

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO ANTONIO PEREIRA FOWLER

DIVERSIDADE GENÉTICA POR MARCADOR RAPD EM POPULAÇÕES  
NATURAIS DE *Piptocarpha angustifolia* Dusén ex Malme

CURITIBA  
2008

JOÃO ANTONIO PEREIRA FOWLER

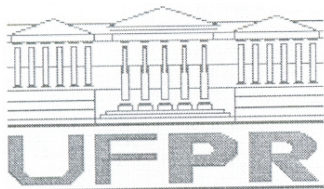
DIVERSIDADE GENÉTICA POR MARCADOR RAPD EM POPULAÇÕES  
NATURAIS DE *Piptocarpha angustifolia* Dusén ex Malme

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciência Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katia Christina Zuffellato  
Ribas

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Chirlei Glienke

CURITIBA  
2008




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
PRODUÇÃO VEGETAL

## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a argüição da Tese de DOUTORADO, apresentada pelo candidato **JOÃO ANTONIO PEREIRA FOWLER**, sob o título "**DIVERSIDADE GENÉTICA POR MARCADOR RAPD EM POPULAÇÕES NATURAIS DE *Piptocarpha angustifolia* Dusén ex Malme**", para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

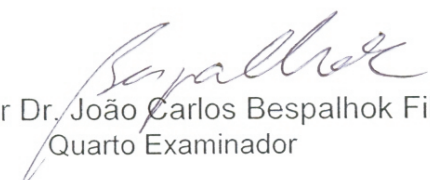
Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Tese.

Curitiba, 19 de Março de 2008.

  
Dr. Hugo Bruno Correa Molinari  
Primeiro Examinador

  
Professora Dra. Claudine Maria de Bona  
Segunda Examinadora

  
Professora Dra. Chirlei Glienke  
Terceira Examinadora

  
Professor Dr. João Carlos Bepalhok Filho  
Quarto Examinador

  
Professora Dra. Katia Christina Zuffellato Ribas  
Presidente da Banca e Orientadora

Aos meus filhos Paula, João Guilherme e a querida Ilka

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que colaboraram na execução deste trabalho, em especial:

À Embrapa pela oportunidade que proporcionou.

À chefia da Embrapa Florestas, em especial ao grande amigo Doutor Moacir José Sales Medrado pelo apoio incondicional e indispensável.

À grande mestre e amiga Professora Doutora Chirlei Glienke pelos inúmeros ensinamentos e apoio indispensável.

À Professora Doutora Katia Christina Zuffelatto-Ribas pela orientação e ensinamentos.

À Professora Doutora Roseli Wassem pelos ensinamentos e apoio.

Aos Professores Doutores Maria Luiza Petzl-Erler, Maria da Graça Bicalho, Enilze Maria Fonseca Ribeiro, Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza e João Carlos Marques Magalhães, do Curso de Pós-Graduação em Genética da UFPR, pelos ensinamentos.

Ao amigo Doutor Antonio Aparecido Carpanezi, pelos conselhos, apoio e confiança.

Aos Professores Doutores Raquel Rejane Bonato Negrelle, Flávio Zanette, Luiz Doni Filho, Francine Lorena Cuquel, Cícero Dechamps, João Carlos Bernaldo Filho, Maristela Panobianco e Henrique Soares Koehler do Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Produção Vegetal pelos ensinamentos, bem como à funcionária Lucimara Antunes pelo apoio.

Aos colegas doutorandos em genética Maria Cristina Cortinhas, Rafael Gustavo Vargas e Rafael Noleto pelo companheirismo, colaboração e amizade.

Aos colegas Embrapianos Eleusis Borba Antunes, Rosana Marques, Solange Cristina Bergamo, Namie Takii, Maria Ângela Lopes de Almeida Amazonas, Paulino Graff, Amílcar Carvalho e Silva, Youssef Antonio Mazlum, Rodrigo Cintra, Fabricio Hansel, Edinelson José Maciel Neves e Erich Gomes Shaitza pelo apoio.

Ao amigo Felipe Macedo Peixoto de Lima e ao acadêmico de agronomia Felipe Poli Nogoceke pelo apoio.

Nenhum problema pode ser resolvido pelo mesmo estado de consciência que o gerou.  
É preciso ir bem mais longe do que isso.

Albert Einstein

## RESUMO

Os projetos com espécies nativas dependem da disponibilidade de sementes e mudas nas quantidades requeridas e com a qualidade apropriada. O mercado contudo, não oferece sementes de inúmeras espécies, e para muitas inexistem estudos visando conhecer a estrutura genética das populações naturais, informação indispensável para formação de lotes de sementes com qualidade genética, entre as quais o vassourão-branco (*Piptocarpha angustifolia* Dúsen ex Malme). O vassourão-branco é comum nas clareiras, capoeirões e no estrato secundário da floresta com Araucária. Além das aptidões madeireiras e para recuperação ambiental, apresenta potencial para compor sistemas silvipastoris. Os objetivos deste trabalho foram: adaptar protocolo para a extração de DNA genômico; quantificar a variabilidade genética intra e inter populacional e estabelecer critérios para a seleção das árvores-matrizes, com base na genotipagem, para coleta de sementes em populações naturais de vassourão-branco. As árvores amostradas de vassourão-branco, das quais foram coletadas folhas para extração do DNA genômico, estão localizadas em fragmentos florestais em Curitiba e São José dos Pinhais (PR) e Rio Negrinho (SC). Para extração do DNA genômico foram utilizadas duas folhas com tecido jovem, pesando aproximadamente dois gramas, que foram maceradas em almofariz após adição de nitrogênio líquido. A extração do DNA genômico das folhas do vassourão-branco, foi eficiente com qualidade e nas quantidades requeridas para execução da metodologia da PCR-RAPD. As dissimilaridades genéticas entre as populações de Rio Negrinho (SC) e Curitiba (PR) e entre São José dos Pinhais (PR) e Rio Negrinho (SC) foi moderada, contudo entre Curitiba e São José dos Pinhais (PR) foi grande. A correlação entre a distância geográfica e dissimilaridade genética entre as populações foi baixa. A maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das populações que apresentam-se estruturadas. A seleção dos indivíduos para coleta de sementes deve pressupor a obtenção da maior dissimilaridade possível, objetivando maior variabilidade genética no lote de sementes. As árvores mais dissimilares geneticamente dos agrupamentos devem ser consideradas, pela contribuição para obtenção da maior variabilidade genética do lote de sementes.

Palavras- chave: Variabilidade genética, espécie nativa, sementes.

## ABSTRACT

Projects of forestation and reforestation with native species depend on the availability of seeds and seedlings in large quantities and of good quality. But in most cases there are no seeds readily available or studies that show the population genetic structure, among them *Piptocarpha angustifolia* what would greatly improve seed collection as genetic quality of a seed lots. The objectives of this work were adapting a protocol for the extraction of genomic DNA, quantify the genetic variability intra and inter population and establish criteria based on genotypes detected by RAPD markers to collection of seeds. The *Piptocarpha angustifolia* is a species from secondary Araucaria forests, with high potential of use in environmental restauration programs, wood production and agroforestry systems. The trees sampled from vassourão-branco, of which were collected leaves for extraction of DNA, are located in forest fragments in Curitiba and São José dos Pinhais (PR) and Rio Negrinho (SC). For extraction of DNA were used two leaves weighing about two grams, which were macerated in mortar after addition of liquid nitrogen. The extraction of genomic DNA from the leaves of *Piptocarpha angustifolia* was efficient with quantity and quality for implementation of RAPD-PCR methodology. The genetic dissimilarity between the populations of Rio Negrinho (SC) and Curitiba (PR) and between São José dos Pinhais (PR) and Rio Negrinho (SC) was moderate. The genetic dissimilarity between Curitiba and São José dos Pinhais (PR) was high. The correlation between the geographical distance and genetic dissimilarity between populations was low. The most genetic variability was found within populations of *Piptocarpha angustifolia*. The populations are structured. The selection of the trees-plus must assume the achievement of greater dissimilarity, targeting high genetic variability on seed lot. The more genetic dissimilar trees-plus of relative groups should be considered because it is important to obtain seeds with greater genetic variability in seed lot.

Key-words: Genetic variability, native specie, seeds.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - FOTOGRAFIA DE ÁRVORE ADULTA DE VASSOURÃO-BRANCO EM FRAGMENTOS FLORESTAL NATIVO EM CURITIBA (PR).....	16
FIGURA 2 - FOTOGRAFIA DE SATÉLITE DO PARQUE BARIGÜI EM CURITIBA (PR) ONDE ESTÃO LOCALIZADAS AS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO.....	40
FIGURA 3 - FOTOGRAFIA DE SATÉLITE DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS (PR) ONDE ESTÃO LOCALIZADAS AS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO.....	40
FIGURA 4 - FOTOGRAFIA DE SATÉLITE DA REGIÃO DE RIO NEGRINHO (SC) ONDE ESTÃO LOCALIZADAS AS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO.....	41
FIGURA 5 - CORRELAÇÃO ENTRE DISTÂNCIAS GEOGRÁFICAS E DISSIMILARIDADES GENÉTICAS ENTRE AS TRÊS POPULAÇÕES DE VASSOURÃO-BRANCO.....	52
FIGURA 6 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO BASEADA NA DISSIMILARIDADE GENÉTICA NAS TRÊS POPULAÇÕES.....	53
FIGURA 7 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADES GENÉTICAS ENTRE AS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO EM RIO NEGRINHO (SC).....	56
FIGURA 8 - DISTRIBUIÇÃO TRIDIMENCIONAL DAS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO BASEADA NAS SIMILARIDADES GENÉTICAS EM RIO NEGRINHO (SC).....	57
FIGURA 9 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADES GENÉTICAS ENTRE AS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO EM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, (PR).....	58

FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO TRIDIMENCIONAL DAS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO BASEADA NAS SIMILARIDADES GENÉTICAS EM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS (PR).....	59
FIGURA 11 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADES GENÉTICAS ENTRE AS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO EM CURITIBA (PR).....	61
FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO TRIDIMENCIONAL DE VASSOURÃO-BRANCO BASEADA NAS SIMILARIDADES GENÉTICAS EM CURITIBA (PR).....	61

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MUNICÍPIOS E LOCAIS DE COLETA DAS FOLHAS DE VASSOURÃO-BRANCO PARA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO .....	39
TABELA 2 - <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO DO VASSOURÃO-BRANCO.....	48
TABELA 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR DAS TRÊS POPULAÇÕES DE VASSOURÃO-BRANCO.....	50
TABELA 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE VASSOURÃO-BRANCO DE CURITIBA (PR) E RIO NEGRINHO (SC).....	50
TABELA 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE VASSOURÃO-BRANCO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS (PR) E RIO NEGRINHO (SC).....	51
TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE VASSOURÃO-BRANCO DE CURITIBA (PR) E SÃO JOSÉ DOS PINHAIS (PR).....	51
TABELA 7 - MATRIZ DE DISSIMILARIDADE GENÉTICA POR <i>BOOTSTRAP</i> ENTRE AS TRÊS POPULAÇÕES DE VASSOURÃO-BRANCO.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP: Arbitrarily Primer - Primer de seqüência arbitrária

AMOVA: Análise molecular de variância

DNA: deoxyribonucleic acid - Ácido desoxirribonucleico

PCR: Polimerase Chain Reaction-Reação em cadeia da polimerase

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA - Amplificação ao acaso dos polimorfismos do DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo no comprimento de Fragmentos de restrição

UPGMA: Unweighted Pairgroup Method Using Arithmetic Averages - Método de agrupamento pareado não ponderada utilizando médias aritméticas

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

QTLs: Locus que controlam caracteres quantitativos

PVP: Polivinilpirrolidona

SDS: Sodium dodecyl sulfate salt - Sal Dodecil sulfato de sódio

G: gravidade

EDTA: Ethylene Diamine tetraacetic acid - Ácido Diamino Etano Tetracético

TBE : Tris Borate EDTA

P/v : Peso por volume

CTAB : Cetyl trimethyl ammonium bromide - Brometo de amônio hexadecil trimetil catiônico

eRAPD: Software para seleção de *primers* para RAPD

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 ESPÉCIE.....	16
2.2 A IMPORTÂNCIA DA VARIABILIDADE GENÉTICA DAS SEMENTES.....	19
2.2.1 Espécies e procedências.....	21
2.3 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS.....	22
2.4 FLUXO GÊNICO EM POPULAÇÕES VEGETAIS NATURAIS.....	23
2.4.1 Modelos de fluxo gênico.....	24
2.4.2 Mensuração do fluxo gênico.....	25
2.5 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS GENÓTIPOS.....	25
2.6 VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES VEGETAIS NATURAIS.....	27
2.6.1 Depressão por endogamia .....	30
2.6.2 Análise da variabilidade genética por marcadores moleculares.....	32
2.7 MARCADORES RAPD.....	34
2.8 ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA.....	37
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
3.1 ORIGEM DO MATERIAL VEGETAL.....	39
3.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	39
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	41
3.4 QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO.....	42
3.5 CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO.....	43
3.6 SELEÇÃO DE <i>PRIMERS</i> .....	43
3.7 ANÁLISE DOS DADOS.....	43
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	45
4.1 PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	45
4.2 SELEÇÃO DE <i>PRIMERS</i> .....	47
4.3 VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES.....	49
4.4 VARIABILIDADE DOS GENÓTIPOS NAS POPULAÇÕES.....	55
4.5 COLETA DE SEMENTES EM POPULAÇÕES NATURAIS DE VASSOURÃO-BRANCO.....	63
4.5.1 Seleção de árvores-matrizes.....	63
4.5.2 Relação genética entre frutos nas árvores-matrizes.....	67
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	68
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	69
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

Os projetos de florestamento ou reflorestamento com espécies nativas dependem da disponibilidade de sementes e mudas nas quantidades requeridas e com a variabilidade genética apropriada. O mercado não oferece sementes de inúmeras espécies nativas e para muitas inexistem estudos visando conhecer a estrutura genética das populações, informação indispensável para formação do lote de sementes com variabilidade genética. A qualidade de um lote de sementes de espécie nativa para qualquer propósito de uso é caracterizada pela amplitude de sua variabilidade genética, pois sua capacidade evolutiva será diretamente proporcional à sua base genética.

A procedência também é importante, pois os materiais para plantio devem ser originários da mesma condição ecológica onde foram coletados, uma vez que plantas oriundas de condições diferentes apresentarão problemas de crescimento, desenvolvimento e sincronia floral. A coleta de sementes de uma população natural requer uma amostragem representativa de sua variabilidade genética para evitar a endogamia e garantir a evolução da espécie nas futuras gerações (SEBBENN, 2002).

A importância de lotes de sementes de espécies florestais nativas em quantidades compatíveis com a demanda, com ampla variabilidade genética e qualidade fisiológica é de reconhecimento geral. As sementes são os principais veículos de propagação das espécies florestais, por apresentarem composição genética resultante da mistura do material parental, por serem produzidas em grande número a cada ano, por serem muito mais resistentes ao estresse ambiental e a danos do que os propágulos vegetativos e por tolerarem armazenamento por longos períodos sob condições apropriadas (SCHMIDT, 2000).

A despeito da potencialidade de múltiplo uso, faltam lotes de sementes de vassourão-branco com variabilidade genética adequada para o estabelecimento de

programas de conservação genética, bem como para utilização em projetos de recuperação ambiental e fomento com fins comerciais.

Os estudos de quantificação da variabilidade genética intra e inter populacional, bem como a distribuição espacial dos genótipos nas populações e fragmentos florestais naturais da espécie possibilitará o planejamento das coletas de sementes com a variabilidade genética adequada, evitando a seleção de árvores-matrizes considerando-se unicamente o aspecto fenotípico, o que compromete a variabilidade genética das sementes e conseqüentemente dos plantios posteriores, pelo risco de que sejam oriundas de indivíduos aparentados.

As diferenças genótípicas entre indivíduos são conhecidas por técnicas de identificação de polimorfismos genéticos em nível do DNA. A técnica da PCR-RAPD tem a vantagem de dispensar o conhecimento prévio sobre o DNA da espécie em estudo, sendo mais simples, rápida e de custo mais baixo. A técnica utiliza oligonucleotídeos sintéticos com dez pares de base, conhecidos como *primers*, para amplificar regiões polimórficas do DNA, identificadas aleatoriamente, revelando as diferenças genéticas entre indivíduos (WILLIAMS *et al.*, 1990; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Às questões acima mencionadas, agrega-se o novo ordenamento legal, criado pela edição da Lei de Sementes e Mudanças nº 10.711 de 05 de agosto de 2003 e regulamentada pelo decreto nº 5.153 de 23 de julho de 2004, que coloca no cenário nacional um novo paradigma de produção, embasado na qualidade, em consonância com o conhecimento científico atual, especialmente quanto aos propágulos florestais nativos (BRASIL, 2004).

Os objetivos deste trabalho foram:

Adaptar protocolo para extração de DNA genômico; quantificar a variabilidade genética intra e inter populacional e estabelecer critérios para a seleção das árvores-matrizes com base na genotipagem em populações naturais de vassourão-branco.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A ESPÉCIE

A flora tropical arbórea, de modo geral, é pouco conhecida do ponto de vista silvicultural, inclusive espécies tradicionais. Em se tratando de espécies cuja potencialidade de uso ainda não é conhecida, as informações técnicas até muito recentemente se restringiam unicamente aos aspectos botânicos (SEITZ, 1976).



FIGURA 1 - ÁRVORE ADULTA DE VASSOURÃO-BRANCO EM FRAGMENTO FLORESTAL EM CURITIBA, PR.

O vassourão-branco (Figura 1) é uma espécie perenifólia, secundária inicial, que ocorre preferencialmente na Floresta Ombrófila Mista. Existem registros de ocorrência na Floresta Ombrófila Densa, especificamente na ilha de Santa Catarina e no vale do Itajaí, bem como em associação com a Floresta Estacional Semidecidual em Campo Mourão, região centro-oeste do estado do Paraná. Ocorre naturalmente desde a latitude 23°S no Paraná a 29°30'S no Rio Grande do Sul, e de 400 m a 1.200 m de altitude (CARVALHO, 2003).



A classificação taxonômica do vassourão-branco obedece a seguinte hierarquia: Divisão: Magnoliophyta (Angiospermae); Classe: Magnoliopsida (Dicotyledonae); Ordem: Asterales; Família: Asteraceae (Compositae); Gênero: *Piptocarpha*; Espécie: *angustifolia* (SEITZ, 1976).

O vassourão-branco é uma espécie característica da vegetação secundária, comum nas clareiras, nos capoeirões e na floresta secundária. É uma das melhores indicadoras de vegetação semi-devastada no planalto Sul-Brasileiro e característica da Floresta Ombrófila Mista Montana (Floresta com Araucária) onde ocorre também na mata ciliar. Alguns autores citam sua ocorrência na Floresta Ombrófila densa (Floresta Atlântica) e em associação com elementos da Floresta Estacional Semidecidual. O comportamento sociológico do vassourão-branco caracteriza-se pela presença nas clareiras das matas devastadas de *Araucaria angustifolia*, puras ou formando associações com *Mimosa scabrella*, *Ocotea puberula* e *Vernonia discolor*. Uma vez ocupado o espaço disponível, cessa o processo de regeneração da espécie em estudo e se inicia o daquelas mais tolerantes à sombra (SEITZ, 1976).

