de espécies arbóreas tem demonstrado tratar-se de ferramenta altamente potencial. A reação de polimerase em cadeia (PCR), introduzida por Saiki *et al.* (1985), foi desenvolvida para analisar o polimorfismo genético em nível de DNA, a qual envolvia diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais. Em *M. urundeuva* os primeiros estudos com marcadores genéticos envolviam a utilização de isoenzimas (MORAES, 1992), RAPD e seqüência de cpDNA (REIS, 1999). Porém, outras técnicas moleculares vêm sendo propostas, como, por exemplo, o marcador AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) (VOS *et al.*, 1995). Essa metodologia é tecnicamente acessível, gerando um grande número de marcadores polimórficos (GAIOTTO *et al.*, 1997) devido, principalmente, à especificidade de resolução, ao poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição e à rapidez e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Entretanto, por ter a expressão genética dominante, apresenta menos informações por locos comparado aos marcadores moleculares co-dominantes.

Este trabalho teve como objetivo caracterizar, pelo uso de marcador genético AFLP, a variabilidade genética de uma população natural de *M. urundeuva*, a partir de suas progênes, para fins de conservação genética *in situ* e *ex situ*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Este trabalho avalia a variabilidade genética de um banco *ex situ* de *M. urundeuva*. O banco está localizado na Fazenda de Ensino e Pesqui-

sa da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP, no município de Selvíria - MS, e corresponde a três testes de progênes, combinando diferentes números de espécies, no delineamento de blocos casualizados. Para a implantação dos ensaios, foram coletadas sementes de polinização aberta em 30 árvores-matrizes de uma população natural de *M. urundeuva* localizada na Estação Ecológica do Instituto Florestal em Paulo de Faria – SP, que corresponde ao banco de conservação genética *in situ*. A identificação numérica dada às progênes, quando da coleta de sementes, foi atribuída em função do caminhoamento realizado durante o processo de amostragem. Portanto, números próximos correspondem a árvores próximas. Para caracterização genética, foram amostradas aleatoriamente nove plantas por progênie, sendo três de cada ensaio, totalizando 270 plantas.

Extração do DNA

A extração de DNA do tecido foliar de cada amostra foi realizada pelo método proposto por Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações. Pesou-se 0,1 g de tecido vegetal macerado em nitrogênio líquido e adicionaram-se 750 μ L de tampão de extração CTAB (Tris-HCl pH 8,0 1M; NaCl 1,4M; EDTA 0,5M pH 8,0; CTAB 2%, e β -mercaptoetanol 0,2%), sendo a amostra aquecida a 60°C, por 30 minutos, agitando ocasionalmente. A amostra foi esfriada à temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e, em seguida, foram adicionados, a cada tubo, 450 μ L de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). A amostra foi agitada por inversão durante 8 minutos e o tubo centrifugado a 2.000 g, a 20°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo. Adicionou-se um volume de 2/3 (aproximadamente 400 μ L) de isopropanol gelado e misturaram-se, cuidadosamente, para precipitar, os ácidos nucleicos. Recuperou-se o DNA após centrifugação da solução a 10.000 g, por 10 minutos, a 0°C. Em seguida, o *pellet* foi lavado com 1.300 μ L de tampão de lavagem (76% etanol v/v, Acetato de amônio 10 mM), por 20 minutos. Centrifugou-se o DNA a 12.000 g, por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante, cuidadosamente, e o *pellet* foi seco ao ar em temperatura ambiente e, em seguida, foi ressuscitado em 100 μ L de TE [Tris HCl 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM]. Adicionou-se RNase a uma concentração de 10 μ g/mL e incubou-se por 30 minutos, a 37°C. A amostra foi diluída em 2 volumes de água destilada, adi-

cionando-se 1 volume de Acetato de amônio 7,5 M (pH 7,7) para uma concentração final de 2,5 M e 2,5 volumes de etanol gelado. Misturou-se cuidadosamente o DNA precipitado. A amostra foi deixada a -20° C, por 1 hora. Centrifugou-se o DNA a 12.000 g, por 10 minutos, a 4°C. A amostra foi seca e ressuscitada em 20 μ L de TE. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro pela leitura de absorbância a 260 nm.

