

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

Christian Gabriel Tarnowski

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO
DE MARCADORES MICROSSATÉLITES (SSRs)
PARA *CEDRELA LILLOI* C. DE CANDOLLE.**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais da
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências, Área de
concentração Recursos Genéticos
Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre
Nodari

Florianópolis

2010

A Deus,

A minha esposa Cecília,

E a minha filha Sofia.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de realizar este curso de Mestrado.

Ao Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA) pela possibilidade brindada para realizar esta capacitação profissional e pelo apóio financeiro.

Ao Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ - USP) pelo trabalho laboratorial para o desenvolvimento dos marcadores microssatélites, em especial a Mariza Monteiro e José Baldin Pinheiro.

Ao professor Dr. Rubens Onofre Nodari pela orientação, acolhimento e fornecimento dos recursos materiais para desenvolver esta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora pelas importantes contribuições e sugestões oferecidas para o melhor entendimento deste trabalho.

Aos colegas do INTA, Elvio del Castillo, Luis Fornés, Noga Zelener e Virginia Inza pelas constantes contribuições e ajudas brindadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos todos os colegas do LFDGV, pelos momentos bons e difíceis compartilhados no dia-a-dia de nosso trabalho laboratorial, em especial agradeço a ajuda do Gustavo e a fiel companhia da Regina e do Ramón.

A minha família pelo apóio recebido constantemente e pela paciência e compreensão devido a tantos fins de semana de trabalho.

Resumo

Cedrela lilloi (Meliaceae) é uma das quatro espécies de cedro nativas da Argentina e encontra-se estritamente distribuída na Selva de Yungas na região noroeste do país. Como tantas outras espécies florestais de importância econômica, as populações de *C. lilloi* encontram-se vulneráveis a exploração e fragmentação. No país são escassos os estudos referentes à diversidade e estrutura genética destas populações. Assim, os objetivos principais deste estudo foram a) desenvolver marcadores microssatélites específicos para a espécie e, b) estimar a variabilidade genética de três populações naturais. O DNA genômico de *C. lilloi* foi digerido com enzima, purificado, enriquecido através de sondas de oligos CT(8), GT(8) e TTC(8), clonado em bactérias e finalmente isolado e sequenciado. Dos 258 clones sequenciados, a porcentagem total de sequências microssatélites observadas foi muito baixa (14%). Foram desenhados iniciadores para essas 37 regiões microssatélites encontradas e somente quatro locos amplificaram produtos polimórficos. Devido a que os poucos locos desenvolvidos não foram suficientes para analisar as populações, foi considerado a alternativa da transferibilidade. Foram transferidos cinco iniciadores provenientes de outras espécies da família Meliaceae. No total, foram utilizados oito locos, três próprios de *C. lilloi* e cinco transferidos (média de 5,25 alelos), para analisar três populações com um total de 140 indivíduos. Nenhum loco apresentou desequilíbrio de ligação e não foi observada a presença de alelos nulos. A heterozigosidade observada (H_o) total foi de 0,406 e a esperada (H_e) de 0,416. O índice de fixação dentro das populações ($F_{IS}=0,035$) não foi estatisticamente diferente de zero, indicando que a probabilidade de acasalamento entre indivíduos aparentados não é diferente do esperado no equilíbrio de Hardy-Weinberg. A endogamia a nível grupal ($F_{IT}=0,140$) e a diferenciação genética entre as populações foram iguais e moderadas ($F_{ST}=0,108$), indicando que as populações estão estruturadas por causa da perda de alelos provavelmente devido à deriva genética. As duas populações da região norte das Yungas (Baritú e San Andrés) foram geneticamente mais similares entre si e apresentaram maior diversidade gênica em comparação a população amostrada na região sul (El Siambón).

Palavras-chave: *Cedrela lilloi*, desenvolvimento de microssatélites, diversidade genética, estrutura genética populacional.

Abstract

In the Argentina, *Cedrela lilloi* (Meliaceae) is one of the four species of native cedar and is distributed strictly in the Yungas Forest located in the northwest of the country. Like many other forest species of economic importance, the populations of *C. lilloi* are vulnerable to exploitation and fragmentation. In the country there are few studies on the genetic diversity and structure of these populations. Thus, the main objectives of this study were a) to develop microsatellite markers specific for the species, and b) to estimate the genetic variability of three natural populations. The genomic DNA of *C. lilloi* was digested with enzyme, purified, enriched by oligo probes CT(8), GT(8) and TTC(8), and finally cloned in bacteria, isolated and sequenced. Of the 258 clones sequenced, a very low percentage of microsatellite sequences were observed (14%). Thirty-seven primers for microsatellite regions were designed and only four loci which amplified polymorphic products were found. Due to the few developed loci were not enough to analyze the populations, the alternative of transferability was considered. Five primers from other species of Meliaceae family were transferred. In total, eight loci were used, three specific and five transferred (average of 5.25 alleles), to analyze three populations with a total of 140 individuals. Locus showed no linkage disequilibrium and the presence of null alleles was not observed. The observed heterozygosity (H_o) was 0.406 and the expected heterozygosity (H_e) was 0.416. The fixation index within populations ($F_{IS} = 0.035$) was not statistically different from zero, indicating that the probability of mating between related individuals is not different from the expected in the Hardy-Weinberg equilibrium. The measure of genetic fixation in the pooled population ($F_{IT} = 0.140$) and genetic differentiation among populations were similar and moderate ($F_{ST} = 0.108$), indicating that populations are structured probably because of genetic drift. The two populations of the region north of the Yungas (Baritú and San Andres) were genetically more similar to each other and showed higher genetic diversity compared to the sampled population in the southern region (El Siambón).