As condições climáticas da região de ocorrência apresentam precipitação pluviométrica média anual de 1.200 mm a 2.300 mm, com chuvas uniformemente distribuídas e sem estação seca definida. A temperatura média anual de 15,5°C a 21°C. A temperatura mínima absoluta pode chegar até -15°C na relva. As condições climáticas estão classificadas de acordo com Köppen, como clima temperado úmido (cfa) e em menor escala subtropical úmido (cfb). A espécie é tolerante à solos com pouca fertilidade pois se desenvolve bem em solos degradados, apresentando contudo a limitação de solos encharcados. Dentre as principais características silviculturais, pode-se destacar que é heliófila, além de regenerar-se bem naturalmente. O tronco é quase reto, fuste cilíndrico a irregular com até 15 m de comprimento, podendo atingir até 30 m de altura e 60 cm de diâmetro a altura do peito (DAP) na idade adulta (CARVALHO, 2003).

O comportamento da espécie em plantios é pouco conhecido, contudo estima-se uma produtividade de até  $30 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$  para 1.000 plantas por hectare, aos sete anos de idade, sendo recomendada para recuperação de terrenos erodidos e degradados, uma vez que o sistema radicular do vassourão-branco atinge mais de 2 m de profundidade (SEITZ, 1976).

Dentre as várias espécies arbóreas do gênero *Piptocarpha* que ocorrem no Brasil, destacam-se principalmente *Piptocarpha tomentosa*, conhecida por vassourão-do-graúdo e *Piptocarpha axillaris*, conhecida por vassourão-preto, ambas ocorrem na Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucária) no sul e no sudeste do Brasil e se diferenciam do vassourão-branco, pelo tamanho das folhas e pela cor das flores; as duas primeiras espécies apresentam folhas maiores e flores amareladas (CARVALHO, 2003).

A madeira da espécie apresenta coloração desde cinza-claro até creme, peso específico aparente de  $0,46 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ , fácil trabalhabilidade além de não apresentar rachaduras, colapso ou empenamento, com propriedades físicas e mecânicas normais em relação ao seu peso específico. A madeira é utilizada para a fabricação de compensados industriais, preferentemente como miolo devido ao seu baixo peso específico, substrato para colagem de capas finas de espécies decorativas e partes internas de móveis (LELLES, 1977).

Além das aptidões madeireiras e para recuperação ambiental, o vassourão-branco apresenta aptidão para compor sistemas silvipastoris. A região sul do Brasil possui extensas áreas de pastagens em céu aberto, carentes do componente arbóreo, no qual o vassourão-branco pode ser inserido, atuando na proteção contra os excessos climáticos sobre os animais e propiciando receita extra pela retirada da madeira do sistema (SILVA, 1998).

A espécie também pode contribuir na suplementação alimentar dos animais como forragem, pois suas folhas contém de 12 a 15% de proteína bruta e 4% de tanino (SEITZ, 1976).

## 2.2 A IMPORTÂNCIA DA VARIABILIDADE GENÉTICA DAS SEMENTES

As sementes são responsáveis pelo desempenho de uma determinada progênie por serem os veículos do potencial genético dos seus genitores. Apesar das condições ambientais e silviculturais favoráveis, em caso de potencial genético baixo, o desempenho será correspondente; contudo se o potencial genético é alto, será expresso no plantio com procedimentos apropriados (SCHMIDT, 2000).

No caso de seleção de fontes de semente e de árvores-matrizes para a coleta com variabilidade genética desconhecida, algumas medidas de precaução devem ser tomadas para evitar sementes com variabilidade genética inferior, tais como evitar sementes de indivíduos aparentados e fenotípicamente inferiores. Uma base genética estreita implica em riscos de endogamia. Em uma população quando alguns poucos indivíduos florescem, o risco de auto-polinização indesejável é grande, agravando-se quando a espécie não dispõe de mecanismo de proteção eficiente contra a endogamia. As árvores isoladas quando produzem auto-polinização devem ser rejeitadas como árvores para coletas de sementes pois suas sementes serão endogâmicas. As árvores vizinhas em florestas naturais de espécies com distâncias pequenas de polinização e dispersão são mais suscetíveis a criar grupos de indivíduos aparentados do que aquelas com polinização e dispersão a longa distância. Isso é observado em populações naturais de espécies climáticas como *Tectona grandis*, *Acacia* spp., *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. (SCHMIDT, 2000).

A distância de 100 m entre árvores-matrizes é usualmente considerada como o mínimo em florestas naturais, dependendo do propósito da coleta (PALMBERG, 1985; GRAY, 1990).

A obtenção de sementes com diversidade genética, também é assegurada pela coleta em grande número de árvores. Técnicas especiais de amostragem são aplicadas para coletas visando trabalhos de pesquisa ou conservação *ex-situ* (PALMBERG, 1985; ELDRIDGE *et al.*, 1992).

A primeira geração de progênies de uma árvore-matriz cujos cruzamentos

ocorreram com vários indivíduos distantes não apresenta endogamia, entretanto poderá ocorrer endogamia se essas progênies forem usadas como árvores-matrizes em plantios. O conhecimento da genealogia das fontes de sementes a serem colhidas é importante. As plantações que possuem estreita base genética devem ser rejeitadas como fontes de sementes. Os plantios com algumas espécies exóticas são originados de algumas árvores-matrizes de uma primeira introdução da espécie, como *Swietenia* spp. cultivada em muitas partes da Ásia, possivelmente originada de um pequeno número de árvores-matrizes em Honduras e Belize, bem como de *Cupressus*, no Kenya e *Gliricidia*, no Sri Lanka, que apresentam alto grau de depressão por endogamia (SCHMIDT, 2000).

As árvores próximas em plantios florestais para produção de sementes são menos aparentadas geneticamente do que em florestas naturais, uma vez que a distância mínima requerida para garantir que não haja cruzamento entre parentes é maior nesses plantios do que em florestas naturais. As árvores vizinhas não aparentadas, podem ser polinizadas pela mesma nuvem de pólen e as sementes destas árvores-matrizes apresentarem alta probabilidade de parentesco paternal, ao contrário de árvores distantes. Para evitar efeitos genéticos deletérios na coleta de sementes deve-se evitar coleta em locais onde existam árvores esparsas ou isoladas; dentro de um povoamento deve-se preferir um número mínimo de 15 árvores preferentemente distantes 100 metros entre elas; coletar de árvores vigorosas e de boa forma e fuste (SCHMIDT, 2000).

A utilização de lotes de sementes com ampla base genética, formados de coletas em áreas próximas aos locais de plantio podem aumentar a probabilidade de sucesso, reduzindo a mortalidade e custos. A utilização de sementes coletadas de poucas árvores pode causar aumento da endogamia, assim a estratégia consiste na coleta de sementes de um número adequado de árvores para que se evitem os efeitos nocivos decorrentes da estreita base genética de uma população (SEBBENN, 2002).

A base genética ampla possibilita que fatores evolutivos atuem sobre as plantas eliminando alguns indivíduos da população e tornando o restante adaptado (HEDRICK, 1999).

A chance de parte da população estabelecer-se depende da amplitude de sua base genética, pois a capacidade de adaptação de uma população a um novo ambiente é função das frequências dos alelos que conferem esta capacidade, e da intensidade de seleção contrária a permanência destes alelos na população (CROW e KIMURA, 1970)

O número de árvores-amostradas deve ser adequado, pois quando pequeno causará perda de alelos raros por deriva genética (NEI, 1977).

A capacidade adaptativa a condições de estresse ambiental pode depender da presença de alelos raros na população (KRUSCHE e GEBUREK, 1991).

### 2.2.1 Espécies e procedências

O conceito de espécies baseado em características morfológicas é reconhecido amplamente e as variações da espécie, sua divisão em sub-espécies e variedades. O termo ecótipo designa um habitat especial de crescimento, como zonas secas, úmidas ou de baixa ou alta altitude. Na ciência florestal, o termo procedência é o significado de lugar de origem de um material, designando o ecótipo e o ambiente de crescimento. Apesar das similaridades morfológicas, vários ecótipos ocorrem nas diferentes condições ecológicas. As variações do hábito de crescimento têm sido reveladas por ensaios de procedências, ou seja, desempenho comparativo de diferentes fontes de sementes crescendo sob condições semelhantes (SCHMIDT, 2000).

A procedência designa o local da fonte de sementes, composta por uma comunidade de árvores intercruzadas, de constituição semelhante e significativamente diferentes geneticamente de outras. A procedência deve ser suficientemente grande para que a coleta de material reprodutivo seja significativa

para projetos florestais, e ser facilmente identificada em campo, ainda que as fronteiras de fluxo gênico possam ser difíceis de definir em áreas com populações contínuas. As árvores de uma determinada procedência podem crescer em diferentes áreas e tornarem-se fontes de sementes, no caso de fontes originais, deve ser indicado nos registros da área e das sementes produzidas (BARNER, 1975).

### 2.3 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS

A estrutura populacional se refere à densidade e à distribuição dos indivíduos em cada faixa de idade. Os sistemas de cruzamento e a variação genética são partes da estrutura populacional. As populações apresentam comportamento dinâmico em decorrência dos nascimentos e mortes dos indivíduos, sendo estes processos influenciados pelas interações entre os indivíduos e seus ambientes. A distribuição de uma população é a sua abrangência geográfica, sendo determinantes, o habitat adequado, clima, topografia e tipo de solo, competidores, patógenos e barreiras. Os padrões de distribuição dos indivíduos numa população podem ser agrupados, no qual os indivíduos formam pequenos núcleos; homogênea quando estão uniformemente espaçados e ; randômica, onde estão distribuídos sem qualquer dependência de proximidade com os demais (RICKLEFS, 2003).

A estrutura genética é produto da seleção, deriva, migração e mutação que atuam biológica e temporalmente em uma população de espécies vegetais. A estrutura genética de uma população é afetada pelo sistema reprodutivo da espécie, dispersão do pólen e das sementes, dormência das sementes, ciclo de vida, estágio sucessional, amplitude geográfica, tamanho, densidade e distribuição espacial da população (MORAES, 1997).

A estrutura genética é a distribuição heterogênea e não aleatória dos genótipos no espaço e tempo como resultado das forças evolutivas mutação, migração, seleção e deriva (HAMRICK, 1982).

Analisando a diversidade genética entre populações de espécies florestais dos diferentes grupos sucessionais, percebe-se que concentra-se principalmente dentro das populações. A distribuição da diversidade genética interpopulacional foi observado em várias espécies arbóreas, especialmente nas alógamas que possuem mecanismos eficientes de dispersão de pólen e de sementes. O fluxo gênico entre populações e entre indivíduos, reduz as diferenças entre populações por deriva genética e seleção, diminuindo a diversidade interpopulacional. Nas espécies arbóreas de ciclo de vida longo e isoladas em fragmentos, o fluxo gênico reflete os acontecimentos passados quando eram unidas, sendo que após a fragmentação ocorre o aumento progressivo da diferença genética por deriva entre estas populações (KAGEYAMA *et al.*, 2003).

#### 2.4 FLUXO GÊNICO EM POPULAÇÕES VEGETAIS NATURAIS

O movimento de genes em populações é definido como fluxo gênico, incluindo todos os movimentos de gametas, propágulos e indivíduos que efetivamente trocam genes na distribuição espacial (NEIGEL, 1997).

O fluxo gênico potencial é a deposição de pólen e sementes a partir de uma população fonte em função da distância, por sua vez, o efetivo é a incidência de fertilização pelo pólen e o estabelecimento de indivíduos reprodutivos pelas sementes, em função da distância da população fonte, e o temporal devido à ocorrência de dormência das sementes de algumas espécies, gerando uma sobreposição de gerações sucessivas (LEVIN e KESTER, 1974).

Em populações naturais o fluxo gênico é importante principalmente para a homogeneização das frequências alélicas, que mesmo separadas geograficamente comportam-se como uma população panmítica. A transferência de genes em plantas pode ocorrer pelo movimento dos propágulos e do pólen. A migração é definida como o movimento e a dispersão é mais restrita aos movimentos que aumentam a distância entre os organismos ou propágulos e a fonte dispersora (NEIGEL, 1997).

O grau no qual uma população pode ser delimitada de outras depende do nível de fluxo gênico entre elas. A taxa de fluxo  $m_{ij}$  da população  $j$  para a população  $i$ , é a proporção de indivíduos que se reproduzem na população  $i$  e que migram para a população  $j$  naquela geração. Se  $m_j$  é muito alta, próxima de 0,5 as duas populações são, na realidade, uma população panmítica cujo tamanho populacional é a soma das duas. Desta forma, a taxa de fluxo gênico influencia o tamanho efetivo da população. A importância do fluxo gênico está justamente em contrapor os efeitos da deriva genética, permitindo a homogeneização das frequências alélicas. O fluxo gênico pode ser quantificado por métodos diretos: via marcadores morfológicos e análise da paternidade, e os métodos indiretos são via fluxo gênico aparente ( $F_{st}$ ), alelos privados, autocorrelação espacial e coalescência. Utilizam-se também marcadores de DNA de cloroplastos, mitocôndrias e análise de paternidade por microssátelites (FUTUYAMA, 1992).

#### 2.4.1 Modelos de fluxo gênico

O modelo preconizado atualmente embasa-se em metapopulações, sua dinâmica e dispersão em uma determinada paisagem. Esta abordagem tem como enfoque principal a conscientização de que o fluxo gênico não pode ser plenamente estimado pelos métodos convencionais baseados na estrutura genética. A estimativa da dinâmica espacial e temporal de circulação do pólen e das sementes, relativamente aos recursos existentes na paisagem podem auxiliar a previsão de como a evolução demográfica e genética das espécies se comporta frente às subdivisões das metapopulações, seja por causas naturais ou antrópicas. O modelo de metapopulação, é um conjunto de subpopulações conectadas em interação através do fluxo gênico e controladas por novas colonizações e extinções (SORK *et al.*, 1999).



#### 2.4.2 Mensuração do fluxo gênico

As medidas de fluxo gênico presente são ditas diretas, e do passado indiretas. O estudo de fluxo gênico em populações de plantas leva em conta o movimento dos genes por sementes e pólen. A dispersão por sementes não fornece informações sobre o sistema reprodutivo das espécies, ou seja as autógamas podem ter fluxo gênico menor do que as alógamas, e os movimentos dos grãos de pólen não fornecem informações que garantam o sucesso da fertilização e conseqüente viabilização das sementes (LEVIN e KESTER, 1974).

A análise da paternidade utilizando locos gênicos possibilita a padronização do movimento do pólen na população em estudo, dependendo do número de locos polimórficos, do número de alelos por locos, da freqüência alélica e do número de pais prováveis. As mensurações indiretas do fluxo gênico são baseadas em inferências. O fluxo gênico aparente ( $F_{st}$ ), toma como embasamento analítico o equilíbrio entre deriva genética e migração e baseia-se na análise da estrutura genética das populações, sendo usado para estimar o número de migrantes em cada geração ( $Nm$ ). Os valores de  $F_{st}$  obtidos para populações de espécies tropicais tem sido maior do que um, o que equivale a migração de mais do que um indivíduo por geração para outra população, contrabalançando os efeitos da deriva genética. O uso do  $F_{st}$  também possibilita a obtenção da razão do fluxo gênico pólen/sementes, pelo uso de marcadores genéticos do DNA genômico e de organelas (ENNOS, 1994).

#### 2.5 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS GENÓTIPOS

A autocorrelação espacial tem sido utilizada para detectar o padrão espacial da variabilidade genética e suas inferências sobre os processos evolutivos na diferenciação entre as populações (ENNOS, 1994). A distribuição espacial das espécies representa o primeiro passo para o entendimento das florestas tropicais e

seus componentes. A estrutura de uma população é o resultado da história de vida das espécies ou de eventos do passado os quais ainda exibem sua presença na estrutura da população atual (POORTER e BONGERS, 1993).

Os padrões espaciais dos indivíduos em uma população natural de plantas é uma das ferramentas mais utilizadas para a compreensão do funcionamento dos processos evolutivos e ecológicos (BROWN, 1978).

A caracterização da estrutura espacial é realizada utilizando-se índices de quantificação da similaridade genética entre pares de indivíduos espacialmente adjacentes, concernente à amostra da população como um todo (DEWEY e HEYWOOD, 1988; GANDARA, 1996).

As populações de algumas espécies arbóreas apresentam estruturas familiares, formando sub-populações em forma de manchas onde as frequências alélicas tendem a ser homogêneas e o parentesco interno apresenta-se acima do esperado pelas suposições de cruzamentos aleatórios, decorrente da distribuição das sementes próximas a árvore matriz. Os estudos com várias espécies florestais relatam que a maioria apresentam mancha com raio de até 100 metros, geralmente de 20 a 50 metros. O tamanho das manchas decorre da forma de dispersão das sementes (SEBBENN, 2002).

A recomendação de se observar a distância mínima de 100 metros entre árvores, ou utilizar a distância correspondente a duas vezes a altura da árvore como distância mínima, para evitar coleta de sementes entre aparentados, é preconizada por vários autores (SHIMIZU; KAGEYAMA E HIGA, 1982; ELDRIDGE *et al.*, 1992).

As recomendações supra mencionados foram aplicadas para coletas de sementes visando reflorestamentos de áreas alteradas e degradadas, ressalvando-se que podem ser verdadeiras somente para algumas espécies da floresta semidecidual. As recomendações visam reduzir a probabilidade de coleta de sementes de árvores aparentadas, mas não evitam que sementes endogâmicas sejam incluídas (SEBBENN, 2002).

## 2.6 VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES VEGETAIS NATURAIS

A variabilidade genética é a condição principal para a evolução, sendo sua amplitude e distribuição de interesse fundamental para o conhecimento do potencial para as mudanças evolucionárias e a existência da capacidade adaptativa das espécies de plantas e suas populações. A diversidade genética pode ser mensurada em vários níveis, como as diferenças entre espécies, diferenças entre populações da mesma espécie, diferenças entre partes da mesma população e diferenças entre indivíduos nas populações (SILVERTOWN e DOUST, 1993).