AFLP

O DNA foi submetido à digestão em uma reação contendo 500 ng de DNA; 2,5 U de MseI; 3 U de EcoRI, e 1,25 μ L de tampão React1 (Invitrogen). A reação foi incubada a 37°C, por 24 horas. Para a inativação das enzimas de restrição, a amostra foi incubada a 70°C, por 15 minutos. Ao DNA digerido, promoveu-se a ligação de adaptadores. Para tanto, a reação de ligação constituiu-se de: 3,67 μ L da reação de digestão; 1,5 U da enzima T4 DNA Ligase (5x); 1,0 μ L de tampão T4 Ligase (1 U/ μ L), e 0,66 μ L de cada adaptador. A reação foi incubada a 200°C, por 2 horas. Após esta reação de ligação, adicionaram-se 45 μ L de TE. Os fragmentos ligados aos adaptadores foram amplificados pela reação constituída por 4 μ L de DNA ligado; 1 μ L de iniciador AFLP EcoRI/MseI, e 15 μ L de Core Mix (Taq DNA polimerase; MgCl₂; tampão PCR; dNTP – PE Applied Biosystems – Foster City-CA) AFLP. O programa de amplificação foi de 72°C, por 2 minutos, seguido de 20 ciclos de 94°C, por 20 segundos, 56°C, por 30 segundos e 72°C, por 2 minutos. Após a amplificação pré-seletiva, foram aplicados 10 μ L da amostra em um gel de agarose (1%), e corado com Brometo de etídio (0,5 μ g/mL) para averiguar se ocorreu a amplificação. O restante do produto da amplificação pré-seletiva (10 μ L) foi diluído em 90 μ L TE_{0,1}. Em seguida, montou-se a reação de amplificação seletiva com 3,0 μ L do produto de reação de amplificação pré-seletiva, 1,0 μ L do iniciador MseI/EcoRI (Iniciadores CAC/ACA; CAS/ACT e CAT/AAC), sendo o iniciador EcoRI Marcado por fluorescência, e 15,0 μ L do AFLP Core Mix. Foi realizada uma reação de PCR com os seguintes passos: 1º) um ciclo de 94°C, por 2 minutos; 2º) um ciclo de 94°C, por 1 minuto, 66°C, por 1 minuto e 72°C, por 2 minutos; 3º) um ciclo de 94°C, por 20 segundos, 65°C, por 30 segundos e 72°C, por 2 minutos, sendo que até o décimo passo foram marcados pela diminuição em 1°C do ciclo intermediário da fase anterior até chegar à temperatura de 58°C, e o restante mantendo-se

igual; 11°) 20 ciclos de 94°C, por 30 segundos, 57°C, por 30 segundos, e 72°C, por 2 minutos. Finalizando o décimo segundo passo com um ciclo de 60°C, por 30 minutos. Em cada tubo, foram adicionados 1,5 µL de "Loading buffer" (tampão de carregamento) contendo 1,25 µL de Formamida deionizada, 0,625 µL de "Loading Solution" e 0,125 µL de "Rox Size Standard", e 0,5 µL do DNA da amplificação Seletiva, totalizando 2,0 µL. Aqueceram-se os tubos a 95°C, por 5 min, colocando-os rapidamente em gelo. Aplicou-se 1,0 µL de cada amostra em um gel 5% desnaturante Long Ranger, sendo utilizado TBE 1X (Tris – 0,089M, Ácido Bórico – 0,089M, EDTA – 0,002M) como tampão de corrida, no equipamento ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer (PE - Applied Biosystems), por 3 horas de corrida, a 2500V.

Variabilidade genética intrapopulacional por marcadores AFLP

A variabilidade genética intrapopulacional foi caracterizada pela análise de variância molecular e pela distância genética de Nei (1978). As distâncias genéticas foram utilizadas para a construção de um dendrograma baseado no método de agrupamento UPGMA. A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de progêneses foi analisada a partir da matriz completa obtida pela análise AFLP. A análise da Variância Molecular (AMOVA) foi calculada utilizando-se do programa ARLEQUIN (SCHNEIDER *et al.*, 2000). A distância genética de Nei (1978), o agrupamento pelo método UPGMA e o dendrograma foram obtidos pelo programa TFPGA (MILLER, 1997).

