

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA**

Aplicação de marcadores microssatélites na caracterização de recursos genéticos de *Tabebuia roseo-alba* conservados *ex situ* no Banco de Germoplasma da Floresta da USP de Ribeirão Preto

Marcelo Luís Lombardi Martinez

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

**Ribeirão Preto - SP
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

Aplicação de marcadores microssatélites na caracterização de recursos genéticos de *Tabebuia roseo-alba* conservados *ex situ* no Banco de Germoplasma da Floresta da USP de Ribeirão Preto

Orientado: Marcelo Luís Lombardi Martinez

Orientadora: Dra. Ana Lilia Alzate Marin

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Ribeirão Preto – SP
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Martinez, Marcelo Luís Lombardi

Aplicação de marcadores microssatélites na caracterização de recursos genéticos de *Tabebuia roseo-alba* conservados *ex situ* no Banco de Germoplasma da Floresta da USP de Ribeirão Preto, 2008.

126 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Comparada.

Orientador: Alzate-Marin, Ana Lilia.

1. Ipê-Branco. 2. SSR. 3. Primers heterólogos. 4. Conservação. 5. Diversidade Genética.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Marcelo Luís Lombardi Martinez

Aplicação de marcadores microssatélites na caracterização de recursos genéticos de *Tabebuia roseo-alba* conservados *ex situ* no Banco de Germoplasma da Floresta da USP de Ribeirão Preto

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dr (a): _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Laboratório de Genética Vegetal.

Apoio Financeiro

FAPESP e FAEPA



Dedico a meus pais e irmãos, que sempre acreditaram em meu esforço e na forma que encaro a vida, permitindo-me crescer e evoluir com o vigor de minhas crenças e de meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela proteção e por trilhar meu caminho, fazendo com que eu superasse todas as dificuldades para vencer mais esta etapa.

Ao Prof. Dr. Moacyr Antonio Mestriner por todo apoio, incentivo e pela confiança depositada em nosso laboratório.

À Profa. Dra. Ana Lilia Alzate Marin por ter acreditado na minha capacidade para a realização deste trabalho e também pela amizade, orientação e ensinamentos que me ajudaram a enxergar o trabalho de pesquisa com outros olhos e amadurecer tanto profissionalmente como pessoalmente.

Ao Prof. Carlos Alberto Martinez Y Huaman pela orientação inicial deste trabalho e pelas contribuições enriquecedoras nas correções dos artigos produzidos pelo Laboratório de Genética Vegetal (FMRP/USP).

Ao Dr. Alexandre Magno Sebbenn pelo apoio nas análises e interpretações dos dados e também no enriquecimento da discussão deste trabalho.

Ao Geógrafo e técnico do viveiro de mudas Antonio Justino da Silva, que acompanhou e orientou todas as coletas de campo e pôde me ensinar muito sobre as espécies florestais.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Genética Vegetal: Marcela, Juliana, Ronai, Matheus, Alison e Klaus pela amizade, companheirismo, auxílio nos experimentos, resumos, análises dos dados e também pelos momentos de descontração compartilhados ao longo desses dois anos. Agradeço em especial a Marcela C. Guidugli pelas inúmeras sugestões e comentários nas correções desta dissertação.

À Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, à Profa. Dra. Silvana Giuliatti e à Dra. Luciana Rossini Pinto pelas valiosas contribuições no exame de qualificação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada (FFCLRP/USP) e ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, onde todo o trabalho de laboratório foi realizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À CAPES pelo apoio financeiro para participações nos Congressos Brasileiro de Genética e Nacional de Botânica.

A todos os docentes do Departamento de Genética (FMRP/USP) e do Departamento de Biologia (FFCLRP/USP), sempre dispostos a contribuir com seus valiosos conhecimentos e amizade.

Aos amigos: Marcelo, Fernanda, Patrícia, Rick, Eduardo e André pelo apoio, incentivo e compreensão durante a minha ausência em alguns momentos durante esse período.

Agradeço à minha família por sempre estar presente, me apoiando e mostrando que quando se trabalha com amor e honestidade conseguimos alcançar nossos objetivos. Ao meu irmão Márcio em especial por me acompanhar mais de perto e poder dividir comigo as alegrias e tristezas e estar sempre pronto a me ajudar e me ouvir no que eu precisar.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

“Não temos mais árvores em cidades porque elas dependem de um investimento coletivo para mostrar seu efeito. Uma árvore plantada em uma cidade não faz diferença, mas o todo é composto de unidades, e por isso as pessoas preferem pensar que a árvore em frente à sua casa seria aquela que não faz diferença, não aquela que compõe o todo.”

Efraim Rodrigues

RESUMO

Martinez, Marcelo Luís Lombardi. **Aplicação de marcadores microssatélites na caracterização de recursos genéticos de *Tabebuia roseo-alba* conservados *ex situ* no Banco de Germoplasma da Floresta da USP de Ribeirão Preto.** 2008. 126 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O interior do Estado de São Paulo, anteriormente ocupado por matas semidecíduas e cerrado, hoje está praticamente tomado por diferentes culturas ou pastagens, restando apenas algumas pequenas manchas de cerrado e de mata, apontando para uma drástica perda do rico patrimônio genético florestal. A região de Ribeirão Preto é uma das mais devastadas do Estado de São Paulo, principalmente nas regiões próximas aos mananciais e indústrias de cana-de-açúcar e suas matas encontram-se hoje totalmente fragmentadas e reduzidas a 2 % de sua área original. Ante a urgência de se resgatar as espécies arbóreas nativas da flora regional, foi implantado o Projeto Floresta USP, no *campus* da USP de Ribeirão Preto, sendo 30 ha de reflorestamento heterogêneo e 45 ha correspondem ao Banco de Germoplasma (BG-USP/RP). *Tabebuia roseo-alba* (ipê-branco; Bignoniaceae) é uma das 44 espécies presentes nesse Banco pelo fato de ser pouco observada em condições naturais, necessitando de estudos que visem o entendimento da sua diversidade genética nos remanescentes florestais e no próprio BG-USP/RP para a adoção correta das estratégias de manejo e conservação. Os marcadores microssatélites são indiscutivelmente os mais indicados para este tipo de estudo, em razão de seu elevado conteúdo informativo, sua robustez analítica, transferibilidade e facilidade de obtenção de dados genéticos via PCR. Este estudo teve por objetivos analisar a diversidade genética de matrizes e progênies de *T. roseo-alba* e verificar a maternidade dessas progênies conservadas no BG-USP/RP, utilizando 10 pares de *primers* SSR transferidos de *Tabebuia aurea*. O DNA foi extraído de folhas de todos os indivíduos, as condições de amplificação e separação por eletroforese vertical em géis de poliacrilamida padronizadas e os géis corados com nitrato de prata. A partir dos dados gerados foram estimados parâmetros genéticos de diversidade com auxílio dos programas GDA 1.0, FSTAT 2.9.3, Cervus 3.0 e Structure 2.2.3. Houve um sucesso de 90% na amplificação das regiões microssatélites para os 10 locos SSR analisados, mas foram empregados neste estudo apenas 8 locos SSR, que estão em equilíbrio de ligação e apresentaram um valor médio de PIC altamente informativo (0,745). Nas matrizes e progênies do Banco analisadas foi observada uma alta riqueza alélica (85 e 96 alelos), e uma elevada diversidade genética (0,746 e 0,775), respectivamente, sendo que a heterozigosidade média observada foi menor que a esperada, evidenciando um déficit de heterozigotos. O índice de fixação para as matrizes de *T. roseo-alba* foi alto ($F_{is} = 0,638$) e significativamente diferente de zero ($P < 0,05$), sugerindo a atuação de algum fator gerador de endogamia como cruzamentos entre indivíduos aparentados, auto-fecundação, efeito Wahlund e a presença de alelos nulos segregando nestes locos. Adicionalmente, as progênies também apresentaram um alto valor de F_{is} (0,696), indicando que o sistema de cruzamento de *T. roseo-alba* deve ser o principal fator pelo alto coeficiente de endogamia. A análise conjunta dos locos tanto nas matrizes como nas progênies apresentou altas probabilidades de exclusão de paternidade, confirmando que esta bateria de locos tem alto potencial para estudos de análise de paternidade/maternidade em *T. roseo-alba*. Análises de maternidade mostraram que apenas 62 % das progênies de *T. roseo-alba* do BG-USP/RP têm sua origem materna identificada, mas o fornecimento de sementes para programas de reflorestamento não ficará comprometido uma vez que foram transferidos 95,3 % dos alelos das matrizes para as progênies do BG-USP/RP, contribuindo para a conservação *ex situ* desta importante espécie florestal.

Palavras-chave: Ipê-branco. SSR. Primers heterólogos. Conservação. Diversidade genética.

ABSTRACT

Martinez, Marcelo Luís Lombardi. **Application of microsatellite markers in the genetic resources characterization of *Tabebuia roseo-alba* conserved *ex situ* at the Germplasm Bank of the USP Forest in Ribeirão Preto – State of Sao Paulo, Brazil.** 2008. 126 f. Thesis (Master) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The State of Sao Paulo, originally covered with semideciduous forests and Brazilian savannah (Cerrado), is nowadays almost completely covered with different cultures or pastures. Therefore only some small forests and Brazilian savannah fragments remain, pointing to a drastic loss of the rich forest genetic patrimony. The Region of Ribeirão Preto is one of the most devastated areas within the State of Sao Paulo. Seite: 30 Especially areas that are located next to water sources and sugar cane plantations are affected. The original forests have nearly totally been fragmented and their actual extension has been reduced to about 2% of the original zone. The USP Forest Project has been implanted at the Sao Paulo University in Ribeirao Preto given the urgency to rescue the native forest species of the regional flora. There are 30 ha of heterogeneous reforestation and 45 ha that belong to the Germplasm Bank (BG-USP/RP). *Tabebuia roseo-alba* (White Tabebuia tree; Bignoniaceae) is one of the 44 species conserved at this Bank due to the fact that it is nowadays rarely encountered in the natural environment. There is na exigence of studies that aim at the agreement of its genetic diversity in the forest remnants and at the BG-USP/RP for the correct adoption of management and conservation strategies. Microsatellite markers are unquestionably indicated for this type of study because of their high information content, analytical robustness, transferability and easiness of genetic data attainment via PCR. This study aimed to analyze the genetic diversity of mother trees and their progeny individuals of *T. roseo-alba* and verify the maternity of these progeny individuals conserved at the BG-USP/RP, using 10 primer pairs SSR transferred from *Tabebuia aurea*. DNA was extracted from fresh leaves of all samples, the amplification and electrophoresis conditions were standardized and the polyacrilamyde gels stained with silver nitrate. Genetic parameters were estimated using the programs GDA 1.0, FSTAT 2.9.3, Cervus 3.0 and Structure 2.2.3. There was a 90% success in the amplification of the microsatellite regions for 10 loci SSR, but 8 loci SSR had been used in this study. These loci are in linkage equilibrium and presented an average PIC value highly informative (0.745). A high allelic richness was observed for the mother trees (85 alleles) and the progeny individuals at the Bank (96 alleles) and also a high genetic diversity (0.746 e 0.775, respectively), being that the H_o average was smaller than the H_e average, evidencing a heterozigote deficit. The fixation index for the mother trees of *T. roseo-alba* was high ($F_{is} = 0.638$) and significantly different from zero ($P < 0.05$)), suggesting the performance of some factor that caused endogamy such as crossings between related individuals, self-fertilization, the Wahlund effect and the null alleles presence segregating in these loci. Additionally, the progeny individuals also presented a high F_{is} value (0.696), indicating that the *T. roseo-alba* mating system might be the main factor for the high endogamy coefficient. The joint analysis of these loci in the mother trees and progeny individuals presented high paternity exclusion probabilities, confirming that this loci battery has a high potential for paternity/maternity analysis studies in *T. roseo-alba*. Maternity analyses showed that only 62 % of the *T. roseo-alba* progeny individuals at the BG-USP/RP have their maternal origin identified. The supplying with *T. roseo-alba* seeds for reforestation programs will not be endangered because 95.3 % of the mother tree alleles have been transferred to the progeny individuals at the BG-USP/RP, contributing to the *ex situ* conservation of this important forest species.

Keywords: White Tabebuia tree. Heterologous primers. SSR. Conservation. Genetic diversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Remanescentes florestais da Mata Atlântica no Brasil.....	25
Figura 2 - a) Remanescentes florestais e ecossistemas associados da Mata Atlântica no Estado de São Paulo. b) Remanescentes florestais da Mata Atlântica na região de Ribeirão Preto	27
Figura 3 - a) Área do reflorestamento heterogêneo do <i>Campus</i> da USP de Ribeirão Preto b) Área do bloco B do Banco de Germoplasma da USP de Ribeirão Preto.....	29
Figura 4 - a) Árvore adulta de <i>T. roseo-alba</i> b) Detalhe das flores c) Frutos d) Sementes aladas.....	31
Figura 5 - Aspecto externo da semente de <i>Tabebuia roseo-alba</i> , evidenciando as expansões aladas levemente assimétricas.....	32
Figura 6 - a) Metáfase mitótica de <i>T. roseo-alba</i> b) Cariótipo mitótico mostrando $2n = 40$ cromossomos.....	34
Figura 7 - a) Exemplos de microssatélites mono, di, tri e tetranucleotídeos. b) Mecanismo de <i>slippage</i> durante a replicação de DNA. c) Processo de <i>crossing-over</i> desigual durante a meiose.....	37
Figura 8 - a) Localização dos blocos A, B e C do BG-USP/RP, onde estão sendo conservadas as progênies analisadas na presente pesquisa, b) Região de coleta das matrizes de <i>T. roseo-alba</i> , que deram origem às progênies do BG-USP/RP	44
Figura 9 - Gel de poliacrilamida 10% contendo produtos de PCR multiplex dos <i>primers</i> Tau21 e Tau22 (canaletas 1-6), e <i>primer</i> Tau31 (canaletas 7-12)	54
Figura 10 - a) Localização das 84 matrizes de <i>T. roseo-alba</i> , que deram origem às progênies do BG-USP/RP	59
Figura 11 - Géis de poliacrilamida 10% para cada par de <i>primer</i> SSR empregado neste estudo com amostras de matrizes e progênies de <i>T. roseo-alba</i>	61
Figura 12 - Número de alelos totais, raros e privativos encontrados para as matrizes e progênies de <i>T. roseo-alba</i> analisadas neste trabalho	66

Figura 13 - Número de alelos por loco polimórfico de matrizes e progênies de <i>T. roseo-alba</i> no presente estudo.....	68
Figura 14 - Frequências alélicas em oito locos microssatélites polimórficos de matrizes e progênies de <i>T. roseo-alba</i>	69
Figura 15 - Similaridade genética das matrizes de <i>T. roseo-alba</i> consideradas neste estudo..	77
Figura 16 - Mapeamento das matrizes de <i>T. roseo-alba</i> agrupadas em 3 clusters: I, II e III ...	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Núcleo de repetição, seqüência, tamanho dos fragmentos descritos e número de acesso ao GenBank para os dez locos de <i>T. roseo-alba</i> analisados na presente pesquisa.....	47
Tabela 2 - Condições de PCR para os oito locos analisados na presente pesquisa (quantidade em µL para uma reação com volume final de 20 µL).....	48
Tabela 3 - Tamanho dos alelos em pares de base (pb), temperaturas de anelamento - T_a (°C) e número de alelos (A) para os 9 locos SSR transferidos de <i>T. aurea</i> para uma amostra de 36 árvores matrizes de <i>T. roseo-alba</i>	62
Tabela 4 - Probabilidades obtidas com o teste exato para a verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas matrizes e progênes de <i>T. roseo-alba</i> analisadas.....	64
Tabela 5 - Identificação das árvores matrizes de <i>T. roseo-alba</i> contendo alelos privativos pela amplificação de oito marcadores SSR	67
Tabela 6 - Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade das 84 matrizes de <i>T. roseo-alba</i>	73
Tabela 7 - Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade das 189 progênes de <i>T. roseo-alba</i>	73
Tabela 8 - Probabilidades de exclusão de paternidade para as matrizes e progênes de <i>T. roseo-alba</i> analisadas neste trabalho, considerando os oito locos SSR conjuntamente.....	78
Tabela 9 - Lista das progênes de <i>T. roseo-alba</i> com suas respectivas árvores mães, identificadas pelo Programa CERVUS 3.0.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SMA	Secretaria do Meio Ambiente
OMS	Organização Mundial da Saúde
BG-USP/RP	Banco de Germoplasma da USP de Ribeirão Preto
AL	Ala
DNA	Deoxyribonucleic acid
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSR	Single sequence repeats
PCR	Polymerase chain reaction
pb	pares de base
GPS	Global positioning system
S	Sul
O	Oeste
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
USP	Universidade de São Paulo
FFCLRP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
pH	potencial hidrogeniônico
PVP	polivinilpirrolidona
rpm	rotações por minuto
DO	densidade óptica
dNTP	desoxi-nucleotídeo trifosfatado
TEMED	tetrametiletenodiamina
PIC	polymorphic information content
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg

LISTA DE SÍMBOLOS

ha	hectare
°C	graus Celsius
%	porcentagem
km ²	quilômetro quadrado
°	grau
m	metro
cm	centímetro
mm	milímetro
µm	micrômetro
mg	miligrama
µL	microlitro
mL	mililitro
µg	micrograma
nm	nanômetro
U	unidade
mM	milimolar
µM	micromolar
g	grama
x_i	freqüências alélicas
X_{ii}	freqüências genotípicas
n_{ii}	número de homozigotos
n_{ij}	número de heterozigotos
i	alelo
n	número de indivíduos analisados
K	número de clusters
km	quilômetro
ng	nanograma
mA	miliamper
P	significância estatística
F_{is}	índice de fixação intrapopulacional
H_o	heterozigosidade observada
H_e	heterozigosidade esperada

IC	intervalo de confiança
A	número de alelos por loco
$\Pr(\text{Ex}_1)$	probabilidade de exclusão de paternidade para o primeiro parental
$\Pr(\text{Ex}_2)$	probabilidade de exclusão de paternidade para o segundo parental

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Fragmentação florestal e conservação da biodiversidade	20
1.2 Situação atual do Estado de São Paulo e Região de Ribeirão Preto	24
1.3 Reflorestamento e banco de germoplasma.....	28
1.4 Características da espécie florestal do estudo	30
1.4.1 Gênero <i>Tabebuia</i>	30
1.4.2 Espécie <i>Tabebuia roseo-alba</i>	31
1.5 Marcadores moleculares utilizados em espécies florestais	35
1.6 Características dos SSR.....	36
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo geral.....	42
2.2 Objetivos específicos	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Material vegetal, localização e mapeamento das árvores matrizes.....	43
3.2 Coleta e estocagem do material.....	45
3.3 Extração e quantificação de DNA.....	45
3.4 Marcadores genéticos empregados	47
3.4.1 Condições de amplificação para os marcadores SSR.....	48
3.5 Análise do produto amplificado	49
3.6 Coloração com nitrato de prata e secagem do gel.....	52
3.7 Determinação fenotípica	53
3.8 Análise dos dados.....	54
3.8.1 Estimativa do desequilíbrio de ligação.....	55
3.8.2 Caracterização da variação genética.....	55
3.8.3 Análise de similaridade genética das matrizes de <i>T. roseo-alba</i>	56
3.8.4 Análises de maternidade.....	56

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 Mapeamento das matrizes	59
4.2 Marcadores genéticos empregados	60
4.3 Análises genéticas das matrizes vs progênies de <i>T. roseo-alba</i>	63
4.3.1 Estimativa do desequilíbrio de ligação	63
4.3.2 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg	63
4.3.3 Caracterização da variação genética	65
4.3.4. Similaridade genética das matrizes de <i>T. roseo-alba</i>	76
4.3.5 Análises de maternidade	78
5 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS	86
ANEXOS	99
Anexo A	99
Anexo B	103
Anexo C	106
Anexo D	115
Anexo E.....	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fragmentação florestal e conservação da biodiversidade

O Brasil é, reconhecidamente, o país com a maior biodiversidade do planeta. Os recursos genéticos são uma parte bastante importante dessa biodiversidade e são definidos como o material genético de valor real ou potencial para o ser humano (Decreto legislativo n. 2 de 08.02.94 apud Walter, 2000). Os recursos genéticos vegetais compreendem plantas cultivadas e espécies silvestres com valor comprovado ou mesmo com elevado potencial agrícola, industrial ou medicinal que precisam ser urgentemente mantidos.

Populações naturais normalmente têm níveis altos de variação genética (Nevo, 1978), que é introduzida continuamente nas populações por mutação ou migração (fluxo gênico) de indivíduos de outras populações (Matioli, 2001). A mutação gênica é uma fonte de produção de variabilidade nova, uma vez que através dela surgem alelos novos. O fluxo gênico em plantas ocorre através de polens e/ou sementes transportados pela fauna e outros meios, de uma população para a outra; esse processo pode aumentar a variabilidade de uma população pela entrada de alelos anteriormente inexistentes na mesma, ou pela entrada de alelos já presentes, porém em frequências muito diferentes daquelas da população residente (Freitas & Bered, 2003).

Muitas espécies arbóreas possuem meios efetivos de dispersão de genes e com isso mantêm altos níveis de variação genética dentro das populações com pouca diferenciação genética entre populações (Hamrick et al., 1979; Hamrick, 1983; Loveless & Hamrick, 1984; Hamrick & Godt, 1990). Entretanto, diversidade genética e estrutura podem ser alteradas se a

fragmentação florestal modificar os padrões de dispersão de pólen e sementes (Foré et al., 1992).

O componente genético da biodiversidade é fundamental, pois é a variação genética que fornece o material básico para a seleção natural e, portanto, para a evolução de todas as espécies (Allcock et al., 1995). A conservação da biodiversidade representa um dos maiores desafios deste final de século, em função do elevado nível de perturbações antrópicas dos ecossistemas naturais, as quais podem ser muitas vezes irreversíveis às espécies predominantes nesses ambientes (Viana, 1995).

Dentre estas alterações, a redução dos habitats e o conseqüente desaparecimento de várias espécies comprometem o patrimônio genético nestes ecossistemas (Pinto et al., 2004; Collevatti et al., 2001).

A fragmentação florestal, uma das principais conseqüências das perturbações antrópicas, é um processo de formação de mosaicos de habitats, incluindo fragmentos de diferentes tamanhos, áreas agrícolas e urbanas (Collevatti et al., 2001). Esse processo introduz uma série de novos fatores na história evolutiva de populações naturais de plantas e animais.

Essas mudanças afetam de forma diferenciada os parâmetros demográficos de mortalidade e natalidade de diferentes espécies e, portanto, a estrutura e dinâmica de ecossistemas. No caso de espécies arbóreas, a alteração na abundância de polinizadores, dispersores, predadores e patógenos alteram as taxas de recrutamento de plântulas; como também os incêndios e mudanças microclimáticas alteram as taxas de mortalidade de árvores, atingindo de forma mais intensa as bordas dos fragmentos (Schellas & Greenberg, 1997; Laurance & Bierregard, 1997).

Os processos de desmatamento e fragmentação de florestas tropicais têm sido intensos nas últimas décadas. A devastação de florestas tropicais no mundo foi estimada em

9,4 milhões de hectares (ha) por ano, dos quais 2,3 milhões correspondem às florestas tropicais úmidas no Brasil (FAO, 2001).

A exploração intensiva da madeira e mudanças no uso da terra pela agricultura e ocupação urbana são os principais fatores responsáveis pela fragmentação do habitat (Salgueiro et al., 2004), que por sua vez isola reprodutivamente indivíduos que contêm uma pequena amostra do conjunto gênico da população original, podendo causar, a curto prazo, contínua perda de alelos (Souza, 1997), ou sua fixação, devido à deriva genética, o que significa ter as frequências gênicas afastadas daquelas da população original. O processo de deriva genética aleatória, por sua vez, ocorre em toda população, mas é tanto mais rápido quanto menor a população e apresenta numerosas conseqüências evolutivas, das quais a perda da variação genética dentro das populações merece especial ênfase (Futuyma, 1992).

A longo prazo, ainda pode haver um aumento da endogamia, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e acasalamentos entre indivíduos aparentados. A autofecundação é evitada em plantas por mecanismos de auto-incompatibilidade ou por dioiccia. Endogamia biparental é mais freqüente quando populações são pequenas ou quando exibem uma estrutura genética espacial. Esta estrutura é desenvolvida quando a dispersão de pólen e sementes é restrita (Ellstrand & Ellan, 1993). A perda do vigor decorrente da endogamia é conhecida como depressão endogâmica. A endogamia acarreta uma diminuição nos níveis de variação genética, submetendo as espécies a um potencial risco de extinção (Loveless & Hamrick, 1984).

Segundo Pinto et al. (2004), o processo de fragmentação propicia também o declínio das populações, uma vez que as tornam vulneráveis à depressão endogâmica, à mudança genética e a outros problemas associados ao tamanho reduzido da população. A quebra de interações ecológicas pode levar à instabilidade, resultando no desaparecimento de

genótipos, o qual compromete as futuras descendências (Kageyama e Patiño-Valera, 1985; Roche, 1987).

A perda de variabilidade genética ou erosão genética pode reduzir a aptidão individual da espécie, inviabilizando o remanescente populacional (Seoane et al., 2000), e limitando seu potencial evolutivo, podendo levar essas populações isoladas a um possível risco de extinção (Van Treuren, 1993; Futuyama, 1992).

Estudos genéticos visando o entendimento da estrutura genética das espécies existentes nos fragmentos florestais remanescentes são fundamentais para a escolha correta das estratégias de manejo e conservação a serem adotados (Kageyama, 1987, apud Seoane et al., 2000).

Trabalhos sobre diversidade genética em florestas têm mostrado diferenças significativas entre populações de diferentes regiões, o que implica na importância e necessidade de realizar trabalhos de conservação de espécies na sua região de origem (Gillies et al., 1997).

Embora o fenômeno da erosão genética possa ser irreversível, determinadas ações devem ser tomadas para prevenir ou minimizar as suas causas. Uma das ações é a conservação da variabilidade genética via formação de bancos de germoplasma (Faleiro, 2006).

Esses bancos podem ser classificados em bancos de base ou em bancos ativos. Os primeiros são aqueles em que se conserva o germoplasma em câmaras frias (conservação de 1 °C até -20 °C), *in vitro* (conservação de partes vegetais em meio de cultura de crescimento) ou em criopreservação (conservação em nitrogênio líquido a -196 °C), por longos prazos, podendo até mesmo ficar longe do local de trabalho do pesquisador (Veiga, 1999).

São considerados ativos aqueles que estão próximos ao pesquisador, nos quais ocorre o intercâmbio de germoplasma e plantios frequentes para caracterização, o que

proporciona a conservação apenas a curto e mediano prazo. Tais bancos ativos *in vivo* podem ser divididos em dois grupos: os bancos ativos de germoplasma *in situ*, que tratam do trabalho com germoplasma mantido no seu habitat natural, e os *ex situ*, mantidos fora do seu habitat natural (Veiga, 1999).

1.2 Situação atual do Estado de São Paulo e Região de Ribeirão Preto

A Mata Atlântica (Figura 1) é um complexo e exuberante conjunto de ecossistemas de grande importância por abrigar uma parcela significativa da diversidade biológica do Brasil, reconhecida nacional e internacionalmente no meio científico. Lamentavelmente, é também um dos biomas mais ameaçados do mundo devido às constantes agressões ou ameaças de destruição dos habitats nas suas variadas tipologias e ecossistemas associados.

Esse bioma, onde se iniciou todo o processo de colonização brasileira, encontra-se hoje totalmente fragmentado e reduzido a menos de 5 % de sua área original (Consórcio Mata Atlântica e Universidade Estadual de Campinas, 1992). Esses remanescentes florestais, na forma de pequenos fragmentos, encontram-se altamente perturbados, isolados e pouco protegidos (Viana, 1998).

