



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FLORESTAIS E AMBIENTAIS

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE
POPULAÇÕES DE *Cenostigma tocantinum* Ducke**

FABÍOLA VIANA DE ALMEIDA

Manaus - AM
2014

FABÍOLA VIANA DE ALMEIDA

**DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE
POPULAÇÕES DE *Cenostigma tocaninum* Ducke**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Ciências Florestais e Ambientais da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais.

Orientadora: Maria Teresa Gomes Lopes, Dr^a.

Coorientador: Mágnio Sávio Ferreira Valente, Dr.

Manaus – AM
2014

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A447d Almeida, Fabíola Viana de
DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE
POPULAÇÕES DE *Cenostigma tocaninum* Ducke / Fabíola Viana
de Almeida. 2014
42 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Teresa Gomes Lopes
Coorientador: Mágnio Sávio Ferreira Valente
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. *Cenostigma tocaninum*. 2. diversidade genética. 3. AFLP. 4.
marcador molecular. I. Lopes, Maria Teresa Gomes II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

“Diversidade genética entre e dentro de populações de
Cenostigma tocantinum Ducke”

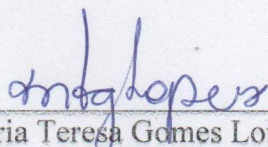
FABIOLA VIANA DE ALMEIDA

Orientadora: Maria Teresa Gomes Lopes, Dr^a
Coorientador: Mágnio Sávio Ferreira Valente, Dr.

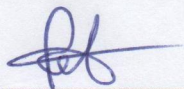
Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas como requisito à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 11 de julho de 2014

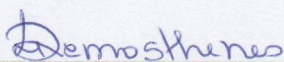
BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a Maria Teresa Gomes Lopes, Presidente
Universidade Federal do Amazonas – UFAM



Prof Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, Membro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM



Prof^a Dr^a Liane Cristine Rebouças Demosthenes
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, por me mostrar que trabalho nunca será trabalho enquanto você amar o que faz.

A meu pai, por me ensinar que mesmo que tudo dê errado ainda se pode gargalhar do próprio infortúnio.

A meus irmãos e amigos, por todos os sorrisos e abraços que aliviaram o cansaço.

Aos que me auxiliaram nesta pesquisa, em especial a Pedro Queiroz e Liane Demosthenes, por iluminarem meu caminho e tornarem o fardo mais leve.

A meus orientadores, Maria Teresa e Magno Sávio, por expandirem meus conhecimentos e confiarem na minha capacidade.

À Universidade Federal do Amazonas, por me mostrar a linha tênue que existe entre o amor e o ódio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais, pela oportunidade.

À CAPES, por financiar essa caminhada.

Minha eterna gratidão!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore de *Cenostigma tocantinum* em diferentes estágios de desenvolvimento.

Figura 2: Ramo, folha e face abaxial e adaxial do folíolo de *Cenostigma tocantinum*.

Figura 3. Flor e inflorescência de *Cenostigma tocantinum*.

Figura 4. Fruto de *Cenostigma tocantinum*.

Figura 5. Sementes de *Cenostigma tocantinum*.

Figura 6. Mapa de localização das áreas de estudo.

Figura 7. Mapa de posicionamento da área de estudo.

Figura 8. Mapa da área de estudo A.

Figura 9. Mapa da área de estudo B.

Figura 10. Mapa da área de estudo C.

Figura 11. Quantificação de DNA de 5 acessos de *Cenostigma tocantinum*, comparados a marcador molecular de 10 ng (primeiro poço), em gel de agarose 0,8%.

Figura 12. Dendrograma de 30 indivíduos de *Cenostigma tocantinum* amostrados da população A, pelo método de agrupamento UPGMA e Índice de Similaridade de Jaccard.

Figura 13. Dendrograma de 30 indivíduos de *Cenostigma tocantinum* amostrados da população B, pelo método de agrupamento UPGMA e Índice de Similaridade de Jaccard.

Figura 14. Dendrograma de 30 indivíduos de *Cenostigma tocantinum* amostrados da população C, pelo método de agrupamento UPGMA e Índice de Similaridade de Jaccard.

Figura 15. Dendrograma entre três populações de *Cenostigma tocantinum* pelo método de UPGMA e distância genética de Nei (1978).

Figura 16. A) Média dos logaritmos da função de verossimilhança para valores de K testados; **B)** Valores de K mais prováveis obtidos pelo método de Evano et. al (2005), dado pela amplitude da ΔK como função de K (média \pm DP superior a partir de 3 repetições).

Figura 17. Estrutura populacional empregando o software Structure a partir de 90 indivíduos amostrados das populações de A, B e C, considerando diferentes valores de agrupamentos (K) e o modelo de análises de mistura com frequências correlacionadas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sítios das enzimas de restrição e sequências de adaptadores.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos usados para as análises de polimorfismo de comprimentos de fragmentos amplificados.

Tabela 3. Combinações de oligonucleotídeos e quantidade de *locos* polimórficos por população.

Tabela 4. Variação genética obtida pela Análise de Variância Molecular – AMOVA entre e dentro de populações de *Cenostigma tocaninum* Ducke.

Tabela 5. Estimativas de fluxo alélico e distância genética de Nei (1978), entre as populações de *Cenostigma tocaninum* Ducke.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Espécie estudada.....	4
3.2 Extração de DNA.....	7
3.3 Marcadores moleculares	9
3.3.1 Marcadores AFLP	10
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Local de estudo e coleta do material vegetal.....	13
4.2 Extração e quantificação de DNA	16
4.3 Desenvolvimento de marcadores AFLP	18
4.3.1 Digestão do DNA	18
4.3.2 Preparo e ligação dos adaptadores.....	18
4.3.3 Reações de amplificação	19
4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	20
4.4.1 Revelação do gel.....	21
4.5 Análises de diversidade e estrutura genética	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Extração e quantificação de DNA	25
5.2 Seleção de oligonucleotídeos e polimorfismo dos marcadores AFLP	26
5.3 Análise de diversidade genética	27
6 CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO	41

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE E DENTRO DE POPULAÇÕES DE *Cenostigma tocaninum* Ducke

RESUMO

Cenostigma tocaninum Ducke (Caesalpinoideae) é uma espécie arbórea, arbustiva, nativa do Brasil e sua madeira é utilizada na construção civil e a árvore em projetos de arborização. Este estudo objetivou avaliar a diversidade genética entre e dentro de populações de *C. tocaninum* por meio de marcadores AFLP. Foram amostradas três populações em cidades do estado do Amazonas: Manaus, Parintins e Presidente Figueiredo, sendo cada população composta por amostra de 30 plantas. Foram testadas 8 combinações de oligonucleotídeos, das quais quatro foram selecionadas para a análise: E+AGT/M+CAT, E+AGT/M+CTC, E+AGT/M+CAC e E+AGT/M+CCA. Foi estimada a porcentagem de locos polimórficos, realizada análise de variância molecular, construído o dendograma e verificado os padrões genéticos de diferenciação e subestruturação populacional. Dos 186 locos revelados, 132 (71 %) foram polimórficos. O valor da diferenciação genética entre as populações (F_{st}) foi de 0,3662. O resultado da Análise Molecular de Variância atribuiu 36,62% e 63,38% da variação entre e dentro das populações, respectivamente. O dendograma construído com base nos marcadores AFLP revelou a formação de dois grupos, o das populações de Manaus e Parintins e o grupo de Presidente Figueiredo. Os padrões genéticos de diferenciação e subestruturação populacional, revelados por $L(K)$ e ΔK , demonstram que as populações analisadas possuem subestruturação populacional e compartilham de três clusters, estando estes presentes nas três populações e distribuídos de forma bastante heterogênea. Os marcadores moleculares AFLP são eficientes para detectar diversidade genética em *C. tocaninum* e diferenciar populações de constituições distintas. A maior parte da variabilidade genética ocorre dentro das populações. Para espécies arbóreas, como *C. tocaninum*, usadas em projetos de arborização urbana, a introdução de plantas em novos projetos oriundas de amostragem adequada em outras populações promove conservação genética da espécie.

Palavras-chave: *Cenostigma tocaninum*, diversidade genética, AFLP.

GENETIC DIVERSITY AMONG AND WITHIN POPULATIONS *Cenostigma tocaninum* Ducke

ABSTRACT

Cenostigma tocaninum (Caesalpinoideae) is arboreal and shrubby specie, native to Brazil and wood is used in building and tree in forestation projects. This study aimed to evaluate genetic diversity among and within of *C. tocaninum* populations by AFLP markers. Three populations were sampled in cities of state of Amazonas: Manaus, Parintins and Presidente Figueiredo, each population composed of 30 plants samples. 8 primers combinations were tested, of which four were selected for analysis: E+AGT/M+CAT, E+AGT/M+CTC, E+AGT/M+CAC, E+AGT/M+CCA. The percent of polymorphics locis was estimated, Analysis of Molecular Variance performed, dendogram builded and the populational differentiation and substructuration genetics patterns checked. From 186 locis disclosed, 132 (71%) were polymorphics. The value of genetic differentiation between populations (F_{st}) was 0,3662. The result Analysis of Molecular Variance imputed 36,62% and 63,38% of the variation among and within populations, respectively. The builded dendrogram based on AFLP markers revealed the formation of two groups, the Manaus and Parintins populations and the group of Presidente Figueiredo. The populational differentiation and substructuration genetic standards, revealed by L (K) and ΔK , demonstrate that populations have examined had populational substructures and share three clusters, being present in these three populations and distributed heterogeneous quite manner. The AFLP molecular markers are efficient for detecting genetic diversity in *C. tocaninum* and differentiating populations of different constitutions. The majority of genetic variability occurs within populations. For arboreal species, as *C. tocaninum*, used in urban forestation projects, the introduction of plants into news projects coming from appropriate sampling in other populations promotes genetic conservation of the specie.

Key words: *Cenostigma tocaninum*, genetic diversity, AFLP.

1 INTRODUÇÃO

Cenostigma tocaninum Ducke é uma espécie nativa da Amazônia utilizada na arborização urbana devido à beleza de sua floração e de aspectos favoráveis como tronco reto, crescimento rápido, copa frondosa, que proporciona sombreamento eficiente e sem a liberação de grande quantidade de folhas, bem como sistema radicular pouco agressivo (BEZERRA e SALOMÃO, 2005; GARCIA et al., 2008).

A espécie também apresenta baixa suscetibilidade ao ataque de pragas e doenças o que a tem tornado atrativa para o plantio na arborização urbana (BEZERRA e SALOMÃO, 2005; GARCIA et al., 2008), pois o processo de fragmentação florestal isola e reduz o tamanho das populações e, conseqüentemente, a sua diversidade genética e potencial adaptativo das espécies florestais fragmentadas, tornando-as significativamente mais vulneráveis a eventos ambientais, demográficos e ou genéticos (BATISTA et al., 2012).

É importante conhecer a diversidade genética de populações de *C. tocaninum* de áreas urbanas porque muitas vezes estas se tornam matrizes alvo de coleta de sementes para uso em outros projetos de arborização e para o plantio realizado pelos próprios moradores das cidades. A coleta realizada em poucos genótipos ou genótipos aparentados pode facilitar a redução da base genética dos plantios. Lins et al. (2003) recomendam maior diversidade de genótipos em plantios, evitando, a vulnerabilidade genética à doenças, à pragas e à condições edafo-climáticas adversas.

A caracterização da diversidade genética pode ser realizada por meio de marcadores moleculares, sendo fundamentais na análise das diferenças nos perfis genéticos e na identificação de alelos específicos em populações. Atualmente existe uma grande variedade de marcadores moleculares disponíveis na literatura, que permitem detectar polimorfismo em espécies florestais e, portanto, permitem analisar a variabilidade genética entre e dentro de populações (ALFENAS, 2006). Entre esses marcadores, destaca-se o Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP) que não requer uso de sondas ou bibliotecas genômicas e pode ser usado para qualquer espécie em que não existem informações genéticas prévias (BONIN et al., 2007; VUYLSTEKE et al., 2007; CLEMENTE, 2010), a exemplo de *C. tocaninum*.

Conhecer a diversidade genética de populações de uma espécie é um passo importante para recomendação quanto à constituição de lotes de sementes para os plantios, para a conservação e o melhoramento genético. O presente trabalho objetivou avaliar a diversidade genética entre e dentro de populações naturais de *C. tocaninum* de cidades do Estado do Amazonas, com auxílio de marcadores moleculares AFLP.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a diversidade genética de populações de *C. tocaninum* em áreas urbanas de cidades do estado do Amazonas por meio de marcadores moleculares AFLP.

2.2 Específicos

Otimizar um protocolo para a extração de DNA de plantas de *C. tocaninum*;
Identificar combinações de oligonucleotídeos AFLP para estudo de diversidade genética na espécie;
Caracterizar a diversidade genética de populações de *C. tocaninum* utilizando marcadores AFLP.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Espécie estudada

O gênero *Cenostigma* é constituído por três espécies de hábitos arbóreos e arbustivos: *Cenostigma. macrophyllum* Tul. (sinonímia *Cenostigma gardenerianum*), *Cenostigma tocantinum* Ducke, e *Cenostigma. sclerophyllum*; onde somente *Cenostigma sclerophyllum* não é exclusivamente brasileira, ocorrendo também no Chaco paraguaio (ALVES, 2012). As espécies estão distribuídas nas formações de mata, cerrado e caatinga das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (FREIRE, 1994; SOUSA et al., 2007).