RESULTADOS

Os três pares de iniciadores, utilizados na análise AFLP (Tabela 1) para a população de *M. urundeuva*, revelaram o total de 137 bandas polimórficas. Os fragmentos resultantes com o emprego dos iniciadores seletivos tiveram um tamanho variável entre 50 a 400 bases, e o número de bandas polimórficas de cada combinação de iniciador foi de: 53 para E-ACA/M-CAC; 34 para E-ACT/M-CAG, e 50 para E-AAC/M-CAT.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Tabela 2) foi utilizada para quantificar a variabilidade genética entre e dentro das progêneses de *M. urundeuva*. Os resultados demonstraram que 16,2% da variabilidade genética se encontram entre progêneses e 83,8% dentro de progêneses. A variabilidade genética observada nesta população,

obtida pelo marcador molecular AFLP, é comparável à coancestria média entre plantas, dentro de progêneses ($\hat{\theta}_p$). Em progêneses de meios-irmãos de populações sem parentesco e endogamia, é esperado que $\hat{\theta}_F$ seja de 0,125 e em progêneses de irmãos-completos de 0,250. Em progêneses de polinização aberta de espécies dióicas como *M. urundeuva*, podem ocorrer mistura de cruzamentos biparentais e aleatórios, fazendo com que $\hat{\theta}_F$ se encontre entre o intervalo de 0,125 e 0,250, quando é assumido que, na população de referência, não existe endogamia e parentesco.

Tabela 1. Iniciadores AFLP selecionados para a análise molecular de *M. urundeuva*. (AFLP starter selected for *M. urundeuva* molecular analysis)

Eco RI	Combinações de Iniciadores			
	ACA	ACT	AAC	Total
Mse I	CAC	CAG	CAT	
Nº de locos polimórficos	53	34	50	137

Tabela 2. Análise de Variância Molecular (AMOVA) entre progêneses de *M. urundeuva*. (Molecular variance analyse (AMOVA) among *M. urundeuva* families)

FV	GL	QM	CV	Correlação Intraclasse
Entre progêneses	29	871,185	2,12	0,162
Dentro progêneses	240	2633,556	10,97	0,838
Total	269	3504,741	13,09	

CV: Coeficiente de Variação

Para verificar se a variabilidade genética retida nos ensaios era similar, calculou-se a distância genética de Nei (1978) entre os ensaios, assumindo estes como amostras independentes (Tabela 3). As distâncias genéticas foram baixas, embora significativas entre os ensaios, indicando que os níveis de variabilidade genética retidos são similares entre os ensaios. A distância genética de Nei (1978) entre progêneses é apresentada na Figura 1.

Tabela 3. Estimativa de distâncias genéticas de Nei (1978) entre os três testes de progêneses. (Estimative of Nei (1978) genetic distance between three progeny tests)

Teste Progênie	EXP1	EXP2	EXP3
EXP1	-	0,0011	0,0020
EXP2	-	-	0,0026

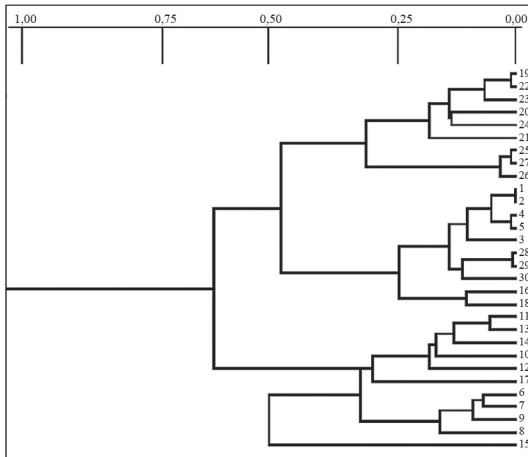


Figura 1. Dendrograma mostrando a distância genética entre 30 progênieis de *M. urundeuva*. (Dendrogram showing genetic distances among 30 *M. urundeuva* families)

O dendrograma das distâncias genéticas de Nei (1978) ilustra a alta variabilidade existente entre progênieis (Figura 1). O dendrograma demonstra três grandes grupos. O primeiro grupo é constituído pelas progênieis 19 a 27; o segundo grupo pelas progênieis de 1 a 5, 16 e 18, e 28 a 30, e o terceiro grupo composto pelas progênieis 6 a 15 e 17.