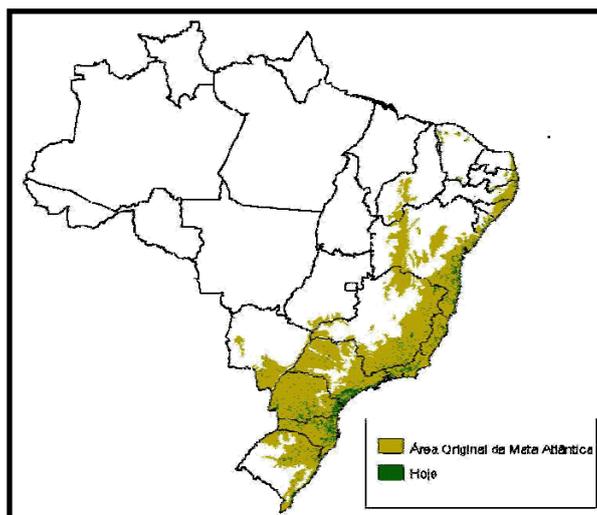


Figura 1. Remanescentes Florestais da Mata Atlântica no Brasil

A dinâmica da destruição foi mais acentuada nas últimas três décadas, resultando em alterações severas para os ecossistemas pela alta fragmentação do habitat e perda de sua biodiversidade. O resultado atual é a perda quase total das florestas originais e a contínua devastação dos remanescentes florestais existentes, que coloca a Mata Atlântica em uma posição negativa de destaque no mundo: como um dos conjuntos de ecossistemas mais ameaçados de extinção (SOS Mata Atlântica, 2008).

Apesar disso, a riqueza em biodiversidade pontual é tão significativa que o recorde mundial de diversidade botânica para plantas lenhosas foi registrado na Mata Atlântica, com 454 espécies em um único hectare do sul da Bahia, sem contar as cerca de 20 mil espécies de plantas vasculares, das quais aproximadamente 6 mil restritas ao bioma (SOS Mata Atlântica, 2008).

O interior do Estado de São Paulo, anteriormente ocupado por matas semidecíduas e cerrado, hoje está praticamente tomado por diferentes culturas ou pastagens, restando apenas algumas pequenas manchas de cerrado e de mata. Como conseqüências verifica-se a exaustão do solo, o assoreamento de cursos d'água e de nascentes e a destruição da biodiversidade, que aponta para a drástica perda do rico patrimônio genético florestal

(Projeto Floresta da USP, 2006). De acordo com um levantamento do Instituto Florestal de São Paulo, restam apenas 13,24 % da cobertura vegetal natural paulista, o equivalente a 3,46 milhões ha, ou 34,6 mil km². Hoje são claras as conseqüências dos avanços econômicos e tecnológicos os quais provocaram a destruição da mata natural, que já ocupou 83 % do território paulista (Zorzetto et al., 2003) (Figura 2a).

No entanto, com os avanços da política ambiental, a população tem se conscientizado em relação aos problemas do meio ambiente, levando a uma crescente procura por espécies florestais nativas, com o intuito de reflorestar áreas degradadas (Silva et al., 1997).

As pesquisas sobre recuperação das áreas degradadas no Estado de São Paulo, considerando, sobretudo, a conservação e/ou restauração da biodiversidade, associadas aos processos de licenciamento ambiental e o estímulo aos programas de reflorestamento, constituem hoje um dos desafios estabelecidos nos principais programas de políticas públicas da Secretaria de Estado do Meio Ambiente de São Paulo. Diretrizes norteadoras do processo de repovoamento florestal heterogêneo no Estado (ver Resoluções SMA 21, de 21/11/2001; SMA 11, de 25/04/2002; SMA 15, de 04/04/2002 e Portaria conjunta CINP/CPRN, de 11/06/2002) têm sido promovidas visando à conservação de espécies vegetais, especialmente arbóreas de ocorrência regional (Barbosa, 2002).

De acordo com o SOS Mata Atlântica (2008), o desflorestamento no Estado de São Paulo (Figura 2a) entre os anos de 2000 e 2005 foi 91 % menor quando comparado ao período de 1995 a 2000. Apesar da queda da taxa de desflorestamento no atual período, os valores brutos continuam elevados, especialmente levando-se em conta os altos índices de desflorestamento identificados desde 1985.

A região de Ribeirão Preto (Figura 2b) é uma das mais devastadas do Estado de São Paulo, principalmente nas regiões próximas aos mananciais e indústrias de cana-de-

açúcar, restando somente pequenas manchas de cerrado, cerradão e floresta mesófila semidecídua. O início do desmatamento na região coincide com a formação das primeiras fazendas de café do século 19 e prosseguiu com a produção de álcool e açúcar, além de carvão. Hoje o município possui apenas 2,0 % (1.281 km²) de sua superfície florestada, sendo que a área original da Mata Atlântica já foi de 56.013 km² (SOS Mata Atlântica, 2008). Dentro do perímetro urbano da cidade existe uma pequena reserva de mata já muito alterada, tombada pelo Estado, chamada de Mata Santa Tereza, e uma pequena área verde na região central da cidade, o Bosque Municipal.

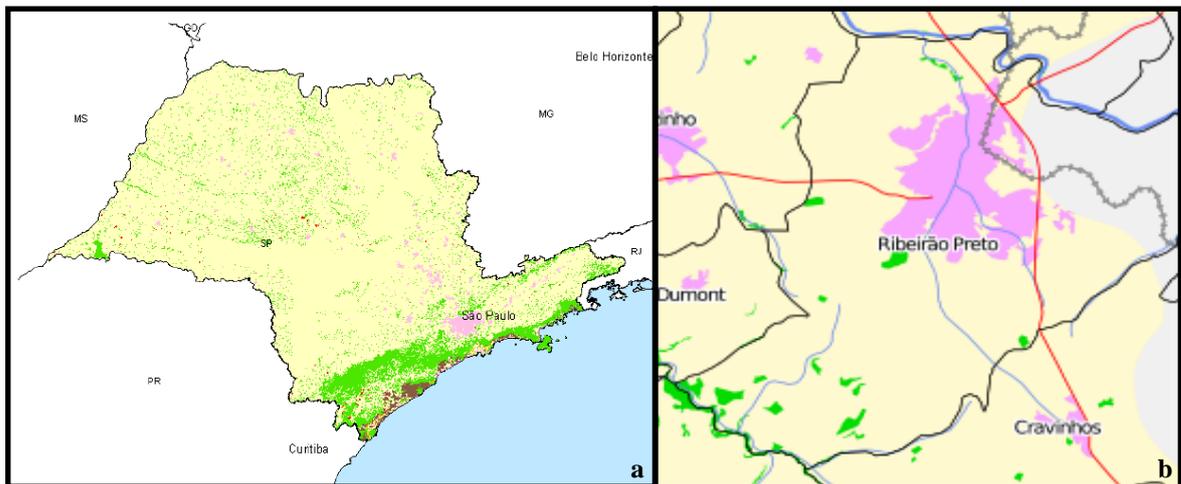


Figura 2. a) Remanescentes florestais e ecossistemas associados da Mata Atlântica no Estado de São Paulo. b) Remanescentes florestais da Mata Atlântica na região de Ribeirão Preto (modificado de SOS Mata Atlântica, 2008)

A manutenção da biodiversidade remanescente é hoje um desafio para todos nós, pois não sabemos quais espécies individuais são críticas para a sustentabilidade dos ecossistemas (Burton et al., 1992).

1.3 Reflorestamento e banco de germoplasma

A adoção de medidas que promovam a regeneração da flora nativa remanescente do Estado de São Paulo e o aumento da fiscalização para inibir as queimadas destinadas a limpar o solo permitiriam à vegetação natural chegar aos níveis do início dos anos 60. Nessa época, a Mata ocupava quase um terço do Estado, algo próximo do mínimo exigido pela legislação ambiental, que determina que as propriedades rurais preservem 20 % da cobertura vegetal nativa, além da vegetação à margem dos rios, as chamadas matas ciliares, e dos topos de morros (Zorzetto et al. 2003).

Programas de reflorestamento podem contribuir para a recuperação das matas e dos campos naturais e a manutenção de recursos genéticos vegetais pode ser efetuada por meio do estabelecimento de áreas de proteção e pela coleta e manutenção desses materiais os quais passam a ser denominados germoplasma (Hoshino et al., 2002).

Ante essa necessidade e visando resgatar 44 espécies arbóreas da Mata Estacional Semidecidual nativas da região de Ribeirão Preto, iniciou-se em 1997, a implantação do Projeto Floresta da USP de Ribeirão Preto, o qual inclui uma área de 30 ha para o reflorestamento heterogêneo (Figura 3a) e outra de 45 ha para o Banco de Germoplasma (BG-USP/RP) (Figura 3b). Depois de totalmente formada, a floresta deve contribuir com 20% a mais no índice de arborização da cidade.

Além disso, através da iniciativa do “Projeto Floresta da USP de Ribeirão Preto”, a implantação de um Centro Regional de Referência Florestal está sendo iniciada dentro do *campus* da USP/RP, o qual proporcionará troca de informações, experiências e difusão de métodos de restauração florestal.



Figura 3. a) Área do reflorestamento heterogêneo do *Campus* da USP de Ribeirão Preto b) Área do bloco B do Banco de Germoplasma da USP de Ribeirão Preto

Estas 44 espécies conservadas no BG-USP/RP fazem parte da lista de espécies a serem utilizadas no reflorestamento do Estado de São Paulo de acordo com resolução SMA-21, de 21/11/2001, artigo 4 da Secretaria do Meio Ambiente (Barbosa, 2002). O BG-USP/RP será utilizado como futura área fornecedora de sementes de origem conhecida e qualidade garantida para a implantação de reflorestamentos junto às unidades rurais da região e do Estado.

As fases de implantação do Banco foram realizadas respeitando os estádios sucessionais (pioneiras, secundárias e climácicas) baseados na proposta de Kageyama et al. (1992) e de acordo com as normas de recuperação de áreas degradadas (Barbosa, 2002), com a colaboração da Fundação Florestal de São Paulo pertencente à Secretaria do Meio Ambiente.

No entanto, a manutenção adequada de bancos de germoplasma depende, em grande parte, da avaliação e caracterização da variabilidade genética contida nos mesmos. Esta avaliação contribui para prevenção de possíveis perdas genéticas, como as que podem acontecer durante as multiplicações dos acessos coletados e, possibilitam o estabelecimento dos sítios ou áreas de coletas que contenham maior variabilidade, auxiliando assim na planificação de novas coletas (Hoshino et al., 2002).

Por isso, visando estudar a variabilidade genética do BG-USP/RP, dados moleculares têm sido obtidos para as espécies florestais *Copaifera langsdorffii*, *Hymenaea courbaril* e *Eugenia uniflora* cujas progênes estão sendo conservadas nesse Banco (Soriani, 2005; Feres, 2006; Mayor, 2007). No presente trabalho pretende-se estudar a espécie florestal *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sandwith, 1954 (Bignoniaceae), cujas progênes também estão sendo conservadas nesse banco genético.

1.4 Características da espécie florestal do estudo

1.4.1 Gênero *Tabebuia*

O gênero *Tabebuia*, pertencente à família Bignoniaceae, compreende cerca de 100 espécies de árvores e arbustos neotropicais, ocorrendo desde os 28° de latitude norte (Sonora e Chihuahua, México e Ilhas Bahamas) até o norte da Argentina e Uruguai (Gentry 1973, 1992), apresentando flores de diferentes colorações.

Muitas das espécies arbóreas do gênero *Tabebuia*, vulgarmente denominadas de ipê, são nativas do Brasil e apresentam grande importância econômica, com grande valor ornamental, medicinal e madeireiro (Lorenzi, 2002; Carvalho, 1994). As espécies deste gênero pertencem ao grupo ecológico das secundárias tardias (Ferretti et al., 1995) e o nome vulgar de cada espécie é complementado pela coloração das flores, que pode ser branca, amarela, rosa ou roxa.

A maioria das espécies de *Tabebuia* caracteriza-se pela floração sazonal, com produção maciça de flores durante 3 a 10 semanas, ou por floração explosiva durante apenas alguns dias - florações dos tipos "cornucopia" e "big-bang", respectivamente, segundo a classificação proposta por Gentry (1974).

Os ipês são extremamente ornamentais, e nos últimos anos têm sido utilizados na arborização de ruas e parques e em reflorestamentos destinados à recomposição de vegetação arbórea, e a sua madeira pode ser empregada na construção civil. Embora seja uma espécie de grande valor, existem poucas informações a respeito de sua biologia reprodutiva e diversidade genética (Lorenzi, 1992).

Dentre as espécies nativas do Brasil mais cultivadas, *T. roseo-alba* é a única que produz flores brancas (Maeda & Matthes, 1984) (Figura 4).

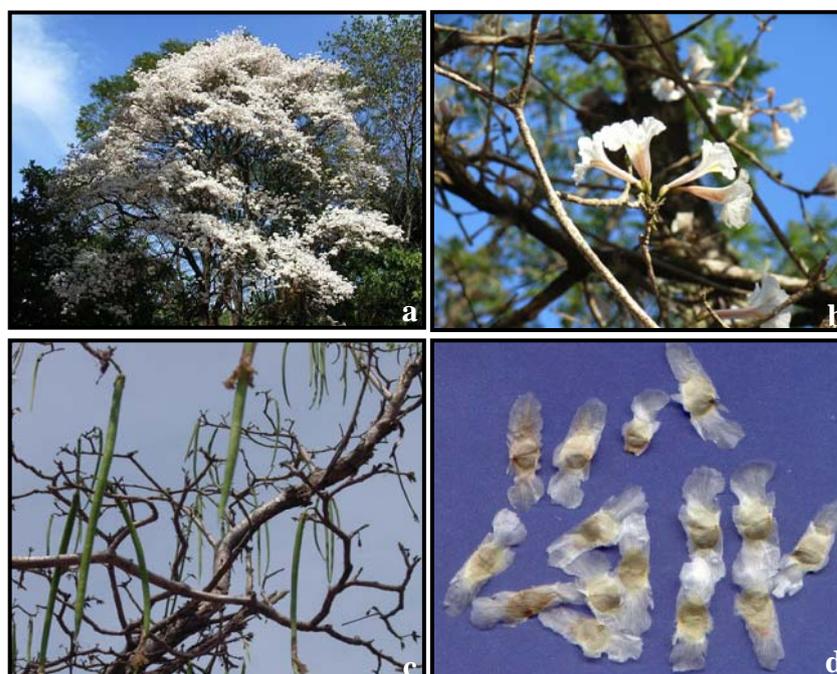


Figura 4. a) Árvore adulta de *T. roseo-alba* b) Detalhe das flores c) Frutos d) Sementes aladas

1.4.2 Espécie *Tabebuia roseo-alba*

Tabebuia roseo-alba é uma espécie decídua, heliófita e seletiva xerófila, característica de florestas estacionais semidecíduais, ocorrendo nos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Norte de São Paulo, podendo ainda ocorrer em alguns Estados do Nordeste, tanto no interior da mata primária como nas formações

secundárias. A espécie apresenta crescimento muito lento e é particularmente encontrada em terrenos secos, pedregosos e encostas com afloramentos rochosos (Árvores úteis – ESALQ, 2006; Lorenzi, 2002).

Conhecida popularmente como ipê-branco, taipoca (GO), piuxinga (MS), pau-d'arco ou ipê-do-cerrado, esta espécie possui árvores de médio porte que variam de 7 a 16 m de altura, troncos retos de 40-60 cm de diâmetro e casca castanho-amareladas com escamas irregulares.

Os ramos jovens são revestidos de pêlos e as folhas são compostas, trifolioladas, com longo pecíolo, folíolos ovais ou oval-oblongos, levemente pubescentes em ambas as faces. As flores são grandes, brancas ou rosadas enquanto os frutos são em forma de cápsula arredondada, muito longa e fina, com numerosas sementes aladas (Árvores úteis – ESALQ, 2006).

As sementes de *T. roseo-alba* (Figura 5) são cordiformes e apresentam uma leve assimetria nas alas, com diâmetro médio de $2,284 \text{ cm} \pm 0,311$ com alas e $0,923 \text{ cm} \pm 0,167$ sem alas, não sendo detectada poliembrionia (Ortolani, 2007). A assimetria das alas das sementes é uma característica favorável na dispersão anemocórica, pois proporciona maior distância percorrida pelas sementes (Oliveira et al., 2006). No entanto, dificulta a coleta das mesmas para estudos científicos (Fonseca et al., 2005).

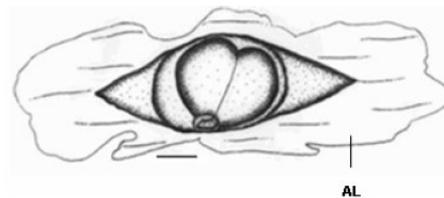


Figura 5. Aspecto externo da semente de *Tabebuia roseo-alba*, evidenciando as expansões aladas levemente assimétricas (AL = ala). Barra = 5 mm (modificada de Ortolani, 2007)

O processo reprodutivo de *T. roseo-alba* inicia-se por volta dos 10 anos. A floração ocorre geralmente no período de agosto a novembro, quando a planta está despida de sua folhagem, e a frutificação, logo em seguida, entre os meses de setembro e dezembro. As sementes cuja produção anual é alta são rapidamente dispersas pelo vento após a abertura natural dos frutos (Flora Tietê, 2006). A germinação das sementes é indiferente à luz, com a faixa de temperatura ótima entre 20 e 30 °C (Santos et al., 2005). A curta longevidade natural das sementes de ipê está ligada à pequena quantidade de substâncias de reserva armazenadas na semente (Kageyama & Marquez, 1981) e ao elevado teor de óleo em sua composição química.

Como a espécie apresenta-se exuberante durante sua floração, é amplamente utilizada para paisagismo - como ornamental e na arborização de ruas e avenidas, dado ao seu médio porte. Essa exuberância é dada não somente pela floração, que pode ocorrer mais de uma vez por ano, mas também pela folhagem densa de cor verde azulada e forma piramidal da copa (Lorenzi, 2002).

Diversas espécies de aves, abelhas e insetos visitam as flores de *T. roseo-alba*, mas não podem ser considerados polinizadores efetivos. Mendonca & Anjos (2005) observaram a presença da espécie de beija-flor *Hylocharis chrysura* em flores de *T. roseo-alba* no *campus* da Universidade Estadual de Londrina. Um trabalho realizado em matas de galeria por Oliveira & Paula (2001), afirma que indivíduos de *T. roseo-alba* são polinizados por abelhas grandes. Observações realizadas por Feres, JM (comunicação pessoal) em indivíduos reprodutivos de *T. roseo-alba* do *Campus* da USP/RP, mostram que *Apis mellifera* é um dos polinizadores desta espécie.

A madeira do ipê-branco é moderadamente pesada, macia, com superfície lustrosa, de boa qualidade e ótima durabilidade em ambientes internos, sendo usada na

construção civil para assoalhos e vigamentos; na construção naval e em obras externas como postes, mourões e esteios (Árvores úteis – ESALQ, 2006; Lorenzi, 2002).

Devido à sua fácil adaptação, o ipê-branco pode ser empregado também em reflorestamentos protetivos de terrenos secos e pedregosos, em regiões livres de geadas, com a finalidade de recomposição da vegetação arbórea (Flora Tietê, 2006; Lorenzi, 2002).

T. roseo-alba é uma espécie diplóide apresentando $2n = 40$ cromossomos (Figura 6), cujo tamanho médio é de $1,093 \mu\text{m} \pm 0,124$, podendo variar de $0,67 \mu\text{m}$ até $1,74 \mu\text{m}$ (Ortolani, 2007).

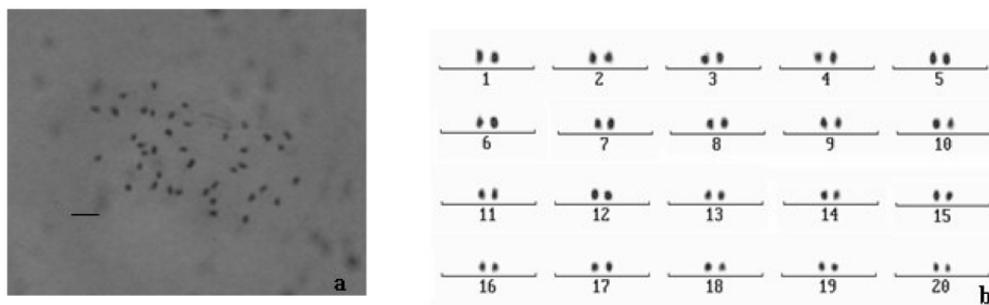


Figura 6. a) Metáfase mitótica de *T. roseo-alba* b) Cariótipo mitótico mostrando $2n = 40$ cromossomos. Barra = $3\mu\text{m}$ (modificado de Ortolani, 2007)

Estudos genéticos visando à análise da estrutura populacional de *T. roseo-alba* são de grande importância para auxiliar nas decisões de manejo e conservação da sua diversidade. O conhecimento da distribuição da variação genética entre e dentro de populações é de fundamental importância quando a espécie for manipulada geneticamente, dado que o sucesso de um método de seleção, visando o melhoramento genético, ou a amostragem visando à conservação dependerá da magnitude da variação genética disponível na população e do sistema reprodutivo da espécie (Fonseca, 1982).

Segundo um recente levantamento feito por Henriques (2003), na região de Ribeirão Preto, a espécie foi encontrada apenas em locais não naturais, ou seja, áreas nas

quais o ipê-branco foi utilizado para ornamentação, preferencialmente em locais particulares, o que demonstra a importância da conservação dessa espécie na região.

Apesar de sua versatilidade ecológica e vasta aplicação econômica, ainda não existe informação sobre a estrutura genética populacional de *T. roseo-alba* e não existem dados acerca da quantidade e distribuição da diversidade genética a nível intraespecífico. Portanto, é importante, tanto para os programas de conservação genética como para o manejo florestal, conhecer o modo como a variabilidade genética está partilhada dentro e entre populações, o fluxo gênico, a endogamia e o tamanho efetivo populacional.

1.5 Marcadores moleculares utilizados em espécies florestais

Marcadores moleculares vêm sendo utilizados em espécies florestais desde os anos 80, quando isoenzimas permitiram realizar os primeiros estudos de sistemas de cruzamento em pomares de sementes e produzir as primeiras versões de mapas genéticos de coníferas (Adams & Joly, 1980).

A análise genética de espécies florestais progrediu essencialmente com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgindo diversos métodos de detecção de maior polimorfismo genético no DNA, usando-se marcadores moleculares. Esses marcadores são obtidos diretamente do DNA e referem-se às diferenças entre indivíduos nas suas seqüências de nucleotídeos ao longo da fita de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para verificar a variabilidade genética a nível de DNA, começando com os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) no final dos anos 80 e início dos anos 90 (Devey, 1991; Bradshaw, 1994; Byrne et al., 1995), seguidos de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Carlson et al., 1991; Grattapaglia e Sederoff, 1994) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Gaiotto

et al., 1997; Marques et al., 1998), microssatélites (Brondani et al., 1998; Byrne, 1996) e, mais recentemente, polimorfismos de base individual (SNP) (Williams et al., 2000; Brown et al., 2004; Gonzales-Martinez et al., 2006).

Estes marcadores podem diferir com respeito a características importantes como, abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro (Buso et al., 2003).

Entre os marcadores moleculares mais adequados para estudar a estrutura de populações estão os marcadores microssatélites ou seqüências simples repetidas (SSR) que se tornaram uma ferramenta útil na construção de mapas genéticos, análise de paternidade, fluxo gênico, diagnóstico de doenças, investigação forense, análise populacional, estudos ecológicos e biologia da conservação (Chase et al., 1996).

No caso de espécies florestais, em geral altamente heterozigotas e diplóides, os marcadores microssatélites são indiscutivelmente os mais indicados, em razão de seu elevado conteúdo informativo, sua robustez analítica e transferibilidade (Borém, 2007).

1.6 Características dos SSR

Os microssatélites formam uma classe de DNA caracterizada por seqüências com 1 a 6 nucleotídeos, repetidas em *tandem* e apresentando uma alta taxa de mutação, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração (Eisen, 1999). Estas repetições surgem provavelmente do deslizamento da DNA polimerase (*strand-slippage*) durante a replicação do DNA (Figura 7a), da recombinação (*crossing-over*) desigual durante a meiose (Figura 7b) ou do alinhamento incorreto das fitas de DNA. O polimorfismo alélico ocorre em um loco SSR devido a mudanças no número de repetições (Buso et al., 2003).

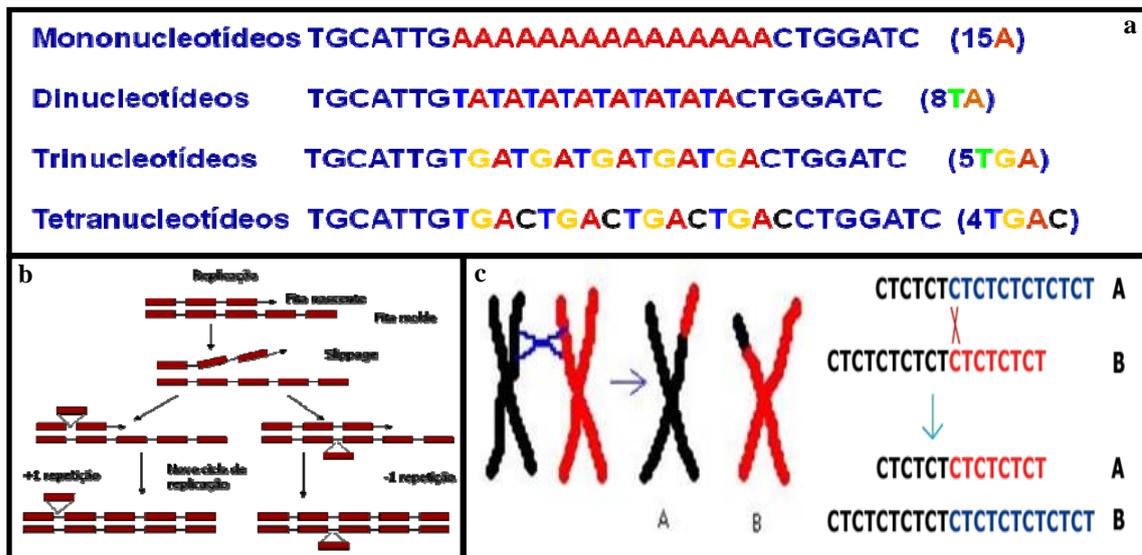


Figura 7. a) Exemplos de microssatélites mono, di, tri e tetranucleotídeos. b) Mecanismo de *slippage* durante a replicação de DNA. c) Processo de *crossing-over* desigual durante a meiose

Estas seqüências são encontradas tanto em animais quanto plantas, constituindo-se na classe mais polimórfica de marcadores (Ferreira & Glattapaglia, 1995). O genoma de plantas contém, em média, dez vezes menos microssatélites do que o genoma humano (Powel et al., 1996 apud Buso et al., 2003). A repetição $(CA)_n$ é raramente encontrada em plantas, mas ocorre com freqüências em animais. As repetições mais comuns em plantas são $(AT)_n$, $(GA)_n$, $(AC)_n$, $(AAT)_n$ e $(AAC)_n$ (Wang et al., 1994; Gupta & Varshney, 2000).

As unidades de repetição dos microssatélites são geralmente mono-, di-, tri- ou tetranucleotídeos. Segundo Oliveira et al. (2006), os microssatélites são classificados de acordo com o tipo de seqüência repetida, podendo ser perfeitos (a seqüência repetida não é interrompida por nenhuma base), imperfeitos (há um par de bases dentro do *motif* de repetição), interrompidos (há uma pequena seqüência de bases dentro da seqüência repetida do microssatélite) e compostos (há duas seqüências repetidas distintas adjacentes).

Muitos locos microssatélites estão localizados entre genes ou dentro de íntrons, sendo extremamente abundantes em todo o genoma. Devido a esta distribuição preferencial nas regiões não codificadoras, os microssatélites podem não sofrer ação da seleção natural, o

que os torna seletivamente neutros e muito úteis para estudos de genética de populações naturais (Eisen, 1999). Entretanto, atualmente sabe-se que a expansão no número de repetições pode causar doenças humanas (como a de Huntington) além de desordens neurodegenerativas que também tem sido associadas à expansão no número de repetições em determinadas regiões microssatélites (Oliveira et al., 2006). Em plantas, microssatélites têm ocorrido freqüentemente dentro e próximo a genes (Morgante et al., 2002).

Estes marcadores possuem todas as características genéticas desejáveis como co-dominância, permitindo a discriminação entre homozigotos e heterozigotos; são neutros; ocorrem abundantemente em genomas eucariotos; são multialélicos e suficientemente estáveis – conservados entre espécies relacionadas - para serem utilizados em análises genéticas e evolução de populações naturais, especialmente em espécies arbóreas altamente heterozigóticas, como já vem sendo demonstrado para espécies tropicais (Brondani et al., 2003; Zucchi, 2002) e temperadas (Steinkellner et al., 1997); são baseados em PCR e, portanto, necessitam de pequena quantidade de DNA; não requerem radioatividade; são altamente reproduzíveis; e estão bem dispersos no genoma em regiões codificadoras e não codificadoras.