Keywords: *Cedrela lilloi*, microsatellites development, gene diversity, population genetic structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa mostrando a localização das duas regiões fitogeográficas com florestas subtropicais na Argentina: as Selvas Paranaenses e as Selvas de Yungas, **1**

Figura 2. Distribuição natural das três espécies de *Cedrela* na Selva de Yungas, **4**

Figura 3. Padrão de digestão de DNA de *Cedrela lilloi* feito pela enzima *RsaI*, **21**

Figura 4. Resultado da purificação dos fragmentos ligados aos adaptadores, **22**

Figura 5. Presença de bandas específicas correspondentes ao DNA plasmidial de três amostras purificadas de *C. lilloi*, **23**

Figura 6. Gel de poli-acrilamida 4% corado com nitrato de prata. Foi testada a temperatura de anelamento ideal em 12 indivíduos de *C. lilloi* para os iniciadores Clilloi09b, Clilloi12 e Clilloi64. Somente o primer Clilloi09b apresentou polimorfismo entre as temperaturas 50,2°C (linha n° 5) e 53,4°C (linha n° 8), **25**

Figura 7. Distribuição de frequências alélicas dos oito locos microssatélites estimados em 140 indivíduos de *Cedrela lilloi*, **32**

Figura 8. Mapa da Selva de Yungas mostrando os pontos de coleta de cada população, **36**

Figura 9. Distribuição do número médio de alelos e heterozigidade observada nas três populações, **45**

Figura 10. Dendrograma construído a partir das distâncias genéticas de Nei (1978), **50**

Figura 11. Teste de Mantel para avaliar a existência e a probabilidade de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, **51**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Motivos repetitivos dos 26 locos microssatélites desenhados para *C. lilloi* a partir de 96 clones sequenciados pela ESALQ e seus correspondentes produtos de amplificação, **23**

Tabela 2. Motivos repetitivos dos 11 locos microssatélites desenhados para *C. lilloi* a partir de 162 clones sequenciados no LFDGV e seus correspondentes produtos de amplificação, **26**

Tabela 3. Resultados da transferibilidade de marcadores microssatélites desenvolvidos em quatro espécies diferentes da família Meliaceae e que foram testados em *C. lilloi*, **28**

Tabela 4. Índices de diversidade genética para três locos microssatélites desenvolvidos e cinco transferidos para *Cedrela lilloi*, testados em indivíduos provenientes de uma população natural (Parque Nacional Baritú), **30**

Tabela 5. Locos microssatélites utilizados para analisar as três populações de *C. lilloi*. Apresentam-se as respectivas temperaturas de anelamento (T_a) e amplitude alélica em pares de bases (pb), **37**

Tabela 6. Análise da diversidade genética para três populações de *Cedrela lilloi* obtidos a partir de oito locos microssatélites, **40**

Tabela 7. Frequências alélicas dos oito locos microssatélites nas três populações, **43**

Tabela 8. Estimativas dos valores de f , F e θ de Weir e Cockerham (1984) para as três populações considerando os oito locos microssatélites, **46**

Tabela 9. Distâncias genéticas não viesada de Nei entre indivíduos de *C. lilloi* para as populações de Baritú, El Siambón e San Andrés, **50**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA, 1

- 1.1. A espécie *Cedrela lilloi* C.DC., **4**
- 1.2. Revisão bibliográfica, **5**
 - 1.2.1. Marcadores moleculares, **6**
 - 1.2.2. Marcadores Microssatélites ou SSR (Polimorfismo de sequências simples repetitivas), **7**
- 1.3. Objetivo geral, **11**
 - 1.3.1. Objetivos específicos, **11**
 - 1.3.2. Hipótese de trabalho, **11**

2. DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES, 13

- 2.1. Material vegetal, **13**
- 2.2. Extração do DNA, **13**
- 2.3. Desenvolvimento de marcadores microssatélites, **14**
 - 2.3.1. Digestão do DNA para construção da biblioteca genômica, **14**
 - 2.3.2. Ligação dos adaptadores, **14**
 - 2.3.3. Pré-amplificação via PCR, **15**
 - 2.3.4. Purificação, **15**
 - 2.3.5. Seleção de fragmentos contendo microssatélites, **16**
 - 2.3.6. Amplificação dos fragmentos selecionados, **17**
 - 2.3.7. Clonagem em um vetor e transformação bacteriana, **17**
 - 2.3.8. Extração plasmidial, **18**
 - 2.3.9. Sequenciamento e purificação, **19**
 - 2.3.10. Desenho dos iniciadores, **20**
 - 2.3.11. Triagem dos iniciadores, **20**
- 2.4. Análise de dados, **21**
- 2.5. Resultados e discussão, **21**
 - 2.5.1. Digestão do DNA, **21**
 - 2.5.2. Sequenciamento e desenho dos iniciadores, **23**
 - 2.5.3. Caracterização e transferibilidade de iniciadores microssatélites, **27**
- 2.6. Conclusões, **33**

3. ESTIMATIVAS DE DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA, 35

- 3.1. Materiais e Métodos, **35**

3.1.1. Locais de coleta e preparo do material,	35
3.1.2. Amplificação do DNA e detecção dos produtos,	37
3.2. Análises dos dados,	38
3.3. Resultados e discussão,	38
3.3.1. Diversidade genética,	38
3.3.2. Estrutura genética,	45
3.4. Conclusões,	54
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS,	56
5. APÊNDICE A. Valores P para o desequilíbrio genotípico,	69

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Na Argentina, as florestas subtropicais incluem a duas formações disjuntas separadas pela grande planície de floresta xerófila chaquenha (CABRERA, 1994). Na região nordeste da Argentina estende-se as Selvas Paranaenses ou Misioneras, relacionada biogeograficamente com a Mata Atlântica brasileira. Por outro lado, na região noroeste encontram-se as florestas subtropicais de montanha ou Yungas, de origem andina. Embora ambos os núcleos selváticos representem menos de 2% da Argentina continental, acumulam mais de 50% da biodiversidade do país. (BROWN; PACHECO, 2006). Constituem os ambientes de maior riqueza de espécies e recursos naturais da Argentina e são ecossistemas severamente ameaçados, principalmente pela degradação e fragmentação de seus bosques devido às intervenções antrópicas.