A espécie *C. tocantinum* é vulgarmente conhecida como pau-preto, pau-prezinho, inharé, cássia-rodoviária e mangiribá. Ocorre nos Estados do Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Rondônia e Tocantins, sendo ainda, encontrada em Goiás e na Bahia, em mata de terra firme (LORENZI, 2002; WARWICK e LEWIS, 2009).

É uma espécie florestal perenifólia, heliófila ou de luz difusa, seletiva higrófila e secundária, cuja madeira é utilizada na construção civil e a árvore para ornamentação, arborização e reflorestamento devido ao seu rápido crescimento, tronco reto e copa frondosa e baixa suscetibilidade ao ataque de pragas e doenças (LORENZI, 2002; WARWICK e LEWIS, 2009; GARCIA et al., 2009).

Tem hábito arbustivo (3 m), arbóreo (8-35 m) (Figura 1) e apresenta copas densas e troncos torcidos ou tortuosos, com profundos sulcos longitudinais irregulares. A casca tem coloração marrom e nos galhos imaturos é castanho-acinzentada, sulcada, lenticelada e com superfície frequentemente descascando, tornando-se brilhante e glabra na maturidade (WARWICK e LEWIS, 2009).



Figura 1. Árvore de *Cenostigma tocantinum* em diferentes estágios de desenvolvimento (ALMEIDA, 2014)

Possui folhas com comprimento de 9,0 a 29,5 cm, pecíolos de 1,2 a 4,2 cm e raque de 5 a 17 cm. Folíolos de três a cinco pares por folha, ovalados, ovalado-elípticos, elípticos, ou raramente obovados, com dimensão de 3,4 a 15,0 cm por 1,5 a 6,0 cm (Figura 2), brilhante na face adaxial e, mais ou menos glabro em ambas as superfícies ou com pelos esparsos na nervura principal, peciólulo de 1 a 4 mm (WARWICK e LEWIS, 2009).



Figura 2. Ramo, folha e face abaxial e adaxial do folíolo de *Cenostigma tocantinum* (ALMEIDA, 2014)

As inflorescências são racemosas, simples e terminais (Figura 3), ferrugíneo-pubescentes, de 5 a 17 cm de comprimento. As Flores são amarelas (Figura 3), hermafroditas, pentâmeras, zigomorfas, heteroclamídeas, dialisépalas, acíclicas, diclamídeas e diplostêmones, com 2,0 a 3,8 cm de comprimento. Possuem antese diurna e longevidade de três dias. A receptividade do estigma está restrita ao primeiro dia, das 14h às 16h. O pólen é viável nos três dias de duração da flor. A espécie floresce durante todo o ano, sendo os picos de floração de agosto a outubro e

de frutificação de outubro a dezembro (WARWICK e LEWIS, 2009; SANTOS et al., 2013).



Figura 3. Flor e inflorescência de *Cenostigma tocanthum* (ALMEIDA, 2014)

Seu fruto é um legume seco lenhoso (vagem), deiscente, cor variando de verde claro (quando em fase de desenvolvimento) a marrom escuro (quando maduro), piloso, plano e comprido, apresentando em média 8,9 cm de comprimento por 2,2 cm de largura e 0,5 cm de espessura (Figura 4). Possui em média três sementes por fruto e quatro contrições na valva, estando uma vazia, geralmente (LORENZI, 2002; SILVA, 2007).



Figura 4. Fruto de *Cenostigma tocanthum* (ALMEIDA, 2014)

A semente tem a forma oblonga a circular (Figura 5), coloração marrom dourado com pequenas manchas vermelhas, com cicatriz de cor marrom, circundando a borda da testa, que é lisa e brilhante. O hilo é saliente, de cor marrom e em posição apical. Possui comprimento médio de 1,5 cm por 1,4 cm de largura e 0,3 cm de espessura. O peso de 100 sementes com teor de água de 13% foi de 281,86 g (SILVA, 2007). Segundo Garcia et al. (2009), as sementes tem comportamento ortodoxo, com grau crítico de umidade de 5,8% de água.



Figura 5. Sementes de *Cenostigma tocantinum* (ALMEIDA, 2014)

3.2 Extração de DNA

As técnicas de biologia molecular vêm sendo amplamente utilizadas na caracterização de espécies vegetais e na identificação de polimorfismos intraespecíficos. Esses métodos, quando combinados com a genética clássica, abrem novas perspectivas para a ampliação do conhecimento e para a aceleração de programas de melhoramento (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; VIDAL et al., 2005).

Normalmente, estudos de identificação e de caracterização da variabilidade genética das plantas, por meio de técnicas moleculares, envolvem a avaliação de um grande número de indivíduos, necessitando-se de métodos rápidos e precisos de extração de DNA (MOLINARI e CROCHEMORE, 2001).

É importante ressaltar que, independente do método de extração de DNA utilizado, deve-se atentar para que o material obtido esteja íntegro, sem impurezas, passível de amplificação e em boa quantidade (MILACH, 1998). Qualquer que seja o tipo de análise molecular desejado, o preparo de DNA deve gerar amostras suficientemente puras para que não iniba os tratamentos enzimáticos ou interfira nos padrões de migração em gel de eletroforese (ROMANO e BRASILEIRO, 1999).

Para o isolamento e purificação de ácidos nucleicos, é necessário separá-los efetivamente dos outros constituintes celulares. Aliás, o principal problema encontrado nesses processos é o coisolamento de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários (KIDWELL e OSBORN, 1992; MERCADO et al., 1999; ROMANO e BRASILEIRO, 1999; MOLINARI e CROCHEMORE, 2001). Esses contaminantes, liberados durante a lise celular, principalmente de tecidos de folhas maduras, aderem

irreversivelmente ao DNA, inibindo a digestão com endonucleases de restrição e ou a amplificação através da reação em cadeia da polimerase - PCR (COUCH e FRITZ, 1990). O rompimento da célula também libera polissacarídeos que são de difícil separação do DNA e inibem muitas diferentes DNA polimerases e enzimas de restrição (LODHI et al., 1994).

A maioria dos métodos de isolamento de DNA emprega detergentes na elaboração do tampão de lise para auxiliar a solubilização das membranas celulares e até a desnaturação de proteínas (ROMANO e BRASILEIRO, 1999; MESQUITA et al., 2001). A diferença básica entre tais métodos está na composição do tampão de extração, que, normalmente, integra um agente tamponante para estabilizar o pH em torno de 8.0, um sal para dissociar as proteínas do DNA, um detergente para solubilizar as membranas e auxiliar na inativação de algumas enzimas e um inibidor de DNAses para proteger o DNA (BERED, 1998).

O método de extração de DNA mais utilizado para diferentes espécies vegetais é baseado no uso do detergente brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB, componente que desfavorece a ação de enzimas degradantes e de DNAses endógenas, sendo um detergente que solubiliza as membranas, facilitando a precipitação diferencial do complexo formado com o DNA. As extrações com métodos que utilizam este reagente fornecem, geralmente, DNA suficientemente puro para a amplificação por PCR (GONÇALVES, 2006).

Vários autores citam a eficiência deste método de extração, com variações de acordo com a espécie e o tecido utilizado, como Vasconcelos (1997), Ferreira e Grattapaglia (1998), Mercado et al. (1999), Romano e Brasileiro (1999).

Após o processo de extração torna-se necessário quantificar o DNA, para verificar a concentração obtida e a ocorrência de degradação, que é uma etapa fundamental para a eficiência da reação de PCR. Entre as técnicas disponíveis para estimar a concentração de DNA, as mais utilizadas são a leitura em espectrofotômetro e a análise comparativa em gel de agarose (COSTA e MOURA, 2001).

Este procedimento é necessário porque a concentração de DNA inadequada implicará em falhas nas etapas subsequentes. O DNA em excesso pode resultar na falha completa das reações devido a alta concentração de impurezas agregadas, ou perfis eletroforéticos com arraste e bandas pouco definidas. Por outro lado, a baixa concentração de DNA resultará em amplificação errada ou não amplificação de

certos segmentos com perfis de eletroforese não reproduzíveis (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Vale ressaltar que a quantidade de DNA obtida, varia em função do genoma e da eficiência do protocolo de extração utilizado. Após a quantificação e qualificação do DNA, devem ser feitas soluções de trabalho adequadas à concentração exigida no protocolo das análises a serem realizadas (COSTA e MOURA, 2001).

3.3 Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares surgiram como uma ferramenta rápida e eficaz na análise de variações genéticas uma vez que detectam o polimorfismo diretamente ao nível de DNA e não sofrem qualquer influência ambiental (SOUZA, 2001). Com base nesse polimorfismo, é possível fazer inferências sobre as relações entre o genótipo e o fenótipo dos indivíduos, o que em última análise permite aumentar a eficiência dos programas de melhoramento, além de melhorar as estimativas da diversidade genética de uma determinada população (JOHNS et al., 1997; RODRIGUES, 2001).

Esses marcadores são baseados nas mutações de sequências nucleotídicas dentro do genoma do indivíduo e são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma, nos quais a sequência de seus nucleotídeos e a sua função podem ou não ser conhecidas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; YANG et al., 2013). Em outras palavras, são sequências de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos (COUTINHO et al., 2006).

Os marcadores moleculares são numerosos e distribuídos por todo o genoma, possuem herança mendeliana, expressam, em geral, caráter codominante e muitas vezes são multialélicos, além de raramente apresentarem efeitos pleiotrópicos sobre os *loci* de caracteres quantitativos (QTLs). São os marcadores disponíveis mais confiáveis e têm sido usados com sucesso na análise genética de plantas e na caracterização da variabilidade contida em Bancos de Germoplasma (SALLA et al., 2002; GANGA et al., 2004). Mais especificamente, podem investigar as variações genéticas no DNA entre diferentes populações e indivíduos, tendo como vantagem a

capacidade de encontrar variações genéticas de forma rápida e direta (TENEVA, 2009; YANG et al., 2013).

Para Konstantinov et al. (2005), aplicações possíveis de marcadores moleculares incluem: identificação e verificação de velhos e novos acessos coletados, detecção de duplicatas, análise de pureza genética, análise de diversidade genética, construção de coleções de base e seleção de genes de interesse agrônomico. Além disso, os marcadores moleculares podem ser usados para avaliação da estrutura e função do genoma em processos evolucionário nas plantas cultivadas.

De forma geral, os marcadores moleculares podem ser classificados em duas categorias de acordo com as técnicas utilizadas para a revelação das características entre indivíduos: do tipo I, cujos marcadores estão associados a genes ou sequências de DNA conhecidas, as quais serão visualizadas por hibridização; e do tipo II, que geralmente são associados a uma sequência desconhecida, as quais amplificam o DNA (COUTINHO et al., 2006; BENALI et al., 2011).

Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment of Length Polymorphism*) e Minissatélites ou *loci* VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles que amplificam o DNA, incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*); STS (*Sequence Tagged Sites*) Microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (MILACH, 1998).

3.3.1 Marcadores AFLP

Uma variedade de diferentes técnicas moleculares pode ser usada para estudar a diversidade botânica (KARP et al., 1996). Procedimentos baseados em técnicas de biologia molecular são atualmente usados para estimar graus de divergência genética entre populações e espécies de plantas. Entre as técnicas que não requerem sequenciamento, uso de sondas ou bibliotecas genômicas, destaca-se o AFLP (CLEMENTE, 2010).

A técnica AFLP é usada para visualizar centenas de fragmentos de restrição de DNA amplificados simultaneamente. O polimorfismo detectado decorre principalmente da variação nos sítios de restrição para a enzima de corte frequente,

conferindo a estas marcas um carácter dominante (SPOONER et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011).

A detecção da variabilidade genética é realizada por meio da combinação do poder de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição com a flexibilidade da tecnologia baseada em PCR, mediante a ligação de sequências de iniciador de reconhecimento (adaptadores) ao DNA restringido (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; CAIXETA et al., 2009). Portanto, a técnica de AFLP é uma combinação de estratégias utilizadas pelas técnicas de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e RAPD (Random Amplified Polymorphic), com vantagens de detectar múltiplos *loci* por reação e apresentar alta repetibilidade (OLIVEIRA et al., 2011).

A análise de AFLP consiste em quatro etapas. Na primeira, o DNA genômico total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição, uma que corta sítios de seis pares de base (geralmente, a *EcoRI*) e a outra que corta sequências de quatro pares de bases (geralmente, a *MseI*). Este processo de clivagem gera milhões de fragmentos de distintos tamanhos que, em função da concentração, não são detectados em eletroforese (BIOSYSTEMS, 2010).

Na segunda etapa, as impressões digitais são produzidas sem o conhecimento prévio da sequência, usando-se um adaptador, que consiste em pequenas sequências de DNA que são ligadas às extremidades dos fragmentos de restrição para gerar moldes para as etapas seguintes de amplificação (VOS et al., 1995; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Estes adaptadores possuem de 20 a 30 pares de bases e as sequências dessas bases são diferentes para cada adaptador. Portanto, um grande número de fragmentos é gerado, sendo necessárias algumas etapas de seleção dessa grande quantidade de fragmentos para que a análise seja viável (VOS et al., 1995; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Na terceira etapa, ocorre, inicialmente, a amplificação dos fragmentos, agora ligados aos adaptadores, através da reação da polimerização em cadeia com o uso de iniciadores complementares aos adaptadores com uma base a mais. Isto é importante, pois somente 25% dos fragmentos serão amplificados, caso contrário todos os fragmentos cortados seriam amplificados e a resolução no gel seria virtualmente impossível. Em seguida, é feita outra amplificação com uma pequena amostra da primeira. Neste caso, são utilizados iniciadores que são compostos de todas as bases

dos *primers* da primeira amplificação, mais duas a três bases, dependendo do nível de polimorfismo da espécie ou da população (BIOSYSTEMS, 2010).