Cada uma das regiões de microssatélites constitui um loco genético e os diferentes tamanhos de bandas que se podem amplificar constituem os diversos alelos desse loco. Sendo assim, a comparação de dados é facilitada pelo fato de que os resultados de microssatélites se expressam numericamente, mediante o tamanho dos pares de nucleotídeos dos alelos de cada loco (Cenis, 2006).

A análise de microssatélites requer um par de *primers* (seqüências conservadas de DNA que flanqueiam as SSR) para cada loco marcador, que então são usados para amplificar o DNA, usando o DNA genômico como substrato através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1995), a primeira etapa da PCR consiste na desnaturação da fita dupla de DNA alvo, por meio da elevação da temperatura para 92 a 95 °C. A depender do tamanho e seqüência do primer utilizado, na etapa de anelamento, a temperatura é drasticamente reduzida para 35 a 60 °C, a fim de que ocorra a hibridação DNA-DNA da cada primer com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos primers, a temperatura deve ser novamente elevada, neste caso para 72 °C. A etapa de extensão compreende a adição de nucleotídeos empregando como molde a seqüência alvo, de forma que é formada uma cópia desta seqüência. Estas etapas são repetidas por inúmeras vezes, produzindo uma grande quantidade de DNA da seqüência alvo de interesse.

Um par de *primers* irá amplificar seu próprio trecho repetitivo e quaisquer variações de tamanho dele em DNA de indivíduos diferentes (Griffiths et al., 1998), produzindo um padrão de bandas com tamanhos diferentes que podem ser visualizadas em géis de agarose ou poliacrilamida.

A formulação do gel exerce influência sobre o número de alelos detectados. Géis de poliacrilamida desnaturantes permitem a separação de fragmentos que diferem em apenas um par de bases, enquanto géis de agarose apresentam um limite de resolução acima de quatro pares de base (pb) (Vieira et al., 2004). Cada segmento amplificado de tamanho diferente é considerado um “alelo” de um mesmo loco (Freitas & Bered, 2003).

As análises com microssatélites podem ser sofisticadas, escolhendo-se locos cujas amplitudes no comprimento dos alelos não se sobreponham, de modo a permitir sua amplificação em uma mesma reação de PCR (*multiplex*). Os alelos gerados em reações separadas também podem ser resolvidos utilizando-se um mesmo poço do gel na aplicação da amostra - *multiload* (Vieira et al., 2004). Esta técnica tem sido empregada com sucesso em muitas áreas de teste de DNA, incluindo análises de deleções, mutações e polimorfismos, ou

ensaios quantitativos ou PCR de transcrição reversa (Henegariu et al., 1997). Nesta metodologia tem-se, em relação a PCR convencional, redução do custo e tempo de análise.

Até alguns anos atrás, a principal limitação para a utilização mais ampla de microssatélites no estudo das principais espécies florestais era a inexistência de marcadores publicados e o custo e a complexidade técnica demandados para o seu desenvolvimento. Com a rápida evolução no número e na diversidade taxonômica de seqüências depositadas no GenBank, por exemplo, cada vez mais são desenvolvidos marcadores baseados em microssatélites a partir de uma mineração em bancos de dados públicos (Borém, 2007).

Adicionalmente marcadores microssatélites em geral são plenamente transferíveis entre indivíduos dentro de uma espécie e freqüentemente entre espécies taxonomicamente próximas, muitas vezes mesmo de gêneros distintos (Borém, 2007). Elevadas taxas de transferência de *primers* têm sido observadas entre espécies do mesmo gênero, diminuindo os custos com o uso destes tipos de marcadores.

No Brasil, o desenvolvimento e o uso de marcadores microssatélites de plantas é recente e está sendo empregado em estudos populacionais de espécies florestais como *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 1999), *Ceiba pentandra* (Brondani et al., 2003), *Oenocarpus bacaba* (Lepsch-Cunha et al., 2003), *Swietenia macrophylla* (Lemes et al., 2002), *Copaifera langsdorffii* (Ciampi et al., 2000; Gonela, 2005; Soriani, 2005), *Hymenaea courbaril* (Guidugli et al., 2006; Feres et al., 2006, Alzate-Marin et al., 2006), *Eugenia uniflora* (Ferreira-Ramos et al., 2006; Ferreira-Ramos et al., 2008), *Cariniana estrellensis* e *Cariniana legalis* (Guidugli et al., 2008).

Na área florestal, todas as seqüências de *primers* (iniciadores) vêm sendo disponibilizadas no domínio público com o objetivo de facilitar o mapeamento comparativo e colaborativo, bem como a unificação de marcadores a serem utilizados para fins de proteção varietal de clones (Borém, 2007).

Marcadores microssatélites para a espécie *T. roseo-alba* foram transferidos em estudos de desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites para a espécie arbórea tropical *Tabebuia aurea* (Braga et al., 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a diversidade genética e realizar análises de maternidade de progênies da espécie *T. roseo-alba* conservadas *ex situ* no BG-USP/RP, e suas respectivas matrizes localizadas nas Bacias dos Rios Pardo e Mogi-Guaçu, utilizando marcadores moleculares microssatélites.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Mapear as 84 matrizes de *T. roseo-alba* distribuídas na Região de Ribeirão Preto;

2.2.2 Realizar estudos de diversidade genética de 189 progênies da espécie *T. roseo-alba*, conservadas nos Blocos A, B e C do BG-USP/RP e suas respectivas matrizes (84 árvores) localizadas nas Bacias dos Rios Pardo e Mogi-Guaçu, utilizando marcadores microssatélites;

2.2.3 Verificar a similaridade genética entre as 84 matrizes de *T. roseo-alba* e agrupá-las em clusters de acordo com dados moleculares;

2.2.4 Analisar o emprego da bateria de locos SSR estudados para análises de maternidade/paternidade em *T. roseo-alba*;

2.2.5 Verificar a maternidade das 189 progênies de *T. roseo-alba* conservadas no BG-USP/RP.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal, localização e mapeamento das árvores matrizes

Na implantação do Banco de Germoplasma da USP/RP (21°9'15.89" S e 47°51'32.59" O) (Figura 8a) – dividido em 3 blocos: A, B e C; e de acordo com os livros de campo disponíveis, foram plantadas 329 plântulas de *T. roseo-alba* (média de 4 progênies/matriz). No entanto durante a coleta, foi constatada a morte de 131 plântulas da espécie (39,8%) e a ausência de folhas em outras 10 plântulas. Portanto, foram usadas para esta pesquisa 189 progênies de *T. roseo-alba*.

As 84 árvores matrizes de *T. roseo-alba*, que deram origem às 189 progênies do Banco e que também foram usadas nesta pesquisa, possuem identificação por placas de metal em seu tronco, e estão situadas em áreas urbanas (praças, calçadas e canteiros centrais) e pomares de fazendas localizados nas Bacias dos Rios Pardo e Mogi-Guaçu, compreendendo 31 municípios da Região de Ribeirão Preto (Figura 8b; Anexo A).

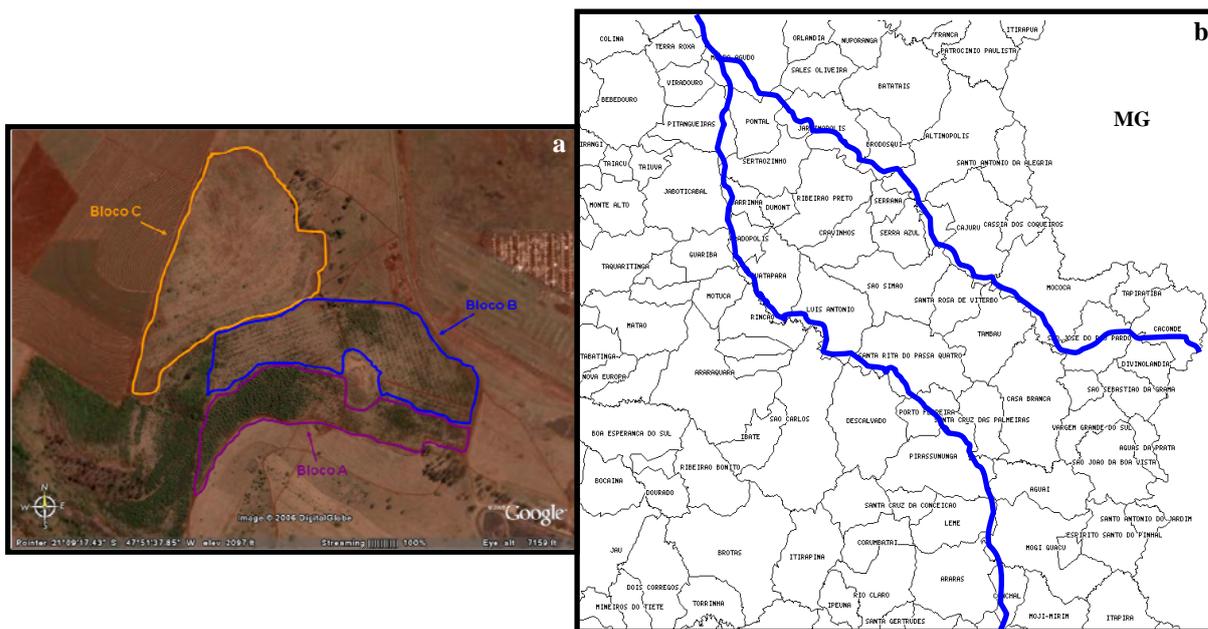


Figura 8. a) Localização dos blocos A, B e C do BG-USP/RP, onde estão sendo conservadas as progênies analisadas na presente pesquisa, b) Região de coleta das matrizes de *T. roseo-alba*, que deram origem às progênies do BG-USP/RP

Todas as matrizes foram georeferenciadas através da tomada de ponto por GPS (*global positioning system*), com a utilização de um aparelho GPS GARMIN modelo eTrex Vista Cx. A maioria das matrizes de *T. roseo-alba* já havia sido mapeada na seleção de árvores matrizes do Projeto Floresta USP, coordenado pela Profa. Dra. Elenice Mouro Varanda, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP). A segunda etapa do mapeamento das matrizes foi realizada durante a execução deste trabalho e contou com a colaboração da Profa. Dra. Silvana Giuliatti, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). Assim, nesta segunda etapa, 30 matrizes foram georeferenciadas através da tomada de ponto por aparelho GPS GARMIN modelo eTrex Vista Cx.

Através do programa MapSource versão 6.10.2, foi gerado um mapa com a localização exata das 84 matrizes de *T. roseo-alba*, finalizando o trabalho de mapeamento desta espécie.

3.2 Coleta e estocagem do material

O procedimento de coleta das amostras de folhas das 84 matrizes de *T. roseo-alba* foi realizado durante os anos de 2004 a 2007. As folhas das 189 progênies da espécie do BG-USP/RP foram coletadas entre os meses de março e julho de 2007. Imediatamente após as coletas, o material foi identificado, limpo, embalado em papel alumínio e armazenado em freezer à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da extração de DNA.

3.3 Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA das folhas das amostras descritas no item anterior foi efetuada com base na metodologia de Doyle & Doyle (1990) modificada por Alzate-Marin et al. (2008, no prelo).

Foram utilizados, aproximadamente, 300 mg de tecido foliar de cada planta, que foram macerados em cadinhos de porcelana contendo 800 μL de tampão de extração (2 % CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 % PVP sólido), previamente aquecido a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a maceração, o material foi transferido para tubos Eppendorf de 1,7 mL, aos quais foram adicionados 0,2% β -Mercaptoetanol, e mantidos a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos em banho-maria, com agitações periódicas.

Após a retirada dos tubos do banho-maria, realizou-se uma etapa de separação (eliminação das proteínas) com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), seguindo-se à homogeneização das amostras por inversões suaves durante 10 minutos. Subseqüentemente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13200 rpm em centrífuga Eppendorf modelo 5415R, recuperando cerca de 500 μL do sobrenadante, os quais foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL.

Ao sobrenadante, foi adicionada RNase (40 µg/mL), procedendo-se a incubação em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, acrescentou-se isopropanol gelado na proporção 1:1 (isopropanol:sobrenadante) e as amostras foram armazenadas a -20 °C durante no mínimo 30 minutos (ou *overnight*) para favorecer a precipitação do DNA. Após esse período, houve a centrifugação das amostras a 13.200 rpm durante 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado submetido a duas lavagens para a retirada do excesso de sal, uma com etanol 70 % e outra com etanol 95 %, durante 5 e 2 minutos, respectivamente. O DNA extraído foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido com TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0).

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro modelo Spectronic Genesys 5, medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Para estimar a quantidade de DNA, tomou-se como referência que uma unidade de densidade óptica (DO) equivale a 50 µg de DNA por mL (Sambrook et al., 1989) e aplicou-se a seguinte fórmula (form. 1):

$$[DNA] \mu g / \mu L = (A_{260} * DO * f) / 1000 , \text{ onde:} \quad (1)$$

A_{260} = absorbância sob luz UV no comprimento de onda 260 nm;

DO = unidade de densidade óptica (50 µg/mL);

f = 8,33 (fator de diluição).

De acordo com a metodologia descrita acima para a extração de DNA genômico, obteve-se boa qualidade e um bom rendimento em todos os ensaios realizados. Deste modo, estima-se que cerca de 260 a 312 ng/µL de DNA foram obtidos, a partir de 250-300 mg de tecido foliar das matrizes e progênies de *T. roseo-alba*.

3.4 Marcadores genéticos empregados

Para esta pesquisa foi utilizado um conjunto de dez pares SSR previamente desenvolvidos para *Tabebuia aurea*, dos quais 8 pares foram previamente amplificados para 6 amostras de árvores de *T. roseo-alba* por Braga et al. (2007) (Tabela 1).

Tabela 1 - Núcleo de repetição, seqüência, tamanho dos fragmentos descritos e número de acesso ao GenBank para os dez locos de *T. roseo-alba* analisados na presente pesquisa, sendo pb: pares de base

Loco	Repetição	Seqüencia (5' - 3')	Tamanho esperado (pb)	GenBank
Tau 12	(TC) ₈ (TA) (TG) ₂₉	F: CATCATCAAGGTCAAGATCA R: CATTCTAGTCTTCCATAAGT	140-170	DQ666987
Tau13	(TC) ₂₂ (ACTCCC) (TC) ₄ (AC) ₁₁	F: CCATCTCAATGCTTAAACAGT R: TTGCAATGCTACCATACA	130-160	DQ666988
Tau 15	(AG) ₃₂	F: TTTGAGGGGTTGAAGCATTT R: CATTGTGGTCCCTCTCAACA	124-170	DQ666990
Tau16*	(CT) ₃₃ (CA) ₁₁	F: GCTTGTAGCAACGTTAGGTTT R: TGTGCATTGTGACTACCAGCTA	234	DQ666991
Tau19*	(GA) ₃₃	F: AGGGCAAGCTTTTCCAGTTT R: TTCCTCACACGGATATGTGC	224	DQ666994
Tau 21	(GA) ₂₆	F: CTTTTGGGGGTCTTTGGAAT R: GAAAGAGACAGAGACAAAGATACA	190-230	DQ666996
Tau 22	(CT) ₁₈ (CCCTCTCGT CA)(GT) ₃	F: TATCTCTCCGCCGTACACCT R: CCAATCGAAGAGCCCATTTA	122-158	DQ666997
Tau 27	(CT) ₂₄ (CA) ₈ (CC) (CA) ₇	F: GGTAATCATCTTCCGCTTCC R: ACTGCAGAATCGCCTTTTGT	172-200	DQ667000
Tau28	(CT) ₃₃	F: TCAGCCACTACACAACCAAAG R: GGAAGCAATGGAGTCAAAA	120-130	DQ667001
Tau 31	(CT) ₂₈ (CA) ₁₀ (CTT)(GT) ₅	F: TCGTGCAGCTTTTGGAGTCTG R: CTGCAAAACACAAAGCGAAA	180-210	DQ666982

* não transferidos para *T. roseo-alba* por Braga et al. (2007)

Para as análises de transferibilidade dos *primers* de *T. aurea* para os indivíduos de *T. roseo-alba* empregados nesta pesquisa, foram testadas as temperaturas de anelamento dos *primers* SSR no intervalo 45 – 56 °C.

3.4.1 Condições de amplificação para os marcadores SSR

As condições das reações de amplificação do DNA de *T. roseo-alba*, para os 8 locos SSR empregados neste estudo, foram padronizadas por Feres et al. (2008, no prelo) e estão descritas na Tabela 2, sendo que foram otimizados dois sistemas bplex: Tau21/Tau22 e Tau15/Tau19.

Tabela 2 - Condições de PCR para os oito locos analisados na presente pesquisa (quantidade em μL para uma reação com volume final de 20 μL)

Loco	DNA (10ng/ μL)	dNTP (2,5mM)	Tampão PCR livre de cloreto	MgCl ₂ (50mM)	Água	Taq (1U/ μL)	Primers (solução de trabalho) (2,5 μM)
Tau12	5,0	2,0	2,0	0,9	7,1	0,6	2,4
Tau16	5,0	2,0	2,0	0,9	7,3	0,4	2,4
Tau27	5,0	2,0	2,0	0,9	7,1	0,6	2,4
Tau31	5,0	2,0	2,0	0,9	7,3	0,4	2,4
Tau21/22	5,0	2,0	2,0	0,6	5,2	0,4	2,4 + 2,4
Tau15/19	5,2	2,0	2,0	0,9	4,5	0,6	2,4 + 2,4

As condições de PCR usadas para a amplificação dos *primers* SSR foram: 1 ciclo 96 °C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a T_a (Tabela 1) por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, seguido por uma extensão final de 72 °C por 7 minutos. Após o término da reação, o produto de PCR foi guardado em geladeira (4 °C) até a sua utilização. A seguir são listados os reagentes e soluções usados para as reações de amplificação:

DNA polimerase (Taq): 1 U/ μL de tampão de estocagem (Biotools – B & M Labs, AS).

dNTP solução estoque: quatro soluções separadas de 100mM de cada base (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), pH 8,3 (Biotools – B & M Labs, AS).

dNTP (20mM): foi obtida diluindo-se com água a solução estoque (100mM) de cada dNTP para uma solução única de concentração 200 μ M (20 μ L de água MiliQ autoclavada mais 20 μ L da solução estoque de cada dNTP).

Iniciadores (*Primers*) específicos: os *primers* liofilizados *forward* e *reverse* específicos para cada loco foram diluídos em 50 μ L de água autoclavada, ficando à 50 μ M (Bio-Synthesis).

Iniciadores (*Primers*) solução de trabalho (2,5 μ M): 10 μ L do *primer forward*, 10 μ L do *primer reverse* e 180 μ L de água MiliQ autoclavada.

MgCl₂: concentração de 50 mM (Biotools – B 7 M Labs, AS).

Tampão de estocagem de DNA polimerase: 10 mM de Tris/HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 50% de glicerol (Biotools – B & M Labs, AS).

Tampão PCR livre de MgCl₂: Tris/HCl 75 mM pH 9,0; KCl 50 mM; (NH₄)₂SO₄ 20 mM. (Biotools – B & M Labs, AS).

3.5 Análise do produto amplificado

O produto amplificado foi separado por eletroforese vertical em géis de poli-acrilamida 10 % desnaturantes e não desnaturantes, partindo de condições pré-estabelecidas no Laboratório de Genética Vegetal (FMRP/USP), e não de condições especificadas por Braga et al. (2007), que utilizam outro sistema de placas de eletroforese. Para todos os *primers* SSR foram utilizadas placas de 22 x 17 cm, corrente elétrica de 23 mA durante um tempo de corrida eletroforética de 3 h 30 min.

Os géis desnaturantes, específicos para cada loco, foram feitos dissolvendo a uréia com a solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) e água em banho-maria a 50 °C, antes da adição do TBE, que foi adicionado apenas após o resfriamento da solução.

Os catalisadores da reação de polimerização do gel, TEMED e persulfato de potássio foram adicionados à mistura do gel imediatamente antes de verter a mistura em um cassete previamente montado, composto de duas placas de vidro separadas por espaçadores de teflon e presas com grampos. O tamanho das placas foi determinado de acordo com o loco. Logo após a mistura de gel ter sido vertida, colocava-se um pente de teflon na borda superior, formando poços no gel, onde posteriormente foram aplicadas as amostras de DNA amplificado, aguardando-se a polimerização do gel por no mínimo 30 minutos.

Após a polimerização dos géis, retirou-se o pente e os poços foram lavados com água. Os géis polimerizados foram montados em cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE para cubas, em ambos os pólos (porção superior e inferior). Esta cuba foi conectada a uma fonte de voltagem, Amershan Pharmacia Biotech - EPS 1001 - ajustada à voltagem ou corrente constante necessária para uma boa separação dos fragmentos amplificados. Foi realizada uma pré-corrída de pelo menos 30 minutos, onde as cubas com os géis foram ligados às fontes e submetidos à voltagem ou miliamperagem. Após a pré-corrída, a fonte foi desligada e as amostras foram aplicadas nos poços.

Antes da aplicação das amostras (fragmentos amplificados) nos géis desnaturantes, estas foram submetidas às condições desnaturantes com tratamento prévio com formamida, que auxilia no processo de desnaturação das amostras. Para tanto, foram colocados 7 μ L de tampão de amostra desnaturante em um tubo *ependorf*, junto com 5 μ L do produto amplificado. Estes tubos foram aquecidos a 94 °C por 7 minutos, sendo a seguir colocados imediatamente em banho de gelo (tratamento desnaturante), seguindo-se a aplicação no gel.

Quando o objetivo da eletroforese era somente verificar a região de amplificação dos fragmentos, foi utilizado um gel não desnaturante 10 %, no qual não foi necessário

tratamento desnaturante, sendo aplicados 5 μL de amostra e 7 μL de tampão de amostra (ou tampão de carregamento, do inglês *loading buffer*), seguindo-se a aplicação no gel.

Após a aplicação das amostras, as fontes foram novamente ligadas e a eletroforese prosseguiu normalmente. Com o término da corrida eletroforética, o gel foi retirado cuidadosamente das placas de vidro e submetido aos procedimentos de coloração.

Segue-se a lista de reagentes e soluções utilizados na preparação dos géis de poliacrilamida e corrida eletroforética:

TEMED N, N, N', N', tetrametiletilenodiamina (Pharmacia Biotech).

Solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1): 29 g de acrilamida, 1 g de bis-acrilamida diluídas em 100 mL de água deionizada.

Solução de EDTA pH 8,0: 186 g de EDTA; 1 L de H₂O. Acertar o pH com pastilhas de hidróxido de sódio (NaOH).

Solução de persulfato de potássio: 650 mg de persulfato de potássio; 6,5 mL de H₂O.

Tampão TBE 10X (0,9M) pH 8,0: 108 g de Tris (PM = 121,1); 53 g de ácido bórico; 40 mL de solução de EDTA pH 8,0; H₂O qsp 1 L.

Tampão TBE cuba (1X): 100 mL Tampão TBE (10X); 900 mL H₂O.

Tampão de amostra (*Loading buffer*): 900 μL de bromofenol, 900 μL xilenocianol, 900 μL TBE (10X), 4,5 mL Ficol 30% diluído em água destilada, 1,8 mL EDTA 0,5M pH 8,0, 3,6 g sacarose. Misturar tudo até a dissolução completa da sacarose.

Tampão de amostra desnaturante: 300 μL de tampão de amostra, 900 μL de formamida.

Gel desnaturante 10% (30ml): 14,4 g de uréia, 10 mL solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), 3 mL de TBE (10X), 30 μL TEMED, 500 μL solução de persulfato de potássio. Completar o volume para 30 mL com H₂O.

Gel não desnaturante 10% (20ml): 1,4 mL de glicerol, 9,72 mL H₂O, 6,7 mL solução acrilamida/bis-acrilamida (29:1), 2 mL TBE (10x), 15 µL TEMED, 30 µL solução persulfato de potássio.

3.6 Coloração com nitrato de prata e secagem do gel

Os reagentes e soluções utilizados na etapa de coloração e secagem dos géis são:

Solução de nitrato de prata (20%): 2 g de nitrato de prata, 10 mL de água destilada. Dissolver a prata e manter a solução ao abrigo da luz.

Solução fixadora: 160 mL etanol (PA) e 7 mL de ácido acético glacial (PA), 833 mL de água (volume final 1 L).

Solução reveladora: 22 g de NaOH, 1 L de água. Dissolver em um agitador o hidróxido de sódio em uma parte da água e depois completar com o restante (volume final 1 L). Na hora da coloração adicionar 750 µL de formaldeído para cada 100 mL da solução.

Os fragmentos obtidos foram detectados em coloração com nitrato de prata (20%) segundo protocolo adaptado de Sanguineti et al. (1994):

Fixação: após a retirada das placas de vidros e dos espaçadores, o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 200 mL de solução fixadora;

Impregnação com nitrato de prata: adicionou-se 3,0 mL de solução de nitrato de prata e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada e o gel lavado em água por cerca de 10 segundos, agitando levemente e, ao final, descartando a água;

Revelação: a solução reveladora (200 mL) foi despejada cuidadosamente no recipiente contendo o gel juntamente com 1,5 ml de formaldeído, que foi submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente. Esta solução foi pré-aquecida em estufa para facilitar a reação de coloração, que no frio fica mais lenta;

Bloqueio da reação: após ter sido revelado, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 200 mL de solução fixadora;

Secagem dos géis: após a leitura, todos os géis passaram por um processo de secagem para que pudessem ser armazenados para análises e confirmações posteriores. Duas folhas de papel celofane foram colocadas em um recipiente com água para que ficassem bem molhadas. Uma placa de vidro, com a área maior que a do gel, foi coberta com uma das folhas de celofane. O gel foi colocado sobre a placa com celofane sem deixar bolhas e coberto com a outra folha de celofane, também se tendo o cuidado de não deixar bolhas. Após este processo, este gel foi deixado secando a temperatura ambiente por dois ou três dias até a secagem completa, sendo então devidamente identificado e arquivado.

3.7 Determinação fenotípica

Os alelos de todos os locos das matrizes e progênies de *T. roseo-alba* foram identificados por ordem crescente de tamanho, definida pela migração eletroforética (Anexos B e C). Fragmentos de diferentes mobilidades foram considerados alelos diferentes e receberam uma numeração de acordo com sua posição no gel (Figura 9).

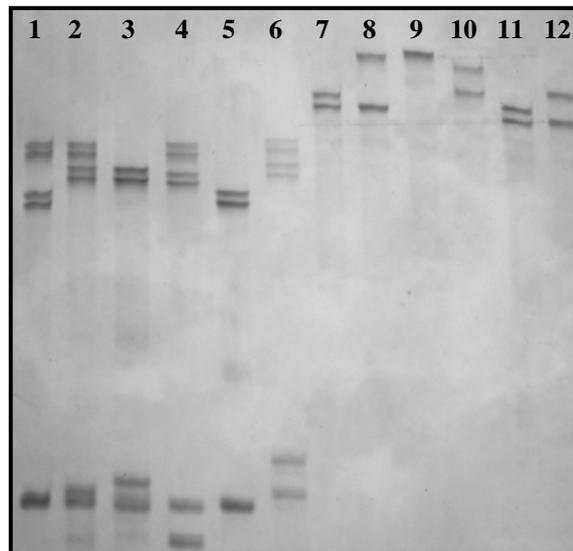


Figura 9. Gel de poliacrilamida 10% contendo produtos de PCR multiplex dos *primers* Tau21 (superior) e Tau22 (inferior) (canaletas 1-6), e *primer* Tau31 (canaletas 7-12)

O intervalo de tamanho em pares de base (pb) para cada par de *primer* foi estimado utilizando as amostras com menor e maior peso molecular juntamente com um marcador de 10 pb (Invitrogen).

3.8 Análise dos dados

Os locos SSR apresentam alelos co-dominantes o que permitiu inferir os genótipos a partir dos respectivos fenótipos. A determinação dos genótipos de cada indivíduo foi obtida através da leitura das bandas nos géis, possibilitando estimar vários parâmetros que caracterizam a variabilidade das 84 matrizes e 189 progênes de *T. roseo-alba* genotipadas.

Utilizando o programa Cervus 3.0 (Kalinowski et al., 2007), foi calculado o conteúdo de informação do polimorfismo (PIC: *polymorphic information content*) para os dez locos analisados tanto para as matrizes como para as progênes de *T. roseo-alba* analisadas. Segundo Botstein et al. (1980), os valores de PIC são classificados em três níveis: (a)

altamente informativo ($PIC > 0,5$); (b) moderadamente informativo ($0,5 > PIC > 0,25$); (c) pouco informativo ($PIC < 0,25$).