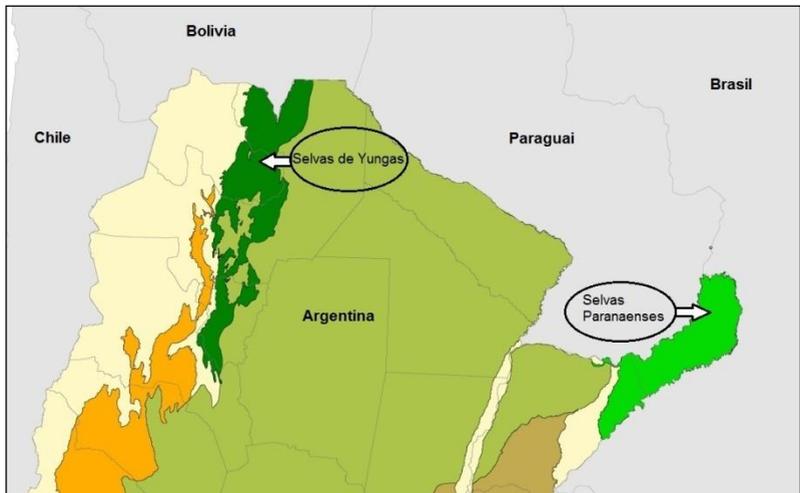


Figura 1. Mapa mostrando a localização das duas regiões fitogeográficas com florestas subtropicais na Argentina: as Selvas Paranaenses e as Selvas de Yungas. Fonte: Direção de Bosques, Secretaria de Agricultura e Desenvolvimento Sustentável.

A formação vegetal conhecida como Yungas ou “Selva tucumana-boliviana” tem a sua origem nos bosques andinos da Venezuela (7°N) e ocupam uma estreita e longa faixa com mais de 4000 km de extensão nas ladeiras orientais dos Andes (INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA, 2005).

Na Argentina, especificamente, as Yungas cobrem uma superfície estimada de 5.2 milhões de hectares, desde a divisa com a Bolívia (23°S) até o norte da Província de Catamarca (29°S), passando pelas Províncias de Salta, Jujuy e Tucumán. Ela tem um comprimento de 700 km no sentido Norte-Sul, menos de 100 km de largura, e uma gradiente altitudinal de entre 400 e 3000 m sobre o nível do mar (BROWN et al., 2002).

A presença das Yungas esta associada aos cordões montanhosos que interceptam os ventos úmidos do Atlântico e condensam a umidade em forma de chuvas orográficas, concentradas entre novembro e abril, constituindo cerca de 80% das precipitações anuais. Os registros variam desde os 800 mm até um máximo conhecido de 3000 mm. As nuvens cobrem grande parte do ano nestas florestas, provendo a umidade necessária para a subsistência de sua exuberante vegetação e a manutenção do fluxo de água nos rios e arroios. A temperatura média anual é de 21,5°C com um marcado gradiente de Oeste a Leste.

Todas estas características associadas permitem que nas Yungas ocorra uma rica cobertura vegetal, caracterizada por apresentar uma grande heterogeneidade de paisagens, que se diferenciam de acordo com a orientação e altitude das ladeiras. Estas características permitem também o desenvolvimento de uma rica fauna, com muitas espécies endêmicas, especialmente em grupos como aves, anfíbios e répteis (VILLAFANE, 2002).

Como uma resposta ao forte gradiente altitudinal, a vegetação das Yungas organiza-se em patamares com características florísticas e climáticas bem marcadas (BROWN et al., 2002):

- **Selva de Baixa Montanha ou de Transição ao Bosque Chaqueño.**

Ocupa o patamar entre os 400 e 700 m nas ladeiras de escassa altitude. Nesta selva é comum a espécie *Cedrela balansae* e outras nove espécies de importância florestal, entre elas: *Calycophyllum multiflorum*, *Phyllostylon rhamnoides*, *Tabebuia impetiginosa*, *Anandenthera colubrina*, *Cordia trichotoma*. As chuvas concentram-se nos meses de novembro a maio, com uma média de 850 mm/ano e temperaturas de até 40°C (INZA, 2010). É um ecossistema muito ameaçado porque vem sofrendo uma importante pressão de

transformação principalmente por causa do cultivo da soja e cana de açúcar (BROWN; MALIZIA, 2004).

- **Selva Montana**

Ocupa as ladeiras das montanhas entre os 700 e 1500 m e representa a faixa altitudinal de máxima precipitação pluvial (mais de 2000 mm anuais). Em geral, é um bosque com predomínio de espécies perenifólias além de muitas lianas, trepadeiras e epífitas. As espécies arbóreas mais importantes são: *Cedrela balansae*, *Ficus maroma*, *Nectandra pichurim*, *Ocotea puberula*, *Inga edulis*, *I. marginata* (BROWN et al., 2002).

- **Bosque Montano**

Ocupa a faixa altitudinal entre os 1500 m e 3000 m e representa o patamar dos bosques nebulosos propriamente ditos por causa da presença de densos cúmulos de neblinas na época do outono (INZA, 2010). O ecossistema apresenta uma elevada heterogeneidade estrutural por causa das pastagens nativas localizadas mais para cima e devido ao uso do fogo pelas comunidades locais para manejar esse ambiente (BROWN et al., 2002). As espécies florestais mais comuns são *Cedrela lilloi*, *Podocarpus parlatorei*, *Roupala meisneri*, *Alnus acuminata* e *Juglans australis*.

- **Pastagens de Neblina**

Apresenta-se entre os 2000 m a 4000 m sobre o nível do mar formando uma paisagem heterogênea com o Bosque Montano. O ambiente está praticamente dominado por gramíneas e leguminosas de interesse para forragem. Acima dos 4000 m, o gênero que predomina é *Festuca* (INZA, 2010).