Na quarta etapa, a subpopulação de fragmentos selecionados é separada e verificada em gel de alta resolução como um gel de poliacrilamida com marcação radioativa ou em um sequenciador automático de DNA, através de marcação por fluorescência. Potencialmente, apenas o sequenciamento de fragmentos, mesmo manualmente, pode resolver todas as diferenças possíveis entre as amostras (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; LIU, 1998; RAMALHO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007; BIOSYSTEMS, 2010).

Esse tipo de marcador apresenta vantagens comparativas, tais como detecção de maior número de *loci*, cobertura ampla do genoma e baixo custo (LOPES et al., 2003). Os *Fingerprints* (impressões digitais) são produzidos sem o conhecimento prévio de sequência e usando um conjunto limitado de *primers* genéricos (VOS et al., 1995; LIU, 1998). Ademais, muitos subconjuntos de fragmentos de restrição podem ser amplificados pela alteração das extensões nucleotídicas nas sequências de adaptador. Outra vantagem é que pode ser usada em organismos de qualquer origem ou complexidade e para os quais não existem informações genéticas prévias (BONIN et al., 2007; VUYLSTEKE et al., 2007).

Além disso, a possibilidade de se empregarem condições mais estritas para o anelamento dos *primers* na reação de PCR resulta em maior repetibilidade e robustez do AFLP, quando comparado com o RAPD. As desvantagens da técnica de AFLP são a dominância dos marcadores, o alto custo e as várias etapas e reagentes necessários à obtenção dos marcadores (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de estudo e coleta do material vegetal

Foram estudadas populações de *C. tocantinum* utilizadas em arborização urbana em três cidades do Estado do Amazonas (Figuras 6 e 7): Manaus (Figura 8), Parintins (Figura 9) e Presidente Figueiredo (Figura 10). As árvores da espécie quando usadas na arborização urbana nas cidades originam-se do plantio de mudas provenientes de sementes. Cada população foi constituída de uma amostra de 30 plantas, totalizando 90 plantas no estudo, sendo todas devidamente identificadas e suas posições geográficas registradas com sistema de posicionamento global - GPS (Anexo I).

Foram amostradas árvores localizadas em ruas e praças de área urbana. Folhas jovens e sadias foram colhidas de cada planta, acondicionadas em sacos plásticos, devidamente identificados, contendo sílica gel e armazenadas à temperatura de -20 °C para posterior extração do DNA e análise com marcadores AFLP no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LAB-MGV) da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM.

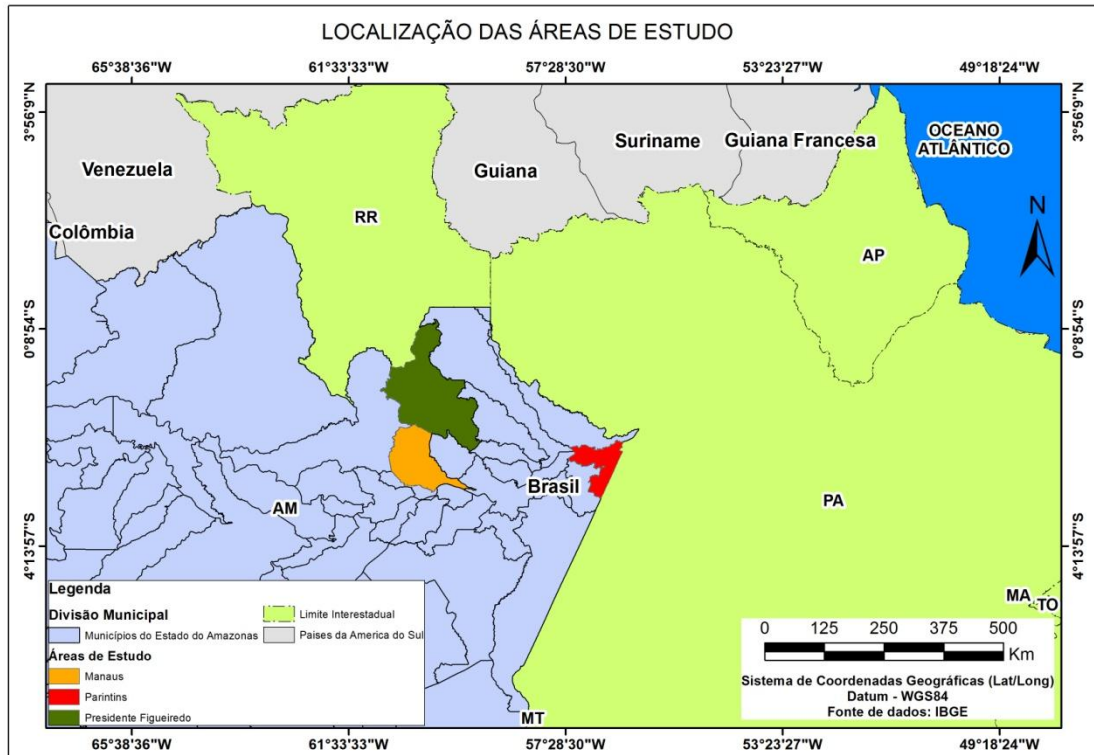


Figura 6. Mapa de localização das áreas de estudo: Manaus, Parintins e Presidente Figueiredo (ALMEIDA, 2014)

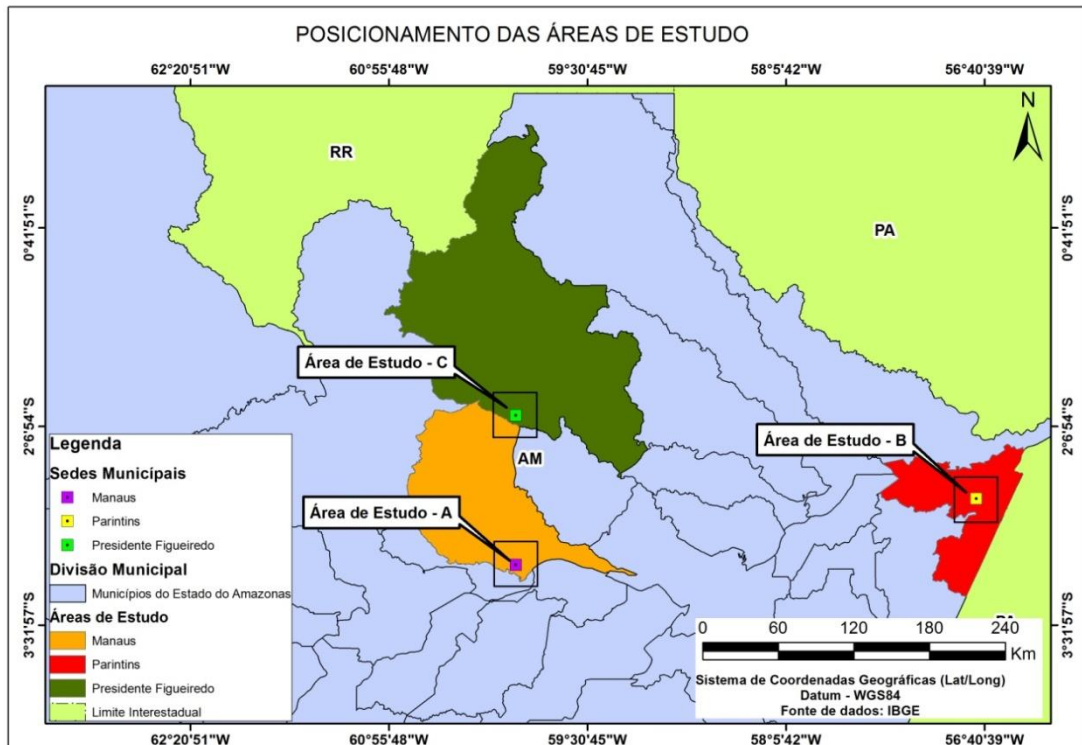


Figura 7. Mapa de posicionamento da área de estudo (ALMEIDA, 2014)

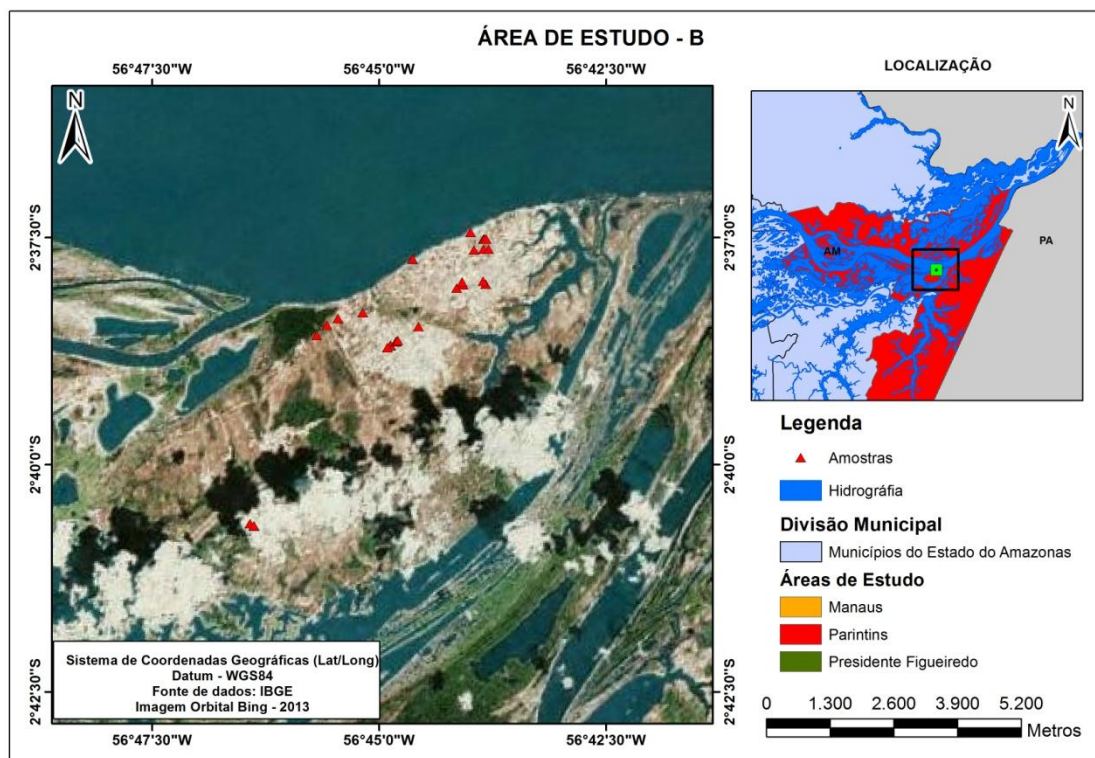
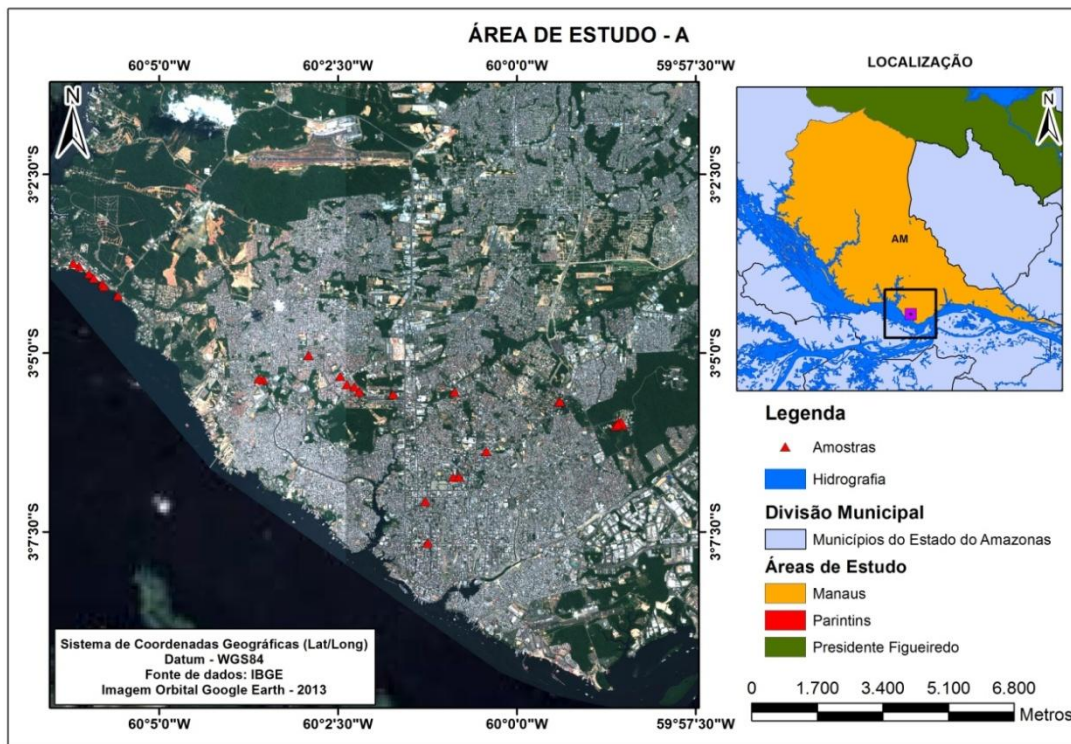