3.8.1 Estimativa do desequilíbrio de ligação

O estudo do desequilíbrio de ligação procura conhecer a associação entre alelos de diferentes locos. Qualquer associação encontrada será geralmente referida como desequilíbrio de ligação, mesmo que não tenha nada a ver com ligação (Weir, 1996). Alelos em diferentes locos podem ter frequências que mostram associações, quando estes locos não estão ligados.

No presente trabalho, estas estimativas foram obtidas com auxílio do software FSTAT versão 2.9.3 (Goudet, 2002), aplicando a correção de Bonferroni para múltiplas comparações nas progênies e matrizes de *T. roseo-alba* analisadas.

3.8.2 Caracterização da variação genética

As frequências alélicas (x_i) e genótípicas (X_{ii}) de cada loco para as matrizes e progênies de *T. roseo-alba* foram obtidas a partir da leitura das bandas nos géis e estimadas por contagem direta, utilizando-se o programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000), segundo as equações (form. 2 e 3):

$$x_i = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n} \text{ e } X_{ii} = \frac{n_{ii}}{n} \quad (\text{form. 2 e 3})$$

Em que:

x_i é a frequência do alelo “i”;

X_{ii} é a frequência do genótipo “ii”;

n_{ii} e n_{ij} correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados para o alelo i , respectivamente;
 n corresponde ao número de indivíduos analisados.

O programa GDA versão 1.1 (Lewis & Zaykin, 2000) também foi empregado para verificar a aderência das frequências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg e estimar outros parâmetros que medem a diversidade genética, como o número médio de alelos por loco (A), as heterozigosidades médias observada (H_o) e esperada (H_e) e o índice de fixação intrapopulacional ou coeficiente de endogamia (F_{is}).

3.8.3 Análise de similaridade genética das matrizes de *T. roseo-alba*

A similaridade genética entre as 84 matrizes de *T. roseo-alba* foi analisada usando o programa Structure 2.2.3 (Falush et al., 2007) para pesquisar o número apropriado de clusters.

Pela opção de frequência alélica correlacionada, múltiplos testes de estrutura foram executados para o estabelecimento de K , que variou de 1 a 10 clusters. Foram utilizadas de 10 mil a 100 mil interações (Pritchard et al., 2007), com o intuito de obter estimativas acuradas dos parâmetros de interesse.

3.8.4 Análises de maternidade

As análises de maternidade foram realizadas inicialmente utilizando uma abordagem determinística, ou seja, analisando o genótipo de cada uma das supostas árvores

mães (matrizes) de *T. roseo-alba* frente a cada um dos genótipos dos descendentes (progênes) conservados no BG-USP/RP.

A posição das bandas das árvores matrizes foi comparada com a posição das bandas das progênes para os locos considerados neste trabalho, num procedimento seqüencial de exclusão, verificando o compartilhamento de pelo menos um dos alelos de cada loco entre a suposta árvore mãe e as respectivas progênes testadas.

Quando a matriz e as progênes testadas compartilharem pelo menos um dos dois alelos do genótipo (diplóide), aquela matriz não pode ser excluída da maternidade. Quando, por outro lado, a árvore mãe e a progênie testada não compartilharem alelos, se configura uma exclusão de maternidade, ou seja, aquela matriz não é mãe da progênie testada.

As probabilidades de exclusão de paternidade (Slate et al., 2000), considerando todos os locos conjuntamente, foram estimadas através do programa CERVUS versão 3.0 (Kalinowski et al., 2007). As frequências alélicas das árvores matrizes e progênes de *T. roseo-alba* foram estimadas por contagem direta, conjuntamente, utilizando-se o programa CERVUS versão 3.0 (Kalinowski et al., 2007). Através desses dados foram realizados cálculos de probabilidade de maternidade, com o auxílio do mesmo programa em questão.

Antes da análise de maternidade propriamente dita, foi feita uma simulação de maternidade para o cálculo dos valores limites para a estatística delta, sendo consideradas 50000 simulações, proporção amostrada da população de 1,0, de mães candidatas de 0,95 e de locos tipados de 0,98, e uma taxa de erro de genotipagem de 1%.

A análise de maternidade foi efetuada utilizando um nível de confiança restrito de 95 % e relaxado de 80 %. Foram identificadas as mães das progênes que apresentaram pelo menos 1 alelo idêntico ao da mãe em todos os locos analisados. A análise de maternidade pode ser dificultada caso as matrizes de *T. roseo-alba* apresentem um elevado nível de compartilhamento alélico.

A taxa de erro de identificação da maternidade foi calculada pelo número de progênies que estão com maternidade incorreta em relação ao número de progênies analisadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Mapeamento das matrizes

O mapeamento final com o sistema GPS das 84 matrizes de *T. roseo-alba* analisadas neste trabalho (Anexo A), permitiu definir com precisão sua ampla distribuição geográfica em uma área de 16.000 km² entre as Bacias dos Rios Pardo e Mogi-Guaçu (Figura 10). Foi também observado que as árvores matrizes podem chegar a estar distantes entre si até 178 km.

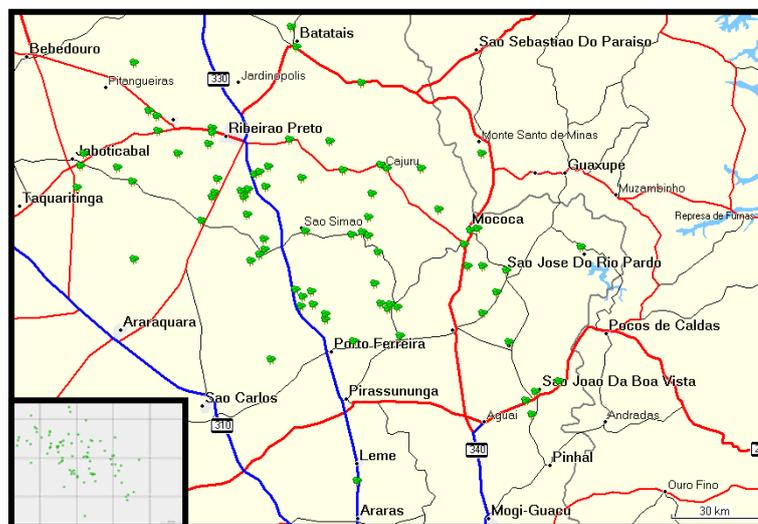


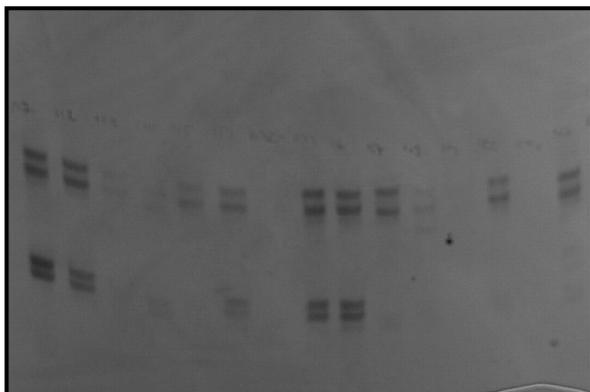
Figura 10. Localização das 84 matrizes de *T. roseo-alba*, que deram origem às progênies do BG-USP/RP

4.2 Marcadores genéticos empregados

Dos dez pares de *primers* SSR testados neste trabalho, 9 locos SSR apresentaram uma boa amplificação da região microssatélite, apontando um sucesso de 90 % na amplificação desses *primers* heterólogos em *T. roseo-alba*. Embora o *primer* Tau13 tenha amplificado no início deste trabalho, este foi desconsiderado da análise pela dificuldade de amplificação posterior, sendo empregados, portanto, 8 locos SSR (Figura 11).

A amplificação desses oito locos SSR mostra a conservação das regiões flanqueadoras desses locos entre as espécies *T. aurea* e *T. roseo-alba*, pertencentes ao mesmo gênero. Dentro do gênero das *Tabebuia*, Braga et al. (2007) relataram a transferibilidade de 52,4% dos *primers* desenvolvidos para *T. aurea* nas espécies *T. ochracea*, *T. serratifolia*, *T. roseo-alba* e *T. impetiginosa*.

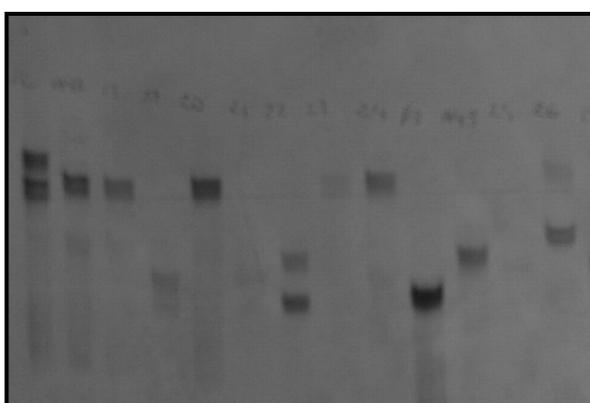
Tau12



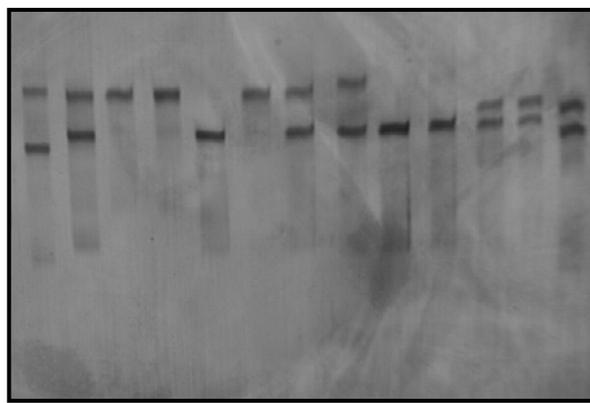
Tau16



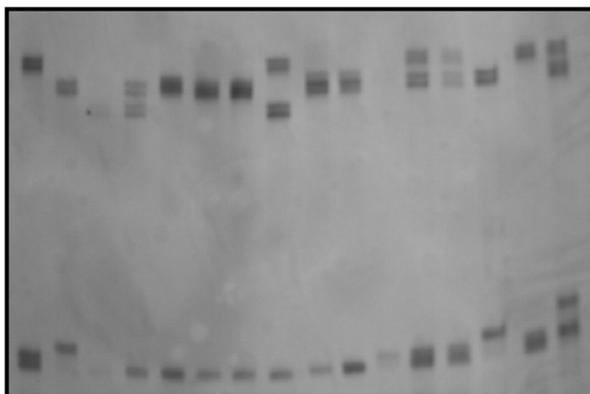
Tau27



Tau31



Tau21 (superior) e Tau 22 (inferior)



Tau15 (inferior) e Tau 19 (superior)

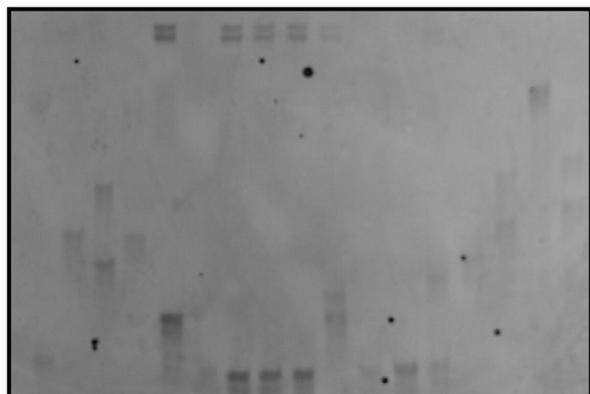


Figura 11. Géis de poliacrilamida 10% para cada par de *primer* SSR empregado neste estudo com amostras de matrizes e progênies de *T. roseo-alba*

As temperaturas de anelamento ótimas para cada *primer* SSR encontram-se descritas na Tabela 3. Os resultados da caracterização genética destes marcadores SSR usando uma amostra de 36 árvores matrizes de *T. roseo-alba* em conjunto com uma população urbana da mesma espécie foram aceitos para publicação na revista internacional *Molecular Ecology Resources*, fator de impacto 1,257 (Anexo E).

Tabela 3 – Tamanho dos alelos em pares de base (pb), temperaturas de anelamento - T_a (°C) e número de alelos (A) para os 9 locos SSR transferidos de *T. aurea* para uma amostra de 36 árvores matrizes de *T. roseo-alba*

Loco	Repetição	Tamanho esperado (<i>T. aurea</i>)	Tamanho observado (<i>T. roseo-alba</i>)	T_a (<i>T. aurea</i>)	T_a (<i>T. roseo-alba</i>)	A (<i>T. aurea</i>)	A (<i>T. roseo-alba</i>)
Tau 12	(TC) ₈ (TA) (TG) ₂₉	180	140-170	56	50	23	8
Tau13	(TC) ₂₂ (ACTCCC) (TC) ₄ (AC) ₁₁	120	120-170	56	49	22	13
Tau 15	(AG) ₃₂	151	120-150	56	50	19	9
Tau16*	(CT) ₃₃ (CA) ₁₁	234	140-170	56	50	25	11
Tau19*	(GA) ₃₃	224	190-250	56	50	20	8
Tau 21	(GA) ₂₆	238	210-240	56	56	18	6
Tau 22	(CT) ₁₈ (CCCTCTCG TCA)(GT) ₃	157	130-140	56	56	9	5
Tau 27	(CT) ₂₄ (CA) ₈ (CC) (CA) ₇	212	170-220	56	49	16	12
Tau28	(CT) ₃₃	186	--	56	---	17	--
Tau 31	(CT) ₂₈ (CA) ₁₀ (CTT)(GT) ₅	265	240-300	56	56	17	8
Média						18,6	8,9

* não transferidos para *T. roseo-alba* por Braga et al. (2007)

4.3 Análises genéticas das matrizes vs progênies de *T. roseo-alba*

4.3.1 Estimativa do desequilíbrio de ligação

Estudos de ligação entre locos são importantes porque geralmente os locos detectados são utilizados para calcular médias entre si, de forma que locos ligados tendem a gerar vícios nas estimativas, por aumentarem o peso de um padrão observado no cálculo da média entre locos.

No teste de desequilíbrio de ligação analisado, verificou-se que os oito locos SSR analisados, tanto para as matrizes como para as progênies de *T. roseo-alba*, não estão ligados ($P > 0,000893$) e, portanto, segregam independentemente. Estas observações estão de acordo com os nossos resultados observados com uma amostra de 36 árvores matrizes e outra de 22 árvores reprodutivas de uma população urbana de *T. roseo-alba* analisadas previamente (Feres et al., 2008, no prelo), indicando que esses marcadores SSR são apropriados para estudos de genética de populações.

4.3.2 Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

De acordo com Weir (1990), a análise de dados genéticos deve ser baseada em algum modelo ou teoria. O modelo clássico que embasa a genética de populações é chamado de Teorema de Hardy-Weinberg, que presume que uma população de tamanho infinito, onde os indivíduos se acasalam aleatoriamente e que não sofre ação de forças perturbadoras (mutação, migração, seleção), estabelece frequências genotípicas binomiais que não irão se alterar nas gerações subsequentes. Os desvios das proporções esperadas pelo EHW significam que uma ou mais das pressuposições do modelo foi alterada (Futuyma, 1992).

Na análise da aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4), observou-se que todos os locos SSR das matrizes e progênies de *T. roseo-alba* estão em desequilíbrio.

Tabela 4 - Probabilidades obtidas com o teste exato para a verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas matrizes e progênies de *T. roseo-alba* analisadas

	Tau12	Tau15	Tau16	Tau19	Tau21	Tau22	Tau27	Tau31
Matrizes	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
Progênies	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*

*Desvio significativo ($P \leq 0,05$)

Esses resultados mostram que alguma força perturbadora está atuando tanto nas matrizes como nas progênies de *T. roseo-alba*, provocando alterações nas frequências alélicas. Feres et al. (2008), também observaram desvios do EHW em duas populações de *T. roseo-alba* analisadas nesse trabalho, sendo que esses desvios podem ser devido à estruturação populacional (Efeito *Wahlund*), presença de alelos nulos, endogamia biparental e/ou autofecundação. Estas mesmas forças podem, portanto, também estar atuando nas matrizes e progênies de *T. roseo-alba* analisadas neste estudo uma vez que parte das matrizes compõem a população I caracterizada por Feres et al. (2008, no prelo).

Com relação às progênies que compõem o BG-USP/RP, os desvios observados do EHW eram esperados por se tratar de um banco formado recentemente por sementes oriundas de várias localidades, sendo, portanto, a primeira geração. Segundo as premissas do Teorema de HW, na próxima geração as progênies já estarão em EHW.

A hipótese de que um processo endogâmico pode estar atuando na alteração das frequências genotípicas das matrizes e progênies de *T. roseo-alba* consideradas neste estudo, é corroborada pelos valores de outros parâmetros genéticos, como os coeficientes de endogamia significativos (F_{IS}), além de valores menores das heterozigosidades observadas (H_o) em relação às heterozigosidades esperadas (H_e), como será devidamente discutido em um item posterior deste trabalho.

4.3.3 Caracterização da variação genética

Dentro do âmbito conservacionista, dados sobre a distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações naturais de espécies florestais como *Tabebuia roseo-alba* são considerados essenciais para adoção de estratégias eficientes de conservação *in situ* e *ex situ* da espécie.

As análises realizadas com os oito locos SSR para as 84 matrizes de *T. roseo-alba* indicaram um alto polimorfismo, sendo observado um total de 85 alelos (10,63 alelos/ loco) (Anexo B). Do total de alelos, 41 alelos (48,2%) apresentaram uma frequência inferior a 5%, sendo considerados alelos raros (Figura 12). As progênies de *T. roseo-alba* apresentaram 11 alelos a mais que as matrizes, totalizando 96 alelos (12 alelos/ loco), dos quais 51 são alelos raros (53,1%) (Anexo C).

O número médio de alelos por loco para as matrizes e progênies de *T. roseo-alba* foi bem menor quando comparado com a média encontrada para *T. aurea* (18,4) (Braga et al., 2007), considerando os mesmos locos empregados neste estudo. Segundo Pinto (2007), ocorre um decréscimo do polimorfismo com o aumento da distância evolucionária em relação à espécie fonte devido à presença de alelos nulos e à homoplasia de tamanho de fragmentos.

Feres et al. (2008) encontrou valores de alelos por loco inferiores ao encontrados neste estudo, quando ela analisou uma população urbana de *T. roseo-alba* do campus da USP/RP (4,4 alelos/loco) e suas respectivas progênies (7,8 alelos/loco). Jones & Hubbell (2003), encontraram 13,5 alelos/loco em *Jacaranda copaia*, outra espécie de Bignoniaceae, em estudos realizados com 10 locos SSR.

Os alelos que são encontrados apenas nas matrizes ou nas progênies de *T. roseo-alba* são chamados de alelos exclusivos ou privativos. Foi encontrado um total de 19 alelos

exclusivos, sendo quatro provenientes das matrizes e 15 das progênies de *T. roseo-alba* analisadas.

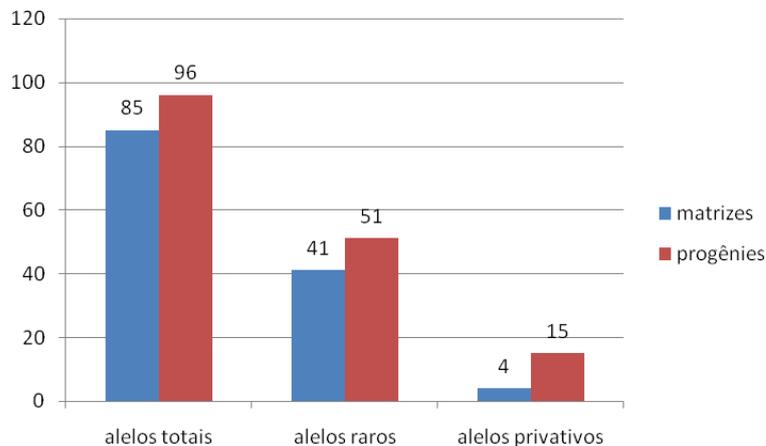


Figura 12. Número de alelos totais, raros e privados encontrados para as matrizes e progênies de *T. roseo-alba* analisadas neste trabalho

Tanto a riqueza alélica quanto a presença de alelos raros ou privados são importantes na tomada de decisões conservacionistas (Kalinowski, 2004). A presença de alelos raros (de baixa frequência) nas matrizes e progênies de *T. roseo-alba* estudadas, mostra a importância de se conservar todos os indivíduos amostrados, uma vez que esses alelos podem ser importantes na contribuição da variabilidade genética da espécie e sua sobrevivência em condições adversas.

Isso é válido também para a presença de alelos privados nas matrizes de *T. roseo-alba* que devem ser recuperados, uma vez que se conhece a localização exata das matrizes na natureza, e trazidos para o BG-USP/RP através do plantio no Banco de progênies originadas dessas matrizes. A identificação das árvores matrizes de *T. roseo-alba* analisadas neste trabalho, contendo alelos privados, pode ser encontrada na Tabela 5.

Tabela 5 - Identificação das árvores matrizes de *T. roseo-alba* contendo alelos privativos pela amplificação de oito marcadores SSR

Loco	Alelo	Matriz	Local de coleta	Coordenada (UTM)
Tau15	1	37	Cravinhos-SP	23 K 222316 7644596
	9	75	Jaboticabal-SP	22 K 781766 7648933
	23	18	São José do Rio Pardo-SP	23 K 301176 7602736
Tau16	9	5	Mococa-SP	23 K 291806 7623676

A presença de alelos privativos nas progênes de *T. roseo-alba* analisadas são um forte indicativo de que esteja ocorrendo fluxo gênico proveniente de árvores não amostradas ou vindas de outras regiões. Os principais responsáveis por este fluxo gênico são os polinizadores. Mendonca & Anjos (2005) observaram a presença da espécie de beija-flor *Hylocharis chrysura* em flores de *T. roseo-alba* e Feres, JM (comunicação pessoal) observou também a presença de abelhas da espécie *Apis mellifera* em flores desta espécie.

As abelhas do gênero *Apis* apresentam um raio de ação em busca de néctar entre 750 m a 24 km (Crane, 1985; Wiese, 1985; Hamrick e Murawski, 1990), portanto, suficiente para levar pólen de uma planta não amostrada para uma coletada, o que atuaria como veículo de fluxo gênico. De acordo com Dunphy et al. (2004), a capacidade para movimentar polens a longa distância pode ser crucial para plantas em florestas fragmentadas, onde a endogamia e deriva genética ameaçam a sobrevivência das pequenas populações.

Segundo Lorenzi (2002), a dispersão das sementes de *T. roseo-alba* é anemocórica, ou seja, podendo se afastar muito da planta mãe pela ação do vento, indicando que possivelmente o fluxo gênico também ocorra vias sementes.

O loco que apresentou o maior número de alelos foi o Tau15 (21 para as matrizes e 19 para as progênes) e o menor foi o loco Tau12 (4 para as matrizes e 5 para as progênes) (Figura 13).

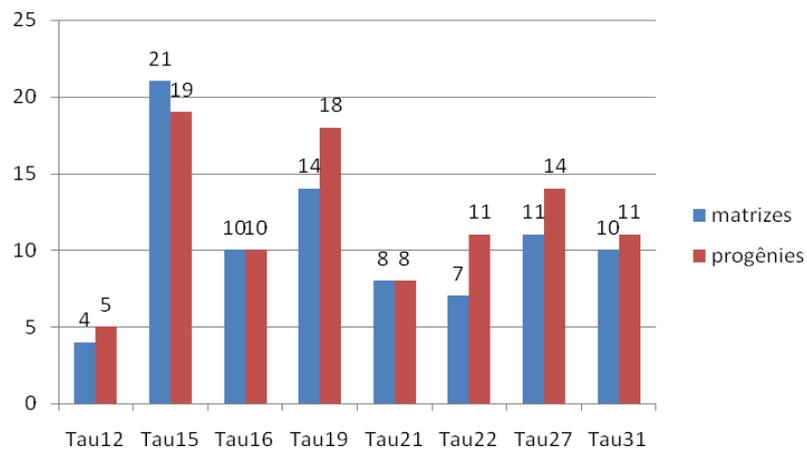


Figura 13. Número de alelos por loco polimórfico de matrizes e progênies de *T. roseo-alba* no presente estudo

A distribuição das freqüências alélicas para os oito locos SSR presentes nas matrizes e progênies de *T. roseo-alba* analisadas nesta pesquisa encontra-se na Figura 14 e no anexo D.

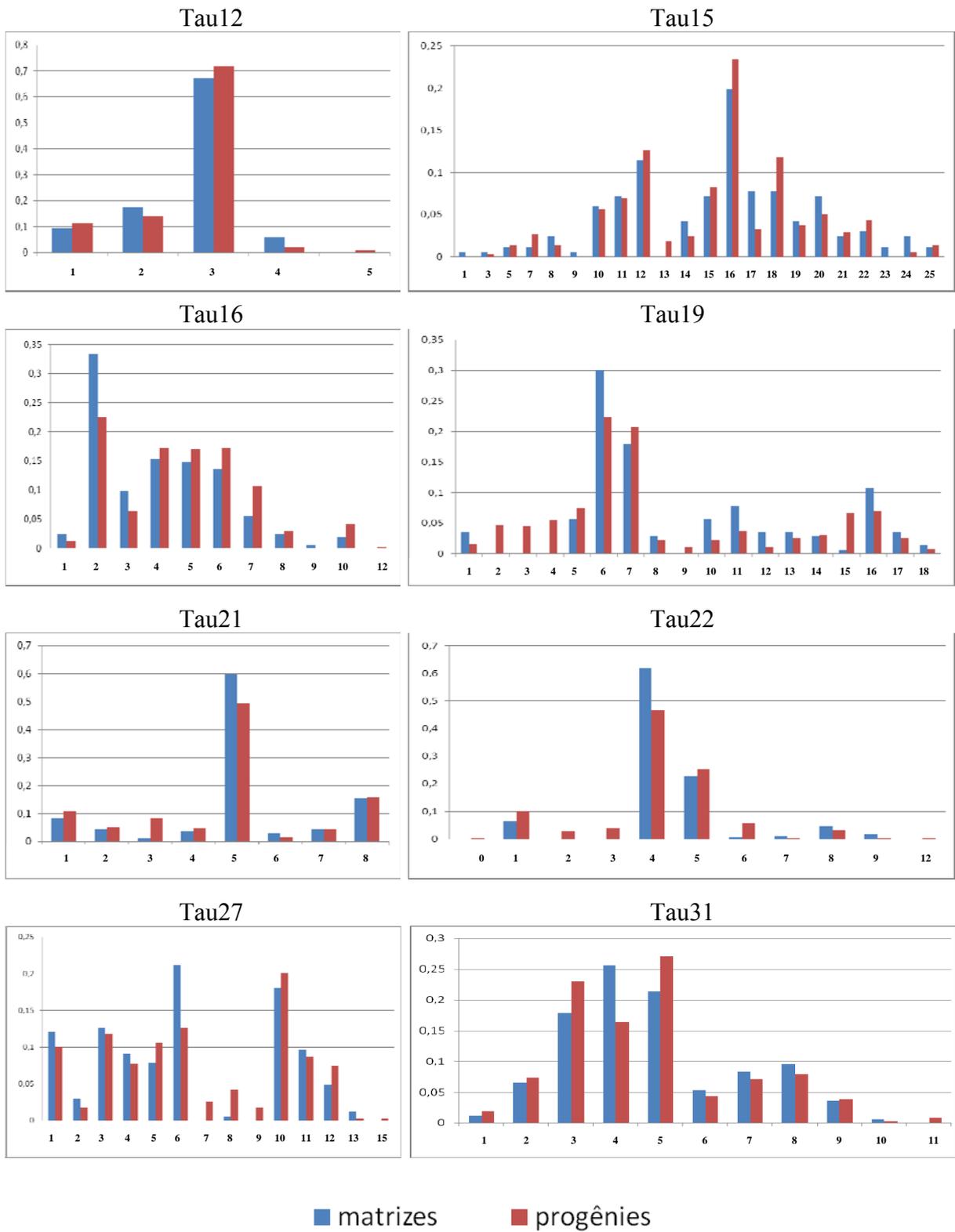


Figura 14. Frequências alélicas em oito locos microsatélites polimórficos de matrizes e progênies de *T. roseoalba*

A amplificação das matrizes de *T. roseo-alba* com o *primer* Tau12 apresentou um total de 4 alelos com tamanho mínimo de 140 pb e máximo de 170 pb. O alelo 3 foi o mais freqüente (0,673) enquanto o alelo 4 foi o menos freqüente (0,059). As progênies de *T. roseo-alba* apresentaram um total de 5 alelos para esse loco, sendo 1 alelo exclusivo (alelo 5), com tamanho variando de 140 a 180 pb. O alelo 3 também foi o mais freqüente (0,719) enquanto o alelo exclusivo 5 o menos freqüente (0,011).