DISCUSSÃO

O número de bandas polimórficas amplificadas, por par de iniciador, em *M. urundeuva* foi superior ao observado em alguns trabalhos reportados em pesquisas envolvendo espécies arbóreas e utilizando-se de marcador AFLP, como ao encontrado em *Azadirachta indica* (SINGH *et al.*, 2002), *Pinus pinaster* (MARIETTE *et al.*, 2001), *Hevea* spp. (LESPINASSE *et al.*, 2000) e *Moringa oleifera* (MULUVI *et al.*, 1999). Em contrapartida, os trabalhos de Cardoso *et al.* (2000), com *Euterpe edulis*, e Cardoso *et al.* (1998), com *Caesalpinia echinata*, apresentam maior porcentagem de bandas polimórficas, demonstrando haver alta variabilidade genética dentro das populações estudadas.

Isto sugere a ocorrência de níveis de variabilidade genética intermediários para a população de *M. urundeuva*, porém acima da média, pois o polimorfismo encontrado entre as progênieis nesta espécie, por esse marcador molecular, é consideravelmente alto. Estudos intrapopulacionais

poderão proporcionar melhores expectativas para a espécie, em relação a este tipo de marcador molecular, sendo que qualquer diferenciação encontrada nos níveis de polimorfismo pode ser esperada. Somente um trabalho comparativo entre populações e a condição de aumento significativo no número de bandas polimórficas poderão determinar qual a probabilidade de variabilidade genética esperada para esta espécie. No momento, estima-se que os níveis de variabilidade genética se encontram superiores a algumas espécies, observando-se estudos relacionados. Usando caracteres quantitativos, Oliveira *et al.* (2000) obtiveram sucessos satisfatórios com a seleção entre e dentro de progênieis desta população.

A divergência genética (0,162) obtida pela Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi superior à esperada em progênieis de meios-irmãos (0,125), sugerindo que as progênieis não são constituídas somente por meios-irmãos, mas, sim, por misturas de meios-irmãos e irmãos completos. A causa pode ser atribuída a cruzamentos biparentais e cruzamentos entre parentes, visto que a espécie é dióica e não pode se autofecundar. Em concordância, Moraes *et al.* (2004), avaliando o sistema de reprodução de duas populações naturais de *M. urundeuva*, em termos de cruzamentos correlacionados e utilizando locos isoenzimáticos, detectaram correlação de paternidade de $0,371 \pm 0,062$ e coeficiente de coancestria de 0,171 na mesma população aqui em estudo (Paulo de Farias). Os resultados de Moraes *et al.* (2004), juntamente com os aqui obtidos, reforçam a hipótese de que as progênieis não são formadas exclusivamente por meios-irmãos, mas, sim, por misturas de meios-irmãos e irmãos completos.

Apesar de apenas uma população ter sido estudada, diversos trabalhos confirmam os resultados obtidos nesta pesquisa. Assim, quando se comparam estudos de variabilidade genética, verifica-se haver maior variação genética dentro de populações, como em *Abies alba*, com 74,76% (SAGNARD *et al.*, 2002), e *Tabebuia cassinoides*, com 96,9% (SEBBENN *et al.*, 2000), utilizando-se de marcador isoenzimático; *Elaeis oleifera*, com 81,19% (MORETZSOHN *et al.*, 2002), utilizando-se de marcador RAPD, e *Eugenia uniflora*, com 88% (MARGIS *et al.*, 2002), e *Euterpe edulis*, com 57,4% (CARDOSO *et al.*, 2000), utilizando-se de marcador AFLP.