Figura 9. Mapa da área de estudo B (Parintins) (ALMEIDA, 2014)

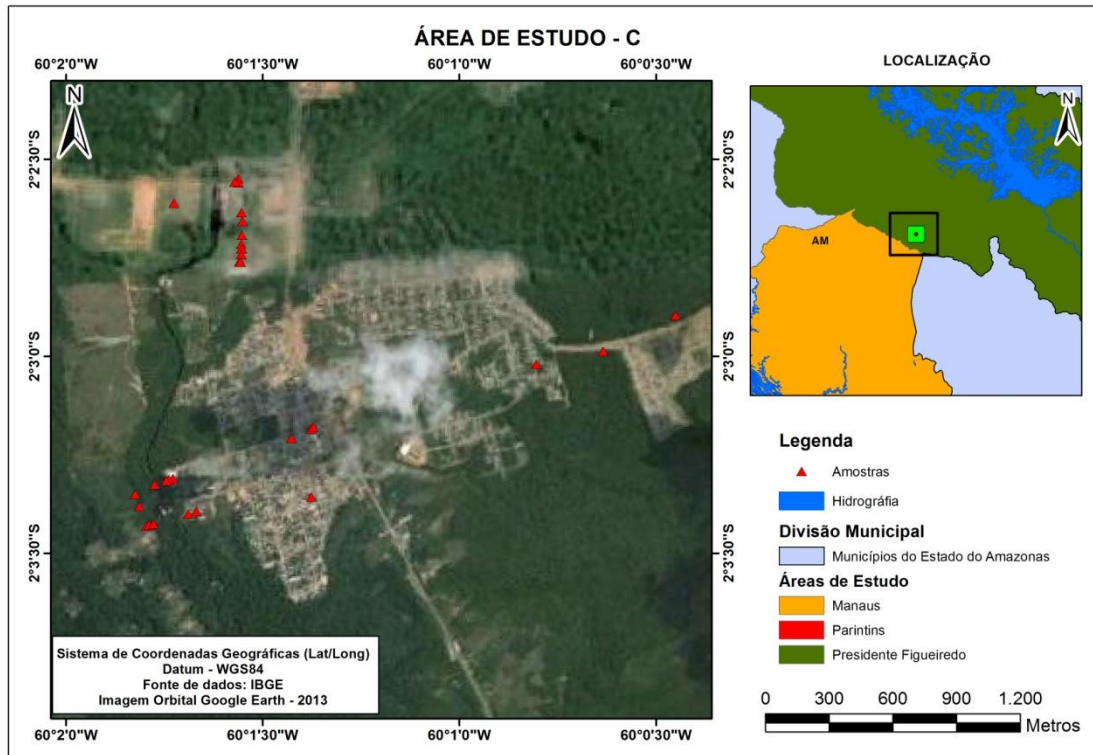


Figura 10. Mapa da área de estudo C (Presidente Figueiredo) (ALMEIDA, 2014)

4.2 Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo CTAB descrito por (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998) modificado. Para cada amostra, macerou-se aproximadamente 60 mg de tecido foliar fresco (máximo de dois dias após a coleta) sem a nervura principal em cadinho contendo 700 μ L de tampão de extração (CTAB 20%, NaCl 1,4 M, Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, 2- β -mercaptoetanol 0,8%, PVP-Polivinilpirrolidona 1% e água ultrapura).

O macerado foi colocado em microtubo de plástico de 1,5 μ L e mantido em recipiente com gelo até o termino do processo de maceração de todas as amostras. As amostras foram homogeneizadas mecanicamente por trinta segundos e incubadas em banho-maria a 60 °C por trinta minutos com homogeneização a cada dez minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 600 μ L da mistura gelada de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) na amostra, que foi suavemente homogeneizada por cinco minutos e centrifugada a 14.500 rpm por dez minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para novos tubos, aos quais foram

adicionados 450 μL de isopropanol gelado e, após homogeneização suave, foram incubados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24h.

Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas por dez minutos a 7.500 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% por cinco minutos duas vezes e uma vez com 1 mL de etanol absoluto, ambos gelados. Após a retirada do etanol o precipitado foi deixado para secar à temperatura ambiente por 1 hora para então ser ressuspensionado em 30 μL de tampão TE (Tris - EDTA) acrescido de RNase (39:1), incubado em banho-maria por 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para algumas amostras foi necessário uma etapa de limpeza em que foi acrescentado 500 mL de NaCl 2M ao precipitado, que após vortexado foi incubado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo tubo acrescido de 400 mL de isopropanol. Após duas horas de armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, os tubos foram centrifugados a 7500 rpm por dez minutos e o sobrenadante foi descartado. Realizou-se a limpeza com etanol conforme feito anteriormente para as demais amostras com folhas frescas, bem como o restante dos procedimentos.

Para a quantificação, 2 μL de DNA ressuspensionado foi diluído em solução contendo 3 μL do corante azul de bromofenol e 1 μL de gel Red. Este volume, 6 μL , foi aplicado em gel de agarose 0,8 % (p/v). Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese, em tensão de 100 V por dez minutos para a saída do poço e 60 V por 50 minutos para o restante da corrida. A quantidade de DNA foi avaliada por análise comparativa entre o DNA extraído de cada amostra e um DNA de concentração conhecida (DNA lambda-Invitrogen) em transluminador de UV e fotodocumentados por sistema digital Vilber Lourmat. Após quantificação, as amostras foram diluídas em água ultrapura para ajustar as suas concentrações para condição de trabalho (10 ng/ μL).

As modificações realizadas no protocolo de Ferreira e Grattapaglia (1998) foram: não foi acrescentada a proteinase K ao tampão de extração; a extração com CIA foi feita apenas uma vez; e foi retirada a etapa de limpeza com NaCl para a extração com folhas frescas.

4.3 Desenvolvimento de marcadores AFLP

A análise de marcadores AFLP foi realizada segundo os procedimentos propostos por Vos et al. (1995), com modificações de Lopes et al. (2003), os quais serão detalhados a seguir.

4.3.1 Digestão do DNA

As reações de digestão foram realizadas utilizando 200 ng de DNA genômico, 5,0 μL do tampão One Phor All-OPA 10X (Pharmacia), 0,5 μL de solução Albumina de Soro Bovino-BSA ($10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), 1,0 μL da enzima *MseI* ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) e 0,4 μL da enzima *EcoRI* ($12 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), ambas fornecidas pelo New England Biolabs, e água ultrapura completando o volume final para 50 μL . O material foi incubado em termociclador ESCO[®] PCR Thermal Cyclers por três horas a 37 °C para as reações de restrição e, em seguida, por 15 minutos a 70 °C para inativação das endonucleases.

4.3.2 Preparo e ligação dos adaptadores

Foram preparados adaptadores específicos de *EcoRI* e *MseI* que possuem terminais complementares às extremidades resultantes da digestão pelas enzimas de restrição. O adaptador *EcoRI* foi preparado utilizando 5,6 μL de adaptador *EcoRI forward*, 4,8 μL de adaptador *EcoRI reverse*, 6 μL de tampão OPA (Amersham[®]) e água ultrapura esterilizada para o volume final de 120 μL . O adaptador *MseI* foi preparado utilizando 64 μL de adaptador *MseI forward*, 56 μL de adaptador *MseI reverse*, 7 μL de tampão OPA (Amersham[®]) e água ultrapura esterilizada para o volume final de 140 μL . Ambos os adaptadores foram incubados no termociclador ESCO[®] PCR Thermal Cyclers, a temperaturas subsecutivas de 65, 37 e 25 °C, com duração de dez minutos cada.

Para a reação de ligação dos adaptadores foi utilizado 1,0 μL de adaptador *EcoRI*, 1,0 μL de adaptador *MseI*, 1,0 μL de tampão para a enzima T4 DNA Ligase (10X), 0,33 μL da enzima T4 DNA Ligase ($3 \text{ U}/\mu\text{L}$) (Promega[®]) e água ultrapura esterilizada completando o volume para 10 μL . Este mix foi adicionado a 50 μL do DNA digerido com as enzimas de restrição. As amostras foram incubadas em termociclador a 23 °C por 3 horas e estocadas a -20 °C. Na Tabela 1 são apresentados sítios de restrição das enzimas utilizadas no estudo e sequência dos adaptadores.

Tabela 1. Sítios das enzimas de restrição e sequências de adaptadores

Enzima	Sítio de Restrição	Especificação	Sequência
<i>EcoRI</i>	5'- G AATTC 3'	Adaptador <i>forward</i>	5' - CTC GTA GAC TGC GTA CC - 3'
	3'- CTTAA G 5'	Adaptador <i>reverse</i>	5' - CAT CTG ACG CAT GGT TAA - 3'
<i>MseI</i>	5'- T TAA 3'	Adaptador <i>forward</i>	5' - GAC GAT GAG TCC TGA G - 3'
	3'- AAT T 5'	Adaptador <i>reverse</i>	5' - TAC TCA GGA CTC AT - 3'

Fonte: Vos et al. (1995)

4.3.3 Reações de amplificação

Foram utilizados 0,6 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo contendo um nucleotídeo seletivo adicionado à extremidade 3': oligo *EcoRI* (25 ng/µL) + A e oligo *MseI* (25 ng/µL) + C, 1,0 µL de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (10X) (Fermentas[®]), 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL) (Fermentas[®]), 2,5 µL de DNA digerido e ligado, e água ultrapura para completar o volume para 10 µL. As amostras foram incubadas em termociclador a 94 °C por dois minutos, seguidos de 26 ciclos de 94, 56 e 72 °C, com duração de um minuto para cada temperatura, e uma extensão final de 72 °C por cinco minutos. Terminada a reação de PCR foram acrescentados 40 µL de água ultrapura a cada amostra, as quais foram armazenadas a -20 °C. As sequências dos oligonucleotídeos usados na reação de pré-amplificação encontram-se na Tabela 2.

Na segunda reação de amplificação, conhecida como amplificação seletiva, os iniciadores utilizados possuem mais dois nucleotídeos arbitrários adicionais, o que torna a seleção bem mais significativa. Para esta etapa foram utilizadas oito combinações de oligonucleotídeos em uma amostra aleatória de seis indivíduos da coleção (Tabela 2) para análise da qualidade de amplificação e do número de locos polimórficos amplificados.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos usados para as análises de polimorfismo de comprimentos de fragmentos amplificados

Enzima	ETAPA	Especificação	Sequência
<i>EcoRI</i>	Pré-amplificação	<i>Primer E + A</i>	5' GAC TGC GTA CCA ATT CA - 3'
	Amplificação seletiva	<i>Primer E + AGT</i>	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAG T - 3'
		<i>Primer E + AGC</i>	5' GAC TGC GTA CCA ATT CAG C - 3'
<i>MseI</i>	Pré-amplificação	<i>Primer M + C</i>	5' GAT GAG TCC TGA GTA AC - 3'
	Amplificação seletiva	<i>Primer M + CAT</i>	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACA T - 3'
		<i>Primer M + CAC</i>	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACA C - 3'
		<i>Primer M + CCA</i>	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACC A - 3'
		<i>Primer M + CTC</i>	5' GAT GAG TCC TGA GTA ACT C - 3'

Para as reações de amplificação seletiva foram utilizados 1,2 μL de MgCl_2 (25 mM), 0,4 μL de dNTPs (10 mM), 1,0 μL do oligo *EcoRI* (25 ng/ μL) + ANN, 1,2 μL do oligo *MseI* (25 ng/ μL) + CNN (Em que N é o nucleotídeo arbitrário usado na amplificação seletiva), 2,0 μL de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (10X) (Fermentas[®]), 0,2 de *Taq* DNA polimerase (5 U/ μL) (Fermentas[®]), 1,5 μL de DNA das amostras pré-amplificadas, e água ultrapura para completar o volume de 20 μL . As amostras foram incubadas em termociclador à temperatura 94 °C por dois minutos, seguida de 12 ciclos de 94, 65 e 72 °C com duração de 30, 30 e 60 segundos, respectivamente, mais 23 ciclos de 94, 56 e 72 °C com duração de 30, 30 e 60 segundos, respectivamente, e uma extensão final de 72 °C por dois minutos. As amostras foram estocadas a -20 °C.

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% (acrilamida/bis-acrilamida (19:1 v/v)). Para o preparo da matriz de poliacrilamida foram utilizados 50,40 g de uréia, 0,36 g de bis-acrilamida e 7,20 g de acrilamida e tampão 1X TEB (Tris base, Ácido bórico e EDTA) para completar o volume de 120 mL. Foi usado o sistema de gel de sequenciamento "Sequi-Gen GT" (Biorad), fonte de 3.000 V.

As placas foram limpas duas vezes com etanol 95%. Em seguida, na placa maior foram aplicados 1,5 mL de Repel químico e na placa menor foi aplicada uma solução contendo 1 mL de etanol 95 %, 5 μL de ácido acético glacial e 5 μL de bind químico. Após cinco minutos as placas foram limpas mais duas vezes com álcool 95%, neste caso com leves movimentos apenas para a retirada do excesso das soluções. Foram utilizados lenços de papel, tanto na limpeza das placas como na aplicação e retirada do excesso das soluções.