As ampliações resultantes do loco Tau15 para as matrizes apontaram o maior número de alelos (21), os quais variaram de 120 a 150 pb, sendo 3 alelos privativos (1, 9 e 23). Dentre estes, verificou-se que o alelo de 16 foi o mais freqüente (0,199), e que os alelos 1, 3 e 9 foram os menos freqüentes (0,006). Já as progênies apresentaram o maior número de alelos também para esse loco, totalizando 19 alelos, sendo 1 alelo (13) exclusivo. O intervalo em pares de bases foi de 120 a 150. O alelo 16 também foi o mais freqüente (0,234), enquanto que o alelo de menor freqüência foi apenas o 3 (0,0027).

As análises derivadas do loco Tau16 para as matrizes evidenciaram um total de 10 alelos com tamanho mínimo de 140 pb e máximo de 170 pb. O alelo 4 foi o mais freqüente (0,154), enquanto o alelo 1 foi o menos freqüente (0,0057). Este loco apresentou apenas 1 alelo privativo (9). As progênies apresentaram o mesmo número de alelos das matrizes (10), sendo 1 exclusivo (12), que variaram de 140 a 180 pb. Diferentemente das matrizes, o alelo 2 foi o mais freqüente para as progênies (0,225) e o alelo 12 foi o menos freqüente (0,0027).

Com o *primer* Tau19 foi observado um total de 14 alelos para as matrizes com tamanho mínimo de 190 pb e máximo de 250 pb, sendo que nenhum alelo é exclusivo. Em relação aos alelos mais e menos freqüentes, o alelo 6 foi o mais freqüente (0,300) enquanto o alelo 15 foi o menos freqüente (0,0071). Considerando esse mesmo *primer*, as progênies apresentaram 18 alelos, 4 a mais que as matrizes, ou seja, alelos exclusivos. O intervalo de

tamanho desses alelos em pares de base (pb) foi de 190 a 250. O alelo que apresentou a maior frequência (0,224) foi o 6 e os alelos 9 e 12 foram os menos frequentes (0,0112).

Das amplificações resultantes do SSR Tau21 para as matrizes, foram observados 8 alelos, variando entre 210 a 240 pb, dentre os quais o alelo 5 é o mais frequente (0,596) e o alelo 3 o menos frequente (0,0116), não havendo nenhum alelo privativo. As progênies também apresentaram 8 alelos para esse loco, não ocorrendo nenhum alelo exclusivo e o intervalo em pares de base ficou entre 210 e 240. O alelo 5 também foi o mais frequente (0,495) enquanto o alelo menos frequente (0,0164) foi o 6.

As amplificações das matrizes com o loco Tau22 apresentou um total de 7 alelos com tamanho mínimo de 130 pb e máximo de 140 pb, não existindo nenhum alelo privativo. O alelo 4 foi o mais frequente (0,621) ao contrário do alelo 6 que foi o menos frequente (0,006). Nas progênies, foram observados 4 alelos a mais que nas matrizes, ou seja, 11 alelos dos quais 4 são exclusivos. O intervalo de tamanho desses alelos variou de 120 a 150 pb, sendo que o alelo 4 foi o mais frequente (0,476) enquanto que o alelo menos frequente foi o 12 (0,0027).

As análises derivadas do loco Tau27 para as matrizes evidenciaram um total de 11 alelos – nenhum privativo, com intervalo de tamanho variando de 170 a 220 pb. O alelo 6 foi o mais frequente (0,211) enquanto o alelo 8 foi o menos frequente (0,006). Já as progênies apresentaram 14 alelos dos quais 3 são exclusivos, com tamanho mínimo de 170 pb e máximo de 230 pb. O alelo 10 apresentou a maior frequência (0,201) enquanto que os alelos 13 e 15 foram os menos frequentes (0,0029).

Finalmente, o resultado das amplificações realizadas com o *primer* Tau31 para as matrizes evidenciou um total de 10 alelos que variaram entre 240 a 300 pb. O alelo 4 foi o mais frequente (0,256) e o alelo menos frequente foi o 10 (0,0059), não havendo nenhum alelo privativo. Já as progênies apresentaram 1 alelo a mais que as matrizes num total de 11

alelos, sendo que 1 deles é exclusivo dessas progênies. Esses 11 alelos variaram de 240 a 300 pb, sendo que o alelo mais freqüente foi o 5 (0,271) e o menos freqüente continuou sendo o alelo 10 (0,0027).

Oscilações nas freqüências alélicas, perdas e fixação de alelos, podem ser indicativos de deriva genética ou de seleção. As oscilações se desenvolvem por meio de processos aleatórios, quando não existem mecanismos de seleção natural. Nestes aspectos, a análise das freqüências alélicas é de grande importância, pois pode refletir melhor os efeitos aleatórios do que a maioria dos parâmetros utilizados no estudo de genética de populações, uma vez que tais parâmetros não refletem diretamente freqüências alélicas eventualmente muito baixas (Oliveira et al., 2002).

De acordo com a classificação de PIC por Botstein et al. (1980), os dados revelados para o presente conjunto de dados mostram-se altamente informativos, quando consideramos os locos individualmente e conjuntamente, visto que o PIC variou entre os locos de 0,466 a 0,903, com média de 0,718, para as matrizes de *T. roseo-alba*, e de 0,416 a 0,876, com média de 0,752, para as progênies (Tabelas 6 e 7). A única exceção foi o loco Tau12, que apresentou um valor de PIC moderadamente informativo ($0,25 < \text{PIC} < 0,5$), tanto para as matrizes como para as progênies de *T. roseo-alba* estudadas.

A heterozigosidade observada (H_o) para todos os locos nas matrizes variou de 0,048 (Tau12) a 0,667 (Tau31), com média de 0,271 (Tabela 6). Nas progênies, os valores da heterozigosidade observada para todos os locos variou de 0,093 (Tau22) a 0,437 (Tau31), com valor médio de 0,236 (Tabela 7).

Comparando-se as heterozigosidades observada e esperada (H_e), verificou-se que H_e foi mais alta do que H_o em todos os locos das matrizes e progênies de *T. roseo-alba*, evidenciando um déficit de heterozigotos, assim como o observado pelo valor do F_{IS} significativamente diferente de zero ($P < 0,05$), tanto nas matrizes com valor médio de 0,638

(IC 95%; 0,453 a 0,803) quanto nas progênies, apresentando um valor médio de 0,696 (IC 95%; 0,610 a 0,773) (Tabelas 6 e 7).

Feres et al. (2008) também encontrou um valor de H_o (0,493) menor que H_e (0,693) para uma população urbana de *T. roseo-alba* e suas progênies ($H_o= 0,425$ e $H_e= 0,708$), caracterizando um excesso de homozigotos nessa população. As médias das heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) tanto das matrizes como das progênies de *T. roseo-alba* foram inferiores às encontradas para *T. aurea* (H_o : 0,585; H_e : 0,912) por Braga et al. (2007).

Tabela 6 - Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade das 84 matrizes de *T. roseo-alba*, sendo A: número de alelos por loco; PIC: conteúdo de informação de polimorfismo; H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg; F_{is} : índice de fixação intrapopulacional

loco	A	Tamanho (pb)	PIC	H_o	H_e	F_{is}
Tau12	4	140 - 170	0,466	0,048	0,508	0,907
Tau15	21	120 - 150	0,903	0,470	0,914	0,488
Tau16	10	140 - 170	0,788	0,123	0,815	0,849
Tau19	14	190 - 250	0,833	0,100	0,853	0,883
Tau21	8	210 - 240	0,579	0,398	0,610	0,350
Tau22	7	130 - 140	0,509	0,120	0,559	0,785
Tau27	11	170 - 220	0,851	0,241	0,871	0,724
Tau31	10	240 - 300	0,811	0,667	0,837	0,205
Média	10,63		0,718	0,271	0,746	0,638

Tabela 7 - Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade das 189 progênies de *T. roseo-alba*, sendo A: número de alelos por loco; PIC: conteúdo de informação de polimorfismo; H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg; F_{is} : índice de fixação intrapopulacional

loco	A	Tamanho (pb)	PIC	H_o	H_e	F_{is}
Tau12	5	140 - 180	0,416	0,139	0,452	0,693
Tau15	19	120 - 150	0,882	0,366	0,893	0,591
Tau16	10	140 - 180	0,822	0,187	0,844	0,779
Tau19	18	190 - 250	0,870	0,218	0,882	0,754
Tau21	8	210 - 240	0,679	0,208	0,707	0,707
Tau22	11	120 - 150	0,661	0,093	0,701	0,867
Tau27	14	170 - 230	0,876	0,241	0,889	0,729
Tau31	11	240 - 300	0,806	0,437	0,829	0,473
Média	12,0		0,752	0,236	0,775	0,696

Em termos gerais, as matrizes e progênies de *T. roseo-alba* apresentaram diversidade genética relativamente alta, com valores médios de H_e de 0,746 e 0,775, respectivamente (Tabelas 8 e 9). Uma alta diversidade genética também foi encontrada para *Jacaranda copaia* ($H_e = 0,778$) (Jones & Hubbell, 2003), espécie pertencente também à família Bignoniaceae, como *T. roseo-alba* e *T. aurea*.

Com relação às espécies florestais Hamrick et al. (1992) constatou que diversos fatores influenciam os níveis de diversidade genética nestas espécies. Espécies arbóreas, comparadas às outras formas de vida, apresentam uma alta variação intraespecífica e geralmente exibem menos variação entre as populações, particularmente nas espécies muito dispersas, com sistemas de cruzamento ao acaso e sementes dispersas pelo vento ou animais (Hamrick et al., 1993).

Uma explicação para os altos valores de diversidade gênica pode estar relacionada à existência de uma alta variabilidade genética no conjunto das matrizes de *T. roseo-alba* estudado, as quais foram coletadas num raio de 16.000 km² na Região de Ribeirão Preto e, conseqüentemente, nas progênies provenientes dessas matrizes, conservadas no BG-USP/RP. Outra hipótese que não pode ser descartada é a alta taxa de mutação dos locos SSR (Weber & Wong, 1993; Kayser et al., 2000).

O alto valor de F_{is} nas matrizes e progênies de *T. roseo-alba* (Tabelas 6 e 7) acusou tendência de excesso de homozigotos, indicando que pode estar ocorrendo endogamia entre as árvores matrizes que deram origem às progênies de *T. roseo-alba* conservadas no BG-USP/RP. Feres et al. (2008) também encontrou um F_{is} alto de 0,267 em uma população urbana de *T. roseo-alba* e também nas suas progênies (0,390), mostrando um nível alto de endogamia, porém inferior ao encontrado neste estudo.

Feres et al. (2008), através de estudos de sistemas de cruzamento em *T. roseo-alba*, descreveu que esta espécie apresenta sistema de cruzamento misto, com predomínio de

fecundação cruzada. Com base nesse pressuposto, pode-se inferir que os altos níveis de endogamia observados neste trabalho sejam decorrentes de auto-fecundação e também de cruzamentos entre parentes.

Neste mesmo estudo conduzido por Feres et al. (2008), foi detectada a presença de alelos nulos em famílias (1 matriz x 20 progênies) de *T. roseo-alba*. Locus SSR transferidos apresentam maior probabilidade de ocorrência de alelos nulos (Pinto, 2007), outro fator que pode estar contribuindo para esses altos índices de fixação gerados neste estudo com *primers* heterólogos de *T. aurea*. A presença de alelos nulos nos indivíduos de *T. roseo-alba* analisados mascara os indivíduos heterozigotos por apresentarem uma única banda no gel ao invés de duas bandas, aumentando, portanto, a proporção de indivíduos homozigotos nas amostras testadas.

Outra causa pode estar associada à ocorrência de subdivisão das matrizes de *T. roseo-alba* em unidades reprodutivas diferenciadas e isoladas, devido à grande extensão amostral (16.000 km²). Segundo Wright (1931), a subdivisão de uma população aumentaria a probabilidade de cruzamentos dentro dos grupos, conseqüentemente aumentando a coancestria e a endogamia, e reduzindo a proporção de heterozigotos na população, fenômeno este conhecido como efeito *Wahlund*.

No entanto, vale ressaltar que o coeficiente de endogamia pode ser superestimado em razão de erros de amostragem, pois com tamanho de amostras pequeno é quase impossível capturar todos os possíveis genótipos de cada um dos locos (Collevatti et al., 2001), e pela natureza mutacional dos marcadores microssatélites, a qual aumenta consideravelmente a probabilidade de alelos serem idênticos por estado do que por descendência (Slatkin, 1995).

Por outro lado, os resultados comparativos da caracterização genética das matrizes e progênies de *T. roseo-alba* mostram que aproximadamente 95,3% dos alelos presentes nas árvores adultas (matrizes) foram transferidos para as progênies conservadas no BG-USP/RP.

Para a espécie *Copaifera langsdorffii* (copaíba), 94,3% dos alelos presentes nas matrizes foram transferidos para as progênies da espécie conservadas no BG-USP/RP (Gonela, 2005; Soriani, 2005). Análises conjuntas de parâmetros genéticos de *Hymenaea courbaril* (jatobá) obtidos por Feres (2006) e por Guidugli (2007) mostraram que aproximadamente 94,9% dos alelos presentes nas matrizes foram transferidos para as progênies de *H. courbaril* conservadas neste Banco genético. Segundo Mayor (2007), a análise das matrizes *versus* progênies de *Eugenia uniflora* (pitanga) mostrou que 94,2% dos alelos presentes nas matrizes foram transferidos para as suas progênies conservadas no BG-USP/RP.

Esses resultados indicam o sucesso da coleta e plantio de sementes de *T. roseo-alba* no Banco e também das outras três espécies, contribuindo dessa forma para a conservação destes valiosos recursos genéticos da Região de Ribeirão Preto (SP).

De modo geral, as informações geradas neste trabalho para a espécie *T. roseo-alba*, através de marcadores moleculares microssatélites, foram muito importantes para o entendimento dos processos envolvidos na manutenção de sua diversidade genética, indicando que esses marcadores podem ser empregados em estudos genéticos desta espécie e contribuir com a formulação de recomendações conservacionistas.

4.3.4 Similaridade genética das matrizes de *T. roseo-alba*

A análise de clusters baseada em dados moleculares de 8 locos SSR sugeriu um número ótimo de três clusters para as 84 matrizes de *T. roseo-alba*, que deram origem às progênies do BG-USP/RP.

O cluster I é composto por um número intermediário de indivíduos (34); o cluster II apresentou o menor número de indivíduos (14) enquanto o cluster III contém o maior

número (36) (Figura 15). O mapeamento das 84 matrizes de *T. roseo-alba* está representado na Figura 16.

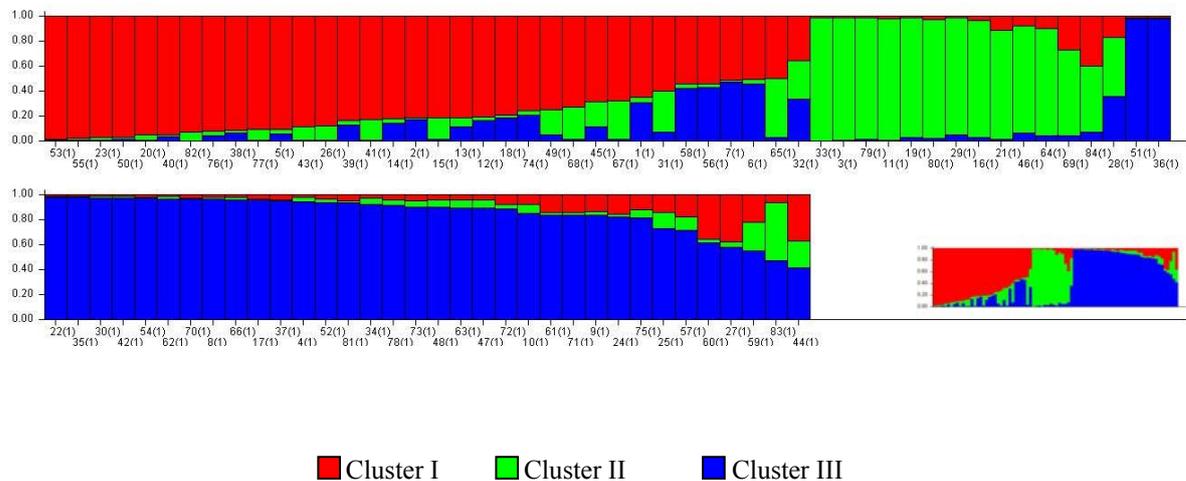


Figura 15. Similaridade genética das matrizes de *T. roseo-alba* consideradas neste estudo

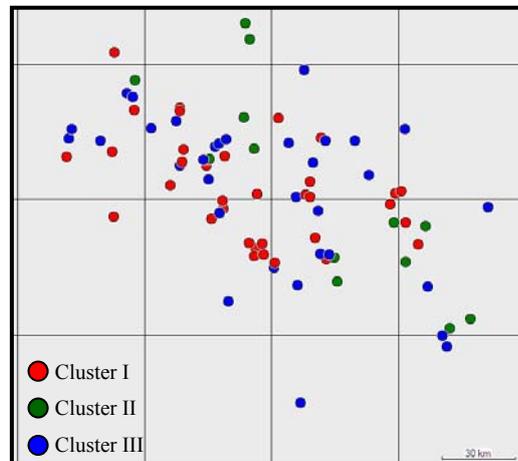


Figura 16. Mapeamento das matrizes de *T. roseo-alba* agrupadas em 3 clusters: I, II e III

Não se pode afirmar que cada cluster representa uma população definida de *T. roseo-alba*, uma vez que a maioria dos indivíduos dessa espécie tem uma origem distinta por terem sido plantados por diversos proprietários de fazendas e nos programas de arborização de ruas e avenidas dos municípios existentes na extensa Região de Ribeirão Preto.

Esta informação é válida para os programas de coleta de sementes que podem selecionar as árvores mais distantes geneticamente, ou seja, pertencentes a clusters distintos, para a formação de lotes de sementes com alta variabilidade genética, independente se essas sementes foram coletadas de árvores matrizes pouco ou muito distantes geograficamente.

4.3.5 Análises de maternidade

Os locos combinados apresentaram altas probabilidades de exclusão de paternidade tanto nas matrizes como nas progênies de *T. roseo-alba*, para as 2 estimativas consideradas (Tabela 8). A primeira estimativa de probabilidade de exclusão de paternidade ($\text{Pr}(\text{Ex}_1)$) ocorre quando a progênie é amostrada, mas a mãe não é; a segunda estimativa, $\text{Pr}(\text{Ex}_2)$, ocorre quando ambas a mãe e a progênies são amostradas.

Tabela 8 – Probabilidades de exclusão de paternidade para as matrizes e progênies de *T. roseo-alba* analisadas neste trabalho, considerando os oito locos SSR conjuntamente

	Pr(Ex₁)	Pr(Ex₂)
Matrizes	0,99105	0,99951
Progênies	0,99475	0,99976

Esses resultados indicam que esta bateria de locos microssatélites tem alto potencial para estudos de análise de paternidade/maternidade em *T. roseo-alba*, uma vez que eles fornecem dados com mais de 99% de precisão quando utilizados conjuntamente.

Analisar a distribuição das freqüências alélicas das matrizes e progênies de *T. roseo-alba* também é essencial, pois a determinação dos alelos mais freqüentes e exclusivos para cada loco não são *a priori* discriminatórios para análises de maternidade.

Neste trabalho foi observado que grande parte dos alelos dos oito *primers* SSR analisados teve uma freqüência alélica baixa, explicada pelo alto nível de polimorfismo desses

locos. O pequeno número de alelos exclusivos das matrizes (4) facilita as análises de parentesco, considerando que as progênies devem também apresentar pelo menos um dos alelos encontrados na matriz correspondente. Por outro lado, a presença de alelos exclusivos nas matrizes já exclui qualquer progênie testada da maternidade.

Em uma abordagem determinística foi verificado o compartilhamento de pelo menos um dos alelos a cada loco entre a suposta árvore mãe e as progênies testadas, e constatou-se que apenas 89 progênies de *T. roseo-alba* possuem pelo menos um dos alelos encontrados nas supostas árvores mães para os oito locos analisados (Anexo C). Essa análise indica que apenas 47% das progênies testadas tiveram sua maternidade identificada.

A verificação da maternidade foi também realizada através do programa Cervus 3.0, submetendo-se as 84 matrizes genotipadas de *T. roseo-alba* frente a cada uma das 189 progênies da espécie. Com o auxílio do programa, a correspondência de maternidade foi encontrada para 117 progênies de *T. roseo-alba*, considerando a presença de pelo menos um alelo para cada um dos oito locos estudados, tanto para o nível de confiança restrito (95 %) como relaxado (80 %).

Assim, as 89 progênies de *T. roseo-alba* com a maternidade identificada pela abordagem determinística também foram confirmadas pela análise computacional. No entanto, com auxílio do programa, foi identificada a maternidade de mais 28 progênies de *T. roseo-alba* provenientes de 20 árvores mães, as quais estavam erroneamente colocadas em outras famílias (Anexo C; Tabela 9).

Tabela 9 - Lista das 28 progênies de *T. roseo-alba* com suas respectivas árvores mães, identificadas pelo Programa CERVUS 3.0

Matriz	Progênie	Matriz	Progênie
7	36	32	25, 78, 102, 125, 159, 164, 166, 182
9	74	39	189
10	186	43	126
12	114	47	128
14	42	48	35
20	99	66	40
22	118	68	156
25	31	75	1
28	165, 171	76	129
30	188	77	122

Portanto, através dessas análises 62% das progênies de *T. roseo-alba* do BG-USP/RP tiveram sua origem materna verificada e corrigida. Por outro lado, não pôde ser confirmada a maternidade de 72 progênies (taxa de erro de identificação de maternidade de 38 %).

Erros de coleta em campo das sementes que formaram o BG-USP/RP e mistura das sementes durante o plantio no Banco podem ser alguns dos fatores principais que podem estar levando a uma elevada taxa de erro de identificação de maternidade, a qual foi calculada pelo número de progênies que estão com maternidade incorreta em relação ao número de progênies analisadas.

Desde que o BG-USP/RP foi implantado, utilizando sementes de 3450 árvores matrizes de 44 espécies da Floresta Estacional Semidecidual, entre elas *T. roseo-alba*, catalogadas em 450 remanescentes florestais da região, é possível entender as grandes dificuldades que tiveram que ser enfrentadas durante seu estabelecimento. Assim, não é de se estranhar que a mistura das sementes das progênies durante o plantio no BG-USP/RP pode ter acontecido tanto pelo manejo de grande volume de materiais, quanto pela inexperiência inicial dos técnicos encarregados do manejo em viveiro como das pessoas encarregadas do plantio nos 45 ha destinados para o BG-USP/RP.

Com relação à coleta, pode ter havido a seleção de frutos de *T. roseo-alba*, para a coleta de sementes para a formação do BG-USP/RP, que se encontravam no solo próximos às árvores matrizes, mas que na verdade, podiam não pertencer a ela, mas sim transportadas pelo vento de outras árvores vizinhas da mesma espécie. Por falta de treinamento e conhecimento inicial dos técnicos que participaram das saídas de campo, não houve a preocupação de se coletar apenas frutos de *T. roseo-alba* que ainda se encontravam na árvore selecionada como matriz fornecedora de sementes para a implantação do banco de germoplasma.

Além disso, artefatos de PCR podem causar a amplificação de alelos com comprimento incorreto e a não amplificação de um alelo nos indivíduos heterozigotos (Hoshino et al., 2002), interferindo na análise de maternidade.

Os microssatélites também podem apresentar alelos nulos, como resultado de mutações nos sítios complementares aos *primers*, que podem levar a interpretações errôneas dos géis (Pinto et al., 2001), uma vez que somente uma parte dos alelos amplificará, se as alterações não estiverem fixadas na população (Hoshino et al., 2002). Os alelos não amplificados são denominados de alelos nulos (Pemberton et al., 1995).

No entanto, neste trabalho, a leitura dos alelos foi feita meticulosamente, sendo feitos géis de confirmação quando os resultados apresentaram-se duvidosos. Assim, acredita-se, portanto, que os resultados encontrados refletem a mistura das sementes durante a formação do banco de germoplasma e erros de coleta.

O principal problema causado pela mistura de sementes pode refletir futuramente no manejo das sementes derivadas do banco. Isto porque o fornecimento de sementes e mudas pode ficar comprometido, ocasionando um impacto direto nas estratégias de produção de sementes e seleção de árvores superiores. Reflorestamentos mal sucedidos podem resultar da seleção de materiais de baixa variabilidade genética, erroneamente classificados como procedentes de matrizes de alta variabilidade.

Outro problema é a realização de reflorestamentos com sementes altamente endogâmicas. A endogamia em espécies arbóreas de vida longa pode levar a perda de fertilidade, baixa taxa de crescimento, má formação do fuste, redução na produção de sementes e redução da adaptabilidade da população. Por exemplo, uma das estratégias de manejo das sementes derivadas das árvores do Banco seria a seleção dentro de parcelas, visando reduzir o parentesco dentro destas e, conseqüentemente, o cruzamento entre parentes. Assim, teríamos a redução nos níveis de endogamia biparental nas sementes coletadas.

Satisfatoriamente, este estudo mostrou que existe uma alta variabilidade genética tanto nas matrizes como nas progênies de *T. roseo-alba* conservadas no BG-USP/RP, havendo uma importante riqueza alélica que precisa ser conservada.

Cientes de sua importância ecológica, econômica e etnobotânica, somada ao processo de degradação dos ambientes naturais nos quais *T. roseo-alba* ocorria, fica clara a importância e a urgência de se realizar estudos como este que visem auxiliar a conservação *ex situ* dessa espécie. Na região de Ribeirão Preto, *T. roseo-alba*, já não é mais encontrada em populações naturais, sendo que as progênies conservadas no Banco de Germoplasma da USP/RP foram originadas de árvores adultas encontradas em áreas urbanas e pomares de fazendas da região.

Considerando as áreas urbanas como sendo um sistema onde existem interações entre os organismos e os indivíduos destas populações, torna-se imprescindível a atenção com a variabilidade genética de seus indivíduos arbóreos. Populações de árvores em áreas urbanas com baixa variabilidade genética tornam-se mais vulneráveis à infestação de pragas e doenças, o que é acentuado pelas condições de estresse provocado por esse ambiente bastante alterado (Yamamoto, 2007).

O levantamento e a manutenção *ex situ* da variabilidade genética desses recursos genéticos são fundamentais para a sobrevivência de espécies comprometidas, como é o caso de *T. roseo-alba*.

Portanto, acredita-se que apesar do BG-USP/RP não possuir a identidade correta de 38 % das progênies de *T. roseo-alba* (futuras árvores matrizes), o fornecimento de sementes da espécie para programas de reflorestamento junto às unidades rurais da Região não ficará comprometido. Houve um sucesso na transferência de 95,3 % dos alelos das matrizes de *T. roseo-alba* para as progênies do BG-USP/RP, o que mostra a alta riqueza alélica de tais progênies. Assim, satisfatoriamente será possível cumprir o objetivo estratégico do projeto de implantação desse Banco de Germoplasma.