É importante destacar que as Yungas têm suma importância desde o ponto de vista da conservação para Argentina, já que apresentam a maioria dos seus ecossistemas seriamente ameaçados. Neste sentido, no dia 8 de novembro de 2002, a Mesa do Conselho Internacional do Programa do Homem e a Biosfera (MAB), aprovou a inscrição da Selva de Yungas na Rede Mundial de Reservas de Biosfera da UNESCO (BROWN, MALIZIA; LOMÁSCOLO, 2006). Como uma das funções básicas da Reserva de Biosfera é alcançar a conservação da biodiversidade de paisagens, ecossistemas e a proteção da diversidade genética, este trabalho contribuirá com estas necessidades e proporcionará conhecimentos para sua realização.

1.1. A espécie *Cedrela lilloi* C.DC.

A família Meliaceae está representada na Argentina por quatro gêneros nativos. Um deles, *Cedrela* P. Browne, reúne quatro espécies arbóreas de grande porte e com um alto valor comercial e industrial (ZAPATER; DEL CASTILLO; PENNINGTON, 2004; ZAPATER; DEL CASTILLO, 2003). Estes autores mencionam que três das espécies de *Cedrela* encontram-se na Selva de Yungas: *C. balansae* C.DC. (cedro orán), presente na Selva de Baixa Montanha; *C. saltensis* Zapater & del Castillo (cedro rosado), presente sobre montanhas baixas e na Selva Montana, e *C. lilloi* C.DC. (cedro coya, cedro tucumano) na Selva Montana e Bosque Montano; enquanto que a espécie restante, *C. fissilis* Vell. (cedro missioneiro) é exclusiva da Selva Misionera.

C. lilloi é a espécie com a maior faixa de distribuição nas Yungas (Figura 2). No norte da província de Salta ocorre entre uma altitude de 1100 m e 2500 m onde geralmente é encontrada junto com *Juglans australis* Griseb (noqueira crioula), *Podocarpus parlatorei* Pilg. (pinheiro do morro) e *Alnus acuminata* Kunth (aliso do morro) (ZAPATER; DEL CASTILLO; PENNINGTON, 2004). É uma espécie emergente do Bosque Montano, e pode ser encontrados indivíduos de

até 40 m de altura. No limite Sul de sua ocorrência natural no país, na província de Tucumán, ocupa uma gradiente de altitude mais amplo, entre os 500 m e 1900 m (GRAU; ZAPATER; NEUMANN, 2006).

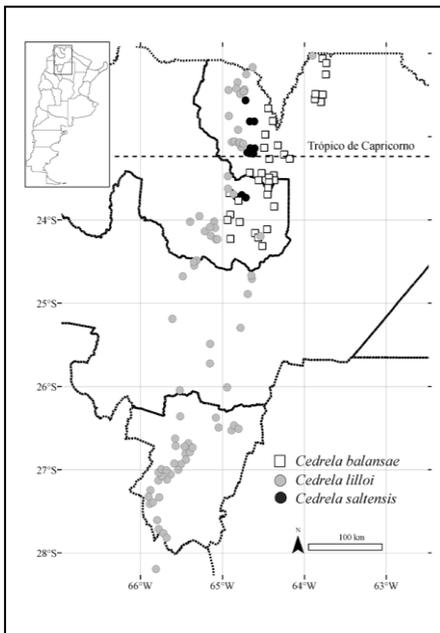


Figura 2. Distribuição natural das três espécies de *Cedrela* na Selva de Yungas.

Fonte: (GRAU; ZAPATER; NEUMANN, 2006).

O registro fenológico de *C. lilloi* indica que na província de Tucumán o período de florescimento ocorre de novembro até janeiro e a frutificação de fevereiro a março (DIGILIO; LEGNAME, 1966 apud ZAPATER; DEL CASTILLO; PENNINGTON, 2004). No entanto, nas províncias de Salta e Jujuy, a frutificação se estende até o mês de agosto (DEL CASTILLO; ZAPATER; GIL, 2005). Na estação de inverno, mais seca, suas folhagens são perdidas e é quando seus frutos, já maduros (cápsulas de entre 3,5 – 5 cm) desidratam, e se abrem, liberando as sementes aladas, sendo dispersas com ajuda do vento (GRAU, 2000). Os indivíduos de *C. lilloi* portam flores morfológicamente bissexuais, porém, são funcionalmente femininas ou masculinas, uma vez que apresenta vestígios não funcionais do outro sexo, o que diminui a probabilidade de autofecundação e promove a polinização cruzada (ASCHERO, 2006). Em um estudo recente sobre a biologia floral do gênero *Cedrela*, Gouvêa, Dornelas e Martinelli-Rodriguez (2008) confirmaram esta observação.

A produção de sementes é esporádica e escassa, sendo um dos principais fatores limitantes para sua propagação sexual. Aschero (2006) comenta que isto poderia ser explicado devido a pouca quantidade de pólen depositado no estigma por falta de polinizadores. Não obstante, a produção de mudas em casa de vegetação das três espécies de cedro do noroeste argentino não oferece nenhuma dificuldade (DEL CASTILLO et al., 2003).

1.2. Revisão bibliográfica

A exploração e corte seletivo das espécies do gênero *Cedrela* nas Yungas tem sido mantida a uma taxa constante durante vários séculos, pois sempre foram reconhecidas suas excelentes propriedades madeiráveis para a construção de mobílias e artigos em geral, além de terem um elevado valor no mercado local e nacional (MINETTI, 2006). *C. lilloi* é provavelmente a espécie madeirável mais atrativa em termos econômicos na Alta Bacia do Rio Bermejo, já que é relativamente comum e tem um alto valor no mercado interno da Argentina (US\$ 170-300/m³ em Novembro 2005) (MALIZIA; BLUNDO; PACHECO, 2006). Ademais, o seu valor é incrementado ainda mais porque os melhores exemplares de cedro presente no patamar inferior das Yungas (*C. balansae*) estão praticamente desaparecendo devido à atividade florestal ter sido sempre maior neste ambiente por causa da fácil acessibilidade topográfica. Estes fatos favoreceram uma diminuição acelerada de árvores por unidade de superfície e atualmente pode ser observada uma

maior proporção de indivíduos defeituosos e em deficientes condições sanitárias (DEL CASTILLO et al., 2003; DEL CASTILLO et al., 2005; MINETTI, 2006).