Os resultados dos trabalhos de pesquisa com 480 espécies de plantas forneceram indícios sobre como variáveis ecológicas e a forma de vida influenciam a diversidade genética em espécies e populações. Ao nível das espécies, a abrangência geográfica foi a variável mais importante, onde espécies endêmicas apresentaram menos da metade da diversidade genética comparadas com as demais. A forma de vida foi a segunda variável mais importante, sendo que as espécies florestais apresentam muito maior diversidade genética do que as herbáceas. O sistema reprodutivo e o modo de dispersão das sementes representam 17% cada um da variabilidade genética expressa, com tendência a que as espécies alógamas apresentem maior diversidade genética do que as autóginas, bem como as espécies cujos dispersores são animais apresentarem maior diversidade do que aquelas com outras formas de dispersão. As mesmas variáveis são importantes dentro das populações, sendo o sistema reprodutivo o mais importante, seguido da abrangência geográfica, forma de vida, classificação taxonômica e o modo de dispersão das sementes. As espécies que possuem alta diversidade genética intrapopulacional, em torno de 30%, são árvores com ciclo de vida longo, alógamas e com dispersão anemocórica de pólen, enquadrando-se nesta descrição muitas gimnospermas dicotiledôneas (HAMRICK e GODT, 1990).

Os estudos de variabilidade genética em populações de plantas são prioritários pelas informações sobre a capacidade de sobrevivência da espécie e de

suas populações, diante das constantes alterações ambientais (PRATHEPHA e BAIMAI 1999). As populações com pequena variabilidade genética estão em maior risco de extinção do que aquelas populações com maior variabilidade genética (O'BRIEN e EVERMANN, 1988).

A perda da variabilidade genética é o tópico central da conservação genética. As pequenas populações fragmentadas em áreas distintas principalmente de plantas alógamas, estão propensas à endogamia resultante da subdivisão. A endogamia pode atuar desmascarando determinados alelos deletérios recessivos, diminuindo num curto espaço de tempo o valor adaptativo da população, nas quais ocorre redução da heterozigosidade e pode resultar em perda da diversidade alélica. Os conservacionistas acrescentam que este declínio na variação genética pode inibir no futuro a adaptação do organismo às mudanças ambientais e conseqüentemente limitar seu potencial evolucionário, podendo levar essas populações a um possível risco de extinção (AVISE, 1994).

Os fatores que interferem na distribuição da variabilidade genética em uma espécie em sua área de ocorrência, são a forma de reprodução e acasalamento, migração, seleção natural, deriva genética, entre outros (HAMRICK, 1982).

Um fator importante que influencia a estruturação genética de uma espécie nativa é a fragmentação florestal com conseqüente redução populacional. Os seus principais efeitos são: perda de diversidade genética, semelhança na estrutura populacional e aumento nas taxas de endogamia. A ação antrópica sobre a variabilidade genética, seja pela fragmentação de florestas ou pela eliminação dos indivíduos de valor econômico, causa maior diferenciação genética entre populações pelo prejuízo que causa ao fluxo gênico (ROTMAN e BOYLE, 2000).

As perdas da variabilidade genética em populações florestais de até 25% não afetam a capacidade destas em manter o processo evolutivo e conseqüentemente a capacidade de adaptação às alterações ambientais (AMOS e BALMFORD, 2001).

A redução dos indivíduos de uma população causa o aumento das taxas de endogamia e maiores efeitos da deriva genética, levando a perdas de alelos importantes. A deriva genética se refere à semelhança nas frequências alélicas devido à amostragem aleatória dos gametas. Os efeitos da redução populacional na perda da variabilidade foram relatados para orquídeas (SUN e WONG, 2001).

Os resultados de quantificação da variabilidade genética podem sofrer influência da metodologia empregada, pois o uso de marcadores isoenzimáticos fornecem melhor a caracterização fenotípica das espécies, enquanto as técnicas que utilizam marcadores moleculares em nível do DNA, tais como RAPD, dão uma melhor caracterização genotípica. Apesar de ser um marcador codominante, por isso permitir a estimativa dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, as isoenzimas possuem um número limitado de locos polimórficos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Além disso, por possuírem função metabólica, estes marcadores estão sujeitos a variações ambientais e conseqüentemente às pressões seletivas. O conhecimento dos padrões de distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações naturais garante o estabelecimento de práticas conservacionistas efetivas e eficientes (FRANKEL; BROWN e BURDON, 1998).

O conhecimento da variabilidade genética nas populações é compulsório, para a aplicação de técnicas de manejo nas florestas e para o estabelecimento de ações de conservação *in situ* (KAGEYAMA e GANDARA, 1993).

Os marcadores genéticos são a principal ferramenta para descrever os padrões da variabilidade genética de uma população natural, possibilitando avaliar a variabilidade intra e interpopulações (TELLES, 2000; SEBBENN, 2002).

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações está relacionada com fatores intrínsecos à espécie, como o mecanismo de dispersão de pólen e sementes, o sistema reprodutivo e cruzamentos, além dos fatores ambientais que possam influenciar ou direcioná-la. Os parâmetros, como o número de alelos por loco, a porcentagem de locos polimórficos, a heterozigosidade

observada, heterozigosidade esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o índice de fixação, são usados na caracterização da variabilidade genética intrapopulacional (PINTO; SOUZA e CARVALHO, 2004; GUSSON, 2003).

Pelo exposto, pode-se perceber que é inegável a importância dos estudos sobre estrutura genética de populações, principalmente quantificar sua variabilidade, bem como verificar as relações entre populações de diferentes locais. Para isso, os marcadores genéticos moleculares são ferramenta indispensável.

### 2.6.1 Depressão por endogamia

Os estudos comparando progênies de autofecundação com de cruzamento de coníferas florestais e folhosas têm constatado depressão por endogamia para produção de sementes, floração, germinação, sobrevivência e crescimento, além da redução do peso da semente e do aumento da mortalidade em plantios, entre progênies e populações, bem como aumento na variação fenotípica dentro de progênies. A depressão por endogamia reduziu o crescimento em *Pseudotsuga menziesii* e *Pinus ponderosa* na ordem de 18 e 21% respectivamente, nos primeiros anos de desenvolvimento, com taxa de mortalidade de 11 e 9%, respectivamente. A depressão por endogamia em *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa* e *Abies procera* para sobrevivência nos dois primeiros anos de plantio variou de 3% a 16% e aos dez anos de 0,4% a 3% e a altura de plantas apresentaram uma variação de até 36% no décimo ano (SORENSEN e MILES, 1982).

Os alelos letais parecem ser as causas da redução da produtividade pelo aborto de flores e mortalidade das plantas e os alelos deletérios pelas alterações negativas do fenótipo dos indivíduos como a perda de forma, fertilidade e menor produção de sementes (CROW, 1993).

A endogamia, em populações naturais de espécies arbóreas, pode ocorrer quando os agentes polinizadores atuam em flores da mesma planta, devido à estrutura da população, em agrupamentos de indivíduos aparentados espacialmente

próximos, ou pela redução do tamanho populacional. A principal consequência é a redução do valor fenotípico médio, demonstrado pela redução da capacidade reprodutiva ou da eficiência fisiológica (MATHER, 1994).

As hipóteses que explicam a base genética da endogamia são a sobredominância e a dominância parcial ou balanço mutação-seleção. As duas inferem que a autofecundação aumenta a homozigose nas progênes, em relação às progênes de cruzamento, assim na hipótese da sobredominância, as progênes de cruzamento apresentam melhor desempenho por possuírem uma grande proporção de locos para a adaptação em heterozigose e muitos desses locos são sobredominantes, o melhor desempenho ocorre devido à vantagem dos heterozigotos em locos adaptativos. A hipótese de dominância parcial ou balanço mutação-seleção, a causa da menor adaptação de progênes derivadas de autofecundação em relação à de cruzamentos é a exposição de genes recessivos letais e mutações deletérias nas progênes endogâmicas (KOELEWIJN; KOSKI e SAVOLAINEN, 1999).

O mapeamento genômico para detecção de QTLs em uma progênie da autofecundação de *Pinus taeda* detectaram dois QTLs, ambos demonstraram sobredominância, revelando ainda que a depressão por endogamia para crescimento em altura não estava associada a alelos de pequenos efeitos e os locos que atuam sobre a depressão por endogamia ocorrem em estágios específicos do crescimento (REMINGTON e O'MALLEY, 2000).

Entretanto, em espécies que sofreram redução populacional, espera-se uma taxa maior de endogamia, o que eliminaria a pressuposição de que tais populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Se uma população teve seu tamanho reduzido, há maior chance de ocorrerem acasalamentos entre indivíduos aparentados, aumentando a estimativa de  $F$  (MOURA *et al.*, 2003).

O parâmetro  $F_{ST}$  é um dos coeficientes  $F$  de Wright e estima o coeficiente de endogamia de uma subpopulação em relação à população total, medindo o grau de

diferenciação entre as subpopulações. Pode também ser um índice de fixação, que representa a redução na heterozigosidade em uma subpopulação devido à deriva genética. A estimativa deste parâmetro depende da obtenção das frequências alélicas da população.

### 2.6.2 Análise da variabilidade genética por marcadores moleculares

Os recentes avanços na biologia molecular abriram novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies e populações. As diferenças na seqüência gênica podem ser diretamente observadas e descritas com alto grau de precisão. Estes marcadores moleculares são utilizados no estudo da extensão e distribuição da variação entre espécies como também para investigar questões taxonômicas e evolutivas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores genéticos moleculares avaliam as relações entre os genótipos e são utilizados para estabelecer a variação genética entre populações e indivíduos de população natural (BOULLI ; BAAZIZ e M'HIRIT, 2001).

O poder de detecção da variabilidade existente diretamente em nível do DNA foi alcançada com técnicas em biologia molecular. A primeira técnica chamada de RFLP, surgiu na década de 70 em um experimento destinado à detecção de mutação de DNA de vírus e baseia-se na ação de enzimas de restrição, as quais reconhecem uma seqüência de DNA e clivam a molécula nestes sítios específicos. Os efeitos de mutações pontuais, inserções, deleções e rearranjos nos sítios de clivagem, são detectados através de *Southern blots* como polimorfismos no tamanho dos fragmentos de DNA após digestão com uma enzima de restrição (GRODZICKER *et al.*, 1974).

Os trabalhos utilizando marcador dominante para estudo da diversidade e estrutura genética de populações de espécies florestais, se repetiram para várias espécies como em *Populus tremuloides* (YEH; CHONG e YANG, 1995), *Pedicularis palustris* (SCHMIDT e JENSEN, 2000), *Camellia sinensis* (KAUNDUN e PARK,



2002), *Aniba rosaeodora* (SANTOS *et al.*, 2004), *Eremanthus erythropappus* (ESTOPA *et al.*, 2006), *Bertholletia excelsa* (SERRA *et al.*, 2006) e *Schizolobium parahyba* (FREIRE *et al.*, 2007).

Os programas de melhoramento ou conservação dependem do conhecimento da variabilidade genética nas populações da espécie de interesse. Os caracteres morfológicos utilizados para medição da diversidade genética em determinada população, são de difícil aplicação na identificação de grupos taxonômicos discretos, por serem influenciados por fatores ambientais e por isso apresentarem variabilidade contínua e alto grau de plasticidade. Em decorrência disso, passou-se a utilizar técnicas de genética molecular no estudo da variabilidade genética (PARKER *et al.*, 1998).

Os RFLP tornaram-se ferramenta útil e importante para várias áreas da biologia. Porém, em estudos de genéticas de populações este marcador não foi muito utilizado devido à grande morosidade de técnica e da necessidade de amostragem em grande número de indivíduos (BOTSTEIN *et al.*, 1980).

O surgimento da técnica PCR permitiu a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, e por isso provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular (MULLIS e FALLONA, 1987).

Os RAPD destacam-se pelas vantagens que apresentam como simplicidade, aplicabilidade a um grande número de espécies e por permitir a análise de grande número de locos. No entanto, o uso dos marcadores dominantes tem sido muito limitado pela falta de informação genotípica do marcador, não sendo possível identificar o genótipo heterozigótico (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998).

Os microssátelites surgiram também na década de 80, e a primeira região hipervariável foi isolada ao acaso a partir de uma biblioteca genômica (WYMAN e WHITE, 1980). Estes marcadores tem sido utilizados no melhoramento de plantas para a identificação de variedades e clones, na análise de diversidade genética e na determinação da paternidade (DALLAS, 1988).

Os microssatélites possuem todas as características desejáveis para serem utilizados em estudos de genética de populações (POWEL; MACHRAY e PROVAN, 1996).

Os locos do microssatélites são constituídos por seqüência curtas de DNA repetitivo de um a seis pares de bases repetidas várias vezes de maneira idêntica e adjacente (repetições em tandem). As seqüências de DNA que flaqueiam os microssatélites são conservadas, o que permite a seleção de um par de pequenos fragmentos indicadores de fita réplica, denominados *primers*, de 20 a 30 pares de bases e sua amplificação via PCR. O polimorfismo é baseado nas diferenças de comprimento das seqüências, pois o número de repetições em cada microssatélite é altamente variável (LITT e LUTY, 1989).

Os marcadores microssatélite são utilizado em estudos de genética de populações de plantas. As facilidades deste marcador dependem da disponibilidade das seqüências de DNA que flanqueiam o microssatélite para confecção dos *primers*. O uso de marcadores microssatélites em espécies nativas é limitado devido às escassas informações sobre seqüências de DNA e pelo alto custo dos trabalhos envolvidos na construção de bibliotecas genômicas, clonagens e sequenciamentos necessários para o isolamento de microssatélites e o desenvolvimento dos *primers* (SOUZA, 2002; TAYLOR; KRAAIJEVELD e LINDENMAYER, 2002 ; YAMAMOTO *et al.*, 2002).

## 2.7 MARCADORES RAPD

O avanço da técnica de análise genômica por marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu quando se descobriu o *primer* único, mais curto e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando a necessidade de conhecimento prévio da seqüência do DNA. As técnicas denominadas PCR-RAPD e AP-PCR são semelhantes e utilizam *primers* de seqüência arbitrária (WILLIAMS *et al.*, 1990; WELSH e McCLELLAND 1990). Em função da grande

quantidade de DNA, o segmento amplificado pode ser visualizado diretamente em forma de uma banda em gel de eletroforese (WAUGH, 1997; FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998).

O polimorfismo em nível do DNA é identificado pela presença de fragmento amplificado em um genótipo e ausente em outro (CRUZ, 1998).

A despeito das dificuldades para padronização da técnica, devido as suas variações intrínsecas, a análise de RAPD é amplamente utilizada, contudo seria mais útil como uma ferramenta meio, para explorações iniciais, e não uma ferramenta conclusiva. Por isso esta técnica supõem-se seria mais útil em análises genéticas iniciais de espécies não caracterizadas. Com esta técnica é possível escanear o genoma inteiro para obter um conjunto de marcadores polimórficos de DNA. A maioria dos problemas com a análise de RAPD são a reprodutibilidade e homologia dos produtos. A reprodutibilidade é determinada por uma variedade de fatores e influenciada pelas condições de cada laboratório, como a escolha da TaqDNApolimerase e do termociclador (BINNECK; NEDEL e DELLAGOSTIN, 2002).

O uso do marcador RAPD resulta em vantagens práticas: simplicidade, rapidez e quantidade mínima de DNA necessária para a análise genotípica do indivíduo. O custo é baixo e não requer experiência profunda em biologia molecular, nem instalações sofisticadas. A amplificação de um fragmento RAPD no genoma ocorre se as seqüências de DNA complementares ao *primer* arbitrário estiverem adjacentes (< 4000 pares de bases) e em sentido oposto. A limitação desta técnica é o baixo conteúdo de informação genética por loco por ser dominante. A dominância deste marcador se refere a interpretação entre o genótipo e fenótipo do indivíduo, ou seja, não é possível distinguir se aquele segmento originou-se de uma ou de duas cópias da seqüência amplificada (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998).

A técnica de RAPD demonstrou ser indicada para estudos de espécies desconhecidas geneticamente, por utilizar *primers* pequenos e de seqüência arbitrária, por demandar pequena quantidade de DNA para as análises e por possuir

grande potencial para detectar polimorfismo genético, permitindo a obtenção de resultados rapidamente. Apresenta custo baixo, tornando-se ferramenta acessível a muitos laboratórios (LACERDA *et al.*, 2002).

A análise do DNA é uma ferramenta muito eficiente para responder as questões relacionadas à distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de plantas. O acesso imediato, baixo custo e a transferibilidade de utilização dos *primers* entre as espécies são características que tem tornado os marcadores RAPD intensamente usados. As espécies arbóreas particularmente, pelo longo tempo e altos custos da experimentação convencional, bem como pela inviabilidade imediata do uso dos marcadores microssatélite pelos altos custos e tempo para o desenvolvimento de *primers* específicos, tem tornado os marcadores RAPD muito usados para investigação da diversidade genética em populações naturais e caracterização de coleções de germoplasma (REIS e GRATTAPAGLIA, 2003).

A diferenciação genética entre espécies de *Taraxarum* utilizando o RAPD revelou que é eficiente em estudos de genética de populações, a despeito dos problemas de comparação das bandas devido ao fenômeno de diferenças de amplificação. A análise RAPD, não obstante, foi utilizada com sucesso na determinação de parentesco genético entre espécies de plantas apomíticas (REISCH, 2004).

O marcador RAPD foi utilizado com sucesso em *Olea europaea* L. subsp. *europaea* para caracterização da diversidade genética entre cultivares, sendo que o uso combinado com o marcador microssatélite possibilitou ampla cobertura do genoma da espécie estudada, devido que os marcadores RAPD tem apresentado possivelmente associação de amplificação com importantes locos, ao passo que os marcadores microssatélite amplificam regiões hipervariáveis não codificadas do genoma (GEMAS *et al.*, 2004).

A análise de RAPD embora apresente limitações teóricas e práticas em sua aplicação ainda é amplamente utilizada em laboratórios de genética molecular na África, por ser tecnicamente simples e por revelar um grande número de marcadores genéticos moleculares. As limitações são minimizadas pela aplicação cuidadosa da técnica, pelo alto número de polimorfismos detectados e pela adoção de técnicas de análise dos resultados apropriadas ( MUCHUGI *et al.*, 2006).

A técnica molecular RAPD provou ser uma ferramenta valiosa na caracterização e avaliação da diversidade genética dentro e entre populações de várias espécies, com as vantagens da simplicidade de uso, baixo custo e pequena quantidade de material vegetal para sua execução (ZOGHLAMI *et al.*, 2007).

## 2.8 ANÁLISE DA SIMILARIDADE GENÉTICA

A estimativa da similaridade genética entre um genótipo e outro podem ser obtidos por meio de variáveis quantitativas ou dicotômicas. As medidas mais simples são aquelas relacionadas a variáveis dicotômicas, geradas por marcadores moleculares dominantes como o RAPD. Para estes marcadores, as observações de comparação entre dois genótipos são baseadas na presença (1) ou ausência (0) da banda no gel de eletroforese (KRZANOWSKI, 1988).

Os coeficientes não quantitativos são preferidos em estudos com marcadores dominantes, já que não se sabe a natureza molecular da ausência da banda no gel de eletroforese. Os mais utilizados em dados obtidos pelo marcador molecular RAPD são Jaccard, Sorensen-Dice e Nei e Li. Os valores do coeficiente de similaridade genética de Jaccard e de Nei e Li na elaboração de dendrogramas, são idênticos (DUARTE; SANTOS e MELO, 1999).