5 CONCLUSÕES

Baseado nas análises realizadas neste estudo pode-se concluir que:

- (1) Houve um sucesso na transferência dos locos SSR de *T. aurea* para *T. roseo-alba*, mostrando a conservação das regiões flanqueadoras entre as duas espécies;
- (2) Foi observada uma grande riqueza alélica nas matrizes de *T. roseo-alba* localizadas nas Bacias dos Rios Pardo e Mogi-Guaçu, sendo que esta riqueza alélica foi praticamente toda transferida para o BG-USP/RP;
- (3) Existe entre as matrizes amostradas de *T. roseo-alba*, alelos raros e privativos que precisam ser transferidos para o BG-USP/RP;
- (4) Apesar da interferência humana fragmentando a Região de Ribeirão Preto em pequenos fragmentos isolados, existe uma elevada diversidade genética tanto nas matrizes – muitas delas de procedência urbana - como nas progênies de *T. roseo-alba* estudadas;
- (5) Um excesso de homozigotos tanto nas matrizes como nas progênies de *T. roseo-alba* foi detectado, indicando a possível existência de um processo endogâmico, decorrente de autofecundação, cruzamentos entre indivíduos aparentados, efeito *Wahlund* e presença de alelos nulos;
- (6) Os oito locos SSR utilizados neste trabalho podem ser utilizados seguramente para análises de maternidade/paternidade em *T. roseo-alba*, por fornecerem uma discriminação individual precisa;
- (7) As matrizes de *T. roseo-alba* podem ser agrupadas em três clusters de acordo com sua similaridade genética, independente do seu posicionamento geográfico;
- (8) 62% das progênies de *T. roseo-alba* conservadas no BG-USP/RP possuem sua maternidade identificada;

(9) Os resultados obtidos neste trabalho apontam o sucesso de marcadores moleculares microssatélites para estudos genéticos em *T. roseo-alba* e serão estratégicos na geração de informações genéticas que possam servir de auxílio tanto nos Programas de Conservação *in situ* como *ex situ* (BG-USP/RP).

REFERÊNCIAS

ADAMS, W. T. & JOLY, R. J. Allozyme studies in loblolly pine seed orchards: clonal variation and frequency of progeny due to self fertilization. **Silvae Genetica**, 29: 1-4, 1980.

ALLCOCK, A. L.; CHAUVET, M.; CRANDALL, K. A.; GIVEN, D. R.; HALL, S. J. G.; IRIONDO, J. M.; LEWINSOHN, T. M.; LYNCH, S.M.; SOLÉ-CAVA, A. M.; STACKEBRANDT, E.; TEMPLETON, A. R.; WATTS, P. C. **Genetic diversity as a component of biodiversity**. In: Heywood, V. H.; Watson, R. T. (eds). *Global Biodiversity Assessment*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995, p.57-88.

ALZATE-MARIN, A. L.; GUIDUGLI, M. C.; FERES, J. M.; CANAS, M. C. T.; PIMENTEL, A. L.; CIAMPI, A. Y.; SILVA, A. J.; MESTRINER, M. A. Análises alélicas visando conservação *in-situ* e *ex-situ* da espécie florestal *Hymenaea courbaril* no Noroeste de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Genética, 52. Foz do Iguaçu: 2006. **CD-ROM...** Foz do Iguaçu: SBG, 2006. p: 1004.

ALZATE-MARIN, A. L.; GUIDUGLI, M. C.; SORIANI, H. H.; MARTINEZ, C. A.; MESTRINER, M. A. An Efficient and Rapid DNA Minipreparation Suitable for PCR/SSR and RAPD Analyses in Tropical Forest Tree Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2008. (no prelo)

ÁRVORES ÚTEIS – ESALQ. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/trilhas/uteis/ut17.php>>. Acesso em: 28 jul. 2006.

BARBOSA, L. M. **Diretrizes da Secretaria de Estado do Meio Ambiente de São Paulo para reflorestamento heterogêneo de áreas degradadas**. CINP – SMA – São Paulo, 2002. Disponível em: <<http://www.rc.unesp.br/xivbsbp/Mesa03MLMB.PDF>>. Acesso em: 10 set. 2006.

BARBOSA, L. M. **Diretrizes da Secretaria de Estado do Meio Ambiente de São Paulo para reflorestamento heterogêneo de áreas degradadas**. CINP – SMA – São Paulo, 2002. Disponível em: <<http://www.rc.unesp.br/xivbsbp/Mesa03MLMB.PDF>>. Acesso em: 10 set. 2006.

BORÉM, A. **Biotecnologia Florestal**. Viçosa: UFV, 2007. 387 p.

BOTSTEIN, D.; White, R.L.; Skolnick, M.; Davis, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, 32: 314-331, 1980.

BRAGA, A. C.; REIS, A. M. M.; LEOI, L. T.; PEREIRA, R. W.; COLLEVATTI, R. G. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Mol. Ecol. Notes**, 7: 53-56, 2007.

BRADSHAW, H. D.; STETTLER, R. F. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. 2. Segregation distortion due to genetic load. **Theoretical Applied Genetics**, 89: 551-558, 1994.

BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development and mapping of microsatellite based markers in *Eucalyptus*. **Theor. Appl. Genet.**, v. 97, p. 816-827, 1998.

BRONDANI, R. P. V.; GAIOTTO, F. A.; MISSIAGGIA, A. A.; KIRST, M.; GRIBEL, R.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Mol. Ecol. Notes**, v. 3, n. 2, p. 177-179, 2003.

BROWN, G. R.; GILL, G. P.; KUNTZ, R. J.; LANGLEY, C. H.; NEALE, D. B. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in loblolly pine. **Proceedings National Academy Science USA**, 101: 15255-15260, 2004.

BURTON, P. J.; BALISKY, A. C.; COWARD, L. P.; CUMMING, S. G.; KNEESSHAW, D. D. The value of managing for biodiversity. **The Forest Chronicle**, v. 68, n. 2, p. 225-237, 1992.

BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Circular Técnica**, 20, p.1-11, set. 2003.

BYRNE, M.; MURREL, J. C.; ALLEN, B.; MORAN, G. F. An integrated genetic linkage map for *Eucalyptus* using RFLP, RAPD and isozyme markers. **Theoretical Applied Genetics**, 91: 869-875, 1995.

BYRNE, M.; MARQUES-GARCIA, M. I.; UREN, T.; SMITH, D. S.; MORAN, G. F. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. **Australian Journal Botany**, 44: 331-341, 1996.

CARLSON, J. E.; TULSIERAM, L. K.; GLAUBITZ, J. C.; LUK, V. W. K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theoretical Applied Genetics**, 91: 194-200, 1991.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: CNPF/EMBRAPA, 1994. 369p.

CENIS, J. L. Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas. **Terral.**, v. 12, p. 40-43. Sem ano. Disponível em: <<http://www.terral.com/revista12/pagina40.htm>>. Acesso em: 14 jul. 2006.

CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **Am. J. Bot.**, v. 83, p. 51-57, 1996.

CIAMPI, A. Y.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. **Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco e desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorfii* Desf. (Copaiba) Leguminosae-Caesalpinoideae.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 40 p.

COLLEVATTI, R.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterisation of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v.83, p.748-756, 1999.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Mol. Ecol.**, v. 10, p. 349-356, 2001.

CONSÓRCIO MATA ATLÂNTICA & UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. **Reserva da Biosfera da Mata Atlântica Plano de Ação: referências básicas.** Campinas: Unicamp, 1992. 101 p.

CRANE, E. **O livro do mel.** São Paulo, Nobel. 1985. 226p.

DEVEY, M. E.; JERMSTAD, K. D.; TAUER, G. C.; NEALE, D. B. Inheritance of RFLP loci in a loblolly pine 3-generation pedigree. **Theoretical Applied Genetics**, 83: 238-242, 1991.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p. 13-15, 1990.

DUNPHY, B. K.; HAMRICK, J. L.; SCHWARGEL, J. A comparison of direct and indirect measures of gene flow in the bat-pollinated tree in *Hymenaea courbaril* in the dry forest life zone of southwestern Puerto Rico. **International Journal of Plant Science**, Chicago, v. 165, p. 427 - 436, 2004.

EISEN, J. A Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D. B., Schlötterer, C. (eds) **Microsatellites – evolution and applications**. Oxford University Press, Oxford, UK, 1999, p. 34-48.

ELLSTRAND, N.C.; ELAN, D.R. Population genetic consequences of small population size: implication for plant conservation. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** v. 24, p.217-242, 1993.

FALEIRO, F. G. **Preservação da variabilidade genética de plantas: um grande desafio**. Artigo Técnico, 2002. Disponível em: <<http://www.boletimpecuario.com.br/artigos/showartigo.php?arquivo=artigo350.txt>>. Acesso em: 11 set. 2006.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, 2007.

FAO's report. Global forest resources assessment 2000, tropical South America. **FAO Forestry Paper**, v.140, p.287-291, 2001.

FERES, J. M. **Estudos genéticos de progênies de *Hymenaea courbaril* conservadas no banco de germoplasma da floresta da USP/RP através do uso de marcadores SSR**. 2006. 57 f. Monografia (Especialização em Genética) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

FERES, J. M.; MESTRINER, M. A.; SEBBENN, A. M.; ALZATE-MARIN, A. L. Mating system and pollen flow in Brazilian urban population of *Tabebuia roseo-alba* (Ridl. Sand. - Bignoniaceae): implications for conservation. In: International Congress on Sexual Plant Reproduction, XX. Brasília-DF: 2008. **Anais...Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2008. p. 159-160.

FERES, J. M.; MARTINEZ, M. L. L.; MARTINEZ, C. A.; MESTRINER, M. A.; ALZATE-MARIN, A. L. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. **Molecular Ecology Resources**, 2008. (no prelo)

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1995. 220p.

FERREIRA-RAMOS, R.; GUIDUGLI, M. C.; CANAS, M. C. T.; PIMENTEL, A. L.; SILVA, A. J; MESTRINER, M. A.; ALZATE-MARIN, A. L. Transferibilidade de marcadores microssatélites heterólogos para *Eugenia uniflora*, uma espécie arbórea ameaçada

na região de Ribeirão Preto-SP. In: Congresso Brasileiro de Genética, 52. Foz do Iguaçu: 2006. **CD-ROM...** Foz do Iguaçu: SBG, 2006. p. 1328.

FERREIRA-RAMOS, R.; LABORDA, P. R.; SANTOS, M. O.; MAYOR, M. S.; MESTRINER, M. A.; SOUZA, A. P.; ALZATE-MARIN, A. L. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conserv Genet**, 9, 1281 – 1285, 2008.

FERREIRA-RAMOS, R. Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de *Eugenia uniflora* L. na região de Ribeirão Preto (SP), utilizando marcadores microssatélites. 2008. 170 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

FERRETTI, A.R.; KAGEYAMA, P.Y.; ÁRBOCZ, G.F.; SANTOS, J.D.; BARROS, M.I.A.; LORZAT, R.F.; OLIVEIRA, C. Classificação das espécies arbóreas em grupos ecológicos para revegetação com nativas no Estado de São Paulo. **Florestar Estatístico**, São Paulo, v.3, n.7, p.73-77, 1995.

FLORA TIETÊ – Associação de Recuperação Florestal do Médio Tietê. Disponível em: <<http://www.floratiete.com.br/biblioteca.htm#ipebranco>>. (Árvores/ Ipê-branco). Acesso em: 24 jul. 2006.

FONSECA, S.M. **Variações fenotípicas e genéticas em bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)**. 1982. 86p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, ESALQ, Piracicaba.

FONSECA, F. L.; MENEGARIO, C.; MORI, E. S.; NAKAGAWA, J. Maturidade fisiológica das sementes de ipê-amarelo *Tabebuia chrysotricha* (Mart. ex Dc.) Standl. **Scientia Forestalis**, n.69, p.136-141, 2005.

FORÉ, S.A.; HICKEY, R.J.; VANKAT, J.L.; GUTTMAN, S; SHAEFER, R. Genetic structure after forest fragmentation: a landscape ecology perspective on *Acer saccharum*. **Can. J. Bot.** v. 70, p. 1659-68, 1992.

FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. 463p.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2º ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992. 646p.

GAIOTO, F. A.; BRAMUCCI, M.; GRATTAPAGLIA, D. Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. **Theoretical Applied Genetics**, 95: 842-849, 1997.

GENTRY, A. H. 1973. Bignoniaceae. *In* Flora do Panama. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 60: 781-997.

GENTRY, A. H. 1974. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. **Biotropica**, 6(1): 64-68.

GILLIES, A.C.M.; COMELIUS, J.P.; NEWTON, A.C.; NAVARRO, C.; HERNÁNDEZ, M.; WILSON, J. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L. (Spanish Cedar), assessed using RAPDs. **Mol. Ecol.**, v.6, p.1133-1145, 1997.

GONELA, A. **Análise da estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais e respectivas progênes de *Copaifera langsdorffii* Desf. utilizando marcadores microssatélites**. 2005. 83 f. Tese (Pós-Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

GONZALEZ-MARTINEZ, S. C.; ERSOZ, E.; BROWN, G. R.; WHEELER, N. C.; NEALE, D. B. DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L. **Genetics**, 172: 1915-1926, 2006.

GOUDET, J. **Fstat version 2.9.3.2**. 2002. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Available from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: Mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**, 137: 1121-1137, 1994.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1998, 856p.

GUIDUGLI, M. C.; HILDEBRAND, H. S.; CANAS, M. C. T.; PIMENTEL, A. L.; CIAMPI, A. Y.; MESTRINER, M. A.; SILVA, A. J.; ALZATE-MARIN, A. L. Diversidade genética de populações naturais da espécie florestal *Hymenaea courbaril* no Noroeste de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Genética, 52. Foz do Iguaçu: 2006. **CD-ROM...** Foz do Iguaçu: SBG, 2006. p. 1002.

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

GUIDUGLI, M.C.; CAMPOS, T.; SOUSA, A. C. B.; FERES, J.M.; SEBBENN, A.M.; MESTRINER, A.M.; CONTEL, E.P.B.; ALZATE-MARIN, A.L. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics**, DOI: 10.1007/s10592-008-9672-4, 2008.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY; R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v. 113, p. 163-185, 2000.

HAMRICK, J.L.; LINHART, Y.B.; MITTON, J.B. Relationships between life history characteristic and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 10, p. 173-200, 1979.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: C. M. SCHONE-WALD-COX, S.H. CHAMBERS, B. MacBYDE; L. THOMAS. **Genetics and conservation.** Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park, California, p. 335-348. 1983.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L.; Weir, B.S. (Eds) **Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources.** Sinauer, Sunderland, Massachusetts, p. 43-63, 1990.

HAMRICK, J. L.; MURAWSKI, D. A. The breeding structure of tropical tree populations. **Plant Species Biology**, v.5, p.157-165, 1990.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W.; SHERMAN-BROYLES, S. L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**, v.6, p.95-124, 1992.

HAMRICK, J. L.; MURAWSKI, D. A.; NASON, J. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic-structure of tropical tree populations. **Vegetatio**, v.108, p.281-297, 1993.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; DLOUHY, S.R.; VANCE, G.H.; VOGT, P.H. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. **BioTechniques**, 23:504-511, 1997.

HENRIQUES, O. K. **Caracterização da vegetação natural em Ribeirão Preto, SP: Bases para a conservação**. 2003. 270 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

HOSHINO, A. A.; PALMIERI, D. A.; BRAVO, J. P.; PEREIRA, T. E. B.; LOPES, C. R.; GIMENES, M. A. Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 146-150, 2002.

JONES, F. A.; HUBBELL, S. P. Isolation and characterization of microsatellite loci in the tropical tree *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes**, 3, 403–405, 2003.

KAGEYAMA, P.Y.; MARQUEZ, F.C.M. Comportamento de sementes de curta longevidade armazenadas com diferentes teores de umidade inicial: gênero *Tabebuia*. In: Reunion sobre Problemas en Semillas Forestales Tropicales, 1980, San Felipe-Bacalar. **Memoria...** México: INIF, 1981. v.1, p.347-352. Publicación Especial, 35.

KAGEYAMA, P. Y. ; PATIÑO-VALERA, F. **Conservación y manejo de recursos forestales: factores que influyen en la estructura y diversidad de los ecosistemas forestales**. In: Congresso Florestal Mundial, IX, 1985, México. 24 p.

KAGEYAMA, P.Y.; FEIXÊ das, V.M.; GERES, W.L.; DIAS, J.H.P.;BORGES, A.S. Consórcio de espécies nativas de diferentes grupos sucessionais em Teodoro Sampaio. In: **II Congresso Nacional sobre essências nativas, II Anais...** São Paulo, 1992. p.527-533.

KAYSER, M.; ROEWER, L.; HEDMAN, M.; HENKE, L.; HENKE, J. et al. Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. **American Journal of Human Genetics**, v.66, n.5, p.1580-8, 2000.

KALINOWSKI, S. T. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, v.5, p.539-43, 2004.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, 16, 1099-1106, 2007.

LAURANCE, W. F.; BIEEREGARD, R. O. **Tropical forest remnants**. Chicago: University of Chicago Press, 1997. 615 p.

LEMES, M. R.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **The Journal of Heredity**, v. 93, n. 4, p. 287-291, 2002.

LEPSCH-CUNHA, N.; LUND, C. A.; HAMILTON, M. B. Isolation and characterization of nuclear microsatellite *loci* in the tropical arboreal palm *Oenocarpus bacaba* (Arecaceae). **Mol. Ecol. Not.**, v. 3, n. 3, p. 435-437, 2003.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **GDA – Genetic Data Analysis: version 1.1 for Windows 95/NT**. Disponível em: <<http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>>. 2000. Acesso em: 10 set. 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4.^a Ed. Vol. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 368 p.

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

MAEDA, J.A.; MATTHES, L.A.F. Conservação de sementes de ipê. **Bragantia**, Campinas, v.43, n.1, p.51-61, 1984.

MARQUES, C. M.; ARAUJO, J. A.; FERREIRA, J. G.; WHETTEN, R.; O'MALLEY, D. M.; LIU, B. H.; SEDEROFF, R. R. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. **Theoretical Applied Genetics**, 97: 727-737, 1998.

MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202p.

MAYOR, M. S. **Estudos genéticos de *Eugenia uniflora* L. na região de Ribeirão Preto, SP através do uso de marcadores SSR**. 2007. 67 f. Monografia (Especialização em Genética) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MENDONÇA, L. B.; ANJOS, L. Beija-flores (Aves, Trochilidae) e seus recursos florais em uma área urbana do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 22 (1): 51-59, 2005.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, p. 194 -200, 2002.

NEVO, E. Genetic variation in natural populatin: patters and theory. **Theor. Pop. Biol.** v.13. p.121-177, 1978.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatelites. **Gen. and Mol. Biol.**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, P.E.A.M.; PAULA, F.R. Fenologia e biologia reprodutiva de plantas de Mata de Galeria. In: Riberio, J.F.; Fonseca, C.E.L. da; Sousa-Silva, J.C. eds. **Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria**. Planaltina: Embrapa-Cerrados, pp. 301-332, 2001.

OLIVEIRA, A.F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.3, p.331-338, 2002.

OLIVEIRA, A. K. M.; SCHELDER, E. D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. F. ex. S. Moore. **Revista Árvore**, v.30, n.1, p.1-11, 2006.

ORTOLANI, F. A. **Morfo-anatomia, citogenética e palinologia em espécies de ipês (Bignoniaceae)**. 2007. 106 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal, 2007.

PEMBERTON, J.M.; Slate, J.; Bancroft, D.R.; Barret, J.A. Nom amplifying alleles at microsatellite loci - a caution for parentage and population studies. **Mol. Ecol.** 4. 249-52, 1995.

PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; de CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, v. 65, p. 40-48, 2004.

PINTO, M. F. F. C. **Caracterização de locos microssatélites em duas espécies de abelhas da região Amazônica: *Melipona compressipes* e *Melipona seminigra* (Hymenoptera: Apidae: Meliponina)**. 2007. 66 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas – Manaus, 2007.

PRITCHARD, J. K.; WEN, X.; FALUSH, D. 2007. **Documentation for STRUCTURE software: Version 2.2**. Available at: www.pritch.bsd.uchicago.edu/software. Cited, 15 September 2008.

PROJETO FLORESTA DA USP – Ribeirão Preto. Fundação Florestal. Disponível em: <<http://www.fflorestal.sp.gov.br>>. (Projetos/projeto floresta da USP/saiba mais). Acesso em: 24 jul. 2006.

ROCHE, L. **Forest genetic conservation**. Brasil/Bangor: IICA, 1987. 37 p. (IICA; EMBRAPA. Report on the threeweek consultancy).

SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J. F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity and Distributions**, v. 10, p. 201-210, 2004.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques, Natick**. 17: 914-921, 1994.

SANTOS, D.L.; SUGAHARA, V. Y.; TAKAKI, M. Efeitos da luz e da temperatura na germinação de sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich, *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex DC.) Standl. e *Tabebuia roseo-alba* (Ridl) Sand – Bignoniaceae. **Ciência Florestal**, 15 (1): 87-92, 2005.

SCHELLAS, J.; GREENBERG, R. **Forest patches in tropical landscapes**. Washington: Island Press, 1997. 426p.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scien. Forest.**, v. 57, p. 123-139, 2000.

SILVA, I. R.; FURTINI NETO, A. E.; CURI, N.; VALE, F. R. Crescimento inicial de quatorze espécies florestais nativas em resposta à adubação potássica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 205-212, 1997.

SLATE J.; MARSHALL T.; PEMBERTON, J. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program cervus. **Molecular Ecology**, 9, 801–808, 2000.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 130, p. 457 – 462, 1995.

SORIANI, H. H. **Uso de marcadores SSR no estudo de diversidade genética de matrizes de *Copaifera langsdorffii* vs. progênies conservadas no banco de germoplasma da Floresta da USP/RP**. 2005. 42 f. Monografia (Especialização em Genética) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

SOS Mata Atlântica. Disponível em: <<http://www.sosmatatlantica.org.br>>. (Atlas Mata Atlântica/clique para acessar os dados do Atlas/Acesso às informações do Atlas dos Remanescentes Florestais). Acesso em: 1 ago. 2008.

SOUZA, L. M. F. I. **Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* St. Hill (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru (SP) – Brasil**. 1997. 76 f. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

STEINKELLNER, H.; LEXER, C.; TURETSCHKEK, E.; GLOESSL, J. Conservation of (GA)_n microsatellite loci between *Quercus* species. **Mol. Ecol.**, v. 6, p. 1189-1194, 1997.

VAN TREUREN, R. **The significance of genetic erosion for the extinction of locally endangered plant populations**. 1993. 116 f. Tese (Pós-doutorado em Genética) – University of Groningen, Kerklaan, 1993.

VEIGA, R. F. A. **Bancos de Germoplasma**. In: JOLY, C. A. & BRITO, M. C. W. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. 7: Infra-estrutura para conservação da biodiversidade. São Paulo: FAPESP, 1999. Parte 2 - cap. 4, p. 103-110.

VIANA, V. M. **Conservação da biodiversidade de fragmentos de florestas tropicais em paisagens intensamente cultivadas**. In: Abordagens interdisciplinares para a conservação da biodiversidade e dinâmica do uso da terra no novo mundo. Gainesville: Conservation International do Brasil, Universidade Federal de Minas Gerais, University of Florida, 1995, p. 135-154.

VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. **Série Técnica**, IPEF, v. 12, n. 32, p. 25-42, dez. 1998.

VIEIRA, M. L. C.; VELLO, N. A.; SILVA FILHO, M. de C. Genética e Melhoramento Vegetal. In: Mir, L.; **Genômica**. 1.^a Edição. São Paulo: Ateneu, 2004, p. 679-699.

WALTER, B.M.T. Biodiversidade e recursos genéticos: Questões e conceitos. **Embrapa**, doc. No. 46, 48pp, 2000.

WANG, Z.; WEBER, J. L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S. D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theor. Appl. Genet.**, v. 88, p. 1-6, 1994.

WEBER, J. L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Human Molecular Genetics**, v.2, p.1123-8, 1993.

WEIR, B. S. **Genetics data analysis: Methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1990. 377 p.

WEIR, B.S. **Genetics data analysis II – Methods for discrete population genetic data**. Suderland MA, Sinauer Associates, Inc. Publishers. 1996.

WIESE, H. **Nova apicultura**. Porto Alegre, Livraria e Editora Agropecuária Ltda. 1985. 493p.

WILLIAMS, C. G.; ELSIK, C. G.; BARNES, R. D. Microsatellite analysis of *Pinus taeda* L. Zimbabwe. **Heredity**, 84 (Pt 2): 261-268, 2000.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97 - 159, 1931.

YAMAMOTO, M. A.; SOBIERAJSKI, G. R.; SILVA-FILHO, D. F.; COUTO, H. T. Z. Árvores matrizes de *Tabebuia pentaphila* (L.) Hemsl. (Ipê de El Salvador) e *Caesalpinia pluviosa* DC. (Sibipiruna) em área urbana, selecionadas por meio de índice de importância. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v. 2, n. 3, p. 13-30, 2007.

ZORZETTO, R.; FIORAVANTI, C.; FERRONI, M. **A floresta renasce**. Pesquisa Fapesp, v. 91, p. 48-52, 2003.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ANEXOS

Anexo A - Descrição do lugar de coleta e posição geográfica (UTM – Córrego Alegre) de cada amostra das matrizes de *Tabebuia roseo-alba* localizadas na região A de coleta entre as bacias dos Rios Pardo e Mogi-Guaçu

(continua)

Matriz	Localização da matriz	Região	Coordenadas (UTM)
1	No <i>Campus</i> da USP, na Rua Prof. Clóvis Vieira, na frente da casa n.º 43	Ribeirão Preto – SP	23 K 202901 7657303
2	No Ypê Tênis Club ao lado do estacionamento local	Tambaú – SP	23 K 263850 7596468
3	No final da Rua Benjamin Spiga Real, virando à direita e mais 10 m à direita	Tambaú – SP	23 K 267209 7597064
4	No sítio da Lúcia à direita da estrada de entrada da propriedade	Tambaú – SP	23 K 261500 7598364
5	No canteiro da Av. José Hermínio de Moraes perto do n. 327	Mococa – SP	23 K 291806 7623676
6	Na Reserva do Jataí na colônia em frente ao n. 14	Luís Antônio – SP	23 K 216792 7612121
7	Na Fazenda Maíra na Av. de Ipês a 900 m da entrada da propriedade situado à direita	Tambaú – SP	23 K 259349 7605050
8	Na Fazenda Santa Maria da Bela Vista a esquerda da estrada de entrada	Santa Rosa de Viterbo – SP	23 K 251300 7621700
9	Na Fazenda Santa Maria da Bela Vista a esquerda da estrada de entrada	Santa Rosa de Viterbo – SP	23 K 251300 7621700
10	No bosque perto do escritório do zoológico ao lado do campo de areia	Vargem Grande do Sul – SP	23 K 305374 7585722
11	Na Rua Orcival P. Silva em frente ao Café Expresso	Águas da Prata – SP	23 K 322832 7572636
12	Na Fazenda Canaã perto do barracão de maquinários agrícolas a 30 m do escritório	Luís Antônio – SP	23 K 221654 7616197
13	Na Fazenda São Joaquim na cerca da área da sede perto da estrada de acesso à sede	Luís Antônio – SP	23 K 221256 7619685
14	Na Rua Deodoro da Fonseca em frente ao n. 702	São Simão – SP	23 K 235276 7622655
15	Na Fazenda São Luís à direita da estrada de entrada da propriedade perto da sede	Mococa – SP	23 K 294102 7624470
16	Na Praça Rio Branco perto do Mercado Municipal	São José do Rio Pardo – SP	23 K 304268 7610343
17	Na Praça Coronel Gustavo Ribeiro atrás da Escolinha	Caconde – SP	23 K 329740 7618458
18	Na Fazenda Santa Lúcia na área da sede atrás da piscina perto da cerca do pasto	São José do Rio Pardo – SP	23 K 301176 7602736
19	Na Av. Ângelo Trogiani perto do Tonetti Supermercado	Itobi – SP	23 K 296314 7595587
20	Na Rua Dona Maria Pires em frente ao n. 555	Cajuru – SP	23 K 260967 7645846

Anexo A - Descrição do lugar de coleta e posição geográfica (UTM – Córrego Alegre) de cada amostra das matrizes de *Tabebuia roseo-alba* localizadas na região A de coleta entre as bacias dos Rios Pardo e Mogi-Guaçu

(continuação)