O avanço da fronteira agrícola sobre o ecossistema de Yungas e o gado bovino sem manejo são as principais ações antrópicas que incidem diretamente na falta de regeneração natural destas espécies. Para reverter este processo de degradação ambiental, econômica e social, e levando em consideração que as espécies do gênero *Cedrela* se caracterizam por possuírem uma maior velocidade de crescimento, em comparação a muitas outras espécies tropicais de madeira valiosa, é importante assegurar a produção comercial sustentável das mesmas para aliviar a pressão sobre o bosque nativo. Esta atividade é desenvolvida através dos métodos silvícolas conhecidos como Reflorestamento sob Cobertura ou Enriquecimento de Mata Nativa, e Reflorestamento a Céu Aberto ou em Maciço (DEL CASTILLO et al., 2005; MINETTI, 2006). Ademais, este último autor propõe ações de manejo que incluam controlar os aproveitamentos ilegais, tanto como selecionar e preservar as matrizes produtoras de sementes.

A extração intensiva e seletiva de uma espécie em particular pode comprometer sua viabilidade como uma unidade evolutiva devido à redução de seu tamanho populacional e dos níveis da variabilidade genética (FINKELDEY; HATTEMER, 2007). Para caracterizar apropriadamente os atuais recursos genéticos florestais, e particularmente referidos a *C. lilloi*, deve-se conhecer primeiramente uma série de informações básicas importantes, em especial sua ecologia e distribuição natural, bem como a forma de reprodução e sistema de cruzamento (NAMKOONG; KOSHY, 2001). Como esses conhecimentos já foram adquiridos pelos pesquisadores do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), seria muito importante acrescentar as informações respeito a sua conservação, manejo sustentável, implementação de estratégias de domesticação, seleção e melhoramento, bem como estimar a distribuição de sua diversidade dentro e através de suas populações (BUTCHER; GLAUBITZ; MORAN, 1999; ALLENDORF; LUIKART, 2007).

1.2.1. Marcadores moleculares

Os primeiros caracteres usados pelo homem para diferenciar as características expressadas nos indivíduos (fenótipo) foram os marcadores morfológicos, de fácil identificação visual tais como forma, cor e tamanho. Não obstante a principal desvantagem destes caracteres é

que estão sujeitos a mudanças devido a fatores ambientais, variam nas diferentes etapas do desenvolvimento do indivíduo, seu número é limitado e possuem baixo polimorfismo dentro da espécie (PICCA et al., 2004). Nas últimas décadas tem-se desenvolvido tecnologias capazes de examinar, com alto grau de eficiência, a diversidade genética no nível de marcadores moleculares, permitindo complementar a informação gerada pelas metodologias tradicionais (LANGRIDGE; CHALMERS, 2007).

Os marcadores moleculares são biomoléculas que podem estar relacionadas com uma característica fenotípica (proteínas) ou genética (ácidos nucleicos) (MALONE; ZIMMER, 2005). Neste último caso, trata-se de um marcador molecular genético e pode ser definido como um segmento de DNA, com ou sem função conhecida, e com uma localização física (identificável) em um cromossomo cuja herança é possível detectar experimentalmente entre os indivíduos de uma população. O desenvolvimento dos marcadores de DNA, tais como: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e SSR (Simple Sequence Repeats) ou Microssatélites, permite gerar um grande número de locos que servem como ferramentas para estudar as regiões altamente variáveis do genoma codificante ou não codificante, tanto nucleares como de organelas (BUTCHER; GLAUBITZ; MORAN, 1999; ROBINSON; HARRIS, 1999).

Como exemplo, para o estudo da estrutura genética populacional de várias espécies florestais da família Meliaceae têm-se empregado isoenzimas (LOVELESS; GULLISON, 2003; HALL; ORRELL; BAWA, 1994); RAPD (GILLIES et al., 1997, 1999), AFLP (DE LA TORRE et al., 2008; INZA et al., 2008) e SSR (WHITE; BOSHIER; POWELL, 1999; NOVICK et al., 2003; HERNÁNDEZ, 2008).

1.2.2. Marcadores Microssatélites ou SSR (Polimorfismo de sequências simples repetitivas)

Os microssatélites são marcadores genéticos que utilizam iniciadores especificamente desenhados para detectar regiões genômicas altamente polimórficas através da técnica conhecida como PCR. Consistem de sequências de 1 a 5 nucleotídeos (CA, GC, TGC, etc) repetidos em *tandem* até 40 vezes e distribuídos pelo genoma de muitas espécies eucariotas, inclusive não aleatoriamente dentro de genes que codificam para proteínas e regiões regulatórias (LI et al., 2002; FUJIMORI et al., 2003). Os marcadores microssatélites são classificados de acordo

ao tipo de sequência repetitiva como perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos (OLIVEIRA et al., 2006).

Um indivíduo (genótipo) pode ter uma sequência repetitiva de tamanho igual ou diferente entre os dois cromossomos homólogos. Caso essa sequência tenha o mesmo tamanho em pares de base (ex., 15 repetições de CA) em ambos os cromossomos, ele é homocigoto para esse loco, caso contrário é um heterocigoto. Devido a que o número de sequências simples repetitivas varia muito entre os indivíduos de uma mesma espécie, cada segmento desses amplificado via PCR gera produtos altamente variáveis e de amplo conteúdo informativo. Então, o polimorfismo (ocorrência de diferentes alelos na população para o mesmo loco) é produto das diferenças no número de repetições. O marcador SSR é considerado um marcador molecular muito polimórfico por causa da sua natureza multialélica (ELLEGREN, 2004; CHAMBERS, MACAVOY, 2000), além de ter uma herança mendeliana e ser codominantes (os heterocigotos podem ser distinguidos dos homocigotos). Em razão destas características, os SSRs são mais informativos e vantajosos quando comparados aos marcadores dominantes RAPD e AFLP (BHARGAVA; FUENTES, 2010).