Para o preparo do gel de poliacrilamida, utilizou-se 150 mL da matriz, 150 μL de Tetrametiletlenodiamina - TEMED e 1 mL de persulfato de amônia (95 mg/mL). O gel permaneceu, no mínimo, por quatro horas em processo de polimerização. Na parte superior da cuba foi utilizado aproximadamente 1,2 L TEB 1X e na parte inferior 350 mL de TEB 1X adido de 50 mL de acetato de sódio 3M.

Antes da aplicação das amostras, foi realizada uma pré-corrída conduzida sob potência constante de 80 W durante uma hora, para aquecimento e limpeza do gel.

Às amostras foram adicionados 8 µL de loading buffer (formamida 98%, EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,002% (p/v) e xilenocianol 0,002% (p/v)) e incubadas no termociclador por cinco minutos à temperatura de 95 °C para desnaturação. Em seguida, foram aplicados 20 µL da amostra desnaturada no gel para eletroforese sob potência constante de 80 W durante três horas.

4.4.1 Revelação do gel

Para a revelação do gel, usou-se o método de coloração com nitrato de prata segundo o protocolo proposto por Creste et al. (2001).

A placa com o gel foi imersa em 3 L de solução para fixação (etanol 10% e ácido acético glacial 1%) durante dez minutos, seguida de lavagem em 3 L de água destilada por um minuto. Realizou-se então um pré-tratamento com solução de oxidação (ácido nítrico 1,5% - 3 L) durante 2,40 minutos e uma lavagem em 3 L de água destilada por um minuto. Para a impregnação foram utilizados 3 L da solução de nitrato de prata (AgNO_3 0,2%) por 20 minutos, seguida de duas lavagens de 30 segundos em 3 L de água destilada cada. A revelação foi feita em duas etapas, ambas utilizando 1,5 L de solução para revelação (Na_2CO_3 3% e formaldeído 0,02%), durando a primeira etapa o tempo de surgimento das primeiras bandas e a segunda até a obtenção do padrão de revelação desejado. Por fim, a placa foi colocada em 3 L de solução bloqueadora (ácido acético glacial 5%) por cinco e lavada em 3 L de água destilada durante um minuto e mantida à temperatura ambiente para secar. Todos os procedimentos foram realizados dentro de bandejas plásticas e sob agitação em mesa agitadora orbital MA-140.

4.5 Análises de diversidade e estrutura genética

A partir dos fragmentos obtidos foi construída uma matriz binária, em que zero e um indicaram ausência e presença de fragmentos, respectivamente. Os dados dessa matriz foram usados na construção de uma matriz de dissimilaridade por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard obtido pela expressão:

$$D_j = 1 - \left(\frac{a}{a + b + c} \right)$$

Sendo a a presença de banda em ambos os acessos, b a presença de banda no primeiro e ausência no segundo, e c a ausência no primeiro e presença no segundo acesso (JACCARD, 1901).

Estes valores foram utilizados para a obtenção de uma nova matriz que, por sua vez, foi submetida à análise de agrupamento pelo método de agrupamento hierárquico da ligação média entre grupos – UPGMA (SNEATH e SOKAL, 1973), cujo resultado pode ser visualizado na forma gráfica de um dendrograma.

A construção do dendrograma é estabelecida pelo genótipo de maior similaridade. O primeiro grupo é formado pelos genótipos mais similares e, em seguida, calcula-se novamente a distância entre todos os genótipos, considerando o grupo formado anteriormente como um genótipo apenas, sendo novamente agrupados os indivíduos dos grupos de maior similaridade e assim sucessivamente. A distância entre os grupos é determinada pela média das distâncias entre pares de indivíduos pertencentes aos diferentes grupos. A expressão geral para este método é dada a seguir.

$$d_{(ij)k} = \frac{n_i}{n_i + n_j} d_{ik} + \frac{n_j}{n_i + n_j} d_{jk}$$

Sendo $d_{(ij)k}$ a distância entre o grupo (ij) , com tamanho interno n_i e n_j , respectivamente, caracterizando i , j e k como indivíduos ou grupos (CRUZ et al., 2011).

Devido à inexistência de um método para selecionar a melhor técnica de agrupamento, é importante avaliar o grau de ajuste desse agrupamento. O ajuste foi avaliado pelo coeficiente de correlação cofenética (r) proposto por (SOKAL e ROHLF, 1962), o qual mede o grau de ajuste entre a matriz de dissimilaridade (matriz fenética - F) e a matriz resultante da simplificação devido ao método de agrupamento (matriz cofenética - C) segundo a fórmula:

$$r = \frac{\widehat{Cov}(F, C)}{\sqrt{\widehat{V}(F) \cdot \widehat{V}(C)}}$$

Segundo (ROHLF, 1970), quanto maior o valor de r melhor o agrupamento, e o valor de r menor que 0,7 indica a inadequação do método de agrupamento.

Tanto as matrizes de dissimilaridade como os dendrogramas foram obtidos com o auxílio do software estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

A abordagem bayesiana implementada no software Structure v.2.3 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003; HUBISZ et al., 2009) foi utilizada para revelar a estrutura das populações. O número de interações utilizadas no *burn-in* e MCMC (Markov Chain Monte Carlo) foram de 100.000 e 200.000, respectivamente. Nas análises, foi considerado o modelo de mistura com frequências correlacionadas com a incorporação *a priori* das informações sobre locais de amostragem (habilitando as funções LOCPRIORI e USEPOPINFO).

O software Structure e seus modelos fornecem alternativas para a detecção da estrutura populacional, atribuição de indivíduos à população e identificação de migrantes e de indivíduos que apresentam genoma de duas ou mais populações. Ele permite a inclusão de informação prévia, como a origem geográfica ou distâncias de adaptação e de marcador, o que tende a tornar as análises mais precisas. Pode ser aplicado para a maioria dos marcadores genéticos mais usados, incluindo SNPs, microsatélites, e AFLPs (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003).

Para visualizar o número de agrupamentos mais adequados aos dados foi utilizado o programa Structure Harvester (EARL e VONHOLDT, 2011). Este calcula os valores de K a partir dos resultados do software STRUCTURE. Foram testados valores de K variando de 1 a 5 com três repetições idênticas para cada valor de K testado. O valor mais provável de K foi determinado pelo critério ΔK descrito por (EVANNO et al., 2005).

A visualização gráfica da estrutura populacional se deu através do software DISTRUCT (ROSENBERG, 2004), usando a repetição que proporcionasse o maior valor do logaritmo da função de verossimilhança.

A diferenciação genética entre e dentro das populações foi estimada pela análise da variância molecular (AMOVA) por meio do programa Genes v.5.1 (CRUZ, 2013). Este, também foi usado para obtenção da matriz de dissimilaridade na avaliação da diversidade genética entre as populações. A distância genética entre as populações foi estimada segundo (NEI, 1972):

$$\hat{D} = \ln \hat{I}$$

O índice de identidade genética (\hat{I}), baseia-se em frequências alélicas de locos homólogos nas diferentes populações. A expressão é a seguinte:

$$\hat{I} = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x - J_y}}$$

Sendo J_{xy} , J_x e J_y , respectivamente, as médias aritméticas de j_{xy} , j_x e j_y sobre todos os locos polimórficos e monomórficos. Em que $j_{xy} = \sum x_i^2$ é a probabilidade de 2 genes escolhidos ao acaso na população x serem idênticos; $j_x = \sum y_i^2$ é a probabilidade de 2 genes escolhidos ao acaso na população y serem idênticos e $j_y = \sum x_i y_i$ é a probabilidade de identidade de um gene da população x e um gene da população y serem idênticos.

Foram realizadas análise de fluxo gênico, com o uso do programa POPGENE versão 1.32 (YEH et al., 1999). O teste de Mantel (MANTEL, 1967) foi realizado pelo *software* estatístico R, com 999 permutações ao acaso e foi usado para investigar a correlação entre a distância geografia e a diversidade genética das amostras em estudo de *C. tocaninum*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração e quantificação de DNA

O protocolo para a extração de DNA genômico apresentou resultados satisfatórios em quantidade e qualidade para todas as populações (Figura 11). As extrações feitas com folhas frescas proporcionaram *pellets* mais limpos, não sendo necessária a limpeza com NaCl, como foi o caso das extrações feitas em folhas armazenadas por 20 dias. A quantidade e qualidade do DNA também variaram de acordo com o tempo de armazenamento das folhas, tendo as extrações em folhas frescas melhores resultados que as folhas armazenadas por mais tempo, em média 30 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ e 20 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, respectivamente. Stefenon (2003) em estudo comparativo da extração de folhas frescas e folhas armazenadas por três meses observou que houve degradação do DNA e redução na quantidade obtida, sendo maior a degradação e menor a quantidade de DNA quanto maior o tempo de armazenamento do material vegetal. Para obter o DNA de boa qualidade, a utilização de tecido foliar fresco e jovem é o ideal (SYSTMA et al., 1993).

Não foi possível utilizar folhas frescas de todas as amostras devido a distância do local de origem das amostras. Neste sentido, é necessária a preservação das amostras, geralmente, por desidratação das folhas em sílica gel, para posterior processo de extração (CHASE e HILLS, 1991) como realizado no presente trabalho para amostras de Parintins e Presidente Figueiredo. Este método de preservação oferece inúmeras vantagens, principalmente, devido à sua simplicidade, otimização de espaço físico tanto para o transporte quanto para armazenamento no laboratório, bem como pela preservação do DNA das amostras dessecadas por longo prazo. Outras vantagens de se usar tecido seco em estudos moleculares é o fato de ele poder ser rompido com maior facilidade e a qualidade do DNA ser, em geral, bastante satisfatória. Além disso, no estado desidratado, o DNA é menos suscetível à degradação química ou enzimática (MURRAY e THOMPSON, 1980).

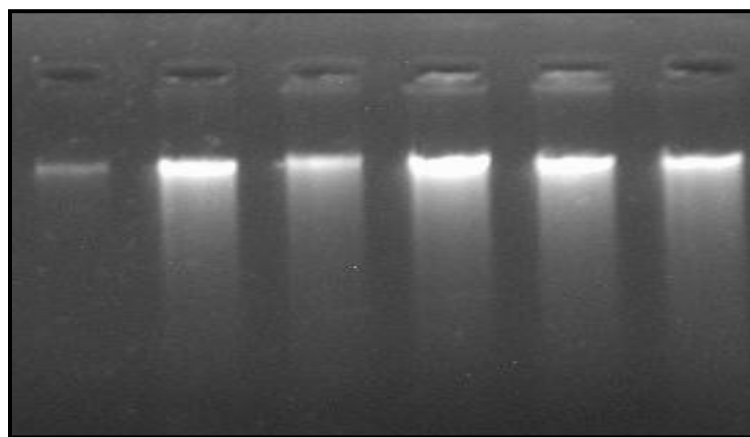


Figura 11. Quantificação de DNA de 5 amostras de *Cenostigma tocantinum*, comparados a marcador molecular de 10 ng (primeiro poço), em gel de agarose 0,8%

5.2 Seleção de oligonucleotídeos e polimorfismo dos marcadores AFLP

Entre as oito combinações realizadas, quatro foram selecionadas para a análise de todas as amostras por apresentar maior número de locos polimórficos e melhor qualidade de amplificação das bandas (E+AGT/M+CAT, E+AGT/M+CTC, E+AGT/M+CAC, E+AGT/M+CCA). As combinações de *primers* analisadas nas três populações totalizaram 186 *loci*, sendo 132 (71 %) polimórficos e 54 (29 %) monomórficos. Houve uma variação de 29 a 37 *loci* polimórficos por combinação de *primers* (Tabela 3). Souza (2008) utilizando 12 *primers* de AFLP, encontrou para a espécie *Dimorphandra wilsonii* 104 fragmentos, sendo 37 (35,6%) polimórficos e para a espécie *Dimorphandra mollis* 115 fragmentos, sendo 81 (70,4%) polimórficos. Segundo Bassi et al. (2010), é essencial uma avaliação prévia de oligonucleotídeos de maneira a evitar o uso daqueles que não amplificam ou que geram poucos fragmentos e baixo polimorfismo, dificultando o estudo de diversidade genética.

Tabela 3. Combinações de oligonucleotídeos e quantidade de *loci* polimórficos por população

Combinações de oligonucleotídeos	<i>Loci</i>		<i>Loci</i> Totais
	Polimórficos	Monomórficos	
E-AGT/M-CAC	31	12	43
E-AGT/M-CAT	29	9	38
E-AGT/M-CCA	37	16	53
E-AGT/M-CTC	35	17	52
Total	132	54	186

5.3 Análise de diversidade genética

As relações de parentesco entre indivíduos foram caracterizadas na forma de dendrogramas construídos a partir do polimorfismo dos fragmentos obtidos. As populações de Manaus (A) e de Presidente Figueiredo (C) apresentaram dois grupos cada e a população de Parintins (B) apresentou três grupos (Figuras 12, 13 e 14).

No dendrograma para os indivíduos da população A, observou-se a formação de dois grupos (A1 e A2), sendo A1 formado por 11 acessos e A2 por 19 acessos (Figura 12). Os coeficientes de dissimilaridade mostraram que os indivíduos mais divergentes da população foram M14 e M22 com 0,820, e os menos divergentes foram M12 e M13 com 0,039.