As informações sobre as divergências de DNA foram incorporadas em análise de variância, derivada da matriz de distâncias quadradas euclidianas entre todos os pares de haplótipos. A análise de variância molecular (AMOVA), produz estimativas dos componentes de variância análogas as estatísticas F,

denominadas de estatísticas  $\Phi$ , que refletem a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica (EXCOFFIER; SMOUSE e QUATTRO, 1992). A significância dos componentes de variância e das estatísticas  $\Phi$ , pode ser testada pelo uso de permutações obtidas através do método de re-amostragem *Bootstrap*.

A base da análise consiste em que as somas de quadrados convencionais (SQ) são escritas na forma de somas de quadrados de diferenças entre pares de observações, construindo uma análise de variância molecular hierárquica, partindo diretamente da matriz das distâncias quadradas de todos os pares de haplótipos (EXCOFFIER; SMOUSE e QUATTRO, 1992).

A AMOVA foi utilizada primeiramente em plantas para estudar a variação genética intra e interpopulações naturais de *Buchloe dactyloides* do México e dos Estados Unidos da América ( HUFF; PEAKALL E SMOUSE, 1993).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ORIGEM DO MATERIAL VEGETAL

As árvores amostradas de vassourão-branco, das quais foram coletadas folhas para extração do DNA genômico, estão localizadas em fragmentos florestais em Curitiba e São José dos Pinhais (PR) e Rio Negrinho (SC). A identificação detalhada das origens do material vegetal é apresentada na Tabela 1 e nas Figuras 2, 3 e 4, onde são indicadas por numeração as árvores amostradas.

TABELA 1 - MUNICÍPIOS E LOCAIS DE COLETA DAS FOLHAS DE VASSOURÃO-BRANCO PARA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Município/Estado	Local	Nº de árvores	Latitude	Longitude	Altitude (m)
Curitiba, PR	Parque Barigüí	30	25°25'54" S	49°18'68" O	934
São José dos Pinhais, PR	BR-376	30	25° 32'05" S	49°12'23" O	906
Rio Negrinho, SC	BR-281	30	26°15'16" S	49°31'06" O	790

#### 3.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A coleta das folhas foi feita com o auxílio de podão nas árvores amostradas mais baixas e do estilingue com linha de nylon e corda nas mais altas.

Após a coleta das folhas nas árvores amostradas, nos locais detalhados na Tabela 1 e nas Figuras 2, 3 e 4, as amostras identificadas foram colocadas em sacos plásticos e isopor com gelo para transporte até o Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Florestas em Colombo (PR) onde permaneceram armazenadas em freezer a – 80°C até a extração do DNA genômico.



FIGURA 2 - FOTOGRAFIA DE SATÉLITE DO PARQUE BARIGUI EM CURITIBA, PR ONDE ESTÃO ESTÃO LOCALIZADAS AS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO. FONTE: GOOGLE EARTH (DEZ/2008).

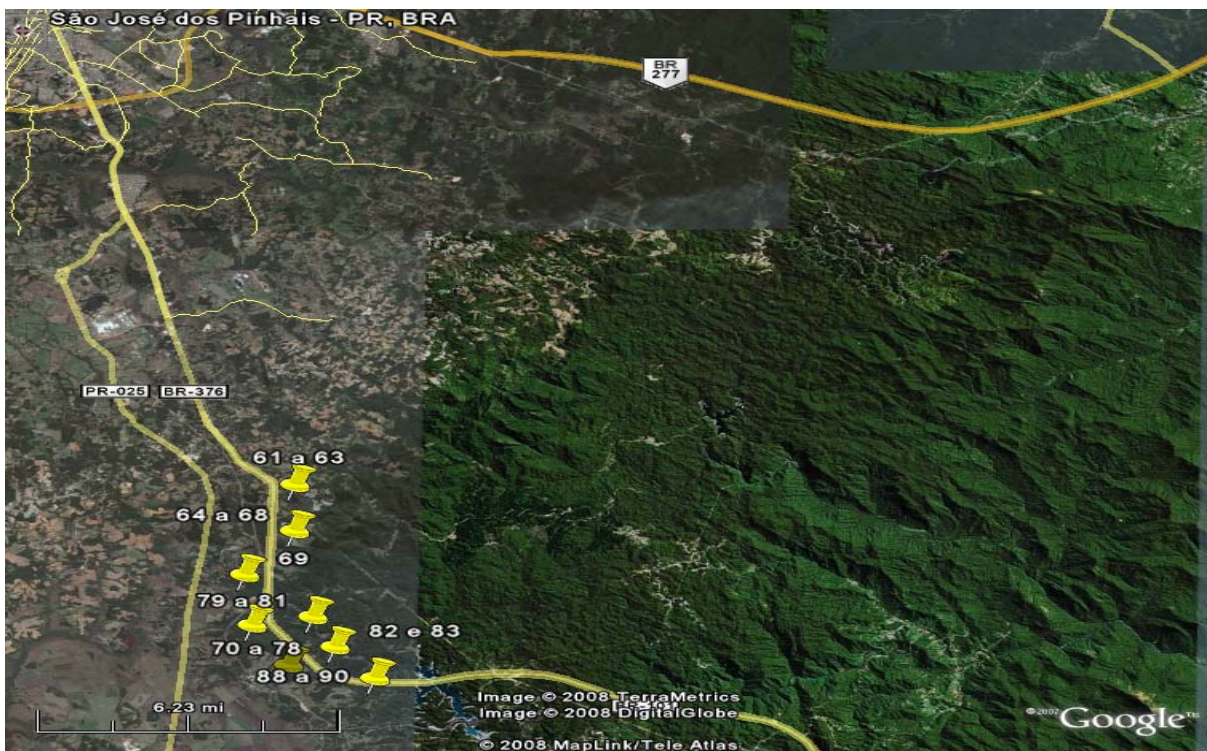


FIGURA 3 - FOTOGRAFIA DE SATÉLITE DO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PR ONDE ESTÃO LOCALIZADAS AS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO. FONTE: GOOGLE EARTH (DEZ/2008).



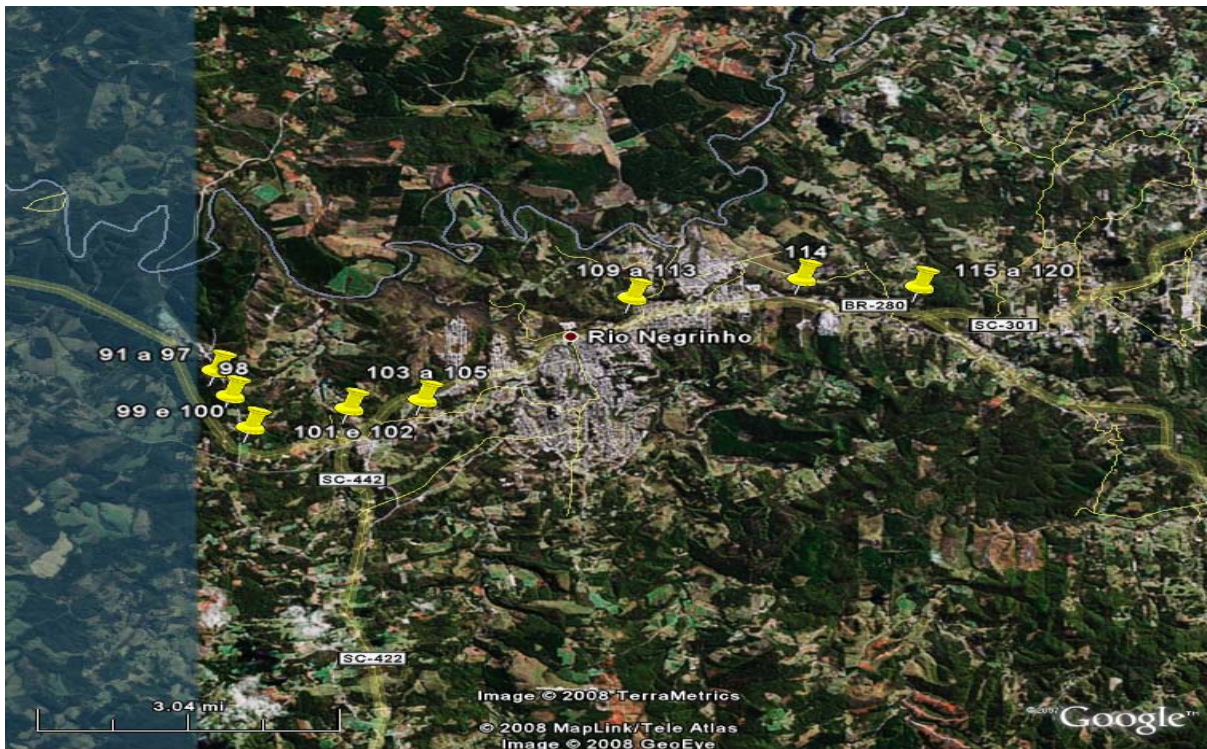


FIGURA 4 - FOTOGRAFIA DE SATÉLITE DO MUNICÍPIO DE RIO NEGRINHO, SC ONDE ESTÃO LOCALIZADAS AS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO. FONTE: GOOGLE EARTH (2008).

### 3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O método utilizado para extração do DNA genômico das folhas de vassourão-branco, foi uma modificação do protocolo desenvolvido por CHEUNG, HUBERT e LANDRY (1993). A técnica preconiza o uso de concentração de sal muito alta no tampão de extração o que elimina vários inibidores da PCR, tornando a ruptura do tecido e a extração do DNA um processo simples, rápido e de baixo custo.

Para extração do DNA genômico foram utilizadas duas folhas com tecido jovem, pesando aproximadamente dois gramas, que foram maceradas em almofariz após adição de nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para o tubo de microcentrífuga de 2,0 ml, adicionados 900 µl de tampão de extração (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 35 mM EDTA; 1 M NaCl, 1% polivinilpirrolidona-PVP) e 40 µl de SDS (dodecyl sulfate sodium salt) 10%, colocado em banho-maria a 60°C por 30 min

Adicionou-se 900 µl da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugou-se por 8 minutos a 3200 G. Coletou-se 800 µl do sobrenadante e colocou-se em outro tubo de microcentrífuga de 2,0 ml, adicionou-se 520 µl de acetato de amônio 7,5 M, homogeneizou-se manualmente por inversão do tubo e centrifugou-se por 7 min. Transferiu-se 1 ml do sobrenadante para outro tubo de microcentrífuga de 2,0 ml e adicionou-se 700 µl de isopropanol e homogeneizou-se manualmente por inversão do tubo. Após a homogeneização, o conteúdo do tubo de microcentrífuga foi centrifugado por 12 min, descartado o sobrenadante deixando ao fundo o pellet de DNA extraído. Adicionou-se ao pellet 1 ml de etanol 70%, centrifugou-se por 5 min e descartou-se o sobrenadante. O pellet de DNA foi secado por 30 min a 37 °C e foi adicionado 50 µl água ultra pura autoclavada para ressuspendê-lo.

#### 3.4 QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO DNA GENÔMICO EXTRAÍDO

A quantificação do DNA das amostras de vassourão-branco foi estimada através da comparação visual da intensidade de fluorescência das bandas com as do DNA do fago λ de concentração conhecidas, 5, 10 e 20 ng.µL<sup>-1</sup> por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (P/v), em corrida de 90 min a 100 V. A visualização também permitiu verificar a integridade do DNA extraído. A comparação foi feita utilizando-se 5 µL de cada uma das amostras de diferentes concentrações do DNA do fago λ, nos três primeiros poços do gel, respectivamente 25, 50 e 100 ng. As mesmas quantidades foram aplicadas ao DNA extraído das folhas do vassourão-branco. Os géis foram revelados após a coloração em brometo de etídeo (0,05%) em tampão TBE 1X, sendo 20 min de imersão seguidos de 10 min em água ultra pura e leitura em transiluminador com luz ultra violeta e foto documentador. Após as quantificações, cada amostra de DNA do vassourão-branco foi diluída para 1 ng.µL<sup>-1</sup> para as reações de RAPD.

### 3.5 CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

As reações de amplificação foram feitas em termociclador modelo Mastercycler Gradient 5331 marca Eppendorff, num volume de reação de 25  $\mu$ L contendo: 1 ng DNA molde, 0,5  $\mu$ M de primer (Operon Technologies), 0,8  $\mu$ M de dNTP, 2,5  $\mu$ L de tampão 10X, 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 2,5 unidades de TaqDNApolimerase e  $H_2O$  (q.s.p.). As condições de amplificação foram: Desnaturação inicial a 92 °C por quatro min; 40 ciclos de um min a 92 °C, um min e 30 s a 40 °C, e dois min a 72 °C. A extensão final foi de cinco min a 72 °C.

Os produtos de amplificação, repetidos 2 vezes para cada árvore amostrada foram submetidos à eletroforese com corrida (3V/cm) em géis de agarose 1,5% (P/v) em tampão TBE 1X. O DNA Ladder 1Kb (Invitrogen) foi usado como marcador de peso molecular. A foto documentação dos géis foi realizada pelo software DigiDoc-it acoplado a câmera Olympus digital modelo C-3040200M 3.3 megapixels no Laboratório do Departamento de Genética da UFPR.

### 3.6 SELEÇÃO DE PRIMERS

O teste para seleção foi realizada com *primers* dos kits A, B, C, D, E, F, X, W, Z da Operon Technologies. Para verificação do perfil de amplificação de cada *primer* foram utilizados DNA de três árvores-amostradas, sendo uma de cada população, gerando uma matriz binária, onde a presença de banda é representada pelo número um (1) e a ausência de banda pelo zero (0). A eletroforese foi executada em cuba horizontal com corrida (3V/cm) em géis de agarose 1,5% (P/v) e tampão TBE 1X.

### 3.7 ANÁLISE DOS DADOS

A análise dos dados foi feita com base nos polimorfismos gerados pelas bandas mais evidentes do marcador RAPD pela análise das fotos dos géis. A

planilha com os dados binários foi construída no Microsoft Excel. O dados foram interpretados como binários, gerando-se uma matriz com a genotipagem dos indivíduos quanto à presença (1) e ausência (0) de bandas.

A porcentagem de polimorfismos obtida nos géis com as amplificações foi calculada dividindo-se o número de bandas polimórficas pelo número total de bandas de cada *primer*.

O coeficiente de similaridade de Jaccard entre as árvores amostradas de cada população, foi calculado conforme a expressão:

$$S_{ij} = a/a+b+c$$

onde:

a = número de casos que ocorre bandas em ambos indivíduos simultaneamente

b = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduos i

c = número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduos j

O valor numérico de  $S_{ij}$  reflete a semelhança entre duas árvores amostradas. Os indivíduos foram agrupados pelo método UPGMA ou agrupamento pareado não ponderado utilizando médias aritméticas que é um modelo hierárquico e permite a construção de dendrogramas. As matrizes e dendrogramas foram elaborados com o uso do software NTSYS 2.0 (ROHLF, 2000).

A consistência dos agrupamentos entre indivíduos de cada população foi testada pelo software BOOD (COELHO, 2000).

A análise de variância molecular (AMOVA) dos dados binários, foi efetuada pela decomposição dos componentes principais entre e dentro das populações conforme EXCOFFIER, SMOUSE e QUATTRO (1992), pelo software Arlequin (SCHNEIDER, ROESSLI e EXCOFFIER, 2000). As dissimilaridades genéticas foram calculadas conforme (NEI e LI, 1979).

A correlação entre as matrizes de dissimilaridade genética e distâncias geográficas entre as populações foi feita pelo coeficiente de Pearson (r).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O protocolo de Cheung, Hubert e Landry (1993) adaptado para este trabalho usou o SDS como detergente, e contrariamente ao que afirmou Romano (1998), de que protocolos simplificados como este, podem fornecer DNA parcialmente degradado ou contaminado, e por isso comprometer a reprodutibilidade dos resultados não se confirmou, pois a extração do DNA genômico das folhas de vassourão-branco foi eficiente, tendo-se obtido em média  $100 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$  de DNA por amostra, variando entre  $50 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$  e  $150 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ . Esta quantidade está muito além daquela necessária para PCR-RAPD, entre cinco e  $10 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$  por reação segundo Ferreira e Gratapaglia (1998), além de apresentar a qualidade necessária para execução da PCR-RAPD.

A reprodutibilidade dos resultados foi testada pela extração e execução da PCR-RAPD de duas amostras de folha de cada árvore. A integridade do DNA extraído pode ser comprovada pelo sucesso nas ampliações dos polimorfismos obtidos.

Os resultados obtidos neste trabalho pela utilização do protocolo de Cheung, Hubert e Landry (1993), quanto à qualidade e quantidade do DNA extraído, estão de acordo com as constatações feitas por Molinari e Crochemore (2001), que testaram três protocolos de extração de DNA vegetal, entre os quais o que foi utilizado neste trabalho e concluíram que todos forneceram DNA de boa qualidade para execução da técnica de PCR-RAPD.

A vantagem do método adaptado de Cheung, Hubert e Landry (1993) está na dispensa da utilização dos reagentes como enzimas, fenol, entre outros, sem comprometimento da qualidade da análise. As qualidades das reações de amplificação demonstraram que o protocolo de extração atendeu aos objetivos.

Os estudos de caracterização de polimorfismos genéticos em nível de DNA de plantas requerem amostras puras e suficientes para não inibir a ação das enzimas ou interferir na migração em gel de eletroforese. Os protocolos para extração devem ser rápidos, eficientes, de baixo custo e preferentemente que utilizem produtos pouco tóxicos. O principal problema na extração de DNA de folhas

é que são co-isolados no processo de extração polissacarídeos, fenóis, alcalóides, esteróides, flavonóides, glicosídeos cianogênicos, gomas, taninos, resinas e ácidos, compostos que danificam o DNA e inibem a ação da enzima TaqDNApolimerase (DUKE, 1989).

A extração do DNA de células vegetais para análise da PCR-RAPD requer principalmente um produto final que apresente pureza, contudo em algumas espécies, a separação do DNA de polissacarídeos e componentes fenólicos é difícil. A extração de DNA foliar de tecido vegetal seco é mais difícil do que de tecido fresco. Os estudos efetuados por vários autores indicam que a extração de DNA não é simples e rotineira, e que os métodos convencionais não são reproduzíveis para todas as espécies, especialmente para folhas secas. A aplicação do protocolo desenvolvido por Wang, Qi e Cutler (1993), Doyle e Doyle (1987), Dellaporta, Wood e Hicks (1983) e Lodhi *et al.* (1994) não produziu DNA suficiente de folhas secas de *Hesperis* spp. (ARAS, DURAN e YENILMEZ, 2003).