Jarne e Lagoda (1996) associam a característica de hipervariabilidade dos marcadores microssatélites a sua elevada taxa de mutação comparada com o resto do genoma. Essa taxa de mutação não é uniforme entre locos, alelos e indivíduos e varia na faixa de 10^{-2} a 10^{-6} eventos por loco por geração. Baseado nesta característica foram definidos vários modelos mutacionais para explicar o elevado número de alelos presente em uma população ou espécie.

Convencionalmente, para microssatélites têm sido considerado dois modelos, o modelo de alelos infinitos (IAM) e o modelo mutacional “stepwise” (SMM) (BHARGAVA; FUENTES, 2010; OLIVEIRA et al., 2006). No modelo IAM cada mutação cria um novo alelo envolvendo a perda ou ganho de alguns números de repetições, e é capaz de gerar alelos não encontrados previamente na população. Este é o modelo clássico usado com as estatísticas F do Wright. No modelo SMM cada evento mutacional envolve uma mudança em só uma repetição, portanto, a perda ou ganho de uma unidade repetitiva resulta na expansão ou contração do microssatélite. Este significa que cada alelo difere do outro em uma repetição. Slatkin (1995) propôs uma medida de diferenciação genética (R_{ST}) similar ao F_{ST} de Wright (1951), porém baseado neste modelo.

Têm sido sugeridos vários mecanismos para explicar a alta taxa mutacional dos microssatélites, a qual depende, em parte, da estrutura intrínseca do microssatélite, quer dizer, do número e motivo das unidades repetitivas (BHARGAVA; FUENTES, 2010). Um deles ocorre durante a replicação da sequência microssatélite, onde uma falha no sistema de reparação do DNA conduz a uma mudança no tamanho desse microssatélite (MOXON; WILLS, 1999). Esse fenômeno é conhecido como “escorregamento” da enzima polimerase. Alguns estudos têm revelado que a taxa de escorregamento é maior em repetições de dinucleotídeos, seguida pelas repetições de tri e tetranucleotídeos e está inversamente correlacionado com o tamanho das unidades repetitivas (ELLEGREN, 2004). Este erro também acontece na amplificação *in vitro* das sequências microssatélites ao observa-se a presença das bandas “stutter”. Tais produtos são comumente menos intensos do que o produto esperado, porém se coincide com um indivíduo heterozigoto então fica difícil diferenciar as bandas verdadeiras das falsas (CIOFI et al., 1998 apud ROBINSON; HARRIS, 1999).

Outra questão de grande importância no uso de marcadores SSR refere-se à homoplasia. Dois alelos microssatélites de igual tamanho assumem-se que são fragmentos homólogos idênticos, porém o sequenciamento deles pode demonstrar que não são iguais (CHAMBERS; MACAVOY, 2000). Esta variação, produzida na região repetitiva ou flanqueadora, é provocada tanto por mutações pontuais, inserções e deleções. Então, às vezes dois fragmentos co-migrantes não necessariamente têm a mesma sequência (não são homólogos) e, portanto, essas duas bandas são consideradas como alelos iguais, quando em realidade não os são (ROBINSON; HARRIS, 1999).

Outro problema para ter em conta são os alelos nulos. Mutações na região de anelamento de um ou dois iniciadores pode impedir a hibridação e conseqüentemente esse alelo não aparecerá na população (CALLEN et al., 1993). Isto produz uma perda de produtos de amplificação, visualizado pela aparição de linhas “vazias” no gel. Portanto, uma consequência importante da existência dos alelos nulos e da homoplasia é a subestimação da heterozigosidade nas populações por causa da diminuição na proporção de heterozigotos esperados.

Microssatélites tem sido encontrado em inúmeras espécies animais e vegetais. Embora seja muito trabalhoso o desenvolvimento prévio dos iniciadores específicos, esta tecnologia é utilizada por um grande número de espécies devido a que possui diversas aplicações práticas: detecção de variabilidade genética, genotipagem de organismos, identificação de híbridos, testes de paternidade,

mapeamento genético e seleção assistida por marcadores moleculares (MALONE; ZIMMER, 2005; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

A maior variabilidade gerada pelos microssatélites em comparação com outros marcadores moleculares permite aumentar a probabilidade de cada indivíduo de uma população ter um genótipo, garantindo a identificação e a continuidade do fluxo de pólen ou a dispersão das sementes (BUTCHER; GLAUBITZ; MORAN, 1999).

Os SSR foram utilizados, por exemplo, para determinar os impactos da fragmentação da floresta sobre a diversidade genética e o fluxo de genes em várias espécies. Chase, Kesseli e Bawa (1996) encontraram evidência sobre o fluxo de pólen entre árvores de *Pithecellobium elegans* isoladas em pastagens e fragmentos de bosque indicando que tais árvores fazem uma importante contribuição à diversidade genética do bosque contíguo não perturbado.

Um estudo comparativo sobre a diversidade genética de árvores de *Swietenia humilis* isoladas em uma pastagem e outras plantas presentes em um bosque adjacente não perturbado, utilizando microssatélites, revelou níveis análogos de variabilidade, apesar do menor número de alelos nas árvores da pastagem (WHITE; POWELL, 1997a). Em outro estudo com populações fragmentadas desta mesma espécie, White, Boshier e Powell (1999) usaram microssatélites para demonstrar a existência de um fluxo gênico extensivo entre populações, o qual reflete que provavelmente houve uma distribuição contínua antes da destruição do habitat.