Considerando a dissimilaridade dentro dos grupos, observou-se maior divergência entre os acessos M14 e M9 (0,674), no grupo A1, e entre os acessos M16 e M29 (0,755) no grupo A2, enquanto a menor divergência foi observada entre os acessos M12 e M13 (0,039), grupo A1, e entre os acessos M25 e M26 (0,150) no grupo A2.

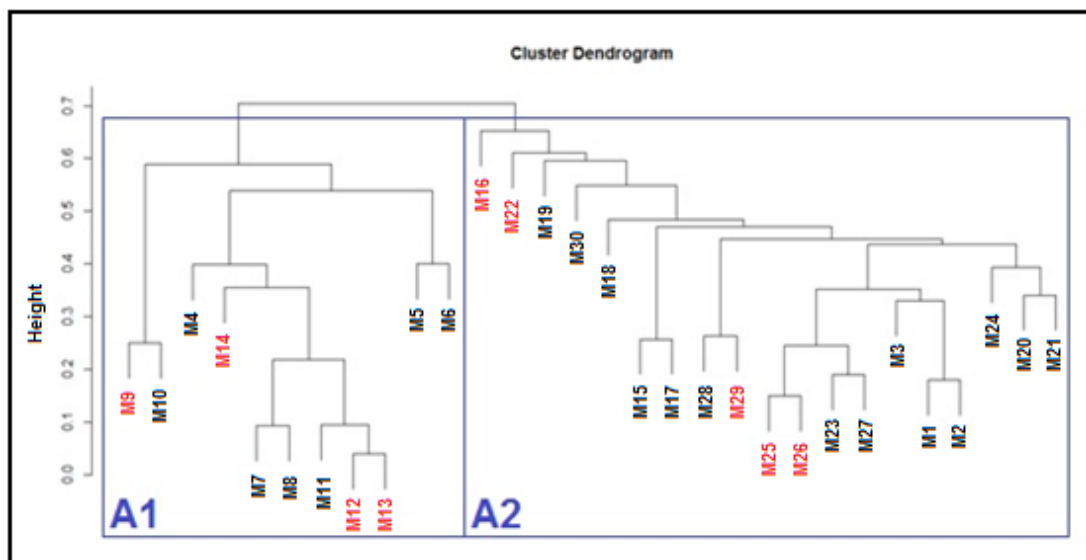


Figura 12. Dendrograma de 30 indivíduos de *Cenostigma tocantinum* Ducke amostrados da população Manaus, pelo Método de Agrupamento Hierárquico da Ligação Média entre Grupos e Índice de Similaridade de Jaccard. Coeficiente de correlação cofenética: $r = 0.9230$

Para a população B, houve a formação de três grupos (B1, B2 e B3), dois com apenas um acesso cada e um com 28 acessos (Figura 13). O coeficiente de dissimilaridade apontou a maior divergência genética entre os acessos P3 e P25 com 0,810, e a menor divergência foi entre P16 e P17 com 0,054.

Dentro do grupo B3 observou-se três subgrupos: B3a com 6 acessos; B3b com 12 acessos; e B3c com 10 acessos. A maior divergência foi encontrada entre os acessos P12 e P16 com 0,635 no subgrupo B3a, acessos P18 e P28 com 0,608 no subgrupo B3b, e acessos P4 e P10 com 0,629 no subgrupo B3c. A menor divergência dentro dos subgrupos B3a, B3b e B3c foi entre os acessos P16 e P17 (0,054), acessos P22 e P23 (0,190) e acessos P2 e P3 (0,163), respectivamente.

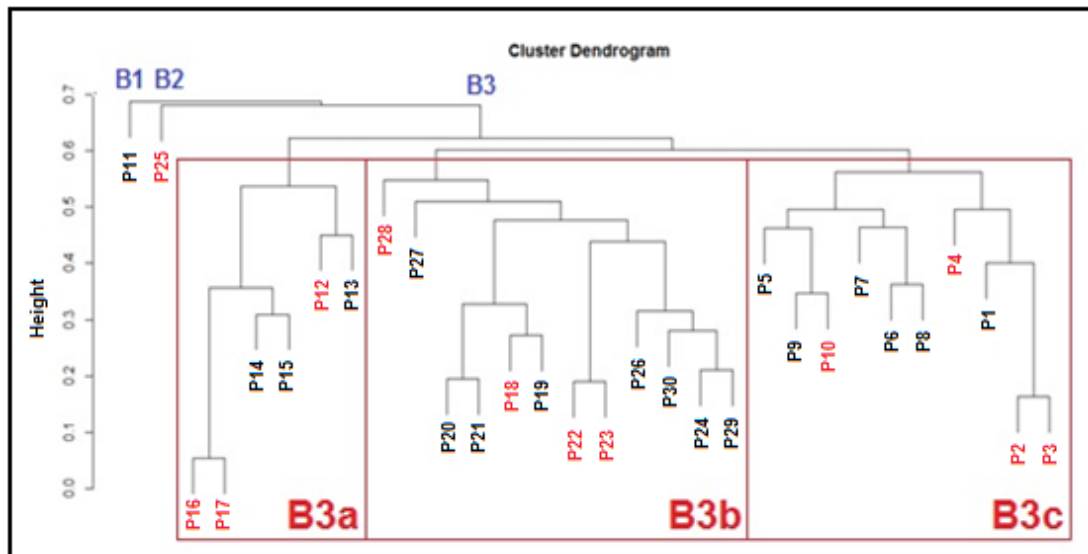


Figura 13. Dendrograma de 30 indivíduos de *Cenostigma tocantinum* Ducke amostrados da população Parintins, pelo Método de Agrupamento Hierárquico da Ligação Média entre Grupos e Índice de Similaridade de Jaccard. Coeficiente de correlação cofenética: $r = 0.8270$

No dendrograma, para a população C, houve a formação de dois grupos (C1 e C2), sendo um composto por 21 acessos e o outro por 9 acessos (Figura 14). O coeficiente de dissimilaridade apontou a maior divergência genética entre os acessos PF15 e PF29 com 0,853 e a menor divergência entre PF6 e PF7 com 0,041.

Dentro do grupo C1 a maior e menor divergência foi observada entre os acessos PF11 e PF21 (0,488) e os acessos PF6 e PF7 (0,041), respectivamente. No grupo C2, a maior divergência foi observada entre os acessos PF27 e PF29 (0,586) e a menor divergência foi entre os acessos PF26 e PF28 (0,295).

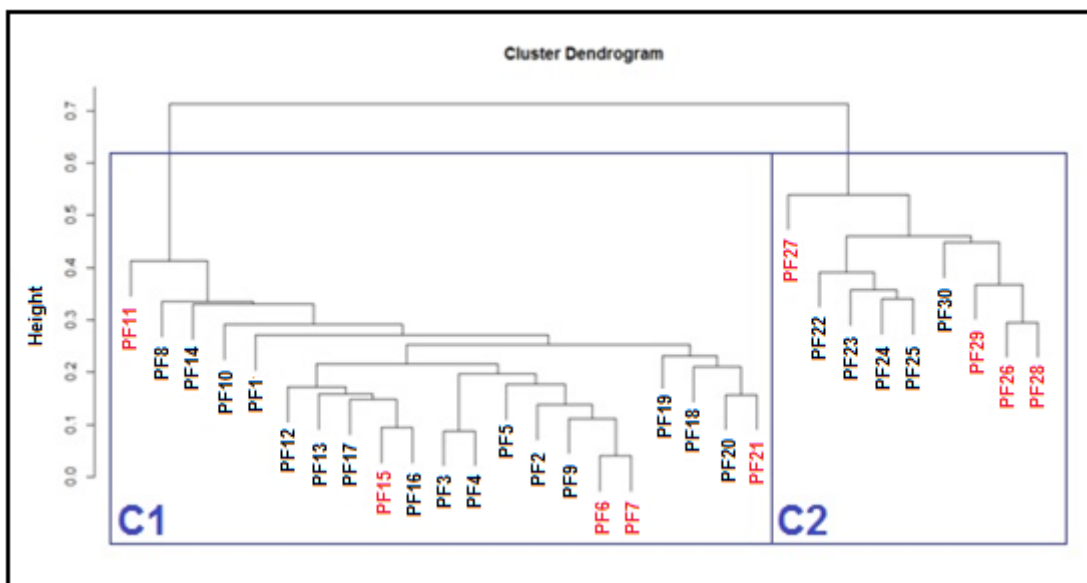


Figura 14. Dendrograma de 30 indivíduos de *Cenostigma tocantinum* Ducke amostrados da população Presidente Figueiredo, pelo Método de Agrupamento Hierárquico da Ligação Média entre Grupos e Índice de Similaridade de Jaccard. Coeficiente de correlação cofenética: $r = 0.9774$

Com base na similaridade genética de Nei calculada entre as populações de *C. tocantinum*, verificou-se no dendrograma a formação de dois grupos, o primeiro formado pela população C e o segundo pelas populações A e B (Figura 15). O coeficiente de correlação cofenética (r) apresentou um valor de 0.5548.

Por meio do complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, os acessos M12 e M13 com distância genética de 0,39 e os acessos PF15 e PF29 com 0,853, mostraram-se os mais similares e dissimilares, respectivamente, representando, este último par, potenciais genitores para cruzamentos em programas de melhoramento.

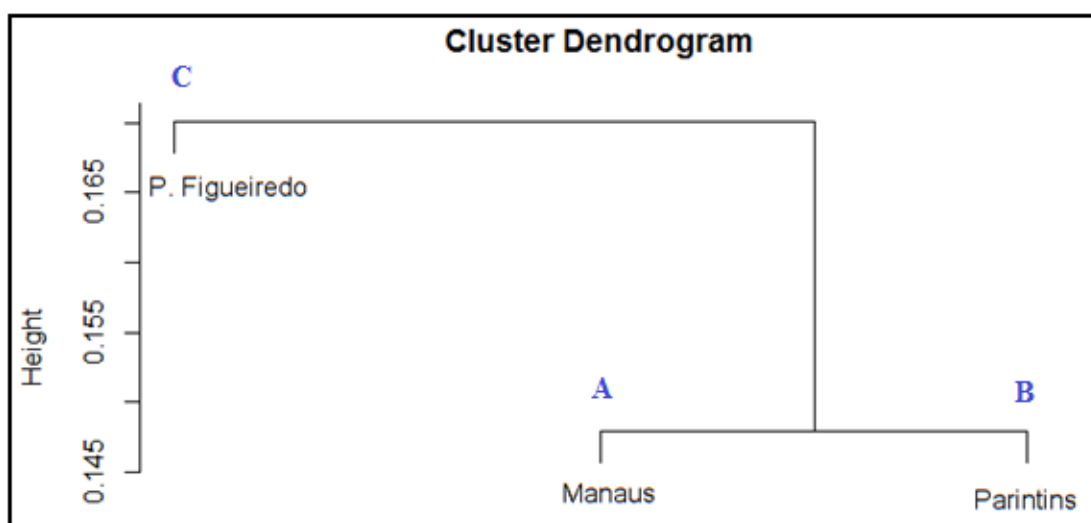


Figura 15. Dendrograma entre três populações de *Cenostigma tocantinum* Ducke, pelo Método de Agrupamento Hierárquico da Ligação Média entre Grupos e distância genética de Nei (1978). Coeficiente de correlação cofenética: $r = 0.5548$

Foi analisada a subestruturação das populações sob análise. Para determinar os padrões genéticos de diferenciação e subestruturação populacional foi utilizado o programa Structure, o qual permite a inclusão de informação prévia, como as distâncias de marcador, o que tende a tornar as análises mais precisas (Figuras 16 e 17). Os gráficos de $L(K)$ e ΔK (Figura 16) demonstraram que os indivíduos das populações de Manaus, Parintins e Presidente Figueiredo possuem subestruturação populacional e compartilham de três *clusters*. A distribuição da subestrutura nas três populações estudadas é bastante heterogênea e os três *clusters* estão presentes em todas as populações (Figura 17). A subestrutura das populações é predominada por um único *cluster*, diferente para cada população (Manaus = azul; Parintins = creme; Presidente Figueiredo = rosa), e outra parte é compartilhada pelos três *clusters*.