Segundo Romano (1998), a obtenção de DNA de boa qualidade depende do rompimento eficiente das paredes celulares para liberação dos constituintes por congelamento com nitrogênio líquido e posterior ação mecânica; rompimento das membranas celulares para liberação do DNA pela ação do detergente SDS ou CTAB; bloqueio da ação da DNase, pela elevação do pH a 8,0 pelo tampão de extração com EDTA (ácido etileno diamônio tetracético); os ácidos nucleicos são separados das proteínas pelo uso de clorofórmio ou fenol, que desnatura-as tornando-as insolúveis em água, enquanto os ácidos nucleicos estão solubilizados; o DNA deve ser protegido dos fenóis que oxidam-no pela adição de agentes anti-oxidantes ao tampão de extração como PVP (polivinilpirrolidona), BSA (albumina de soro bovino) ou  $\beta$ -mercapetanol. Os polissacarídeos inibem a ação de enzimas de restrição, tornando o DNA excessivamente viscoso, interferindo na migração do DNA no gel de eletroforese, a separação do DNA dos polissacarídeos é feita pela adição de detergentes como SDS ou CTAB.

A importância da escolha do protocolo na extração do DNA foi estudada por Hansen, Halldén e Säll (1998), comparando a eficiência de três protocolos com os resultados de amplificação obtidos e concluíram que a combinação do protocolo de extração adequado com os *primers* é condição essencial para obtenção de alto polimorfismo nas reações de RAPD.

O fator mais importante na obtenção do DNA de plantas, segundo Ferreira e Gratapaglia (1998) é a qualidade do tecido vegetal, uma vez que a integridade do DNA é afetada pela condição do tecido antes da extração, recomendando-se utilizar tecido novo em fase ativa de crescimento da planta. Além disso, a técnica deve permitir a extração de quantidade consideráveis de DNA. Os protocolos utilizados para extração do DNA genômico de espécies vegetais diferem na composição do tampão de extração; o sal; o detergente e o inibidor da enzima DNase. O protocolo descrito por Doyle (1991) utiliza como detergente o CTAB, o descrito por Dellaporta, Wood e Hicks (1983) utiliza o SDS e o de Cheung, Hubert e Landry (1993) utiliza o sarcosyl.

#### 4.2 SELEÇÃO DE PRIMERS

A análise do polimorfismo do vassourão-branco foi realizada com *primers* da Operon Technologies, destacando-se que todos apresentam entre 60% e 70% de bases GC (Tabela 2) confirmando de que os *primers* RAPD para amplificar bem os polimorfismos devem possuir no mínimo 50% destas bases (WILLIAMS *et al.*, 1990; WHITKUS, DOEBLEY E WENDEL, 1994). A triagem dos *primers* foi feita utilizando-se um indivíduo de cada população com cada um dos *primers*, optando-se pelos 12 que apresentaram maior número e mais intensas bandas no gel.

Os trabalhos de Vidal, Lamego e Nunes (2005) sugerem que a otimização do número de *primers* em marcadores RAPD segue a seguinte regra: nos casos em que poucos *primers* promovem boa formação de bandas nos indivíduos de uma dada população, faz-se necessário utilizar o maior número deles para a adequada estimativa da variabilidade genética, entretanto, quando muitos *primers* promovem boa formação de bandas nos indivíduos de uma dada população, somente alguns deles são suficientes para estimar a variabilidade genética.

TABELA 2 - PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO DO VASSOURÃO-BRANCO

<i>Primer</i>	Seqüência 5' → 3'	CG %	Locos obtidos Nº	Polimorfismo %
OPC-02	GTGAGGCGTC	70	10	100,0
OPB-04	GGA CTGGAGT	60	10	90,0
OPC-05	GATGACCGCC	70	7	100,0
OPX-11	GGAGCCTCAG	70	8	87,5
OPX-05	CCTTTCCCTC	60	11	100,0
OPB-01	GTTTCGCTCC	60	10	100,0
OPF-03	CCTGATCACC	60	10	90,0
OPC-06	GAACG GACTC	60	10	90,0
OPC-04	CCGCATCTAC	60	8	75,0
OPA-05	AGGGGTCTTG	60	10	100,0
OPC-15	GACGGATCAG	60	11	100,0
OPB-10	CTGCTGGGAC	70	11	100,0
TOTAL			116	94,8

O trabalho de Li *et al.* (2006) propõem um novo método para seleção de *primers*, aplicável através do software denominado “eRAPD” que permite reduzir a quantidade de *primers* em até 50%, comparado com os procedimentos rotineiros, alertando que o número de bandas são subestimados no processo de seleção de *primers* tradicional, pela inespecificidade do *primer*, competição entre os sítios de anelamento e limitações de resolução do gel de agarose que não exhibe todas as bandas. Os autores mencionados indicam que a seleção de *primer* em espécies com genoma grande como vegetais superiores, pode ser melhor executada através do conhecimento de uma ou duas seqüências de um cromossomo.

O estudo desenvolvido por Hansen, Halldén e Säll (1998) comparou a geração de bandas polimórficas da análise de RAPD em três condições de amplificação do DNA genômico de folhas de *Beta vulgaris* L., tendo concluído que



erros de amplificação do DNA nesta técnica são devidos principalmente à competição por sítio de amplificação, indicando ser uma condição intrínseca da técnica. A relação das condições de amplificação com os *primers* testados foram bastante consistentes, refletido no número de bandas polimórficas obtidas e na similaridade do padrão de bandas entre as condições de amplificação.

A amostragem feita neste trabalho foi superior à prescrição feita por Ayala e Kinger (1984) que apontam que amostras de 20 locos já proporcionam estimativas confiáveis dos índices de diversidade e medidas de estrutura de populações, sendo poucas as alterações observadas nos parâmetros a partir deste número. A grande maioria dos trabalhos realizados com espécies arbóreas, baseados em dados de marcadores genéticos, tem revelado de dez a 30 locos (BERG e HAMRICK, 1997).

As comparações genéticas entre indivíduos de uma população, podem gerar duas fontes de variação, inter e intralocos. A variância interlocos decorre da amostragem do número limitado de locos nos indivíduos, aumentando-se esse número reduz-se a variância interlocos (NEI, 1977).

O número de bandas polimórficas utilizadas em trabalhos de avaliação da variabilidade genética em vegetais variam de 27 para *Dryopteris cristata* (Landergott *et al.*, 2001) até 289 para *Phaseolus vulgaris* (Link *et al.*, 1995) entretanto, segundo Dudley (1994) 85 bandas são suficientes.

#### 4. VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES

As análises de variância molecular (AMOVAs) dos dados binários de 116 locos foram efetuadas pela decomposição de seus componentes entre e dentro das três populações, assim, 87,62% da variância genética encontra-se dentro das populações estudadas e 12,38% entre as populações. A diferenciação genética entre as três populações (Tabela 3)  $F_{st} = 0,12379$  é moderada (WRIGHT, 1951).

TABELA 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR DAS TRÊS POPULAÇÕES DE VASSOURÃO-BRANCO

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Variação %	$\Phi_{st}$
Interpopulações	2	17451,556	12,38	0,1238
Intrapopulações	87	144914,933	87,62	0,8762
Total	89	162366,489	FST: 0,12379	p= 0,001

A AMOVA foi também efetuada comparando duas a duas populações para verificação dos índices de variância genética nesta condição, tendo-se constatado que entre a população de Rio Negrinho (SC) e de Curitiba (PR), os índices variaram pouco tanto intra como inter populações, comparativamente a análise conjunta das três, com diferença moderada  $F_{st}= 0,12981$  (Tabela 4), segundo WRIGHT (1951).

TABELA 4 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE VASSOURÃO-BRANCO DE CURITIBA, PR E RIO NEGRINHO, SC.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Variação %	$\Phi_{st}$
Interpopulações	1	9295,467	12,98	0,1298
Intrapopulações	58	98468,533	87,02	0,8702
Total	59	107764,000	FST: 0,12981	p = 0,001

A AMOVA entre as populações de vassourão-branco de São José dos Pinhais (PR) e Rio Negrinho (SC), revelou que intra e inter populações, a variabilidade genética foi 92,43% e 7,57% respectivamente (Tabela 5), valores pouco diferentes daqueles observados nas análises entre as três populações conjuntas e entre Curitiba (PR) e Rio Negrinho (SC). O  $F_{st}= 0,0757$ , indica que a diferença entre as duas populações também é moderada, entretanto mais próximas geneticamente, uma vez que  $F_{st} \leq 0,05$  revela pouca diferença genética entre populações (WRIGHT, 1951).

TABELA 5 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE VASSOURÃO-BRANCO DE SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PR E RIO NEGRINHO, SC.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Variação %	$\Phi_{st}$
Interpopulações	1	47,200	7,57	0,0757
Intrapopulações	58	791,800	92,43	0,9243
Total	59	839,000	FST: 0,07571	p = 0,001

O procedimento adotado de desmembramento da AMOVA foi eficiente para demonstrar que as populações de vassourão-branco de Rio Negrinho (SC) e São José dos Pinhais (PR), separadas geograficamente por 78,43 km são bastante semelhantes geneticamente.

A AMOVA entre as populações de Curitiba e São José dos Pinhais (PR), revelou variância genética intra e interpopulacional de 15,84% e 84,16% (Tabela 6) respectivamente. O valor de  $F_{st} = 0,1584$  indica diferença genética grande entre duas populações segundo Wright (1951), embora estejam próximas geograficamente (28,1 km) (Tabela 6 e Figura 6).

TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE VASSOURÃO-BRANCO DE CURITIBA E SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PR.

Fonte de Variação	G.L.	S.Q.	Variação %	$\Phi_{st}$
Interpopulações	1	11406,667	15,84	0,1584
Intrapopulações	58	99512,533	84,16	0,8416
Total	59	110919,200	FST: 0,15844	p = 0,001

Os resultados obtidos nas AMOVAS comparando as três populações duas a duas foram confirmados pelo BOOD-P, demonstrando que o maior índice de dissimilaridade genética, conforme Jaccard, foi entre as populações de vassourão-branco de Curitiba (PR) e São José dos Pinhais (SC), e menor foi entre São José

dos Pinhais (PR) e Rio Negrinho (SC) (Tabela 7).

TABELA 7 - MATRIZ DE DISSIMILARIDADE GENÉTICA POR *BOOTSTRAP* ENTRE AS TRÊS POPULAÇÕES DE VASSOURÃO-BRANCO.

Populações	Coefficiente de dissimilaridade
Curitiba x São José dos Pinhais	0, 877299
Curitiba x Rio Negrinho	0, 830947
São José dos Pinhais X Rio Negrinho	0, 824449

A Figura 5 mostra a baixa correlação ( $r = 0,2185$ ) entre distância geográfica e dissimilaridade genética entre as populações. Os resultados são respaldados por Schmidt (2000) ao afirmar que nas espécies existe uma ampla variação em termos de adaptação ecológica crescimento e forma, denominado ecótipo para designar um habitat especial de crescimento. Apesar das similaridades morfológicas, vários ecótipos ocorrem de acordo com diferentes condições ecológicas. A evolução depende da existência de variabilidade genética, sendo que a seleção natural atua entre as variantes dentro das populações em relação à adaptação ao ambiente, proporcionando variação entre populações e entre espécies (TORGLER, CONTEL e TORGLER, 1995).

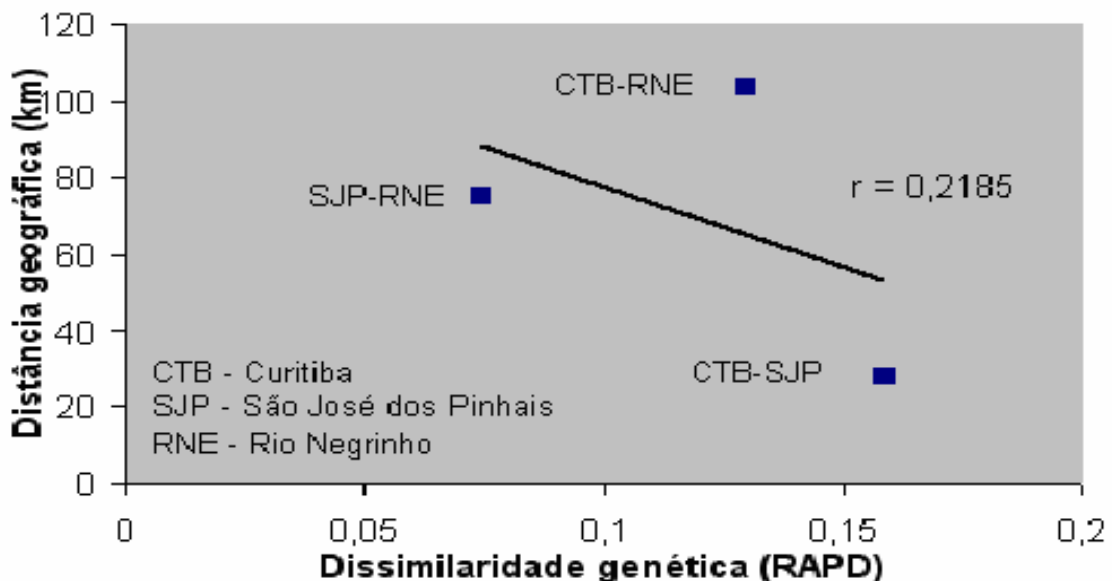


FIGURA 5 - CORRELAÇÃO ENTRE DISTÂNCIAS GEOGRÁFICAS E DISSIMILARIDADES GENÉTICAS ENTRE AS TRÊS POPULAÇÕES DE VASSOURÃO-BRANCO.

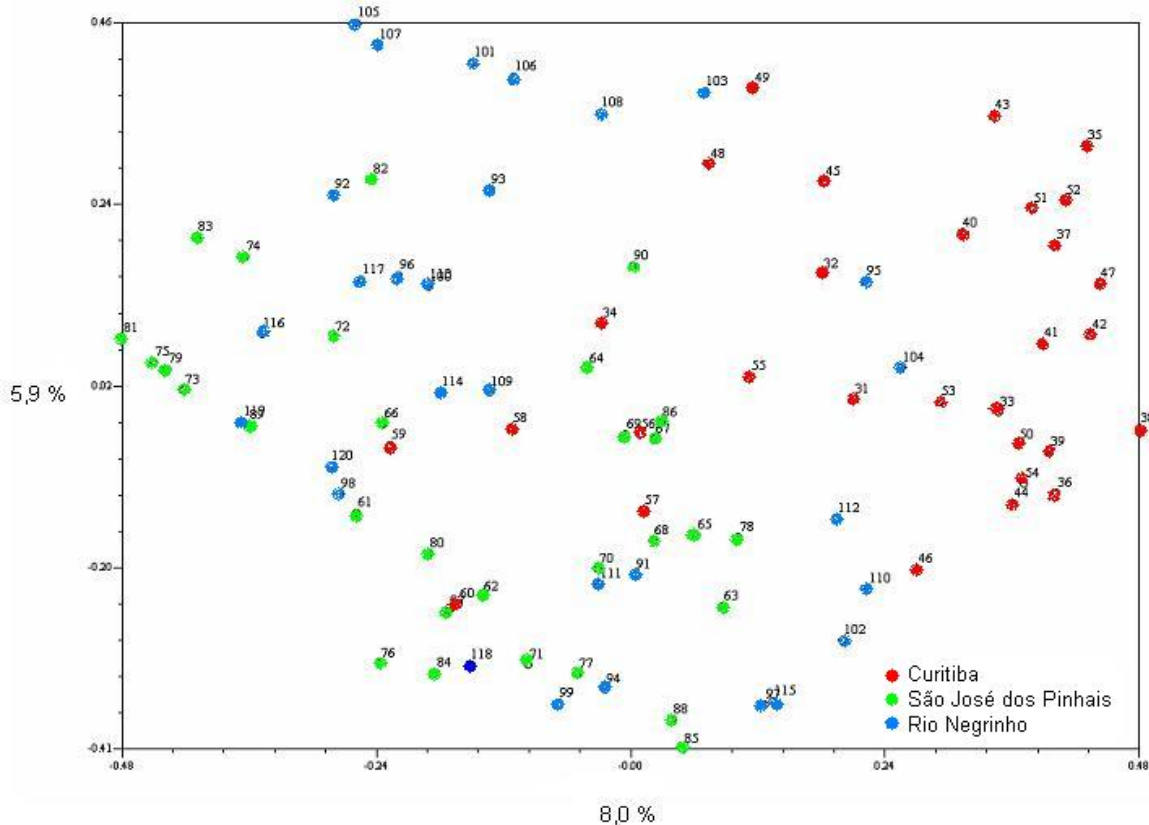


FIGURA 6 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DAS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO -BRANCO, BASEDA NA SIMILARIDADE GENÉTICA NAS TRÊS POPULAÇÕES.

A distribuição bidimensional das três populações, pela análise dos componentes principais, pode-se perceber nitidamente que a população de Curitiba (PR) apresenta maior dissimilaridade genética em relação às populações de Rio Negrinho (SC) e São José dos Pinhais (PR). Por outro lado, as populações de São José dos Pinhais (PR) e Rio Negrinho (SC), apresentam-se menos dissimilares geneticamente (Figura 6).

A população de Curitiba (PR) provavelmente foi isolada a mais tempo, por isso apresenta dissimilaridade genética maior, quando comparada com São José dos Pinhais (PR) e Rio Negrinho (SC). As três populações constituíam provavelmente uma metapopulação, subdivididas pela ação antrópica, o que pode ser explicado por Poorter e Bongers (1993), que afirmam que a estrutura de uma população é produto de eventos passados, quando era uma metapopulação, os

quais ainda exibem sua presença sobre a estrutura atual da população.

O trabalho de Neigel (1997) indica que o fluxo gênico atua na homogeneização das frequências alélicas entre as populações pequenas, mesmo que separadas geograficamente elas comportam-se como uma grande população panmítica. As afirmações do autor acima explicam a proximidade genética entre as populações de Rio Negrinho (SC) e São José dos Pinhais (PR) provavelmente subdivididas pela ação antrópica decorrente da urbanização da sede dos municípios supra mencionados, causando a segmentação destas populações, tornando-as subpopulações em processo de diferenciação genética.

As diferenças genéticas entre as populações estudadas também encontram respaldo nos estudos de Sork *et al.*, (1999) que preconizam o modelo de metapopulação, definida como o conjunto de subpopulações conectadas interagindo através do fluxo gênico e controladas por novas colonizações e extinções.

A variabilidade genética interpopulacional em espécies florestais é bastante variável, demonstrando que o sistema reprodutivo, a dispersão do pólen e das sementes, além do estágio sucessional são fatores determinantes da estrutura genética populacional. As diferentes taxas de variabilidade genética interpopulacional foram observadas em várias espécies entre as quais, *Swietenia macrophylla* 12,58%, (Gillies *et al.*,1999), *Myracrodruon urundeuva*, 8,0% (Reis, 1999) e *Esenbeckia leiocarpa*, 10,0% (CASTELLEN, 2000).