Dayanandan, Bawa e Kesseli (1997) usaram seis iniciadores SSRs desenvolvidos na espécie florestal tropical *Pithecellobium elegans*, para detectar locos polimórficos homólogos em 12 espécies da mesma família (Leguminosas) e conseguiram reconstruir a filogenia das espécies selecionadas através da sequência de DNA do gene que codifica para o cloroplasto.

Alguns estudos indicam que os iniciadores microssatélites desenhados em uma espécie determinada, têm o potencial de ser usados para amplificar a mesma região de DNA em táxons relacionados (NAMKOONG; KOSHY, 2001; ROBINSON; HARRIS, 1999). É possível realizar a transferibilidade de iniciadores entre espécies relacionadas devido à alta conservação das sequências nucleotídicas que flanqueiam aos microssatélites, entre genomas filogeneticamente próximos (STEINKELLNER et al., 1997; DAYANANDAN; BAWA; KESSELI, 1997; SALGUEIRO et al., 2005).

Nesse sentido, Inza et al. (2007) tentaram a transferibilidade de 36 iniciadores microssatélites em 72 indivíduos de sete populações diferentes de *C. lilloi*, e observaram que somente seis locos evidenciaram polimorfismo com uma média de 4,66 alelos por loco. Outros locos tiveram um padrão pouco claro de alelos ou presença de grande quantidade de bandas inespecíficas que não puderam ser eliminadas ajustando a reação de PCR. White e Powell (1997b) informaram que sete dos 11 iniciadores microssatélites desenvolvidos para *Swietenia humilis* puderam amplificar com sucesso quando foram transferidos a *S. macrophylla* e *S. mahogani*, porém eles não testaram seu polimorfismo. No entanto, quando Lemes, Brondani e Grattapaglia (2002) transferiram esses 11 iniciadores a *S. macrophylla* encontraram que somente dois locos foram polimórficos e, para tanto, foi necessário o desenvolvimento de iniciadores microssatélites específicos para essa espécie.

1.3. Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar marcadores moleculares microssatélites específicos para a espécie *Cedrela lilloi*.

1.3.1. Objetivos específicos

- a) Desenvolver, desenhar e selecionar entre oito e 10 iniciadores que amplificam locos microssatélites polimórficos para *C. lilloi*.
- b) Avaliar o polimorfismo dos locos desenvolvidos por meio de parâmetros básicos de diversidade genética.
- c) Estimar a diversidade e estrutura genética de três populações naturais de *C. lilloi*.

1.3.2. Hipótese de trabalho:

O genoma de *Cedrela lilloi* apresenta, como outras espécies do gênero, uma elevada abundância de regiões microssatélites com características favoráveis para o desenvolvimento de iniciadores altamente polimórficos.

As três populações naturais de *Cedrela lilloi* possuem elevados valores de diversidade genética e baixos índices de fixação.

2. DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Os objetivos desta seção foram: a) construir uma biblioteca genômica enriquecida e sequenciar as regiões ricas em sequências repetitivas; b) desenhar iniciadores que flanqueiam essas regiões microsatélites e c) otimizar a amplificação dos locos via PCR e analisar em gel desnaturante de poliacrilamida.

2.1. Material vegetal

Foram coletadas amostras foliares jovens de um indivíduo de *C. lilloi*, localizado em uma parcela experimental da Estação Experimental Agropecuária Yuto do INTA, província de Jujuy na Argentina. O material colhido foi acondicionado em embalagem plástica vedada contendo sílica gel e transportado até o Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para a extração do DNA.

2.2. Extração do DNA

Foi empregado um protocolo de extração de DNA vegetal proposto por Doyle e Doyle (1990) adaptado para o gênero *Cedrela* no Laboratório de Recursos Biológicos do INTA-Castelar (Buenos Aires). Foram macerados em nitrogênio líquido 80 mg de tecido seco cortado em tiras em um cadinho de cerâmica. Uma vez pulverizado, o tecido foi transferido para microtubos e adicionado 1,5 ml de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 2% polivinilpirrolidona e 3% 2-mercaptoetanol) a 65°C e incubado em banho-maria (60-65°C) por 1 h, sendo agitado a cada 5 min durante a incubação.

Após a retirada do banho-maria e resfriamento a temperatura ambiente foi adicionado 400 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA, 24:1 v/v), submetidos à agitação por inversão durante 10 min e centrifugação a 16684 g durante 15 min. Após este procedimento, foi pipetada a fase superior aquosa para um novo tubo e repetido o processo de extração com CIA para garantir a qualidade do DNA obtido. Após a segunda extração, foram retirados 400 µl para um novo tubo e a modificação no protocolo consistiu em adicionar 40 µl de acetato de

sódio 3M (10:1) e 1 ml (2,5 volumeis) de etanol absoluto a -20°C para precipitar os ácidos nucleicos. Foram submetidos a uma centrifugação de 8983 g por 5 min para aderir o DNA precipitado ao fundo do tubo para a formação do *pellet*. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado uma vez em 1 ml de etanol 70% durante cinco min, e um segundo lavado em etanol absoluto durante três minutos, para limpeza e desidratação.

Uma vez lavado, o *pellet* foi ressuspendido em tampão TE com 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RNase, e incubado a 37°C por 30 min, depois foi conservado em freezer -20°C . A quantificação do DNA genômico foi feita no espectrofotômetro NanoDrop1000 (Thermo Scientific).

2.3. Desenvolvimento de marcadores microssatélites

O desenvolvimento de marcadores microssatélites foi efetuado no Laboratório do Prof. Dr. José Baldin Pinheiro, no Depto. de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) pertencente à Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

2.3.1. Digestão do DNA para construção da biblioteca genômica

Para construção da biblioteca genômica foi utilizada uma amostra de *C. lilloi* na concentração de 650 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Esta etapa visou gerar fragmentos de DNA de tamanhos menores. Para reação de digestão utilizou-se 45 μl de água MilliQ; 10 μl de tampão; 5 μl da enzima *RsaI* (10/ μl) e 40 μl de DNA (250 $\text{ng}/\mu\text{l}$). A reação foi incubada em estufa *overnight* a 37°C . A digestão foi submetida à eletroferese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X, corrido a 120 V durante 2 h, e corado com brometo de etídeo. O DNA digerido foi observado em transiluminador UV e comparado com fragmentos de tamanho conhecidos.