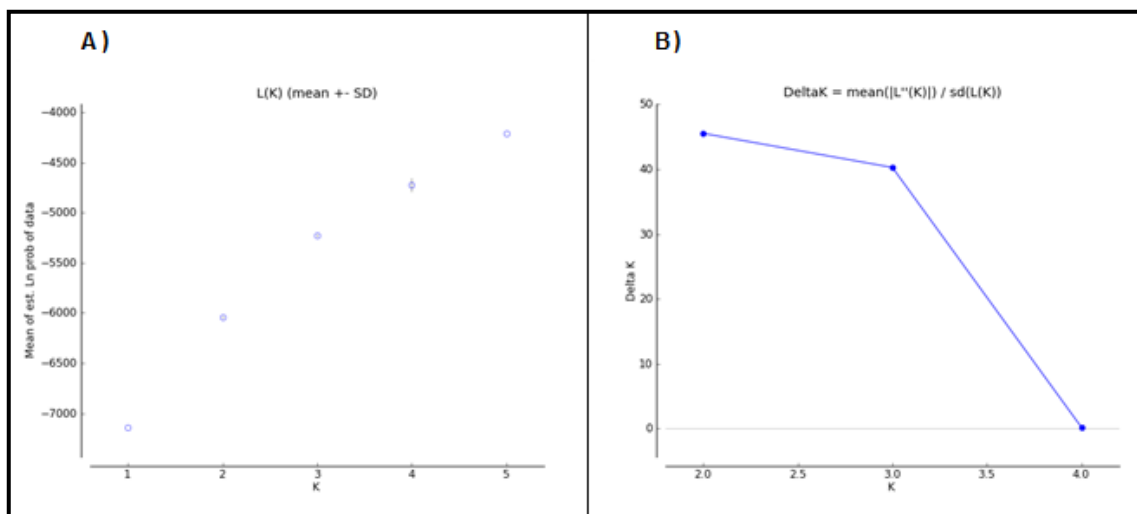


Figura 16. A) Média dos logaritmos da função de verossimilhança para valores de K testados; B) Valores de K mais prováveis obtidos pelo método de Evano et. al (2005), dado pela amplitude de ΔK como função de K (média \pm DP superior a partir de três repetições)

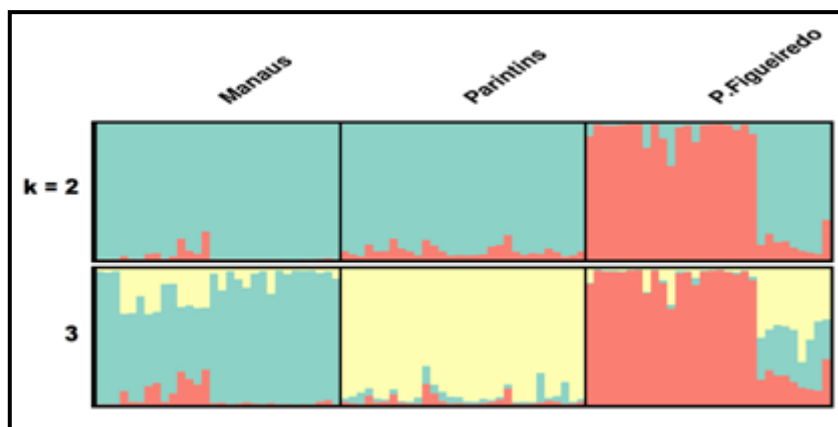


Figura 17. Estrutura populacional empregando o software Structure a partir de 90 indivíduos de *Cenostigma tocantinum* amostrados das populações de Manaus, Parintins e Presidente Figueiredo, considerando diferentes valores de agrupamentos (K) e o modelo de análises de mistura com frequências correlacionadas

A quantidade de variação genética obtida pela Análise de Variância Molecular – AMOVA (Tabela 4) mostrou que 63,38 % da variabilidade genética se encontram dentro das populações e 36,62% entre as populações analisadas. O valor do F_{st} encontrado para as três populações, 0,3662, demonstrou diferenciação genética entre elas, porém, ainda não há fixação de alelos diferentes, o que ocorreria se o teste apresentasse um valor igual ou maior que um (1).

Os resultados encontrados estão de acordo aos apresentados na literatura para populações naturais de espécies arbóreas tropicais que mostram que, em geral, a maior parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações (PAIVA, 1998; GOMES et al., 2011), no entanto deve-se considerar que as populações estudadas não são naturais, são populações plantadas para a arborização urbana.

Foram obtidas informações com os moradores, sobre a origem das mudas das plantas das calçadas e praças nos locais arborizados amostrados e foi constatado que são provenientes de sementes de locais próximos à cidade, principalmente de populações naturais de árvores da floresta próximas à cada cidade e de outros projetos de arborização da própria cidade. A introdução de plantas da proximidade em cada local via plantios de mudas para a arborização é o fator principal responsável pela estruturação das populações estudadas, pois as plantas são representativas de cada área de estudo e representa uma amostragem da diversidade genética de plantas de população de cada região estudada.

Tabela 4. Variação genética obtida pela Análise de Variância Molecular – AMOVA entre e dentro de populações de *Cenostigma tocaninum* Ducke

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Somas dos Quadrados	Quadrados Médios	Componentes de Variância	% da Variação	Fonte de Variação
Entre Populações	2	717,3778	358,6889	11,3042	36,62	<0,0001
Dentro de Populações	87	1702,1000	19,5644	19,5644	63,38	<0,0001
Total	89	2419,4778	27,1851	30,8685	100,00	

$F_{st} = 0,3662$

O fluxo alélico total entre as populações foi baixo ($Nm=1,7768$), mas não inexistente. Os valores de fluxos gênicos entre as populações variaram de 0,8332 a 0,8675, sendo considerados baixos e com valores aproximados entre as populações das três cidades (Tabela 5). Pode-se considerar que fluxos de mudas, sementes e pólen não predominam entre as cidades estudadas.

A distância genética média entre as populações de *C. tocaninum* foi de 0,1566. A menor distância genética foi entre as populações de Parintins e Presidente Figueiredo (0,1451) e a maior distância genética foi entre as populações de Manaus e Presidente Figueiredo (0,1825).

A significativa estatística de Mantel, $r: 0,5034$ ($P=0,001$) mostra que a distância geográfica está correlacionada com a heterogeneidade genética das populações. O baixo valor de fluxo gênico também pode estar relacionado com a distância geográfica entre as populações.

Tabela 5. Estimativas de fluxo alélico (acima da diagonal) e distância genética de Nei (1978) (abaixo da diagonal), entre as populações de *Cenostigma tocaninum* Ducke

Populações	Manaus	Parintins	P. Figueiredo
Manaus	****	0,8675	0,8332
Parintins	0,1422	****	0,8649
Presidente Figueiredo	0,1825	0,1451	****

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que embora grande parte da variação genética da espécie esteja a nível intrapopulacional, há uma sensível diferenciação genética entre populações de *C. tocaninum*. Planos de manejo e conservação da espécie devem observar a variabilidade genética encontrada nessas populações, visando garantir a preservação de seus recursos genéticos. Para que se

garanta que a grande parte da variabilidade seja preservada, uma amostragem representativa das populações de cada uma dessas regiões deve ser conservada.

Para a conservação deve-se levar em consideração o padrão de variabilidade genética encontrado em *C. tocaninum*, sendo necessária uma amostragem representativa do conjunto de genes contidos nos indivíduos de cada população, com a amostragem de indivíduos em todas as populações, uma vez que a maior diversidade está dentro das populações. Para realizar a conservação genética, essa amostragem pode levar a um elevado número de indivíduos a compor uma coleção *ex situ*. As coleções estabelecidas em campo demandam recursos permanentes para a manutenção. Gomes et al. (2011) relataram que a experiência com a conservação em campo de espécies perenes nativas da região Amazônica tem mostrado que se deve fomentar a conservação participativa *in situ* nas áreas de ocorrência.

Para a coleta de sementes visando à constituição de lotes para outros projetos de arborização de cada local, deve-se também buscar amostrar diferentes plantas matrizes da população natural da proximidade da cidade e evitar a coleta de sementes, principalmente, de poucas árvores vizinhas já existentes nos projetos de arborização, visando evitar efeito da endogamia. Não se tem estudos conclusivos do sistema reprodutivo da espécie, no entanto a distribuição de sua variabilidade genética é semelhante às espécies florestais alógamas tropicais. Existindo suspeita de alogamia, a amostragem de sementes de plantas vizinhas, poderia conduzir à obtenção de plantas de indivíduos aparentados, pois existe maior probabilidade das sementes serem resultantes de acasalamentos endogâmicos e resultar em menor potencial genético de descendentes nos projetos de arborização. Ressalta-se ainda que se a coleta de sementes de cada local for feita de uma amostragem adequada na população natural da região próxima à cidade, a introdução das plantas nos novos projetos de arborização irá colaborar com a conservação *in situ* de cada população, colaborando assim com a conservação da espécie.

6 CONCLUSÕES

O DNA extraído de folhas de *C. tocanthinum* por meio do protocolo CTAB de Ferreira e Grattapaglia (1998), com modificações, gerou amostras em quantidade e qualidade satisfatórias para análises com marcadores AFLP.

As folhas podem ser armazenadas em sacos plásticos contendo sílica gel a -20 °C por pelo menos 20 dias por apresentar qualidade de extração de DNA semelhante à extração em folhas frescas.

Os marcadores moleculares do tipo AFLP revelaram alto conteúdo de informação genética em *C. tocanthinum* e podem ser utilizados para análises genéticas, visando obter informações para a sustentabilidade genética e o manejo florestal da espécie.

A distribuição da diversidade genética nas populações estudadas de *C. tocanthinum* usadas na arborização urbana é maior dentro das populações do que entre, sendo necessário obter amostras representativas de todas as populações para a conservação genética da espécie.

A introdução de plantas oriundas de amostragem representativa da população natural da região em novos projetos de arborização pode auxiliar na conservação genética *in situ* da espécie.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. UFV, 2006. 627 p.
- ALVES, C.Q. **Estudo químico e avaliação biológica de duas espécies de leguminosae: *Dioclea virgata* e *Cenostigma macrophyllum***. Salvador: UFB, 2012. 227 p.
- BASSI, D.; SOARES, A.A.F.; OLIVEIRA-COLLET, S.A.; OLIVEIRA JR, R.S.; FREGONEZI, A.M.D.T.; MANGOLIN, C.A. Seleção de *primers* de RAPD para estudo da diversidade genética de *Conyza sp.* **XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas**. Ribeirão Preto - SP; 2010.
- BATISTA, C.M.; FREITAS, M.L.M.; MORAES, M.A.d.; ZANATTO, A.C.S.; SANTOS, P.C.d.; ZANATA, M.; MORAES, M.L.T.d.; SEBBENN, A.M. Estimativas de parâmetros genéticos e a variabilidade em procedências e progênes de *Handroanthus vellosi*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.32, n.71, p.269-276, 2012.
- BENALI, S.; MOHAMED, B.; EDDINE, H.J.; NEEMA, C. Advances of Molecular Markers Application in Plant Pathology Research. **European Journal of Scientific Research**, v.50, n.1, p.110-123, 2011.
- BERED, F. Extração de DNA, considerações e prática. **Marcadores moleculares em plantas**. Rio Grande do Sul: Porto Alegre; 1998. p. 141.
- BEZERRA, A.V.; SALOMÃO, R.P. Base de dados de espécies arbóreas ornamentais para o paisagismo urbano. Belém-PA: In: **Seminário de iniciação científica PIBIC do museu paraense Emílio Goeldi**. 23., 2013, Belém. Anais... Belém. 2013; 2005. p. 45.
- BIOSYSTEMS, A. AFLP Plant Mapping. **Protocol**. USA: Copyright; 2010. p. 56.
- BONIN, A.; EHRICH, D.; MANEL, S. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. **Molecular ecology**, v.16, n.18, 3737-3758, 2007.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: Borem, A, Caixeta, ET (Ed) **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Editora UFV, p. 11-94, 2009.
- CHASE, M.W.; HILLS, H.H. Silica gel: an ideal material for filed preservation of leaf samples for DNA studies. **Taxon**, v.40, p.215-220, 1991.
- CLEMENTE, M.S. Análise da variação genética de populações de *Vochysia pyramidalis* e *V. tucanorum* por AFLP e da composição de ácidos graxos de sementes [**Dissertação**]. Universidade de São Paulo, 2010. 105 p.
- COSTA, M.R.; MOURA, E.F. **Manual de extração de DNA**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 24p.

COUCH, J.A.; FRITZ, P.J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.8, n.1, p.8-12, 1990.

COUTINHO, H.D.M.; MILITÃO NETO, V.; VERDE, L.C.L. Técnicas com marcadores moleculares usadas nas ciências da saúde; Molecular marker techniques used in health sciences. **Revista Brasileira Ciências da Saúde**, v.10, n.2, p.177-188, 2006.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. **Suprema**. Visconde do Rio Branco, 2011. p. 620.

CRUZ, C.D. A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v.35, n.3, p.271-276, 2013.

EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v.4, n.2, p.359-361, 2011.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p.2611-2620, 2005.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v.164, p.1567-1587, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 222p.

FREIRE, F.M.T. *Cenostigma tocaninum* Ducke (Leg. Caes.): uma redescoberta da espécie. **Bradea**, v.6, n.36, p.297-303, 1994.

GANGA, R.M.V.; CARLOS RUGGIERO, C.; LEMOS, W.G.M.; GRILI, G.V.G.; GONÇALVES, M.M.; CHAGAS, E.A.; WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares AFLP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, n.3, p.494-498, 2004.

GARCIA, L.C.; MORAES, R.P.d.; LIMA, R.M.B.d. Determinação do grau crítico de umidade em sementes de *Cenostigma tocaninum* Ducke. **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.3, p.172-176, 2008.

GARCIA, L.C.; MORAES, R.P.; SOUSA, S.G.A. **Tolerância à secagem de sementes de pau-pretinho**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2009. 3p.

GONÇALVES, D. Caracterização molecular de isolados de *Staphylococcus aureus* e produção de marcadores genéticos para diagnóstico de mastite em bovinos leiteiros [Tese]. Universidade Federal do Paraná, 2006, 118p.