O estudo da variabilidade genética da população de *M. urundeuva* sinaliza para a conservação

da área onde está localizada a população *in situ*, pois a ação antrópica ainda não afetou drasticamente seu estado geral. Assim, é possível realizar-se amostragens quando necessário, buscando genes de interesse, para trabalhos de seleção. Além disso, a manutenção dos testes de progênies *ex situ* e suas avaliações, no decorrer dos anos, poderão confirmar a qualidade e o potencial genético disponível na área de ocorrência da população natural. Esta população e suas progênies podem ser importantes quanto à herdabilidade de caracteres de interesse. Ao abdicar-se disso, corre-se o risco iminente da ação antrópica, promovendo a aceleração na perda de determinados genes constituintes desta população.

O resultado observado no dendrograma sugere a existência de estruturação genética espacial na população, visto que progênies procedentes de árvores próximas tendem a apresentar menor distância entre si do que de árvores distantes. Números próximos correspondem a árvores próximas. Em termos de melhoramento, isto implica que a seleção deveria procurar manter progênies originadas de distantes grupos, dado que estes serão teoricamente mais divergentes. Em contrapartida, a seleção deve priorizar progênies mais divergentes a fim de procurar explorar a heterose, ou vigor de híbrido. Tendo em vista que o dendrograma foi construído com base em marcas genéticas de herança dominante e supostamente neutra, não é possível garantir que os cruzamentos de indivíduos, localizados em grupos divergentes, expressarão heterose. Contudo, o elevado número de marcas utilizado (137 bandas polimórficas) e o fato de o marcador AFLP ser distribuído aleatoriamente no genoma, podem servir como indicativo de progênies divergentes.

CONCLUSÕES

- A maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro de progênies;
- A divergência genética entre as progênies é maior do que a esperada em progênies de meios-irmãos;
- A distribuição espacial das árvores matrizes de *M. urundeuva* na população Paulo de Faria, aparentemente não é aleatória e existe a possibilidade de árvores próximas serem parentes entre si;
- O material genético avaliado tem potencial tanto para a seleção como para a conservação genética.

AUTORES E AGRADECIMENTOS

Miguel Luiz Menezes Freitas é Pesquisador do Instituto Florestal do Estado de São Paulo - Caixa Postal 1322 - São Paulo, SP - 01059-970 - E-mail: mfreitas@fcav.unesp.br

Ana Paula de Andrade Aukar é Pesquisadora do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP - Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelani, s/n - Jaboticabal, SP - 14884-900 - E-mail: aukar@fcav.unesp.br

Alexandre Magno Sebbenn é Pesquisador do Instituto Florestal do Estado de São Paulo - Caixa Postal 1322 - São Paulo, SP - 01059-970 - E-mail: alexandresebbenn@yahoo.com.br

Mario Luiz Teixeira de Moraes é Professor Livre-Docente do Departamento de Fitotecnia da FEIS/UNESP - Av. Brasil Centro, 56 - Ilha Solteira, SP - 14870-000 - E-mail: Teixeira@agr.feis.br

Eliana Gertrudes Macedo Lemos é Professora Titular do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP - Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castelani, s/n - Jaboticabal, SP - 14884-900 - E-mail: egerle@fcav.unesp.br

Os autores agradecem à FAPESP, pelo apoio financeiro; aos técnicos: Alexandre Marques da Silva, Ailton dos Reis e Manoel Fernando da Rocha Bonfim, pelo apoio na coleta de material para as análises laboratoriais. Os autores também agradecem a dois revisores anônimos pelas correções e sugestões realizadas no prévio manuscrito.

REFERÊNCIAS

- ALLARD, R.W. (Ed). **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381 p.
- CARDOSO, S.R.S.; ELOY, N.B.; PROVAN, J.; CARDOSO, M.A.; FERREIRA, P.C.G. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v.9, p.1753-1760, 2000.
- CARDOSO, M.A.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P.C.G.; OLIVEIRA, D.E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae - Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p.601-608, 1998.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-5, 1987.