Analisando-se os resultados das AMOVAs referente aos níveis de variabilidade genética intra e interpopulacional das populações estudadas, pode-se inferir que não houve redução da variabilidade genética intra ou interpopulacional em nenhuma das três populações estudadas e que não apresentam endogamia, pois os índices de variabilidade obtidos estão dentro do que preconizam Kageyama *et al.* (2003) para espécies com o mesmo sistema reprodutivo e pertencente ao mesmo grupo sucessional. A inferência acima mencionada também encontra respaldo nas afirmações de Sun e Wong (2001) de que a redução do número de indivíduos de

uma população pode causar o aumento nas taxas de endogamia e a redução da variabilidade. Apesar da ação antrópica e da divisão das populações, provavelmente pelo desconhecimento das potencialidades de uso da espécie, não houve redução significativa do número de indivíduos, evitando com isso a eliminação de árvores de maior porte ou fuste reto, ou qualquer outra característica fenotípica de interesse comercial, evitando assim a redução da base genética destas populações, apesar da divisão.

As constatações de Amos e Balmford (2001) também devem ser consideradas, pois as espécies florestais toleram perdas de até 25% de sua variabilidade sem serem afetadas em sua capacidade adaptativa às mudanças ambientais.

A variabilidade genética das espécies do grupo sucessional secundário, entre as quais a espécie em estudo, por terem ciclo de vida longo e menor densidade populacional, apresentam moderada divergência entre populações, variando de 5% a 15% (KAGEYAMA *et al.*, 2003). As variabilidades genéticas entre as populações de vassourão-branco de Curitiba (PR), São José dos Pinhais (PR) e Rio Negrinho (SC) são de 7,57 a 15,8%.

#### 4.4 VARIABILIDADE DOS GENÓTIPOS NAS POPULAÇÕES

A população de Rio Negrinho (SC) apresentou uma distribuição espacial com agrupamentos de indivíduos com diversos graus de parentesco. O coeficiente de correlação entre o dendrograma e os agrupamentos do *Bootstrap* foi ( $r=0,74927$ ). Os índices de dissimilaridade genética entre as árvores amostradas no dendrograma (Figura 7), foram feitos com base nos agrupamentos baseados no coeficiente de similaridade de Jaccard convertido para dissimilaridade pela análise de *Bootstrapp*, comparando todas as árvores amostradas nesta população. A análise revelou que os indivíduos desta população apresentam uma distribuição agrupada com coeficiente de dissimilaridade entre elas variando de 0,38% a 79,1%.

Os agrupamentos mencionados acima demonstram claramente uma distribuição agregada das árvores nesta população de vassourão-branco. A existência destes agrupamentos decorre das características demográficas da espécie, como a forma de dispersão, onde grandes quantidades de sementes são depositadas nas vizinhanças das árvores amostradas, aumentando a possibilidade de cruzamentos entre estas e seus filhos próximos. Os agrupamentos são formados por árvores com grau de parentesco variado, constituindo demes panmíticos.

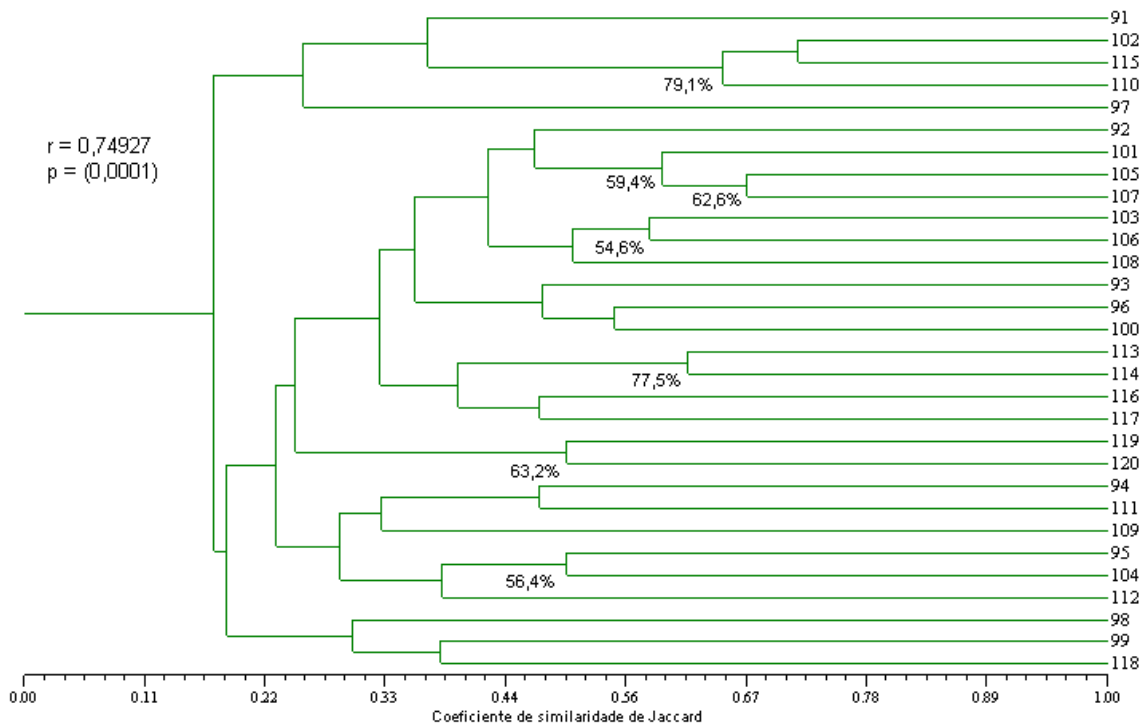


FIGURA 7 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADES GENÉTICAS ENTRE AS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO EM RIO NEGRINHO, SC.

A distribuição espacial das árvores apresenta uma característica comum, árvores fisicamente próximas e geneticamente dissimilares e árvores fisicamente distantes e geneticamente similares, caracterizada por indivíduos com variados níveis de parentesco, independentemente da distância física (Figuras 8).

O coeficiente de correlação ( $r = -0,18865$ ) entre as matrizes de similaridade genética e distâncias físicas das árvores amostradas, confirma a inexistência de



qualquer relação entre estas duas variáveis, na população de vassourão-branco de Rio Negrinho (SC).

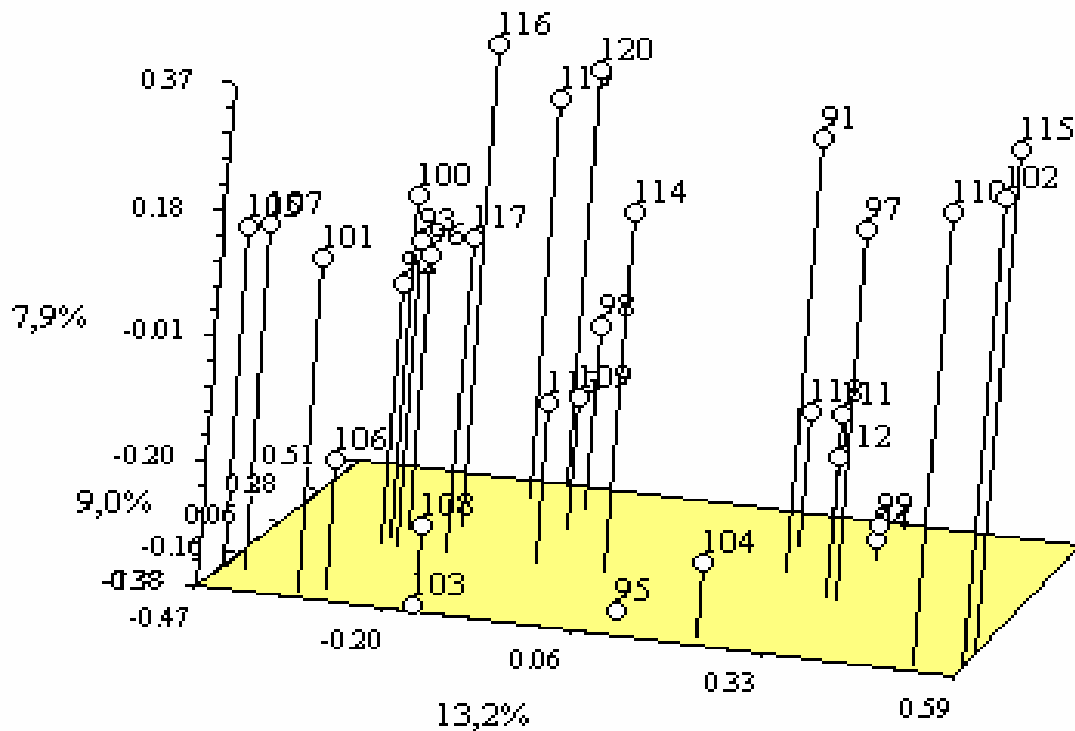


FIGURA 8 - DISTRIBUIÇÃO TRIDIMENSIONAL DAS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO BASEADA NAS SIMILARIDADES GENÉTICAS EM RIO NEGRINHO, SC.

A principal variabilidade genética encontra-se dentro da população de Rio Negrinho (SC).

As constatações de Hamrich e Godt (1990), de que a diversidade genética em espécies arbóreas concentra-se principalmente dentro das populações foram confirmadas também para esta população.

Portanto, caracterizar os níveis da diversidade genética entre os indivíduos dentro das populações é de importância primária em trabalhos de conservação genética, melhoramento e manejo florestal.

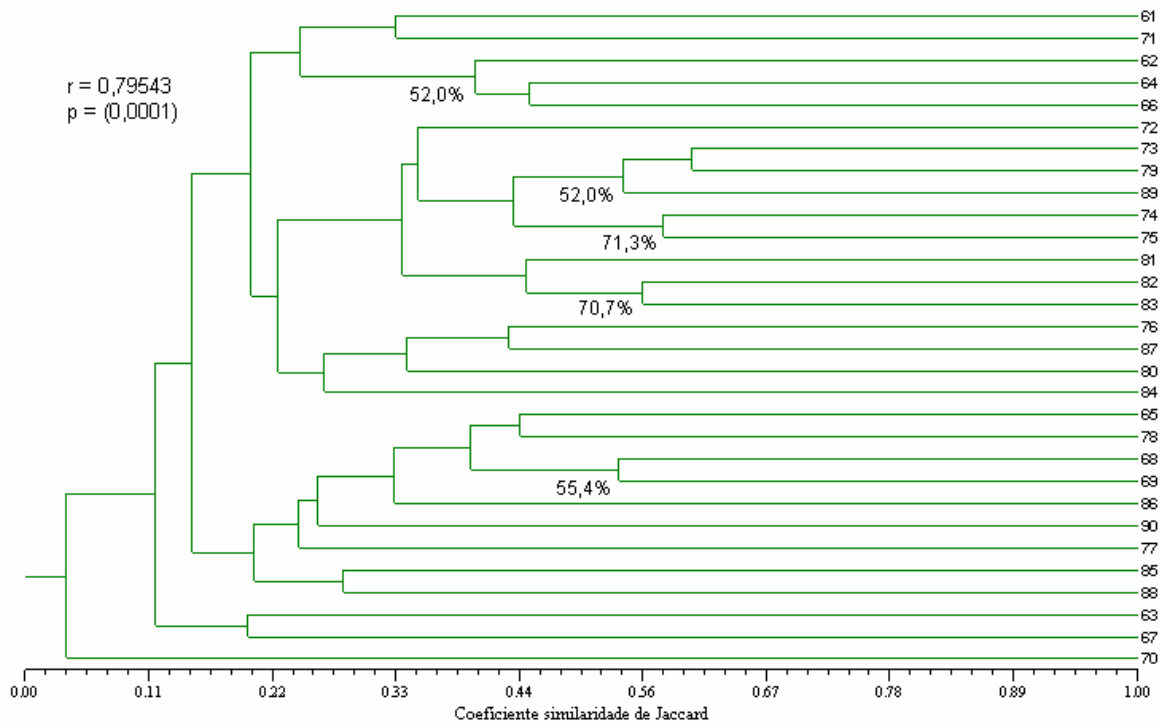


FIGURA 9 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADES GENÉTICAS ENTRE AS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO EM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PR.

O dendrograma da população de vassourão-branco de São José dos Pinhais (PR) (Figura 9), demonstra a distribuição agregada de indivíduos, semelhante à população de Rio Negrinho (SC).

O coeficiente de correlação entre o dendrograma e os agrupamentos do *Boodstrap* foi ( $r=0,79543$ ). Os índices de dissimilaridade entre árvores-amostradas no dendrograma foram feitos com base nos agrupamentos baseados no coeficiente de similaridade de Jaccard convertido para dissimilaridade pela análise de *Boodstrapp*, comparando todas as árvores amostradas nesta população. A análise revelou que esta população também apresentam uma distribuição agrupada com variados graus de parentesco entre os indivíduos, com coeficiente de dissimilaridade

variando entre 1,82% e 71,35%.

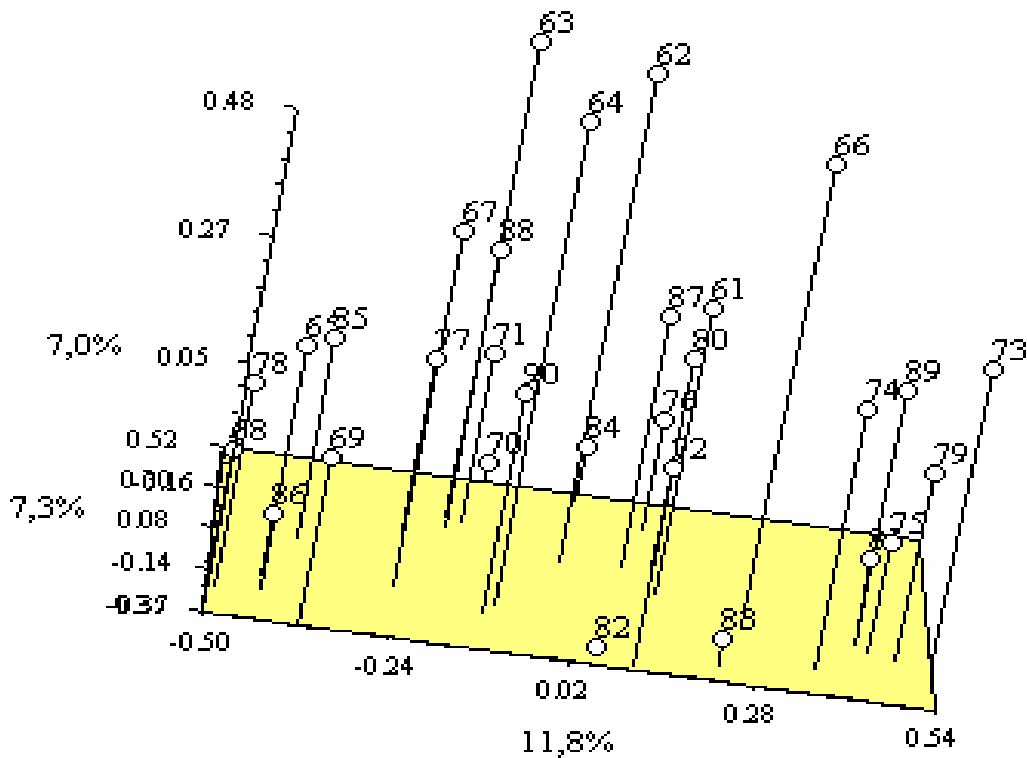


FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO TRIDIMENSIONAL DAS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO BASEADA NAS SIMILARIDADES GENÉTICAS EM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS, PR.

A distribuição espacial observada é consequência do sistema reprodutivo e da dispersão de pólen e sementes da espécie, com grandes quantidades de sementes depositadas nas vizinhanças das árvores-amostradas, estabelecendo condições para cruzamentos entre aparentados.

Os trabalhos de Bawa, Perry e Beach (1985) indicam que muitas espécies com flores bissexuais, como é o caso do vassourão-branco, apresentam incompatibilidade de auto-fecundação, no entanto em outras, a auto incompatibilidade é fraca ou inexistente.

A distribuição agregada dos indivíduos com diversos graus de parentesco

nas três populações estudadas de vassourão-branco, permitem inferir que o mecanismo de incompatibilidade à auto-fecundação na espécie é fraco ou inexistente.

A distribuição espacial dos genótipos na população de vassourão-branco de São José dos Pinhais (PR) demonstra claramente que não existe padrão entre a distância física e dissimilaridade genética. Analisando-se as Figura 10 percebe-se que existem agrupamentos de árvores mais próximas geneticamente, entretanto sem nenhuma relação de proximidade física, a exemplo do que ocorre na população de Rio Negrinho (SC).

O coeficiente de correlação ( $r = -0,19480$ ) entre as matrizes de similaridade genética e distâncias físicas das árvores amostradas, confirma a inexistência de qualquer relação entre estas duas variáveis, na população de vassourão-branco de São José dos Pinhais (PR).

O mesmo comportamento e estrutura genética foram observados em *Cariniana legalis*, espécie com o mesmo sistema reprodutivo e pertencente ao mesmo estágio sucessional, conforme Sebbenn, Kageyama e Zanotto (2001) confirmando as relações existentes entre a estrutura genética e as características das espécies de cada grupo sucessional (KAGEYAMA *et al.*, 2003).

O dendrograma da população de vassourão-branco de Curitiba (PR) (Figura 11) e a distribuição espacial tridimensional (Figura 12) demonstram uma distribuição agregada dos indivíduos, semelhante às populações de Rio Negrinho (SC) e São José dos Pinhais (PR). O coeficiente de correlação entre o dendrograma e os agrupamentos do *Boodstrap* foi ( $r = 0,83152$ ). Os índices de dissimilaridade entre árvores amostradas no dendrograma foram feitos com base nos agrupamentos baseados no coeficiente de similaridade de Jaccard convertido para dissimilaridade pela análise de *Boodstrapp*, comparando todas as árvores amostradas nesta população. A análise revelou que esta população também apresentam uma distribuição agrupada com variados graus de parentesco entre os indivíduos, com coeficiente de dissimilaridade variando entre 0,34% e 96,20%.