GOMES, L. R. P.; LOPES, M.T.G.; BENTES, J. L. da S.; BARROS, W. S.; COSTA NETO, P. de Q.; CONTIM, L. A. S. Genetic diversity in natural populations of Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.11, n3, p.216-22, 2011.

HUBISZ, M.J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Conservation Genetics Resources**, v.9, p.1322-1332, 2009.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vouloise des Sciences Naturelles**, n.37, p.547-579, 1901.

JOHNS, M.A.; SKROCH, P.W.; NIENHUIS, J.; HINRICHSEN, P.; BASCUR, G.; MUÑOZ-SCHICK, C. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. **Crop Science**, v.37, n.2, p.605-613, 1997.

KARP, A.; SEBERG, O.; BUIATTI, M. Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity. **Annals of Botany**, v. 78, n.2, p.143-149, 1996.

KIDWELL, K.K.; OSBORN, T.C. Simple plant DNA isolation procedures. Plant genomes: methods for genetic and physical mapping. **Springer**, p. 1-13, 1992.

KONSTANTINOV, K.; DRINIC, S.M.; SIJACIC, M.; ISAJEV, V.; MATARUGA, M. Molecular markers application for genetic resources characterization of different plant species. In: The role of biotechnology, Turin, Italy, **Annals**, p.179-180, 2005.

LINS, P.M.P.; NETO, J.T.F.; MULLER, A.A. Avaliação de híbridos de coqueiro (*Cocos nucifera* L.) para produção de frutos e de albúmen sólido fresco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 468-470, 2003.

LIU, B.H. **Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis**. New York: CRC Press; 1998.

LODHI, M.A.; YE, G.-N.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.12, n.1, p.6-13, 1994.

LOPES, R.; LOPES, M. G.; OLIVEIRA, FIGUEIRA, A. V. O; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP): aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 64-68, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, p.209-220, 1967.

MERCADO, J.A.; EL MANSOURI, I.; JIMÉNEZ-BERMÚDEZ, S.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M.A. A convenient protocol for extraction and

purification of DNA from *Fragaria*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v.35, n.2 p.152-153, 1999.

MESQUITA, R.A.; ANZAI, E.K.; OLIVEIRA, R.N.; NUNES, F.D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR Evaluation of three methods of DNA extraction from paraffin-embedded material for the amplification of genomic. **Pesquisa Odontologia Brasileira**, v.15, n.4, p.314-319, 2001.

MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas**: SCK Milach, 1998. 140 p.

MOLINARI, H.B.; CROCHEMORE, M.L. Extração de DNA genômico de *Passiflora* spp. para análises PCR-RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, n.2, p.447-450, 2001.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p.4321-4325, 1980.

NEI, M.; LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences from the USA**, v.76, n10, p.5269-5273, 1978.

NEI, M. Genetic distance between populations, **American Naturalist**, Chicago, v.106, p.283-292, 1972.

OLIVEIRA, A.C.B.; SAKIYAMA, N.S.; CAIXETA, E.; ZAMBOLIM, E.M.; RUFINO, R.J.N.; ZAMBOLIM, L. Partial map of *Coffea arabica* L. and recovery of the recurrent parent in backcross progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.7, n.2, p.196-203, 2007.

OLIVEIRA, A.F. Diagnóstico parcial da arborização viária sob rede elétrica no Estado de Minas Gerais [Tese]. Lavras: UFLA; 2013. 258 p.

OLIVEIRA, E.J.; COSTA, J.L.; SANTOS, L.F.; DANTAS, J.L.L. **Otimização da técnica de AFLP para análises moleculares no mamoeiro**. Cruz da Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 21, 2011.

PAIVA, J. R. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia: estratégias e novas abordagens**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 1998. 135p.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p. 945–959, 2000.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing 2013.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**: UFLA, 2004. 472 p.

- RODRIGUES, M.G.F. Caracterização genética de seleções irradiadas de figueira por marcadores moleculares (RAPD e AFLP) [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; 2001. 48 p.
- ROHLF, F.J. Adaptative hierarchical clustering schems. **Systematic Zoology**, v.18, p. 58-82, 1970.
- ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia**, v.9, p.40-43, 1999.
- ROSENBERG, N.A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.137-138, 2004.
- SALLA, M.F.S.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p.15-22, 2002.
- SANTOS, T.F.; NEGRÃO, E.N.M.; PANTOJA, M.V.; MAUES, M.M. Biologia floral e polinização de *Cenostigma tocaninum* Ducke. Embrapa Amazônia Oriental-Resumo em anais de congresso (ALICE): In: **CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 64.; ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS MG, BA E ES, 23.**, 2013, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: SBB, 2013.; 2013.
- SILVA, R.L. Fenologia em ambiente urbano, morfologia da semente e da plântula e germinação sob condições adversas de *Cenostigma tocaninum* Ducke [dissertação]. Universidade Federal do Amazonas, 2007. 64 p.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numeric taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, n.2, p.33-40, 1962.
- SPOONER, D.M.; van TREUREN, R.; VICENTE, C. **Molecular Markers for Genebank Management**. Rome: IPGRI, 2005. 126 p.
- SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-Jr, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.d.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.d.M.; BRANDÃO, M.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.
- SOUZA, A.D. **Biologia molecular aplicada ao melhoramento. Recursos genéticos e melhoramento-plantas**. Rondonópolis: Fundação MT. p.939-966, 2001:.
- SOUZA, H.A.V. Análise comparativa da diversidade genética de duas espécies de faveiro, *Dimorphandra wilsonii*, ameaçada de extinção, in *D. mollis*: implicações para conservação e manejo [Dissertação]. Universidade Federal de Minas Gerais; 2008. 36 p.
- STEFENON, V.M. Adaptação e otimização de protocolos para a extração de DNA e para marcadores moleculares em *Araucaria angustifolia* [Dissertação]. Universidade Federal de Santa Catarina. 2003. 68p.

SYSTMA, K.J.; GIVNISH, T.J.; SMITH, J.F.; HAHN, W.J. [2] Collection and storage of land plant samples for macromolecular comparisons. **Methods in enzymology**, v.224, p.23-37, 1993.

TENEVA, A. Molecular markers in animal genome analysis. **Biotechnology in Animal**, v.25, n.5-6-2, p.1267-1284, 2009.

VASCONCELOS, M. Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo uso de marcadores moleculares RAPD [Dissertação]. Universidade Federal de Viçosa. 1997. 54p.

VIDAL, M.S.; MILANI, M.; MENESES, C.H.S.G.; de SOUZA BEZERRA, C. **Comparação entre Protocolos para Extração de DNA Total de *Ricinus communis* L.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 5 p.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; van de LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4.407-4.414, 1995.

VUYLSTEKE, M.; PELEMAN, J.D.; van EIJK, M.J.T. AFLP technology for DNA fingerprinting. **Nature Protocols**, v.2, n.6, p.1387-1398, 2007.

WARWICK, M.C.; LEWIS, G.P. A revision of *Cenostigma* (Leguminosae – Caesalpinioideae – Caesalpinieae), a genus endemic to Brazil. **Kew Bull**, v.64, n.1, p.135-146, 2009.

YANG, W.; KANG, X.; YANG, Q.; LIN, Y.; FANG, M. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. **Journal of animal science and biotechnology**, v.4, n.1, p.2, 2013.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **POPGENE version 131:Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. Edmonton: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999. 29 p.

ANEXO

Anexo 1. Coordenadas geográficas das plantas utilizadas para o estudo de diversidade genética

Amostras	Coordenadas Geográficas					
	Manaus		Parintins		Presidente Figueiredo	
	Longitude	Latitude	Longitude	Latitude	Longitude	Latitude
01	-060° 2' 54.85" O	-03° 5' 1.98" S	-056° 44' 52.39" O	-02° 38' 41.33" S	-060° 0' 27.02" O	-02° 2' 53.80" S
02	-059° 58' 37.52" O	-03° 6' 1.51" S	-056° 44' 52.20" O	-02° 38' 41.20" S	-060° 1' 25.63" O	-02° 3' 12.52" S
03	-059° 58' 33.01" O	-03° 5' 57.82" S	-056° 43' 48.94" O	-02° 37' 31.08" S	-060° 1' 22.59" O	-02° 3' 11.09" S
04	-060° 2' 28.26" O	-03° 5' 19.67" S	-056° 44' 48.80" O	-02° 38' 38.84" S	-060° 1' 22.28" O	-02° 3' 10.79" S
05	-060° 2' 22.52" O	-03° 5' 26.52" S	-056° 44' 48.34" O	-02° 38' 38.52" S	-060° 1' 33.69" O	-02° 2' 32.93" S
06	-060° 2' 16.29" O	-03° 5' 28.34" S	-056° 44' 47.55" O	-02° 38' 38.04" S	-060° 1' 33.68" O	-02° 2' 33.53" S
07	-060° 2' 12.25" O	-03° 5' 32.57" S	-056° 45' 10.67" O	-02° 38' 19.54" S	-060° 1' 34.23" O	-02° 2' 33.45" S
08	-060° 1' 43.93" O	-03° 5' 34.87" S	-056° 44' 8.53" O	-02° 38' 3.28" S	-060° 1' 43.51" O	-02° 2' 36.65" S
09	-059° 58' 34.89" O	-03° 5' 58.41" S	-056° 44' 4.28" O	-02° 38' 1.27" S	-060° 1' 33.20" O	-02° 2' 38.12" S
10	-060° 0' 52.41" O	-03° 5' 32.60" S	-056° 44' 5.03" O	-02° 37' 59.22" S	-060° 1' 33.08" O	-02° 2' 39.45" S
11	-060° 1' 14.89" O	-03° 7' 39.40" S	-056° 43' 57.10" O	-02° 37' 38.06" S	-060° 1' 33.16" O	-02° 2' 41.53" S
12	-059° 58' 35.56" O	-03° 6' 0.10" S	-056° 43' 50.99" O	-02° 37' 37.68" S	-060° 1' 33.24" O	-02° 2' 42.90" S
13	-060° 1' 16.86" O	-03° 7' 4.58" S	-056° 43' 47.44" O	-02° 37' 37.63" S	-060° 1' 33.17" O	-02° 2' 43.60" S
14	-059° 58' 32.27" O	-03° 5' 58.88" S	-056° 43' 50.88" O	-02° 37' 31.17" S	-060° 1' 33.26" O	-02° 2' 44.48" S
15	-060° 0' 53.31" O	-03° 6' 44.32" S	-056° 43' 50.08" O	-02° 37' 30.89" S	-060° 1' 33.45" O	-02° 2' 45.50" S
16	-060° 0' 48.60" O	-03° 6' 44.01" S	-056° 43' 59.38" O	-02° 37' 26.55" S	-060° 1' 33.41" O	-02° 2' 45.66" S
17	-059° 58' 37.38" O	-03° 6' 1.31" S	-056° 44' 37.63" O	-02° 37' 44.39" S	-060° 1' 43.64" O	-02° 3' 18.64" S
18	-060° 0' 25.71" O	-03° 6' 22.49" S	-056° 44' 37.78" O	-02° 37' 44.23" S	-060° 1' 44.29" O	-02° 3' 18.83" S
19	-059° 59' 24.90" O	-03° 5' 41.23" S	-056° 46' 25.27" O	-02° 40' 38.85" S	-060° 1' 44.70" O	-02° 3' 18.98" S
20	-059° 59' 23.88" O	-03° 5' 40.84" S	-056° 46' 22.47" O	-02° 40' 40.70" S	-060° 1' 46.45" O	-02° 3' 19.55" S
21	-060° 3' 32.60" O	-03° 5' 22.50" S	-056° 46' 22.64" O	-02° 40' 40.43" S	-060° 1' 49.42" O	-02° 3' 21.03" S
22	-060° 3' 36.51" O	-03° 5' 21.65" S	-056° 45' 41.07" O	-02° 38' 34.46" S	-060° 1' 48.77" O	-02° 3' 22.85" S
23	-060° 6' 7.17" O	-03° 3' 47.56" S	-056° 45' 34.26" O	-02° 38' 27.99" S	-060° 1' 47.69" O	-02° 3' 25.85" S
24	-060° 6' 12.04" O	-03° 3' 44.90" S	-056° 45' 27.07" O	-02° 38' 23.49" S	-060° 1' 47.31" O	-02° 3' 25.74" S
25	-060° 5' 58.96" O	-03° 3' 53.54" S	-056° 44' 54.45" O	-02° 38' 42.76" S	-060° 1' 46.67" O	-02° 3' 25.59" S
26	-060° 5' 55.05" O	-03° 3' 57.31" S	-056° 44' 33.82" O	-02° 38' 28.75" S	-060° 1' 41.35" O	-02° 3' 24.03" S
27	-060° 5' 47.50" O	-03° 4' 1.91" S	-056° 43' 49.46" O	-02° 38' 0.72" S	-060° 1' 40.09" O	-02° 3' 23.68" S
28	-060° 5' 46.34" O	-03° 4' 3.87" S	-056° 43' 51.05" O	-02° 37' 58.78" S	-060° 1' 22.54" O	-02° 3' 21.41" S
29	-060° 5' 34.72" O	-03° 4' 12.01" S	-056° 43' 50.64" O	-02° 37' 31.19" S	-060° 0' 48.25" O	-02° 3' 1.21" S
30	-059° 58' 31.26" O	-03° 6' 0.71" S	-056° 43' 50.42" O	-02° 37' 31.02" S	-060° 0' 38.07" O	-02° 2' 59.26" S