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Documento EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, n.20, p.1-220, 1998.
- GAIOTTO, F.A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding populations of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF *EUCALYPTUS*, 1997, Salvador. **Anais...** Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 1997. v.2, p.53-57.
- LESPINASSE, D.; RODIER-GOUD, M.; GRIVET, L. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. **Theoretical Applied Genetic**, Berlin, v.100, p.127-138, 2000.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. p.149, 289, 340.
- MARGIS, R.; FELIX, D.; CALDAS, J.F.; SALGUEIRO, F.; ARAUJO, D.S.D.; BREYNE, P.; VAN MONTAGU, M.; OLIVEIRA, D.; MARGIS-PINHEIRO, M. Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v.11, p.149-163, 2002.
- MARIETTE, S.; CHAGNÉ, D.; LÉZIER, C.; PASTUSZKA, P.; RAFFIN, A.; PLOMION, C.; KREMER, A. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* population: comparison between AFLP and microsatellite markers. **Heredity**, London, v.86, p.469-479, 2001.
- MILLER, M.P. **TFGA: analytical software page**. 1997. Disponível em: <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/tfpga.htm>. Acesso em: 14 jul. 2002.
- MORAES, M.L.T. **Variabilidade genética por isoenzimas e caracteres quantitativos em duas populações naturais de aroeira *Myracrodruon urundeuva* F.F. & M.F. Allemão - Anacardiaceae (Syn: *Astronium urundeuva* (Fr. Allemão) Engler)**. 1992. 139 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.
- MORAES, M.L.T.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. Correlated mating system in dioicous tropical tree, *Myracrodruon urundeuva* FR. AL. **Forest Genetics**, Zvolen, v.11, p.53-59, 2004.
- MORETZSOHN, M.C.; FERREIRA, M.A.; AMARAL, Z.P.S.; COELHO, P.J.A.; GRATTAPAGLIA, D.; FERREIRA, M.E. Genetic diversity of Brazilian oil palm (*Elaeis oleifera* H.B.K.) germplasm collected in the Amazon Forest. **Euphytica**, Dordrecht, v.124, p.35-45, 2002.
- MULUVI, G.M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. **Molecular Ecology**, Oxford, v.8, p.463-70, 1999.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Bethesda, v.89, p.583-590, 1978.
- OLIVEIRA, S.A.; MORAES, M.L.T.; KURAMOTO, C.M.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; KAGEYAMA, P.Y. Variação genética em progênes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) sob diferentes condições de cultivo. I – Aspectos silviculturais. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.12, n.2, p.155-166, 2000.
- PAIVA, J.R. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia: estratégias e novas abordagens**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1998. 135 p.
- RAJORA, O.P. Molecular biology in sustainable forest management. In: ESPINEL, S., RITTER, E. (Ed.). **Proceedings of application of biotechnology to forest genetics: BIOFOR 99**. Madrid: Vitoria-Gasteiz, 1999. p.29-39
- REIS, A.M.M. **Distribuição da variabilidade genética em aroeira (*Myracrodruon urundeuva* - Anacardiaceae) por marcadores RAPD e polimorfismo de seqüência de dpDNA**. 1999. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.
- RITLAND, K. Inferring the genetic basis of inbreeding depression in plants. **Genome**, Ottawa, v.39, p.1-8, 1996.
- RIZZINI, C.T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 294 p.
- SAGNARD, F.; BARBEROT, C.; FADY, B. Structure of genetic diversity in *Abies alba* Mill. from southwestern Alps: multivariate analysis of adaptive and non-adaptive traits for conservation in France. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v.157, p.175-189, 2002.
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIN, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SANTIN, D.A.; LEITÃO FILHO, H.F. Restabelecimento e revisão taxonômica do gênero *Myracrodruon* Freire Allemão (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.14, p.133-145, 1991.

SEBBENN, A.M.; ETTORI, L.C. Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênes misto. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.13, n.22, p.201-211, 2001.

SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; ZANATTO, C.E. Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.58, p.25-40, 2000.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **AR-LEQUIN ver 2000: a software for population genetics data analysis**. 2000. Disponível em: <<http://anthro.unige.ch/arlequin>>. Acesso em: 10 maio 2002.

SINGH, A.; CHAUDHURY, A.; SRIVASTAVA, P.S.; LAKSHMIKUMARAN, M. Comparison of AFLP and SAMPL markers for assessment of intra-population genetic variation in *Azadirachta indica* A. Juss. **Plant Science**, Amsterdam, v.162, p.17-25, 2002.

TORIBIO, M.; CELESTINO, C. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. **Investigación Agraria**, Madrid, v.2, p.249-60, 2000.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Resources**, Oxford, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.