Matriz	Localização da matriz	Região	Coordenadas (UTM)
21	Na Rua Santo Afonso M. Liguori perto da Praça Santuário	São João da Boa Vista – SP	23 K 314690 7568771
22	No pátio da Casa da Agricultura	Tambaú – SP	23 K 264944 7598066
23	No final da Rua Goiás em um terreno	Santa Rosa de Viterbo – SP	23 K 254995 7622591
24	Na Chácara Monte Alto na entrada da propriedade	Cajuru – SP	23 K 262912 7644590
25	Na Estação Experimental na Av. de Ipês-Branços após o prédio da administração	Ribeirão Preto – SP	23 K 201738 7651864
26	Na Rua dos Ipês esquina com a Av. Cândido Pereira Lima	Ribeirão Preto – SP	23 K 202931 7655982
27	Na rotatória Jardim das Esculturas	Altinópolis – SP	23 K 253690 7673588
28	Na Chácara São Rafael à esquerda do portão de entrada	Batatais – SP	23 K 231293 7685646
29	No Viveiro Multiverde próximo à entrada ao lado da SP-334	Batatais – SP	23 K 229372 7692405
30	No jardim da prefeitura próximo à avenida	Luis Antônio - SP	23 K 219986 7614392
31	Na Fazenda Cruzeiro na entrada da sede, perto do terreiro de café	Ribeirão Preto – SP	23 K 204845 7640198
32	Na sede da Fazenda Monte Belo 2, próximo de uma quaresmeira	Cravinhos – SP	23 K 221693 7637810
33	Na sede da Fazenda Santa Mariana, sendo a mais próxima do pomar	Porto Ferreira – SP	23 K 252373 7585448
34	Na sede da Fazenda Santa Mariana, sendo a mais próxima do pomar	Porto Ferreira – SP	23 K 252373 7585448
35	Nos fundos da Fazenda Jandaia, perto da oficina	Cravinhos - SP	23 K 217661 7641749
36	Na Fazenda Santa Ignácia no pasto acima da sede próximo da porteira	Cravinhos - SP	23 K 219417 7642816
37	Na Fazenda Manoel Amaro na sede	Cravinhos – SP	23 K 222316 7644596
38	No Sítio Bebedouro na sede, próximo de um jerivá	Santa Rita do Passa Quatro - SP	23 K 234963 7600263
39	Na Fazenda da Glória na sede, próximo ao escritório	Santa Rita do Passa Quatro - SP	23 K 232243 7602473
40	Na Fazenda São João no pasto, próximo da estrada	Santa Rita do Passa Quatro - SP	23 K 237727 7602198
41	Na Fazenda das Rosas na sede	Cravinhos - SP	23 K 243347 7653577
42	Na Fazenda Bonfim no canto da horta	Cravinhos - SP	23 K 214026 7635189
43	Na Fazenda Santo Antônio na entrada para a sede no lado direito	Cravinhos – SP	23 K 214260 7633868
44	Na Fazenda Sobradinho na sede entre o ipê-roxo e o ipê-amarelo	Cravinhos – SP	23 K 203351 7633720
45	Na Fazenda Santa Maria da Figueira na entrada entre 2 sibipirunas e em frente a um jerivá	Rincão – SP	22 K 798397 7612534

Anexo A - Descrição do lugar de coleta e posição geográfica (UTM – Córrego Alegre) de cada amostra das matrizes de *Tabebuia roseo-alba* localizadas na região A de coleta entre as bacias dos Rios Pardo e Mogi-Guaçu

(continuação)

Matriz	Localização da matriz	Região	Coordenadas (UTM)
46	Na Fazenda Santa Cruz no barranco da sede	Cravinhos – SP	23 K 215550 7636587
47	Na Fazenda Jandira na sede, próximo ao pau-ferro	Cravinhos – SP	23 K 215327 7628015
48	No Sítio Laranjal na sede, perto de uma jaboticabeira	Santa Rita do Passa Quatro - SP	23 K 242769 7592565
49	No Horto Florestal acima da rodovia, próximo a uma quaresmeira	Santa Rita do Passa Quatro - SP	23 K 242768 7594503
50	No Sítio Cortado de Bebedouro, próximo a estrada	Santa Rita do Passa Quatro - SP	23 K 234364 7597119
51	Na Fazenda Bandeira no fundo do pomar	Descalvado - SP	23 K 224380 7578533
52	Na Fazenda São Bento na sede, próximo a um ipê-amarelo	Araras - SP	23 K 254440 7537574
53	Na Fazenda São José do Retiro, próximo à baía dos cavalos	Cravinhos - SP	23 K 204274 7635178
54	Na Fazenda Sapecado na sede, próximo a um pau d'álho	Cravinhos – SP	23 K 213200 7636039
55	Na Fazenda São José na sede, abaixo da represa	Santa Rita do Passa Quatro - SP	23 K 238326 7597648
56	Na Fazenda São Sebastião na Vila Walter Becker na Av. Pedro Biagi em frente ao n. 34	Pontal – SP	22 K 799651 7679792
57	No Sítio 15 de Novembro na avenida de entrada sendo o 10º indivíduo	São João da Boa Vista – SP	23 K 311586 7565829
58	Na Fazenda Sede Trevo do Posto Graciosa no canteiro central da avenida	Santa Rosa de Viterbo – SP	23 K 256886 7627855
59	Na Fazenda Cubatão no pasto acima do curral	Cajuru – SP	23 K 257898 7635756
60	No Sítio Chalet na cerca, próximo à entrada de frente com a Rua Luiz Donegá	Dumont – SP	23 K 295353 7650093
61	Na Praça Central à direita da igreja	Cássia dos Coqueiros – SP	23 K 274790 7644906
62	Na Praça Central, próximo à esquina do ponto de táxi	Dumont - SP	23 K 191318 7648612
63	Na Fazenda Santa Elisa na avenida de entrada, estando à esquerda	Sertãozinho – SP	22 K 804523 7663083
64	No Sítio Recreio na carreira de ipês, sendo o último indivíduo da espécie	Mococa – SP	23 K 291202 7611616
65	Na Fazenda Lagoa da Serra na área de treinamento, perto da placa Lagoa da Serra	Sertãozinho – SP	22 K 807450 7656182
66	Na Fazenda São Geraldo, próximo à barragem da represa em frente aos eucaliptos	Sertãozinho – SP	22 K 806990 7661408
67	No Sítio Trevo à direita antes do portão de entrada	Mococa – SP	23 K 289759 7619023
68	Na Fazenda da Serra, ao lado da casa do administrador	Mococa – SP	23 K 296171 7611649
69	Na Fazenda da Pedra, no reflorestamento a 250 m da porteira de ferro	Serrana – SP	23 K 229311 7653910

Anexo A - Descrição do lugar de coleta e posição geográfica (UTM – Córrego Alegre) de cada amostra das matrizes de *Tabebuia roseo-alba* localizadas na região A de coleta entre as bacias dos Rios Pardo e Mogi-Guaçu

(conclusão)

Matriz	Localização da matriz	Região	Coordenadas (UTM)
70	Na Chácara Santo Antônio, SP-342 no km 219,1	São João da Boa Vista – SP	23 K 313525 7561225
71	Na Estação São Francisco de Assis, 250 m à esquerda a partir da entrada da propriedade	Jaboticabal – SP	22 K 780618 7644840
72	Na Fazenda São Carlos, no trevo da automotiva da usina	Jaboticabal – SP	22 K 793348 7643870
73	Na Fazenda São Carlos, no trevo da automotiva da usina	Jaboticabal – SP	22 K 793348 7643870
74	Na Fazenda São Martinho, no reflorestamento da fideira da usina	Pradópolis – SP	22 K 798199 7639190
75	No Campus da UNESP à esquerda da rodovia do aeroporto a 100 m do trevo	Jaboticabal – SP	22 K 781766 7648933
76	Na Fazenda Capão da Cruz, próximo ao curral de confinamento da propriedade	Luis Antônio – SP	23 K 199738 7625560
77	Na Fazenda Santa Adélia, no bosque próximo ao trevo de acesso à balança	Jaboticabal – SP	22 K 779329 7637486
78	Na Praça Júlio Prestes atrás da igreja	Santa Cruz da Esperança – SP	23 K 247818 7643684
79	Na Rua Dona Laurinda F. Nascimento acima do n. 125	Serra Azul – SP	23 K 233790 7640970
80	Na Fazenda Aurora, porteira de entrada para área da sede a 1000 m à esquerda	Santa Cruz das Palmeiras – SP	23 K 268447 7587281
81	Na Fazenda Santa Carolina, no portão da área da sede a 60 m à esquerda	Mococa – SP	23 K 280921 7630875
82	Na Estância Ouro Verde, à direita da estrada que leva ao calcário PH7	Santa Rosa de Viterbo – SP	23 K 256932 7621655
83	No Sítio Gamelão na entrada da área da sede da propriedade	Santa Rosa de Viterbo – SP	23 K 260314 7615925
84	Na Fazenda Vassoural no pasto dos eqüinos no último piquete	Pontal-SP	22 K 808145 7668196

Anexo B - Genótipos das 84 matrizes de *Tabebuia roseo-alba*, representados pelos alelos de 8 locos SSR

(continua)

Matriz	Tau12	Tau12	Tau15	Tau15	Tau16	Tau16	Tau19	Tau19	Tau21	Tau21	Tau22	Tau22	Tau27	Tau27	Tau31	Tau31
1	3	3	8	24	2	2	6	6	5	5	1	1	2	2	4	7
2	4	4	12	12	2	2	6	6	6	6	5	5	10	12	3	4
3	3	3	17	25	3	3	14	14	2	5	4	4	1	1	6	8
4	3	3	12	20	5	5	6	6	5	5	4	4	3	3	4	8
5	4	4	3	22	8	9	6	6	1	1	4	4	6	6	2	4
6	3	3	12	18	1	1	16	16	8	8	5	8	3	3	4	4
7	3	3	16	16	1	1	6	6	5	5	5	5	6	8	4	7
8	3	3	12	12	6	6	6	6	5	5	4	4	11	11	6	6
9	3	3	16	16	5	5	-	-	1	5	5	5	11	11	3	7
10	3	3	16	16	5	5	7	7	1	8	4	4	3	6	3	7
11	3	3	17	17	3	3	8	8	4	4	4	5	1	12	6	8
12	2	2	20	20	5	5	16	16	8	8	5	5	4	10	4	6
13	2	2	16	16	7	8	11	11	8	8	4	4	4	6	4	6
14	1	1	16	16	6	6	6	6	2	5	5	5	4	11	3	7
15	4	4	16	20	3	3	10	10	6	8	4	4	5	12	4	5
16	1	1	17	17	2	2	8	8	5	5	4	4	1	1	5	5
17	3	3	16	16	2	2	6	6	5	5	4	4	2	2	4	4
18	4	4	23	23	4	4	6	6	1	5	4	4	10	10	4	4
19	3	3	14	14	5	5	13	13	5	5	4	4	1	1	4	4
20	2	4	8	8	6	6	6	6	1	1	4	5	5	5	5	5
21	3	4	14	14	3	4	7	7	5	5	4	4	13	13	5	8
22	3	3	16	16	2	2	6	6	5	8	4	4	6	11	2	3
23	2	2	24	24	2	4	10	10	1	8	4	5	6	6	4	8
24	3	3	16	22	4	4	6	6	5	5	4	4	6	6	4	4
25	3	3	11	16	2	2	16	16	4	5	1	1	3	3	3	4
26	1	1	19	19	4	6	10	10	5	5	1	1	4	4	4	5
27	3	3	16	18	6	6	7	7	5	8	5	5	6	6	4	5
28	3	3	12	18	6	6	-	-	5	5	5	5	1	1	4	5
29	3	3	12	18	5	5	12	12	5	5	4	4	1	1	3	4
30	3	3	12	15	2	2	7	7	5	5	4	4	10	10	3	4
31	1	1	17	20	4	4	11	11	5	5	4	4	3	5	5	7
32	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	5	5

Anexo B - Genótipos das 84 matrizes de *Tabebuia roseo-alba*, representados pelos alelos de 8 locos SSR

(continuação)

Matriz	Tau12	Tau12	Tau15	Tau15	Tau16	Tau16	Tau19	Tau19	Tau21	Tau21	Tau22	Tau22	Tau27	Tau27	Tau31	Tau31
33	2	2	14	25	3	3	13	13	2	5	4	4	1	1	5	7
34	3	3	16	16	5	5	-	-	5	8	4	4	3	3	4	4
35	3	3	10	10	2	2	11	11	5	5	4	4	3	3	4	6
36	3	3	10	16	2	2	11	11	8	8	4	4	10	10	4	4
37	3	3	1	10	2	2	-	-	5	8	4	4	10	10	4	8
38	3	3	12	18	2	2	17	17	7	8	5	9	5	5	3	7
39	3	3	11	15	2	2	6	6	2	2	5	5	5	5	9	9
40	3	3	16	20	4	4	16	16	3	7	9	9	2	10	3	9
41	1	1	17	17	6	6	7	7	7	7	7	7	4	10	3	5
42	3	3	11	11	-	-	7	7	5	5	4	4	11	11	4	4
43	1	1	22	24	4	4	7	7	5	8	1	5	5	5	5	5
44	3	3	12	16	-	-	18	18	4	5	4	4	3	6	2	9
45	2	2	8	14	4	4	6	6	5	5	4	4	3	3	5	5
46	3	3	18	18	4	4	-	-	1	5	4	4	1	1	3	3
47	3	3	12	18	6	6	7	7	5	8	4	4	3	3	3	3
48	1	3	11	11	2	2	-	-	5	5	4	4	-	-	2	2
49	2	2	5	5	3	5	1	1	5	8	4	4	11	11	8	8
50	2	2	16	16	2	5	5	5	2	2	8	8	6	6	8	8
51	3	3	16	20	2	2	6	6	5	5	4	4	11	11	3	3
52	3	3	10	15	2	2	5	16	5	5	4	4	6	6	2	2
53	2	2	19	19	2	2	15	17	7	7	5	8	6	6	1	1
54	3	3	10	10	2	2	11	11	5	5	5	5	11	11	3	5
55	2	2	16	16	4	4	1	5	5	5	8	8	6	6	7	10
56	3	3	16	18	2	5	5	5	5	5	5	5	6	6	5	8
57	2	2	16	16	5	5	-	-	5	5	4	4	3	3	4	4
58	3	3	12	19	7	7	6	6	5	5	5	5	10	10	4	8
59	3	3	11	19	5	5	-	-	5	5	4	4	4	4	4	5
60	3	3	12	12	4	4	-	-	5	8	5	5	10	10	4	5
61	3	3	18	20	4	4	6	6	5	8	4	4	10	10	3	7
62	3	3	15	15	2	2	6	6	5	5	4	4	4	10	3	4
63	3	3	12	15	2	2	16	16	5	5	4	4	6	6	3	7
64	2	2	12	15	3	3	16	16	4	5	4	4	1	12	2	5

Anexo B - Genótipos das 84 matrizes de *Tabebuia roseo-alba*, representados pelos alelos de 8 locos SSR

(conclusão)

Matriz	Tau12	Tau12	Tau15	Tau15	Tau16	Tau16	Tau19	Tau19	Tau21	Tau21	Tau22	Tau22	Tau27	Tau27	Tau31	Tau31
65	3	3	15	17	7	7	7	7	5	8	1	1	5	5	2	7
66	3	3	12	16	6	6	-	-	5	5	4	4	10	10	4	8
67	1	1	14	21	10	10	6	6	3	4	4	4	6	6	3	5
68	1	3	7	7	6	10	7	14	1	1	4	4	6	12	5	6
69	3	3	18	21	7	7	7	7	5	5	4	4	4	4	5	5
70	3	3	10	16	2	2	7	7	5	8	5	5	11	11	3	5
71	3	3	22	22	2	2	-	-	5	5	4	6	10	10	4	6
72	3	3	11	11	6	6	-	-	1	5	4	4	4	10	2	8
73	3	3	11	11	2	2	6	6	5	5	4	4	12	12	3	8
74	3	3	11	19	4	4	5	5	5	5	5	5	4	12	3	8
75	3	3	9	20	2	2	-	-	1	5	4	4	3	3	5	5
76	2	2	12	18	2	5	16	16	5	8	5	8	5	10	5	5
77	2	2	18	18	6	6	10	14	5	7	5	5	4	4	3	5
78	3	3	15	15	2	2	17	17	5	5	4	4	10	10	2	5
79	3	3	21	21	3	3	11	13	5	5	4	4	1	1	5	7
80	3	3	15	15	5	5	12	12	5	5	1	1	1	1	3	9
81	3	3	20	20	2	2	6	6	1	5	4	4	6	6	3	5
82	2	2	17	17	7	7	1	1	6	6	4	8	6	10	3	9
83	3	3	10	10	3	3	10	12	5	8	4	4	10	10	3	7
84	3	3	17	17	8	8	7	7	5	8	4	4	6	6	3	7

Anexo C – Genótipos das 189 progênies e seus supostos parentais de *Tabebuia roseo-alba*, representados pelos alelos de 8 locos SSR

(continua)

Indivíduo	Tau12	Tau12	Tau15	Tau15	Tau16	Tau16	Tau19	Tau19	Tau21	Tau21	Tau22	Tau22	Tau27	Tau27	Tau31	Tau31
Matriz 27	3	3	16	18	6	6	7	7	5	8	5	5	6	6	4	5
169	2	2	22	22	6	6	15	15	2	2	5	5	6	10	2	10
170	2	2	16	16	7	7	15	15	2	2	4	4	10	10	9	9
171	3	3	12	12	4	6	15	15	5	5	5	5	4	4	4	4
172	3	3	12	12	2	2	11	11	3	3	2	2	10	10	5	5
173	1	1	8	16	4	4	6	6	2	2	4	4	1	12	4	9
174	2	2	14	22	6	6	11	11	3	3	1	1	1	1	9	9
175	3	3	12	12	2	2	6	6	5	5	2	2	10	10	2	2
176*	3	3	16	16	6	6	7	7	5	5	5	5	6	6	5	5
177	3	3	18	18	2	2	7	7	3	3	4	4	4	4	9	9
Matriz 28	3	3	12	18	6	6	-	-	5	5	5	5	1	1	4	5
178*	3	3	18	18	6	6	13	13	5	5	5	5	1	1	5	5
179	3	3	16	16	6	6	13	16	5	5	1	1	1	1	11	11
180	4	4	16	16	8	8	16	16	8	8	8	8	10	10	4	11
181*	3	3	12	18	6	6	13	13	5	8	5	5	1	12	4	4
Matriz 29	3	3	12	18	5	5	12	12	5	5	4	4	1	1	3	4
182	3	3	12	12	4	4	10	10	4	4	6	6	6	10	5	5
183	4	4	15	15	5	5	8	8	7	7	1	1	6	10	3	3
184	-	-	15	15	4	4	11	11	-	-	1	1	1	1	4	4
Matriz 30	3	3	12	15	2	2	7	7	5	5	4	4	10	10	3	4
185*	3	3	12	18	2	2	7	7	5	5	4	4	10	10	3	3
186	3	3	16	16	4	4	7	7	-	-	4	4	6	6	3	3
s/ matriz																
187	1	1	10	10	4	4	6	6	5	5	5	5	6	6	4	4
188	3	3	12	18	2	4	7	7	5	5	4	4	10	12	3	5
189	3	3	12	18	2	2	6	6	-	-	5	5	1	5	-	-
Matriz 31	1	1	17	20	4	4	11	11	5	5	4	4	3	5	5	7
1	-	-	17	17	2	2	15	15	5	5	4	4	3	3	5	5
2	3	3	17	17	4	4	6	6	2	2	-	-	7	7	5	7
3	3	3	19	19	2	2	15	15	1	1	4	4	5	5	5	6

Anexo C – Genótipos das 189 progênies e seus supostos parentais de *Tabebuia roseo-alba*, representados pelos alelos de 8 locos SSR

(continuação)

Indivíduo	Tau12	Tau12	Tau15	Tau15	Tau16	Tau16	Tau19	Tau19	Tau21	Tau21	Tau22	Tau22	Tau27	Tau27	Tau31	Tau31
Matriz 32	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	6	5	5
4*	3	3	19	19	5	5	-	-	3	3	4	4	6	6	5	7
Matriz 33/34	2/2	3/3	14/25	16/16	3/3	5/5	13/13	--	2/5	5/8	4/4	4/4	1/1	3/3	5/7	4/4
5*	3	3	16	16	5	5	6	6	5	5	4	4	3	3	3	4
Matriz 35	3	3	10	10	2	2	11	11	5	5	4	4	3	3	4	6
6	3	3	17	17	5	7	9	9	4	4	4	4	3	10	4	4
7	-	-	10	10	7	7	6	6	1	1	4	4	3	3	8	8
8	3	3	16	16	5	5	9	9	8	8	4	4	10	10	6	6
Matriz 36	3	3	10	16	2	2	11	11	8	8	4	4	10	10	4	4
9*	3	3	10	10	2	2	7	11	8	8	4	4	10	10	4	4
10*	3	3	16	16	2	2	11	11	8	8	4	4	10	10	4	9
Matriz 38	3	3	12	18	2	2	17	17	7	8	5	9	5	5	3	7
11*	3	3	16	16	2	7	17	17	7	8	5	5	3	5	7	7
Matriz 39	3	3	11	15	2	2	6	6	2	2	5	5	5	5	9	9
12*	3	3	11	15	2	2	6	6	2	2	5	5	5	5	9	9
13*	3	3	11	15	2	2	6	6	2	2	6	6	5	5	9	9
Matriz 40	3	3	16	20	4	4	16	16	3	7	9	9	2	10	3	9
14*	3	3	16	20	-	-	16	16	7	7	9	9	-	-	3	3
Matriz 41	1	1	17	17	6	6	7	7	7	7	7	7	4	10	3	5
15	1	3	11	11	7	7	8	8	6	6	5	5	4	4	7	7
16	3	3	12	12	5	7	5	5	3	3	6	6	10	10	4	4
17	1	1	-	-	3	3	16	16	7	7	-	-	5	5	3	3
Matriz 42	3	3	11	11	-	-	7	7	5	5	4	4	11	11	4	4
18*	3	3	11	11	4	6	7	7	5	5	4	4	11	11	4	4
19	3	3	16	16	4	4	7	7	1	1	-	-	3	3	4	8
20*	3	3	11	16	-	-	7	7	5	5	4	4	11	11	3	4
21	1	3	16	16	2	6	15	15	3	3	1	1	3	3	5	5
22	3	3	11	16	2	2	15	15	5	5	5	5	1	4	3	3
23*	3	3	11	11	6	6	7	7	5	5	4	4	11	11	4	5
24*	3	3	11	11	2	6	7	10	5	5	4	4	11	11	4	5

Anexo C – Genótipos das 189 progênies e seus supostos parentais de *Tabebuia roseo-alba*, representados pelos alelos de 8 locos SSR

(continuação)

Indivíduo	Tau12	Tau12	Tau15	Tau15	Tau16	Tau16	Tau19	Tau19	Tau21	Tau21	Tau22	Tau22	Tau27	Tau27	Tau31	Tau31
Matriz 43	1	1	22	24	4	4	7	7	5	8	1	5	5	5	5	5
25	3	3	22	22	5	5	7	7	5	5	8	8	-	-	5	5
26*	3	3	24	24	4	4	7	7	8	8	5	5	5	10	5	5
27	3	3	16	16	1	1	7	7	1	1	5	5	3	3	1	1
28	1	1	18	18	4	4	15	15	-	-	5	5	3	5	-	-
29	3	3	16	16	4	6	7	7	3	3	1	1	3	3	4	4
Matriz 44	3	3	12	16	-	-	18	18	4	5	4	4	3	6	2	9
30	3	3	18	18	4	4	-	-	4	4	4	4	10	10	3	5
31	3	3	16	16	2	2	15	15	5	5	-	-	3	3	3	3
32*	3	3	12	12	7	7	18	18	4	5	4	4	6	6	9	9
33	3	3	16	16	3	3	15	15	7	7	3	3	5	5	7	7
34*	3	3	16	16	2	2	15	18	4	5	4	4	3	6	2	2
35	3	3	18	18	2	2	15	15	-	-	4	4	1	1	2	2
Matriz 45	2	2	8	14	4	4	6	6	5	5	4	4	3	3	5	5
36	3	3	16	22	-	-	6	6	5	5	5	5	5	5	5	7
37	3	3	16	16	4	4	6	6	1	1	4	4	2	2	3	3
38	3	3	8	8	3	3	7	7	1	5	4	4	-	-	3	7
Matriz 46	3	3	18	18	4	4	-	-	1	5	4	4	1	1	3	3
39*	3	3	16	18	4	4	3	3	1	1	4	4	1	1	3	3
40	-	-	12	12	7	7	7	7	5	5	4	4	10	10	8	8
41	3	3	19	19	7	7	5	5	5	5	4	4	8	8	6	6
42	3	3	16	16	6	6	6	6	5	7	5	5	4	4	-	-
43	3	3	10	12	4	4	3	7	1	1	5	5	1	1	4	5
Matriz 47	3	3	12	18	6	6	7	7	5	8	4	4	3	3	3	3
49	3	3	16	16	5	5	7	7	5	5	4	4	10	10	7	7
50*	3	3	12	12	6	6	7	7	8	8	4	4	3	3	3	4
51*	3	3	18	18	6	6	7	7	5	5	4	4	3	3	3	3
52*	1	3	12	12	6	6	5	7	5	8	3	4	3	3	3	5
53*	3	3	18	18	4	6	7	7	8	8	4	4	3	8	3	4
54*	3	3	12	18	6	6	7	7	5	5	4	4	3	3	3	5
55*	3	3	-	-	6	6	5	7	5	8	4	4	-	-	3	3

Anexo C – Genótipos das 189 progênies e seus supostos parentais de *Tabebuia roseo-alba*, representados pelos alelos de 8 locos SSR

(continuação)

Indivíduo	Tau12	Tau12	Tau15	Tau15	Tau16	Tau16	Tau19	Tau19	Tau21	Tau21	Tau22	Tau22	Tau27	Tau27	Tau31	Tau31
Matriz 48	1	3	11	11	2	2	-	-	5	5	4	4	-	-	2	2
44	3	3	16	16	4	4	2	2	5	5	8	8	5	5	1	2
45*	-	-	11	11	7	7	2	7	5	5	4	4	10	10	2	2
46	3	3	16	16	2	7	3	3	5	8	4	4	10	10	2	3
47	1	3	16	16	7	7	3	3	5	5	-	-	8	8	1	7
48	3	3	15	15	4	4	4	4	3	3	2	2	5	5	3	5
Matriz 49	2	2	5	5	3	5	1	1	5	8	4	4	11	11	8	8
56*	2	2	5	5	3	3	1	1	8	8	4	4	11	11	3	8
57	3	3	11	11	6	6	3	3	5	5	4	4	1	5	3	3
Matriz 50	2	2	10	16	2	5	5	5	2	2	8	8	6	6	8	8
58*	2	2	16	18	5	5	5	7	2	2	8	8	6	6	8	8
59*	2	2	10	10	2	2	5	5	1	2	5	8	6	6	5	8
Matriz 51	3	3	16	20	2	2	6	6	5	5	4	4	11	11	3	3
60*	3	3	16	16	2	2	6	6	5	5	4	4	11	11	3	3
61*	3	3	16	20	2	5	6	6	3	5	4	8	11	11	3	3
Matriz 52	3	3	10	15	2	2	5	16	5	5	4	4	6	6	2	2
62*	3	3	15	15	2	2	5	5	5	5	4	4	6	6	2	3
Matriz 53	2	2	19	19	2	2	15	17	7	7	5	8	6	6	1	1
63	3	3	17	17	4	4	13	13	5	5	5	5	5	7	1	1
Matriz 19B**	-----															
167	4	4	15	15	3	3	2	2	1	1	1	1	9	9	3	3
s/ matriz																
168	5	5	3	15	3	3	2	10	1	2	1	1	9	9	3	3
Matriz 56	3	3	16	18	2	5	5	5	5	5	5	5	6	6	5	8
73*	2	3	16	16	5	5	5	5	5	5	3	5	4	6	5	5
74	3	3	16	16	5	8	5	5	5	5	5	5	9	9	3	3
Matriz 57	2	2	16	16	5	5	-	-	5	5	4	4	3	3	4	4
64*	2	2	16	18	5	5	4	4	5	5	4	4	3	3	4	4
65*	2	3	16	16	5	5	3	4	5	7	4	4	-	-	4	4
66*	2	2	16	18	5	5	3	3	5	5	4	4	3	4	4	5

Anexo C – Genótipos das 189 progênies e seus supostos parentais de *Tabebuia roseo-alba*, representados pelos alelos de 8 locos SSR

(continuação)