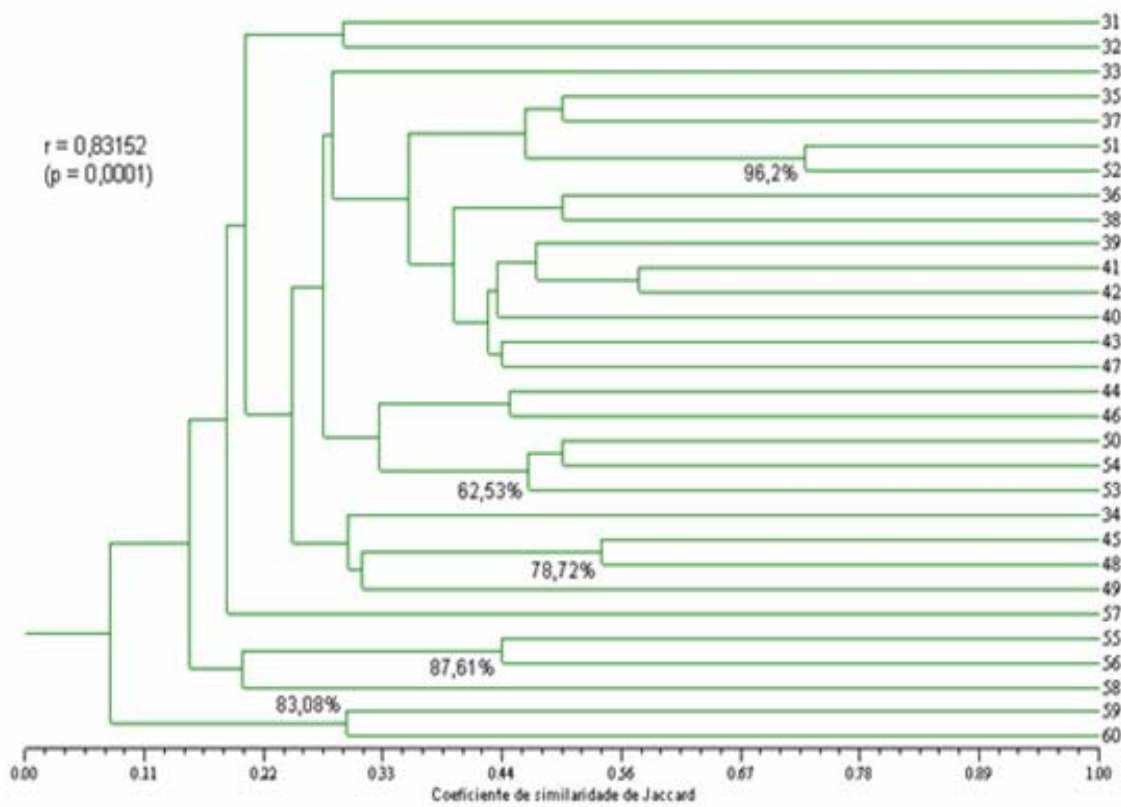


FIGURA 11 - DENDROGRAMA DE SIMILARIDADES GENÉTICAS ENTRE AS ÁRVORES AMOSTRADAS DE VASSOURÃO-BRANCO EM CURITIBA, PR.

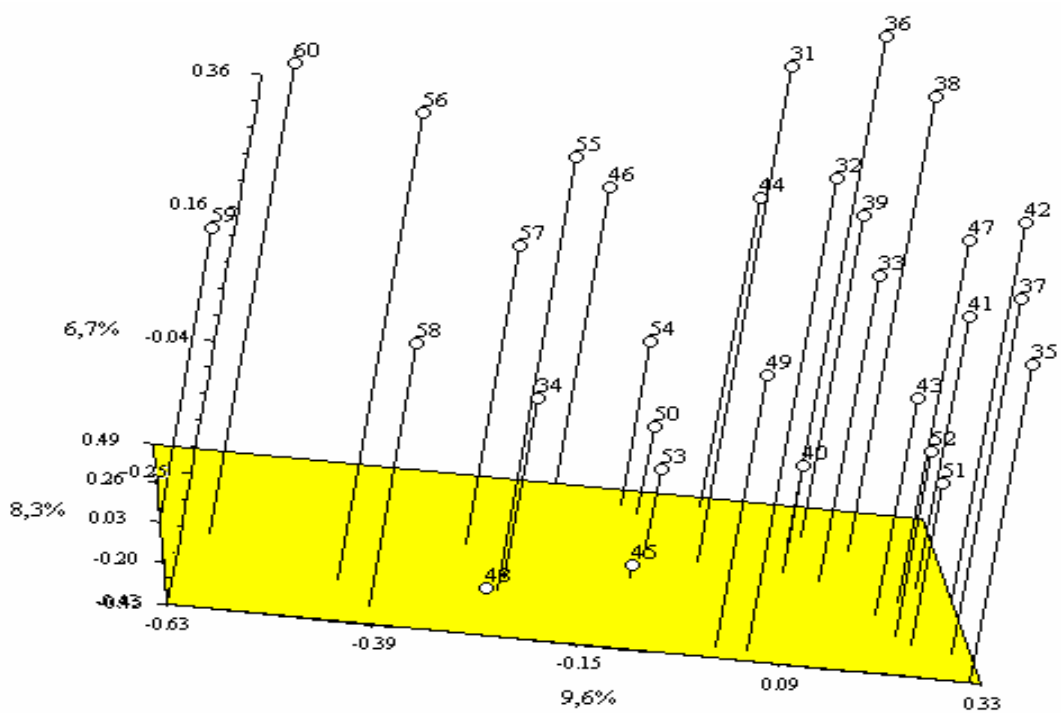


FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO TRIDIMENCIONAL DE VASSOURÃO-BRANCO BASEADA NAS SIMILARIDADES GENÉTICAS EM CURITIBA, PR.

Nesta população, ocorrem também indivíduos geneticamente bem distintos dos demais. Estes indivíduos são importantes para formação do lote de sementes com maior variabilidade genética.

A população de Curitiba (PR), igualmente às populações de São José dos Pinhais (PR) e Rio Negrinho (SC), a formação de agrupamentos de indivíduos com variados graus de parentesco, contudo esta população está em processo de diferenciação genética das populações acima mencionadas em decorrência do isolamento (Figuras 6 e 12).

O coeficiente de correlação ( $r = -0,22921$ ) entre as matrizes de similaridade genética e distâncias físicas das árvores amostradas, confirma a inexistência de qualquer relação entre estas duas variáveis na população de vassourão-branco de Curitiba (PR), a exemplo do que ocorre com as populações de em São José dos Pinhais (PR) e Rio Negrinho (SC).

A característica comum nas três populações, Curitiba, São José dos Pinhais e Rio Negrinho é no número de árvores que compõem os agrupamentos confirmando que nas populações naturais de vassourão-branco, cujos principais polinizadores são as abelhas e pequenos insetos com dispersão anemocórica, as distâncias de polinização e dispersão são pequenas, portanto propícias à criação de grupos de indivíduos aparentados.

As populações de algumas espécies arbóreas apresentam estruturas em forma de manchas onde as freqüências alélicas tendem a ser homogêneas e o parentesco interno apresenta-se acima do esperado pelas suposições de cruzamentos aleatórios, decorrente da distribuição das sementes próximas à árvore matriz. Os estudos com várias espécies florestais relatam que a maioria apresentam manchas com raio de até 100 metros, geralmente de 20 a 50 metros. O tamanho das manchas decorre da forma de dispersão das sementes (SEBBENN, 2002).

As recomendações de distância mínima de 100 metros entre árvores feitas

por Shimizu, Kageyama e Higa (1982) e Eldridge *et al.*, (1992), bem como de se utilizar a distância correspondente a duas vezes a altura da árvore como estratégia para evitar coleta de sementes de árvores aparentadas não pode ser aplicada na seleção de árvores-matrizes para coleta de sementes em populações de vassourão-branco, pois apresentam árvores fisicamente próximas e geneticamente dissimilares e fisicamente distantes e geneticamente similares, caracterizando uma distribuição espacial composta por indivíduos com variados níveis de parentesco independente da distância física.

As ressalvas feitas neste trabalho são respaldadas por Sebbenn (2002) ao afirmar que as recomendações acima não são aplicáveis a todas as espécies.

#### 4.5 COLETA DE SEMENTES EM POPULAÇÕES NATURAIS DE VASSOURÃO-BRANCO

##### 4.5.1 Seleção de árvores-matrizes

Segundo Palmberg (1985) e Gray (1990), para coleta de sementes em uma população de espécie florestal natural, deve ser feita quando a maioria das árvores-matrizes da população apresentem-se em fase de florescimento, para que seja evitado o risco de auto polinização indesejável, especialmente no caso de espécies que apresentam ausência de mecanismo de proteção ao cruzamento de indivíduos aparentados.

As recomendações dos autores supra mencionados não se aplicam às coletas em populações naturais de vassourão-branco, pois a espécie apresenta flores hermafroditas e estrutura populacional caracterizada por agrupamentos de indivíduos geneticamente próximos, assim como o florescimento não é sincronizado entre todas as árvores temporalmente, estabelecendo variadas combinações de trocas de gametas a cada ano, como constatado nas análises de variabilidade genética intra populacional.

O preceito de evitar-se coleta de sementes em árvores isoladas fisicamente,

deve ser analisado criteriosamente uma vez que o sistema reprodutivo da espécie apresenta altas taxas de auto-fecundação, entretanto a questão crucial é a distância do isolamento, uma vez que as árvores mais distantes dos agrupamentos familiares podem ser a única estratégia para obtenção de sementes com maior dissimilaridade genética e obviamente maior variabilidade genética na formação do lote de sementes.

A relação dissimilaridade genética e distância física é muito baixa tanto entre como dentro das populações naturais de vassourão-branco, assim a recomendação feita por Palmberg (1985) e Gray (1990) de 100 m entre árvores também não pode ser aplicado às coletas de semente em populações naturais de vassourão-branco, pela estrutura em agrupamentos de indivíduos com variados níveis de parentesco.

Segundo Palmberg (1985) e Eldridge *et al.*, (1992) a obtenção de lotes de sementes com diversidade genética, também é assegurada pela coleta em grande número de árvores, para coletas em populações naturais de vassourão-branco esta recomendação precisa ser bem planejada para que se evite coleta de sementes de vários indivíduos com alto grau de parentesco, assim como de populações distantes geograficamente, contudo próximas geneticamente.

O número de árvores recomendado para coleta de sementes visando a conservação genética em populações de espécie com cruzamentos mistos é de 25 árvores-matrizes (GRAUDAL *et al.*, 1997; SEBBENN, 2002).

Assim, mais do que o número de árvores, convencionado internacionalmente com sendo entre 20 e 30, a seleção das árvores seria mais estratégica para obtenção de maior variabilidade, uma vez que a característica desta espécie é formar agrupamentos de indivíduos aparentados, contudo a análise da dissimilaridade inicial deve ser ampliada para um tamanho efetivo de 50 árvores para que se obtenha de 20 a 30 árvores matrizes com o menor índice de similaridade genética possível.

A outra variável discutida por Sebbenn (2002) está relacionada com o



tamanho da área a ser florestada ou reflorestada, ou seja para um projeto de recomposição de 100 hectares, o material poderia ser originado de 25 árvores matrizes de um mesmo fragmento ou população com 150 indivíduos. A recomendação para plantios em áreas de 100 a 500 hectares, sugere-se que o tamanho efetivo populacional seja de 100 árvores-matrizes para coletas de 40 a 50 árvores, e para áreas de plantio superiores a 500 hectares um tamanho efetivo populacional de 1000 árvores-matrizes para coleta de 410 a 500 árvores-matrizes. As estratégias acima visam dirigir as coletas dentro de uma sistemática procedimental visando à obtenção de lotes de sementes com baixa taxa de endogamia e conseqüentes problemas de deriva genética nas gerações seguintes.

Os resultados obtidos com vassourão-branco demonstram que as condições ecológicas de cada população, o sistema reprodutivo, os agentes polinizadores e a forma de dispersão, são fatores determinantes da estrutura genética das populações naturais, agregado a estes fatores a ação antrópica produz situações particulares a cada população ou fragmento.

O número de árvores-matrizes como do tamanho efetivo em cada população, indiscutivelmente minimiza os efeitos indesejáveis da endogamia, contudo deve ser considerado como um componente importante da seleção das árvores-matrizes após o conhecimento da estrutura genética de cada uma das populações ou fragmentos escolhidos para coleta das sementes.

A base genética da população de cada espécie apresenta alelos raros e alelos comuns, sendo que a amostragem para ser representativa da população deve incorporar a máxima divergência genética para obtenção destes alelos comuns, pois são de suma importância para adaptação às condições ambientais. Os alelos raros dificilmente são amostrados pois implicaria em coletar sementes de todos os indivíduos de uma população (MARSHALL e BROWN, 1975).

A escolha de áreas ecogeográficas diferentes de ocorrência natural de uma espécie para coleta de sementes deve ser bem analisada, tendo em vista que

árvores da mesma espécie oriundas de populações estabelecidas sob diferentes condições ecológicas apresentarão diferenças genéticas decorrentes da adaptação a ambientes diferentes. Assim o plantio do material colhido em condições ecológicas diferentes da origem poderão apresentar assincronismo floral, problemas de sobrevivência e desenvolvimento, caracterizando exogamia.

A localização das populações de uma mesma espécie sob condições ecológicas diversas, como comprovado por vários estudos, deve ser bem interpretada, principalmente no aspecto relativo a sua vinculação com a localização geográfica, pois no caso da espécie em estudo a relação distância geográfica e dissimilaridade genética foi baixa.

A distribuição da variabilidade genética de uma espécie em zonas ecológicas bem definidas promove a base para uma coleta de sementes com a amostragem adequada.

Considerando os conceitos mencionados de que populações de uma mesma espécie, integrantes da mesma zona ecológica, apresentam baixo índice de dissimilaridade genética entre si, e conseqüentemente, que aquelas de condições ecológicas diferentes apresentam índices de dissimilaridade genética maiores teríamos duas zonas ecológicas diferentes para o vassourão-branco, uma composta pela população de Curitiba (PR) e outra composta pelas populações de São José dos Pinhais (PR) e Rio Negrinho (SC) em razão dos índices de similaridade genética entre as três populações.

Os estudos de sistemas reprodutivos, estrutura genética, fluxo gênico, distribuição espacial dos genótipos dentro das populações e as diferenças genéticas entre elas auxiliam o planejamento da coleta de lotes de sementes com variabilidade genética (SEBBENN, 2002).

A discussão e os subsídios oferecidos por vários autores mencionados neste trabalho, e os resultados obtidos, fortalecem a obrigatoriedade do conhecimento da estrutura genética populacional de espécies florestais nativas para coleta de

sementes e formação de lotes com índices adequados de variabilidade genética.

#### 4.5.2 Relação genética entre frutos nas árvores-matrizes

Os sistemas reprodutivos em populações naturais tem indicado que a correlação de paternidade em populações florestais é mais alta do que a esperada para as espécies com cruzamentos mistos, ou seja, auto fecundação e cruzamentos aleatórios, significando que parte das sementes produzidas por uma determinada árvore é originada de pólen de poucos genitores e podem apresentar diferentes graus de parentesco, desde meio-irmãos até irmãos completos de (SEBBENN, 2002).

Os trabalhos de Fowler (1965) com *Pinus resinosa* e de Patterson *et al.*, (2001) em *Eucalyptus globulus*, sob condições ecológicas diferentes, bem como envolvendo agentes dispersores e polinizadores igualmente diferentes, indicaram que existe uma relação de parentesco maior entre as sementes de um mesmo fruto e menor entre aquelas de frutos diferentes, indicando que as sementes devem ser retiradas de frutos diferentes de uma mesma árvore-matriz, o que normalmente acontece, especialmente em espécies com frutos pequenos como os de vassourão-branco. A posição dos frutos na árvore-matriz também é importante, revelando que se deve dar preferência aos frutos da copa das árvores, pois a chuva de pólen de outras árvores aumenta a probabilidade de cruzamento entre indivíduos, em contrapartida as flores da base tendem apresentar alta taxa de auto fecundação, favorecendo combinações homozigóticas e conseqüentemente a expressão da endogamia.

As condições expostas recomendam cautela ao inferir a repetição de tais mecanismos para o vassourão-branco.

## 5 CONCLUSÕES

A extração do DNA genômico das folhas de vassourão-branco foi eficiente, tendo-se obtido em média  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  de DNA por amostra, quantidade muito além da necessária por reação, com ótima qualidade, para execução da técnica de PCR-RAPD;

As dissimilaridades genéticas entre as populações de Rio Negrinho (SC) e Curitiba (PR) e entre São José dos Pinhais (PR) e Rio Negrinho (SC) foi moderada, contudo entre Curitiba (PR) e São José dos Pinhais (PR) foi grande.

A correlação entre a distância geográfica e dissimilaridade genética entre as populações foi baixa;

Não houve correlação entre a distância física e similaridade genética entre as árvores amostradas nas três populações;

A maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das populações de vassourão-branco;

As três populações estão estruturadas;

A seleção dos indivíduos para coleta de sementes de vassourão-branco deve pressupor a obtenção da maior dissimilaridade possível entre as árvores-matrizes, objetivando maior variabilidade genética na formação do lote de sementes;

As árvores mais dissimilares geneticamente dos agrupamentos devem ser consideradas, pois são importantes para obtenção de sementes com maior variabilidade genética na formação do lote de sementes.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As iniciativas de recomposição florestal com espécies nativas que ocorrem no país, salvo casos raros, não levam em conta a variabilidade genética das sementes e das mudas originadas destas, cujas conseqüências são imprevisíveis, do ponto de vista de sucesso no estabelecimento, crescimento e sobrevivência das espécies implantadas.

A inclusão da técnica de caracterização genética molecular por RAPD, como requisito obrigatório para comprovação dos níveis de variabilidade genética entre as populações naturais e entre as árvores-matrizes selecionadas para coleta das sementes entende-se compulsória. A técnica de RAPD distingui-se das demais por não requerer o conhecimento prévio do DNA molde para análise dos polimorfismos genéticos entre as árvores-matrizes, por isso deve ser incluída como requisito mínimo no processo de certificação da coleta de sementes em populações naturais de espécies nativas florestais.

As razões para adoção deste procedimento embasam-se nos inúmeros trabalhos que salientam a importância da variabilidade genética para as populações florestais, bem como os efeitos nocivos da endogamia como a redução da produtividade pelo aborto de flores e mortalidade das plantas, além de alterações negativas no fenótipo como a perda de forma, fertilidade e menor produção de sementes.

A iniciativa de uso da técnica de caracterização genética molecular por RAPD na seleção de árvores-matrizes, vem ao encontro da organização e qualificação da produção de propágulos florestais, em especial de espécies nativas, de modo que sejam disponibilizadas sementes e mudas com variabilidade genética, mantendo um sistema de certificação com credibilidade perante a comunidade

científica e os usuários nacionais e internacionais.

A proposição de inclusão da técnica acima mencionada como requisito legal decorre da ausência de procedimento que vise conhecer a variabilidade genética dos lotes de sementes de espécies nativas que estão sendo comercializados no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- AMOS, W.; BALMFORD, A. When does conservation genetics matter? **Heredity**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 257-265, Sept. 2001.
- ARAS, S.; DURAN, A.; YENILMEZ, G. Isolation of DNA for RAPD analysis from dry leaf material of some *Hesperis L.* specimens. **Plant Molecular Biology Report**, New York, v. 21, p. 461a-461f, Dec. 2003.
- AVISE, J. C. **Molecular markers: natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994. 511 p.
- AYALA, F.J.; KINGER, J.A. **Modern genetics**. Menlo Park: The Benjamin Cummings Co., 1984. 798 p.
- BAWA, K. S.; PERRY, D. R.; BEACH, J. H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. 1. Sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany**, Oklahoma, v. 72, n. 3, p. 331-345, 1985.
- BARNER, H. **Identification of sources for procurement of reproductive materials**. In: TRAINING COURSE ON FOREST SEED COLLECTION AND HANDLING, Chiang Mai, Thailand, 1975. **Report...** Rome: FAO: DANIDA, 1975. v. 2, p. 42-64.
- BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of diversity at allozyme locos. **Canadian Journal Forest Research**, Edmonton, v. 27, p. 415-424, 1997.
- BINNECK, E.; NEDEL, J. L.; DELLAGOSTIN, O. A. Análise de RAPD na identificação de cultivares: Uma metodologia útil? **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v. 24, nº 1, p.183-196, 2002.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal Human Genetics**, Boston, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BOULLI, A.; BAAZIZ, M.; M'HIRIT O. Polymorphism of natural populations of *Pinus halepensis* Mill. in Morocco as revealed by morphological characters. **Euphytica**, Wageningen, v. 119, n. 3, p. 309-316, 2001.
- BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **Legislação brasileira sobre sementes e mudas**: Lei n. 10.711, de 5 de agosto de 2003 e Decreto n. 5.153, de 23 de julho de 2004. Brasília, DF, 2004. 121 p.

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

CASTELLENN, M. da S. **Uso de marcadores RAPD e isoenzimáticos na quantificação da diversidade genética em populações naturais de *Esenbeckia leiocarpa* Engl.** 2000, 76 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba,

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003. 1039 p.

CHEUNG, W. Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B. S. **A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and others PCR analisys:** PCR methods an aplicacions. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. v. 3, p. 69-70.

COELHO, A. S. G. **Dboot:** avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias /similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores (software). Goiânia: Universidade Federal de Goiás: Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, 2000.

CROW, J. F. Mutation, mean fitness and genetic load. **Oxford Survival Evolutive Biology**, Oxford, v. 9, p. 3-42, 1993.

CROW, J. F.; KIMURA, M. A. **An introduction to population genetics theory.** New York: Harper and Row, 1970. 591 p.

CRUZ, R.P.C.; MILACH, S.C.K. Análise de RAPD. In: MILACH, S.C.K. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas.** Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 107-116.

DALLAS, J. F. Detection of DNA fingerprints of cultivated rice by hibridation with a human minisatélite DNA probe. **Proceeding of the National Academy of science of the United States of America**, Washington, DC, v. 85, p. 6831-6835, 1988.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 1, p. 19-20, 1983.

DEWEY, S. E.; HEYWOOD, J. S. Spatial genetic structure in a population of *Psychotria nervosa*. I. Distribution of genotypes. **Evolution**, Vantaa v. 42, p. 834-838, 1988.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Arlington, v. 12, p. 13-15, 1987.

DOYLE, J. J. DNA protocols for plants. In: G.HEWITT, G.; JOHNSON, A. W. B.; YOUNG, J. P. W. (Ed.). **Molecular techniques in taxonomy.** Local: NATO Advanced Science Institute Cell Biology, Orford, 1991. NATO ASI Series H, **Cell Biology**, v.57, 1991.



DUARTE, J.; SANTOS, J. B. dos; MELO, L. C. Comparison of similarity coefficients based on RAPD markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 419-426, Sept. 1999.

DUDLEY, J. W. Comparison of genetic distances estimators using molecular markers data. In: **Analysis of molecular marker data**. Corvallis: Oregon, 1994. p. 3-7.

DUKE, J. A. **Handbook of medicinal herbs**. Florida: CRC Press, 1989. 667 p.

ELDRIDGE, K.; DAVIDSON, J.; HARWOOD, C., WYK, G. van. **Eucalypt domestication and breeding**. Oxford: Science Publ., 1992.

ENNOS, R. A. Estimating the relative rate of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, Oxford, v. 72, p. 250-259, 1994.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M. de; MOURA, M. C. de O.; BOTREL, M. C.; MENDONÇA, E. G.; CARVALHO, D. de. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 70, p. 97-106, abr. 2006.

EXCOFFIER, N. C.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analyses of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Baltimore, v. 131, n. 2, p. 479-491, Jun. 1992.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FOWLER, D. P. Effects of inbreeding in red pine, *Pinus resinosa*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 14, p. 38-46, 1965.

FRANKEL, O. H.; BROWN, H. D.; BURDON, J. J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge: University Press, 1998. 299 p.

FREIRE, J. M.; PINÃ-RODRIGUES, F. C. M.; LIMA, E. R. de; SODRÉ, S. R. C.; CORRÊA, R. X. Estrutura genética de populações de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvu) por meio de marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 74, p. 27-35, jun. 2007.

FUTUYAMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; Brasília, DF: CNPq, 1992. 646 p.

GANDARA, F. B. **Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. Campinas, 1996, 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Campinas,

GEMAS, V.J.V.; ALMADANIM, M.C.; TENREIRO, R.; MARTINS, A.; FEVEREIRO, P. Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in

Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evaluation**, Witzzenhausen, n.51, p.501-511, 2004.

GILLIES, A. C. M.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J.; NEWTON, A. C.; HERNÁNDEZ, M.; WILSON, J.; CORNELIUS, J. P. Genetic diversity in mesoamerican population of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. **Heredity**, Oxford, v. 83, n. 6, p. 722-732, Dec. 1999.

GRAUDAL, L.; KJAER, E.; THOMSEN, A.; LARSEN, A. B. **Planning national programmes for conservation of forest genetics resources**. Humlebeak: DANIDA: Forest Seed Centre, 1997. 58 p. (Technical note, 48).

GRAY, R. **Professional Seed Collection**. In: SOWING THE SEEDS, DIRECT SEEDING AND NATURAL REGENERATION, Greening, 1990. **Conference proceedings...** Australia

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperatures sensitive mutations of adenoviruses: New York: Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology. **Plainview**, v. 39, p. 439-446, 1974.

GUSSON, E. **Uso e diversidade genética em populações naturais de biriba (*Eschweilera ovata* [Cambess.] Miers): subsídios ao manejo e conservação da espécie**. Piracicaba. 2003, 91f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 69, n. 10, p. 1685-1693, Oct.1982.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plants species. In: BROWN, A. H. D. et al. (Ed.). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Press, 1990. p. 43-63.

HANSEN, M.; HALLDÉN, C.; SÄLL, T. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. **Plant Molecular Biology Report**, New York, v. 16, p. 139-146, 1998.

HEDRICK, P. W. **Genetics of population**. Sudbury: Jones and Bartlett Publ., 1999. 552 p.

HUFF, D. R.; PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E.; RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchoe dactuloides* (Nutt.) Elgen), **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 86, p. 927-934, 1993.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENKOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 93-107, 2003.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: SIMPÓSIO DE ECOSSITEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3., 1993, Serra Negra. **Anais**. São Paulo, 1993. p. 115-125.

KAUNDUM, S. S.; PARK, Y. G. Genetic structure of six korean tea populations as revealed by rapid-pcr markers. **Crop Science**, Madison, v. 42, n. 2, p. 594-601, Mar./Apr. 2002.

KOELEWIJN, H. P.; KOSKI, V.; SAVOLAINEN, O. Magnitude and timing of inbreeding depression in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). **Evolution**, Vantaa, Finland, v. 53, n. 3, p. 758-768, 1999.

KRUSCHE, D.; GEBUREK, T. Conservation of forest gene resources as related to sample size. **Forest ecology and management**, Amsterdam, v. 40, p. 145-150, 1991.

KRZANOWSKI, W. J. **Principles of multivariate analysis: a user's perspective**. Oxford: Oxford Science, 1988. 563 p.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M.B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. Belo Horizonte- UFMG, **Lundiana**, v.3, nº 2, p.87-92, 2002.

LANDERGOTT, U.; HOLDEREGGER, R.; KOSLOWSKI, G.; SCHNELLER, J. J. Historical bottlenecks decrease genetic diversity in natural populations of *Dryopteris cristata*. **Heredity**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 344-355, Sept. 2001.

LELLES, J. G. de. **Adaptabilidade das madeiras de quatro espécies ocorrentes no sudoeste do Paraná, pouco conhecidas, na produção de compensados industriais**. 1977, 177 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

LEVIN, D. A.; KESTER, H. W. Gene flow in seed plants. **Evolutionary Biology**, Penryn, v. 7, p. 139-220, 1974.

LINK, W.; DIXKENS, C.; SINGH, M.; SCWALL, M.; MELCHINGER, A. E. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germoplasm revealed by RAPD markers. **Theoretical Applied in Genetics**, Berlin, v. 90, n. 1, p. 27-32, Jan. 1995.

LITT, M ; LUTY, J. A. A hipervariável microsatélite revelado por in vitro amplificação de um dinucleotídeo repetido dentro do gene da actina do músculo cardíaco. **American Journal of Human Genetics**, Bethesda, v. 44, p. 398-401, 1989.

LI, J. J.; PEI, G. L.; PANG, H. X.; BILDERBECK, A; CHEN, S. S.; TAO, S. H. A new method for RAPD primers selection based on primer bias in nucleotide sequence data. **Journal of Biotechnology**, Bielefeld, v. 126, p. 415-423, 2006.

LODHI, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Report**, New York, v. 12, p. 6-13, 1994.

MARSHALL, D. R.; BROWN, A. H. D. Optimum sampling strategies in genetics conservation. In: FRANKEL, O. H.; HOWKES, J. G. **Crop genetics resource for today and tomorrow**. London: Cambridge University Press, 1975. p. 53-80.

MATHER, W. R. **Princípios de genética quantitativa**. Ribeirão Preto: SBG, 1994. 137 p.

MOLINARI, H. B.; CROCHEMORE, M. L. Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. para análises PCR-RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, 2001.

MORAES, P. R. L. **Estrutura genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees e Martius Ex Ness (Lauraceae)**. 1997, 190 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas / Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro.

MOURA; E. F.; PINTO, J. E. B. P.; SANTOS, J. B. dos; LAMEIRA, O. A.; BERTOLUCCI, S. K. V. Diversidade genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) por meio de marcadores RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Melhoramento da qualidade de vida**: [anais]. Porto Seguro: SBMP, 2003. 1 CD-ROM.

MUCHUGI, A.; LENGKEEK, A.G.; KADU, C.A.C.; MULUVI, G.M.; NJAGI, E.N.M.; DAWSON, I.K. Genetic variation in the threatened medicinal tree *Prunus africana* in Cameroon and Kenya: Implications for current management and evolutionary history. **South Africa Journal of Botany**, Natal, n.72, p.498-506, 2006.

MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, San Diego, v. 55, p. 335-350, 1987.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided population. **Annals of Human Genetics**, London, v. 41, p. 225-233, 1977.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restrictions endonucleases. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, DC, v. 74, p. 5267-5273, 1979.

NEIGEL, J. E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review Ecology Systematics**, Palo Alto, v. 28, p. 105-128, 1997.

O'BRIEN, S. J.; EVERMANN, J. F. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 3, p. 254-259, 1988.

PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUNG, M. D.; BOOTON, G. C.; FUERST, P. A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, Washington, DC, v. 79, n. 2, p. 361-382, 1998.

PALMBERG, C. Sampling in seed collection. In: FAO. **Forest tree improvement**. Rome, 1985. p. 41-45. (FAO. Forestry paper, n. 20).

PATTERSON, B.; VAILLANCOURT, R. E.; POTTS, B. M. Eucalypts seed collectors: beware of sampling seedlots from low in the canopy. **Australian Forestry**, Melbourne, v. 64, n. 3, p. 139-142, 2001.

PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. Genetic variability by isozymes in populations of *Copaíba langsdorffii* desf. In two fragments of riparian forest. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 40-48, 2004.

POORTER, L.; BONGERS, F. **Ecology of tropical forests**. Holanda: Wageningen Agricultural University, 1993, 223 p.

POWEL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends of Plant Science**, Oxford, v. 1, p. 215-222, 1996.

PRATHEPHA, P.; BAIMAI, V. Genetic differentiation in Thai population of the rare species *Afgekia sericea* Craib (Leguminosae) revealed by RAPD-PCR assays. **Gene**, Napoli, v. 105, p. 193-202, 1999.

PROBER, S. M.; BROWN, A. H. D. Conservation of the grassy white box woodlands population genetics and fragmentation of *Eucalyptus albens*. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 8, n. 4, p. 1003-1013, Dec.1994.

REISCH, C. Molecular differentiation between coexisting species of *Taraxacum* sect. *Erythrosperma* (Asteraceae) from populations in south-east and west Germany. **Botanical Journal of The Linnean Society**, London, n.145, p.109-117, 2004.

REIS, A. M. M. **Distribuição da variabilidade genética em aroeira ( *Myracrodruon urudeuva*–Anacardiaceae) por marcadores RAPD e polimorfismo de seqüência de cpDNA**. 1999, 60 p. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

REIS, A. M. M. ; GRATTAPAGLIA, D. RAPD variation in a germoplasm collection of *Myracrodruon urudeuva* (Anacardiaceae), an endangered tropical tree: Recommendations for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Witzhausen, n.51, p.529-538, 2003.

REMINGTON, D. L.; O'MALLEY, D. M. Evaluation of major genetic loci contributing to inbreeding depression for survival and early growth in a selfed family of *Pinus taeda*. **Evolution**, San Francisco, v. 54, n. 5, p. 1580-1589, 2000.

RICKLEFS, R. E. Estruturas populacionais. In:\_\_\_\_\_. **A economia da natureza**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 236–246.

ROHLF, F. J. NTSYS-PC ver. 2.1 **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Stony Brook, 2000. p. 37.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 309 p.

ROTMAM, W.; BOYLE, T. J. Effects of logging and other forms of harvesting humid tropical forests. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Ed). **Forest conservation genetics, principles and practice**. Melbourne: CSIRO, 2000. p. 115-122.

SANTOS, R. P.; ANGELO, P. C. da S.; SAMPAIO, P. de T. B.; QUISEN, R. C.; LEITE, A. C. Alto grau de diversidade genética em populações naturais de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke), no Estado do Amazonas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL, 3.; ENCONTRO AMAZÔNICO DE CIÊNCIAS FLORESTAIS, 1., 2004, Manaus. **Livro de anais**. Manaus: INPA: UFAM, 2004. 1 CD-ROM.

SCHMIDT, K.; JENSEN, K. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. **American Journal of Botany**. Columbus, v. 87, p. 678-689, 2000.

SCHMIDT, L. **Guide to handling of tropical and subtropical forest seed**. Humlebaek: Danida Forest Seed Centre, 2000. 511 p.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000**: a software for population data analysis. (software). Geneva: University of Geneva: Genetic and Biometry Laboratory, 2000.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; ZANATTO, A. C. S. Estrutura genética de jequitibá-rosa (*Cariniana Legalis* (Mart.) O. Ktze) por caracteres quantitativos e isoenzimas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 121-134 jun.2001.

SEBBENN, A. M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamento com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 14, p. 115-132, 2002.

SEITZ, R.A. **Algumas características ecológicas e silviculturais do vassourão-branco (*Piptocarpha angustifolia* Dúsen)**. 1976. 114 f. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SERRA, A. G. P.; PAIVA, R.; PAIVA, E.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; PAIVA, P. D. de O. Estudo da divergência genética em castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) utilizando marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 18, n. 1, p. 42-47, 2006.

SHIMIZU, J. Y.; KAGEYAMA, P. Y.; HIGA, A. R. **Procedimentos e recomendações para estudos com progênies de essências florestais**. Curitiba: EMBRAPA-URPFCS, 1982. 34 p. (EMBRAPA-URPFCS, Documentos, 11).

SILVA, V. P. da. **Modificações microclimáticas em sistema silvipastoril com *Grevillea robusta* A. Cunn. ex R. Br. no Noroeste do Estado do Paraná**. 1998. 128 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- SILVERTOWN, J. W.; DOUST, J. L. **Introduction to plant population biology**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 1993. 210 p.
- SORK, V. L.; NANSON, J.; CAMPBELL, D.; FERNANDEZ, J. F. Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. **Trends Ecology and Evolution**, London, v. 13, n. 5, p. 219-224, 1999.
- SORENSEN, F. C.; MILES, R. Inbreeding depression in height, height growth and survival of Douglas-Fir, Ponderosa Pine and Noble Fir to 10 years of age. **Forest Science**, Bethesda, v. 28, n. 2, p. 283-292, 1982.
- SOUZA, S. A. C. D. **Avaliação da variabilidade genética em *Musa spp* utilizando marcadores microssatélites**. Piracicaba, 2002. 86 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- SUN, M.; WONG, K. C. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 88, n. 12, p. 2180-2188, Dec. 2001.
- TAYLOR, A. C.; KRAAIJEVELD, K.; LINDENMAYER, D. E. Microsatellite for the greater glider, *Petauroides volans*. **Molecular Ecology Notes**, Vancouver, v. 2, n. 1, p. 57-59, 2002.
- TELLES, M. **Diversidade genética e estrutura genética populacional de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) do Sudeste de Goiás**. Goiânia, 2000. 129 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- TORGGLER, M. G. F.; CONTEL, E. P. B.; TORGLER, S. P. **Isoenzimas: variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 186 p.
- VIDAL, R. A.; LAMEGO, F. P.; NUNES, A. L. Otimização do número de primer empregados em RAPD para detectar variabilidade genética entre acessos de picão-preto. **Scientia Agraria**, Piracicaba, v. 6, n. 1-2, p. 71-77, 2005.
- WANG, H.; QI, M. Q.; CUTLER, A. J. A simple method of preparing plant samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 21, p. 4153-4154, 1993.
- WAUGH, R. RAPD Analysis: use for genome characterization tagging traits and mapping. In: CLARK, M.S. (Ed.). **Plant Molecular Biology: a laboratory manual**. Germany: Springer-Verlag, 1997. p. 302-330.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primer. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 7213-7218, 1990.
- WHITKUS, R.; DOEBLEY, J.; WENDEL, J. F. Nuclear DNA markers in systematics and evolution. In: PHILLIPS, R. L.; VASIL, I. K. (Eds.): **DNA - based markers in plants**. 1994. p. 116-141.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6515, 1990.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, p. 395-420, 1951.

WYMAN, A. R.; WHITE, R. A highly polymorphic locus in human DNA. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, DC, v. 77, p. 6754-6758, 1980.

YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SHODA, M.; BAN, Y.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. Development of microsatellite in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). **Molecular Ecology Notes**, Vancouver, v. 2, n. 1, p. 14-16, 2002.

YEH, F. C.; CHONG, D. K. X.; YANG, R. C. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. **Journal of Heredity**, Carey, v. 86, n. 6, p. 454-460, Nov./Dec. 1995.

ZOGLAMI, N.; CHRITA, I.; BOUAMAMA, B.; GARGOURI, M.; ZEMNI, H.; GHORBEL, A.; MLIKI, A. Molecular based assessment of genetic diversity within Barbary fig (*Opuntia fucis indica* (L.) Mill.) in Tunisia. **Scientia Horticulturae**, Natal, South Africa, n. 2677, 8p. 2007.