Indivíduo	Tau12	Tau12	Tau15	Tau15	Tau16	Tau16	Tau19	Tau19	Tau21	Tau21	Tau22	Tau22	Tau27	Tau27	Tau31	Tau31
Matriz 58	3	3	12	19	7	7	6	6	5	5	5	5	10	10	4	8
67*	3	3	12	12	7	7	6	6	5	5	5	5	10	10	4	4
68*	1	3	19	19	7	7	5	6	5	5	5	5	8	10	8	8
69*	-	-	12	19	7	7	6	6	5	5	-	-	10	10	-	-
Matriz 59	3	3	11	19	5	5	-	-	5	5	4	4	4	4	4	5
97*	3	3	10	19	4	5	5	6	5	5	4	4	4	5	4	5
98	1	3	13	13	6	6	6	6	8	8	4	4	10	10	4	4
Matriz 60	3	3	12	12	4	4	-	-	5	8	5	5	10	10	4	5
99	2	2	8	18	6	6	6	6	1	8	0	0	2	2	4	5
100	1	3	13	13	4	6	4	6	8	8	3	3	1	1	5	5
Matriz 61	3	3	18	20	4	4	6	6	5	8	4	4	10	10	3	7
70*	1	3	18	20	4	4	4	6	5	8	4	4	10	10	3	7
71	3	3	11	16	3	3	6	6	7	7	4	4	8	8	5	5
72*	3	3	18	18	4	4	6	6	8	8	4	4	8	10	3	5
Matriz 62	3	3	15	15	2	2	6	6	5	5	4	4	4	10	3	4
144*	3	3	15	22	2	2	6	6	3	5	4	4	10	10	4	4
145	3	3	22	25	3	3	7	7	8	8	5	5	-	-	3	4
146	2	2	18	18	4	4	6	6	8	8	6	6	7	7	4	8
Matriz 63	3	3	12	15	2	2	16	16	5	5	4	4	6	6	3	7
147*	3	3	15	15	2	2	16	16	5	5	4	4	6	6	3	4
148*	1	3	12	12	2	2	10	16	5	5	3	4	6	6	3	7
149	3	3	10	10	5	5	11	11	1	1	4	4	2	2	4	5
150*	1	1	12	15	2	2	13	16	5	5	4	4	6	8	5	7
Matriz 64	2	2	12	15	3	3	16	16	4	5	4	4	1	12	2	5
151*	2	2	15	15	3	3	16	16	4	4	4	4	12	12	5	5
152	3	3	18	22	1	1	-	-	5	5	5	5	1	1	-	-
153	3	3	15	15	5	5	6	6	3	3	5	5	4	4	2	3

Anexo C – Genótipos das 189 progênies e seus supostos parentais de *Tabebuia roseo-alba*, representados pelos alelos de 8 locos SSR

(continuação)

Indivíduo	Tau12	Tau12	Tau15	Tau15	Tau16	Tau16	Tau19	Tau19	Tau21	Tau21	Tau22	Tau22	Tau27	Tau27	Tau31	Tau31
Matriz 65	3	3	15	17	7	7	7	7	5	8	1	1	5	5	2	7
121	3	3	13	13	7	7	2	5	1	1	1	6	3	3	2	5
75*	3	3	10	17	7	10	7	7	5	5	1	1	5	5	2	4
76	2	2	10	17	7	7	7	7	3	3	6	6	-	-	2	5
77	3	3	12	17	10	10	2	2	8	8	4	4	3	3	2	7
78	3	3	19	19	5	5	6	6	2	2	3	3	6	6	5	7
79*	3	3	12	17	5	7	7	7	5	8	1	1	5	5	1	2
80	3	3	10	12	5	5	4	4	6	6	2	2	7	7	2	5
Matriz 66	3	3	12	16	6	6	-	-	5	5	4	4	10	10	4	8
82*	3	3	16	18	6	6	3	3	4	5	4	4	10	10	4	4
83*	1	3	12	12	4	6	2	4	5	7	2	4	10	12	8	8
84*	3	3	16	16	6	8	1	1	5	5	-	-	8	10	8	8
85*	3	3	12	12	6	6	5	5	5	5	4	6	10	12	4	4
Matriz 67	1	1	14	21	10	10	6	6	3	4	4	4	6	6	3	5
81	2	2	19	25	8	8	6	6	6	6	7	7	6	6	4	7
86	3	3	11	21	2	5	4	6	3	3	1	1	-	-	4	8
87*	1	1	21	21	10	10	2	2	4	4	3	3	5	6	5	7
88	1	3	15	21	10	10	-	-	5	5	6	6	3	3	5	5
Matriz 68	1	3	7	7	6	10	7	14	1	1	4	4	6	12	5	6
89*	1	1	7	7	6	6	14	14	1	3	4	4	6	6	5	5
90*	3	3	-	-	10	10	7	7	1	1	4	6	12	12	4	6
91*	1	3	5	7	6	10	7	14	1	1	2	4	6	6	6	6
92*	3	3	7	7	10	12	7	7	1	1	4	4	6	12	5	5
93	2	2	5	5	8	8	12	12	4	4	3	3	7	7	4	4
94*	1	1	7	8	6	6	7	7	1	1	4	5	6	6	5	5
95*	1	3	7	7	10	10	-	-	1	3	4	4	6	12	5	6
96*	1	3	7	7	10	10	14	14	1	1	4	4	6	6	5	5

Anexo C – Genótipos das 189 progênies e seus supostos parentais de *Tabebuia roseo-alba*, representados pelos alelos de 8 locos SSR

(continuação)

Indivíduo	Tau12	Tau12	Tau15	Tau15	Tau16	Tau16	Tau19	Tau19	Tau21	Tau21	Tau22	Tau22	Tau27	Tau27	Tau31	Tau31
Matriz 69	3	3	18	21	7	7	7	7	5	5	4	4	4	4	5	5
101*	-	-	21	21	7	7	5	7	2	5	4	4	4	4	4	5
102	3	3	12	16	8	8	6	6	5	5	4	4	-	-	3	5
103*	3	3	21	21	7	7	6	7	5	5	4	4	3	4	4	5
104	2	2	13	16	7	7	4	6	3	3	1	1	1	1	3	4
105	3	3	12	12	3	3	2	2	5	5	5	5	11	11	-	-
Matriz 70	3	3	10	16	2	2	7	7	5	8	5	5	11	11	3	5
106*	3	3	10	10	2	2	6	7	8	8	5	5	11	11	3	3
107*	3	3	16	16	2	2	7	7	5	5	3	5	11	13	8	8
108*	3	3	10	16	2	2	7	7	5	5	5	5	11	11	5	5
109	3	3	20	20	2	2	-	-	3	3	4	4	10	12	7	7
110*	3	3	10	16	2	2	7	7	5	5	5	5	11	11	3	7
111*	3	3	10	16	2	2	7	7	8	8	5	5	11	11	3	5
Matriz 71	3	3	22	22	2	2	-	-	5	5	4	6	10	10	4	6
112	3	3	12	12	5	5	4	4	5	5	4	4	8	8	6	8
113*	3	3	22	22	2	5	4	5	5	8	6	6	8	10	6	8
114	2	2	20	25	-	-	3	3	8	8	4	5	4	4	3	3
115*	3	3	22	22	2	5	5	7	5	5	6	6	10	10	4	6
Matriz 72/73	3/3	3/3	11/11	11/11	6/6	2/2	-	6/6	1/5	5/5	4/4	4/4	4/10	12/12	2/8	3/8
116*	3	3	11	11	2	2	6	6	5	5	4	4	12	12	8	8
117*	3	3	11	11	2	2	6	6	5	5	4	4	12	12	8	8
118	3	3	16	18	2	2	6	6	1	8	4	4	10	10	3	3
119*	3	3	11	11	1	2	6	6	5	5	4	4	8	12	8	8
120*	3	3	11	11	2	2	4	6	5	5	4	4	12	15	3	8
Matriz 74	3	3	11	19	4	4	5	5	5	5	5	5	4	12	3	8
122	2	2	19	21	6	6	-	-	5	5	5	5	4	4	3	3
123*	-	-	22	25	4	6	5	5	5	8	5	5	4	12	3	3
124	3	3	21	21	6	6	1	1	5	5	6	6	11	11	3	5
125	3	3	22	25	2	4	5	5	8	8	5	5	6	6	3	5

Anexo C – Genótipos das 189 progênies e seus supostos parentais de *Tabebuia roseo-alba*, representados pelos alelos de 8 locos SSR

(continuação)

Indivíduo	Tau12	Tau12	Tau15	Tau15	Tau16	Tau16	Tau19	Tau19	Tau21	Tau21	Tau22	Tau22	Tau27	Tau27	Tau31	Tau31
Matriz 75	3	3	9	20	2	2	-	-	1	5	4	4	3	3	5	5
126	3	3	20	22	4	4	-	-	5	8	4	5	5	5	3	5
127	1	3	18	18	5	5	8	10	5	8	4	4	5	5	5	5
128	3	3	10	12	5	6	8	8	1	5	4	4	3	3	3	5
129	3	3	12	18	5	5	-	-	5	8	5	12	5	5	3	5
133*	1	2	18	20	2	2	16	16	5	8	5	8	-	-	5	5
Matriz 76	2	2	12	18	2	5	16	16	5	8	5	8	5	10	5	5
130*	-	-	12	18	5	5	16	16	5	8	5	5	5	10	5	5
131*	2	2	12	20	2	2	13	16	5	5	5	8	10	10	5	5
132*	2	2	18	18	5	5	14	16	8	8	5	5	5	5	3	5
133*	1	2	18	20	2	2	16	16	5	8	5	8	-	-	5	5
Matriz 77	2	2	18	18	6	6	10	14	5	7	5	5	4	4	3	5
134	2	2	14	20	-	-	8	16	5	5	5	5	1	10	3	8
135*	2	2	18	18	4	6	10	10	5	7	5	5	4	4	5	5
136*	1	2	16	18	6	6	14	14	5	5	5	5	1	4	5	5
137*	2	2	16	18	-	-	12	12	5	7	5	5	-	-	3	6
138*	2	2	16	18	2	2	-	-	5	5	5	5	4	4	5	5
Matriz 78	3	3	15	15	5	5	17	17	5	5	4	4	10	10	2	5
139*	3	3	15	15	3	5	17	17	5	5	4	4	10	10	2	2
140*	3	4	12	15	5	5	11	17	4	5	4	4	10	10	5	5
141*	3	3	15	15	5	5	17	17	5	5	4	4	10	12	2	5
142*	3	5	15	15	5	7	15	17	5	5	4	4	-	-	2	5
143*	3	5	15	15	5	5	11	17	5	5	4	4	10	12	2	2
Matriz 14C**	-----															
154	3	3	14	14	5	5	16	16	5	5	4	4	10	12	6	6
155	3	3	14	20	6	6	14	16	5	5	4	4	10	10	3	3
156	1	3	14	14	2	8	14	14	1	5	4	4	12	12	3	6
157	3	3	14	20	5	5	16	16	5	5	4	4	12	12	3	7

Anexo C – Genótipos das 189 progênes e seus supostos parentais de *Tabebuia roseo-alba*, representados pelos alelos de 8 locos SSR

(conclusão)

Indivíduo	Tau12	Tau12	Tau15	Tau15	Tau16	Tau16	Tau19	Tau19	Tau21	Tau21	Tau22	Tau22	Tau27	Tau27	Tau31	Tau31
Matriz 21C**	-----															
158	1	1	16	16	3	4	4	6	5	5	1	1	1	1	2	5
159	1	3	16	16	3	4	6	6	-	-	1	1	-	-	5	5
160	3	3	16	20	4	4	4	4	5	5	1	1	1	1	3	5
161	3	3	16	20	4	4	4	6	5	5	1	1	-	-	7	7
162	1	1	16	20	4	4	6	6	5	5	1	1	1	1	3	5
163	3	3	14	20	4	4	6	6	4	5	1	1	1	1	3	5
Matriz 8C**	-----															
164	3	3	16	20	-	-	2	2	5	8	5	5	6	11	2	5
165	1	3	20	20	6	6	2	6	5	8	5	5	11	11	5	5
166	3	3	16	16	4	4	6	6	8	8	5	5	-	-	3	5

* progênes com maternidade correta; ** matrizes não coletadas

Anexo D - Distribuição das frequências alélicas dos 8 locos SSR das matrizes e progênies de *Tabebuia roseoalba* consideradas neste estudo

(continua)

Loco	Alelo	Matrizes	Progênies	
Tau12	1	0,0952	0,1111	
	2	0,1726	0,1389	
	3	0,6726	0,7194	
	4	0,0595	0,0194	
	5	0	0,0111	
Tau15	1	0,006	0	
	3	0,006	0,0027	
	5	0,012	0,0134	
	7	0,012	0,0269	
	8	0,0241	0,0134	
	9	0,006	0	
	10	0,0602	0,0565	
	11	0,0723	0,0699	
	12	0,1145	0,1263	
	13	0	0,0188	
	14	0,0422	0,0242	
	15	0,0723	0,0833	
	16	0,1988	0,2339	
	17	0,0783	0,0323	
	18	0,0783	0,1183	
	19	0,0422	0,0376	
	20	0,0723	0,0511	
	21	0,0241	0,0296	
	22	0,0301	0,043	
	23	0,012	0	
	24	0,0241	0,0054	
	25	0,012	0,0134	
	Tau16	1	0,0247	0,0137
		2	0,3333	0,2253
		3	0,0988	0,0632
4		0,1543	0,1731	
5		0,1481	0,1703	
6		0,1358	0,1731	
7		0,0556	0,1071	
8		0,0247	0,0302	
9		0,0062	0	
10		0,0185	0,0412	
12		0	0,0027	

Anexo D - Distribuição das frequências alélicas dos 8 locos SSR das matrizes e progênies de *Tabebuia roseoalba* consideradas neste estudo

(continuação)

Loco	Alelo	Matrizes	Progênies
Tau19	1	0,0357	0,0168
	2	0	0,0475
	3	0	0,0447
	4	0	0,0559
	5	0,0571	0,0754
	6	0,3	0,2235
	7	0,1786	0,2067
	8	0,0286	0,0223
	9	0	0,0112
	10	0,0571	0,0223
	11	0,0786	0,0363
	12	0,0357	0,0112
	13	0,0357	0,0251
	14	0,0286	0,0307
	15	0,0071	0,067
	16	0,1071	0,0698
	17	0,0357	0,0251
	18	0,0143	0,0084
Tau21	1	0,0843	0,1066
	2	0,0422	0,0519
	3	0,012	0,082
	4	0,0361	0,0464
	5	0,5964	0,4945
	6	0,0301	0,0164
	7	0,0422	0,0437
	8	0,1566	0,1585
Tau22	0	0	0,0055
	1	0,0663	0,1016
	2	0	0,0275
	3	0	0,0385
	4	0,6205	0,467
	5	0,2289	0,2555
	6	0,006	0,0577
	7	0,012	0,0055
	8	0,0482	0,033
	9	0,0181	0,0055
12	0	0,0027	

Anexo D - Distribuição das frequências alélicas dos 8 locos SSR das matrizes e progênies de *Tabebuia roseoalba* consideradas neste estudo

(conclusão)

Loco	Alelo	Matrizes	Progênies
Tau27	1	0,1205	0,1006
	2	0,0301	0,0172
	3	0,1265	0,1178
	4	0,0904	0,0776
	5	0,0783	0,1063
	6	0,2108	0,1264
	7	0	0,0259
	8	0,006	0,0431
	9	0	0,0172
	10	0,1807	0,2011
	11	0,0964	0,0862
	12	0,0482	0,0747
	13	0,012	0,0029
	15	0	0,0029
Tau31	1	0,0119	0,0191
	2	0,0655	0,0738
	3	0,1786	0,2295
	4	0,256	0,1639
	5	0,2143	0,2705
	6	0,0536	0,0437
	7	0,0833	0,071
	8	0,0952	0,0792
	9	0,0357	0,0383
	10	0,006	0,0027
	11	0	0,0082

Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*

Juliana Massimino Feres^{*†§}, Marcelo L. L. Martinez^{**‡}, Carlos A. Martinez[‡], Moacyr A. Mestriner[†] and Ana Lilia Alzate-Marin^{†§‡‡}

*These two authors contributed equally to this work. [†]Plant Genetic Laboratory, [§]Graduate Program in Genetics, Department of Genetics, FMRP, University of Sao Paulo (USP), Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil; [‡]Graduate Program in Comparative Biology, Department of Biology, FFCLRP, University of Sao Paulo (USP), Av. Bandeirantes, 3900, 14040-900, Ribeirao Preto, SP, Brazil.

Keywords: Forest conservation, microsatellite marker, population genetics, *Tabebuia roseo-alba*

[‡]Correspondence: Ana Lilia Alzate-Marin, e-mail: anaalzate@rge.fmrp.usp.br; Tel: +55 16 36023356; Fax: +55 16 36330069. Address: Plant Genetic Laboratory, Department of Genetics, University of Sao Paulo (USP), Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirao Preto, SP, Brazil.

Running title: Transferability of SSR markers for *Tabebuia roseo-alba*

Abstract

Microsatellite loci that were previously developed in the tropical tree *Tabebuia aurea* were used for the genetic analysis of *Tabebuia roseo-alba* populations. Nine of ten SSR markers were amplified, and the polymorphism was assessed in 58 individuals sampled from two stands in southeastern Brazil. All loci were polymorphic with Mendelian inheritance. The allele numbers were high, ranging from five to 13 in Population I and three to seven in Population II, with means of 8.9 and 5.5, respectively. We conclude that these markers can be efficiently used for parentage and gene flow studies.

As a consequence of the human-induced impact on ecosystems, the average annual rate of loss for animal and plant populations and their habitats is estimated to be 1% (Balmford et al. 2003). Forest devastation is thought to result in a loss of biodiversity even within species. Consequently, the urgent maintenance of genetic variability is fundamental for the survival of endangered species (Holsinger & Gottlieb 1991). *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniaceae), an endangered species commonly known as ipê-branco, is an important ornamental and wood tree in Brazil. Nothing is known about the fine-scale population structure of *T. roseo-alba*. Understanding the effects of spatial isolation on the level of genetic diversity and gene flow is crucial for providing recommendations for *in situ* and *ex situ* conservation of this species. For these purposes, microsatellite markers are informative tools that can be used to assess the genetic structure of forest populations, and function as basic quantitative genetic parameters. These markers may help us predict genetic impacts by allowing us to identify evolutionarily meaningful management units as well as evolutionary responses to selective harvesting. The ability to use the same microsatellite primers on different plant species, called transferability, depends on the extent of sequence conservation in the primer sites flanking the microsatellite loci and the stability of those sequences during evolution (Choumane et al. 2000, Decroocq et al. 2003, Zucchi et al. 2003). It has been shown that closely related species are more likely to share microsatellite priming sites than more distantly related ones, but it is possible to transfer functional microsatellite primers even from more distantly related species (Lorieux et al. 2000). In this study, we transferred nine microsatellite loci from *Tabebuia aurea* to *Tabebuia roseo-alba*. These loci were characterized in two populations of *Tabebuia roseo-alba* in southeastern Brazil in order to assess the genetic diversity and structure in this species. Fifty-eight reproductive trees of *T. roseo-alba* were sampled in two stands that are highly impacted by agricultural practices: Population I, located in the Pardo river and Mogi-Guaçu

river basins in São Paulo state and Population II, situated on the campus of the University of São Paulo-USP in Ribeirão Preto; both sites are located in southeastern Brazil. All trees in each of these two stands were tagged and mapped (36 individuals in Population I and 22 individuals in Population II). The reproductive trees sampled in Population I are being used as mothers of conserved progeny individuals in a tree Germplasm Bank at the University of São Paulo in Ribeirão Preto city (GB-USP/RP).

The genomic DNA was extracted from frozen leaf tissue using CTAB extraction method, as described by Doyle & Doyle (1990). The extracted DNA pellet was resuspended in 200 μ L of TE buffer and stored at -20°C until further use. Ten microsatellite loci previously described by Braga et al. (2007) were tested. Each primer pair was screened with polymerase chain reactions (PCR) at 12 annealing temperatures (between $45\text{--}56^{\circ}\text{C}$) in 10 individuals of *T. roseo-alba*. For PCR amplification, 2.5 ng of genomic DNA was used in a final volume of 10 μ L containing: 0.3 μ M of each primer, 1 U *Taq* DNA polymerase, 0.25 mM of each dNTP, 1 x MgCl_2 -free reaction buffer [75 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl and 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] and 1.5 mM MgCl_2 . The PCR profile used to amplify the microsatellites was 96°C for 5 min; 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at T_a $^{\circ}\text{C}$ (Table 1) for 1 min, and 72°C for 1 min; followed by a final elongation step at 72°C for 7 min. Amplifications were performed in a MasterCycler Eppendorf. A multiplex system based on the expected allele fragment size of each locus was tested using the same conditions for amplification. PCR products were denatured and separated on 10% denaturing polyacrylamide gels, stained with silver nitrate and sized by comparison to a 10 bp ladder standard (Invitrogen).

Mendelian inheritance analyses were made for each locus, based on two mother trees and their open-pollinated family (20 individuals per family). Population genetic parameters, such as the allele number per locus (A), the observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, the

intrapopulation fixation index (F_{IS}) and the divergence among populations (F_{ST}) were calculated using GDA (Lewis & Zaykin 2001). FSTAT (Goudet 2002) was used to test all loci for linkage disequilibrium, applying the Bonferroni correction for multiple comparisons. From the two stands, nine microsatellite loci (90%) were amplified and all were found to be polymorphic (Table 1). Satisfactory amplification products were obtained using annealing temperatures of 49, 50 and 56°C for markers *Tau 13/Tau 27*, *Tau12/Tau15/Tau16/Tau19* and *Tau21/Tau22/Tau31*, respectively. Two biplex systems of microsatellites for *T. roseo-alba* were optimized: the *Tau21/Tau22* and *Tau15/Tau19*. Each biplex PCR was combined before electrophoresis and loaded into a single gel lane. All sibs displayed at least one of the maternal alleles, and Mendelian inheritance was confirmed for all nine SSR loci. All loci for *T. roseo-alba* were in linkage equilibrium, indicating that these markers are appropriate for population genetics studies.

These nine SSR markers were selected for screening the 58 reproductive trees from the two stands; 80 and 46 alleles were identified for Population I and Population II, respectively (Table 1). The number of alleles per locus ranged from five (*Tau 22*) to 13 (*Tau 13*), with an average of 8.9 for Population I. For Population II, the number of alleles per locus ranged from three (*Tau 12*) to seven (*Tau 21* and *Tau 15*), with an average of 5.5 (Table 1). In both stands the number of alleles per locus was observed to be lower than that in a population of 36 individuals of *T. aurea* (mean = 18.8; Braga et al. 2007). In both Populations I and II, the expected heterozygosity (H_E) was higher than observed heterozygosity (H_O) (Table 1). The fixation index of the *T. roseo-alba* populations was 0.467 (Population I) and 0.340 (Population II). These results suggest inbreeding at all loci. All loci from Population I and six loci (*Tau12*, *Tau13*, *Tau16*, *Tau21*, *Tau22* and *Tau27*) from Population II showed significant departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). The observed departures from HWE

might be due to population substructure (Wahlund effect), the presence of null alleles, biparental inbreeding and/or partial selfing. Presence of null alleles was verified with MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout *et al.* 2004). Null alleles were suggested to occur over most of loci, however, only the loci Tau12, Tau16 and Tau22 presented null alleles as detected in the analysis of the mating system of *T. roseo-alba* in two populations (Feres JM, unpublished data). Genetic differentiation between the populations was high and significant ($F_{ST} = 0.151$; C.I. 95%), demonstrating that it will be important to collect future genotypes in the populations.

We conclude that the nine microsatellite markers are suitable tools for population-wide genetic and parentage studies. We are currently using these markers to investigate questions of genetic diversity, gene flow and the mating system in natural populations of *T. roseo-alba*. We aim to apply this scientific knowledge to implementing a strategy for the conservation and management of this species.

Acknowledgements

This work was financed by a grant from the São Paulo State Government to ALAM: FAPESP 03/04199-4/2004. We also acknowledge the support of Research Pro-rectory of São Paulo University (USP) for ALAM and FAEPA for MAM. This study is part of the postgraduate work of the two first authors. Ana Lilia Alzate-Marin was supported by a Researcher assistantship from FAPESP. CAM is a fellow researcher of CNPq. The two first authors were supported by a postgraduate fellowship from FAPESP. We would like to thank Rosane Garcia Collevatti and Alexandre Magno Sebbenn for their valuable advice. CAM, MAM and ALAM are CEEFLORUSP members.

References

- Braga AC, Reis AMM, Leoi LT, Pereira RW, Collevatti RG (2007) Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology Notes*, 7, 53-56.
- Balmford AR, Green E, Jenkins M (2003) Measuring the changing state of nature. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 326–330.
- Choumane W, Winter P, Weigand F, Kahl G (2000) Conservation and variability of sequence-tagged microsatellite sites (STMSs) from chickpea (*C. arietinum* L.) within the genus *Cicer*. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 269–278.
- Decroocq V, Fave MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 912 – 922.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- Goudet J (2002) fstat version 2.9.3.2. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Available from <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Holsinger KE, Gottlieb LD (1991) Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: Falk DA, and Holsinger KE, (eds) *Genetics and Conservation of Rare Plants*, p.95–124. Oxford University Press, New York.
- Lewis PO, Zaykin D (2001) GDA – Genetic Data Analysis: Computer Program for the Analysis of Allelic Data, Version 1.0. Cited, 2007 August 20. Available at: <http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>.
- Lorieux M, Ndjioudjop MN, Ghesquiere A (2000) A first interspecific *Oryza sativa* x *Oryza glaberrima* microsatellite-based genetic map. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 591-601.

van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.

Zucchi MI, Brondani RPV, Pinheiro JB et al. (2003) Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology*, 26, (4), 449-457.

Table 1: Characteristics of the *Tabebuia roseo-alba* microsatellite markers in each population.

Primer name Accession no.	Primer sequence 5'-3'	Repeat motif	Allele size range (bp)	T_a °C	A		H_o		H_e		Deviation from HWE	
					I	II	I	II	I	II	I	II
<i>Tau 12</i> DQ666987	F: CATCATCAAGGTCAAGATCA R: CATTCTAGTCTTCCATAAGT	(TC) ₈ (TA)(TG) ₂₉	140-170	50	8	3	0.429	0.350	0.647	0.660	0.0022 ND	0.0030 ND
<i>Tau 13</i> DQ666988	F: CCATCTCAATGCTTAACAGT R: TTGCAATGCTACCATAACA	(TC) ₂₂ (ACTCCC) (TC) ₄ (AC) ₁₁	120-170	49	13	4	0.483	0.500	0.901	0.900	0.0000 ND	0.0002 ND
<i>Tau 15</i> DQ666990	F: TTTGAGGGGTTGAAGCATTT R: CATTGTGGTCCCTCTCAACA	(AG) ₃₂	120-150	50	9	7	0.360	0.760	0.847	0.760	0.0000 ND	0.9292 ^{NS}
<i>Tau 16</i> DQ666991	F: GCTTGTAGCAACGTTAGGTTT R: TGTGCATTGTGACTACCAGCTA	(CT) ₃₃ (CA) ₁₁	140-170	50	11	5	0.640	0.250	0.898	0.780	0.0000 ND	0.0000 ND
<i>Tau 19</i> DQ666994	F: AGGGCAAGCTTTTCCAGTTT R: TTCCTCACACGGATATGTCG	(GA) ₃₃	190-250	50	8	6	0.267	0.620	0.768	0.700	0.0000 ND	0.2112 ^{NS}
<i>Tau 21</i> DQ666996	F: CTTTTGGGGGTCTTTGGAAT R: AAGAGACAGAGACAAAGATACA	(GA) ₂₆	210-240	56	6	7	0.438	0.450	0.767	0.780	0.0000 ND	0.0002 ND
<i>Tau 22</i> DQ666997	F: TATCTCTCCGCCGTACACCT R: CCAATCGAAGAGCCCATTTA	(CT) ₁₈ (CCCTCTCGT CA)(GT) ₃	130-140	56	5	6	0.121	0.520	0.426	0.780	0.0000 ND	0.0038 ND
<i>Tau 27</i> DQ667000	F: GGTAATCATCTTCCGCTTCC R: ACTGCAGAATCGCCTTTTGT	(CT) ₂₄ (CA) ₈ (CC) (CA) ₇	170-220	49	12	4	0.375	0.210	0.882	0.660	0.0000 ND	0.0000 ND
<i>Tau 28</i> DQ667001	F: TCAGCCACTACACAACCAAAG R: GGGAAGCAATGGAGTCAAAA	(CT) ₃₃	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>Tau 31</i> DQ666982	F: TCGTGCAGCTTTTIGAGTCTG R: CTGCAAAACACAAAGCGAAA	(CT) ₂₈ (CA) ₁₀ (CTT) (GT) ₅	240-300	56	8	4	0.633	0.710	0.821	0.570	0.0024 ND	0.2536 ^{NS}
Mean					8.9	5.5	0.416	0.490	0.773	0.740		

T_a °C, annealing temperature; A, total number of alleles per locus; I, population I; II, population II; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; NS, not significant ($P > 0.05$); ND, significant ($P < 0.05$)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)