2.3.2. Ligação dos adaptadores

O objetivo desta etapa foi gerar uma maior quantidade de fragmentos de tamanhos iguais e garantir que todos os fragmentos digeridos tenham uma terminação comum e conhecida. Os adaptadores usados foram Rsa21- 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' e Rsa25-5'-ACACGAGAACGAATGAGCACCTGAT-3', os quais possuem sítios complementares à enzima utilizada na etapa anterior. A reação de

ligação consistiu de 5 µl de tampão 10X; 2 µl do adaptador Rsa21 (10µM); 2 µl do adaptador Rsa25 (10 µM); 4 µl de T4 DNA ligase (1U/µl) e 12 µl de DNA digerido no passo anterior e água MilliQ para completar um volume final de 50 µl. A reação foi incubada por 2 h a 20°C em termociclador.

2.3.3. Pré-amplificação via PCR

Na seqüência foi efetuada a verificação da ligação dos adaptadores através de pré-amplificação dos fragmentos via PCR, com a utilização de iniciador complementar a seqüência do adaptador Rsa21. Esta reação consistiu de 5 µl de tampão 10X; 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM); 4 µl de dNTP (2,5 mM); 2 µl do iniciador Rsa21 (10 µM); 5 µl de *Taq* DNA polimerase (5U); 5 µl produto da ligação e 27,5 µl água MilliQ para completar um volume total de 50 µl. Para a amplificação foi utilizado o programa PCR de 95°C por 4 min, seguido de 20 ciclos de 94°C por 30 s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min, e extensão final de 72°C por 8 min.

2.3.4. Purificação

Nesta etapa foi efetuada a purificação do produto de amplificação do passo anterior usando o kit “*QIAquick PCR Purification Kit*” (Qiagen cat. N° 28106). Esta etapa teve por objetivo purificar e preparar o DNA para a etapa de seleção de fragmentos de interesse. Seguindo as instruções do fabricante, 1) foi misturado 225 µl do tampão PB com 45 µl da PCR; 2) essa amostra foi aplicado em uma coluna e depois colocado no tubo coletor de 2 ml; 3) foi centrifugado por 1 min a 16684 g e a solução no tubo coletor foi descartado; 4) colocou-se a coluna no mesmo tubo coletor, adicionou-se 0,75 ml de tampão PE e foi centrifugado nas mesmas condições; 5) foram repetidos os passos 3 e 4 para garantir que todo o etanol fosse descartado; 6) a coluna foi colocado em um novo tubo 1,5 ml e para eluir o DNA foi adicionado 50 µl de água MilliQ e centrifugado por 1 min a 16684 g; 7) o passo anterior foi repetido para garantir a completa eluição do DNA ligado a coluna.

Para verificar o resultado deste processo foi realizado um gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X, corrido a 120 V durante 2 h e corado com brometo de etídeo. O DNA digerido e purificado foi observado em transiluminador UV e comparado com fragmentos de tamanho conhecidos.

2.3.5. Seleção de fragmentos contendo microssatélites

O objetivo desta etapa foi selecionar os fragmentos de interesse que continham microssatélites (fase de enriquecimento). Na seleção dos fragmentos foram empregadas esferas magnéticas ligadas a estreptavidina e oligos de microssatélites CT(8), GT(8) e TTC(8) associados a biotina. Os oligos se ligam aos fragmentos purificados que sejam complementares a sua sequência, e dada a alta afinidade entre biotina e estreptavidina, as esferas magnéticas são ligadas ao complexo biotina-oligo-fragmento. A seleção dos fragmentos é feito por um ímã que magnetiza as esferas contendo os fragmentos enriquecidos com microssatélites.

a)- Preparo das esferas magnéticas

Foram ressuspendidos os 600 µl de bolinhas magnéticas por agitação, e depois de magnetizar por 30 s foi aspirado com cuidado o sobrenadante. Em seguida foi adicionado 300 µl de SSC 0,5X, ressuspendido, magnetizado e descartado o sobrenadante. Esta operação foi repetida três vezes. Por último as esferas foram ressuspendidas em 100 µl de SSC 0,5X.

b)- Preparo do DNA purificado

Foi adicionado 95 µl do DNA purificado a 405 µl de água MilliQ e incubado a 95°C por 15 min em banho maria. Em seguida foi acrescentado 13 µl de SSC 20X e depois 3 µl de cada oligo de microssatélite biotinolado (50 µM) Biotina-(CT)8, Biotina-(GT)8 e Biotina-(TTC)8. A reação foi deixada a temperatura ambiente por 20 min, agitando lentamente a cada 2 min. A esta mistura de hibridação foi adicionado 100 µl de esferas magnéticas pré-lavadas. Em seguida a reação foi incubada por 10 min à temperatura ambiente agitando suavemente o tempo todo. Depois de magnetizar por 30 s e aspirar o sobrenadante, as esferas contendo o complexo biotina-oligo-fragmento DNA microssatélite foram ressuspendidas em 300 µl de SSC 0,1X. Este último passo foi repetido três vezes e por último foi adicionado 100 µl de água MilliQ autoclavada e magnetizado por 30 s. A água quebra a ligação estreptavidina-biotina e o DNA de interesse fica dissolvido no meio aquoso. Depois de aspirar o sobrenadante, foi realizada mais uma ressusensão com 150 µl de água e em seguida foram juntadas as duas partes (250 µl) e estocadas a -20°C.

2.3.6. Amplificação dos fragmentos selecionados

Foi efetuada uma amplificação dos fragmentos selecionados e ligados aos adaptadores para gerar fragmentos de fita dupla em maior quantidade. A reação de PCR consistiu de 10 µl de tampão 10X; 3 µl de MgCl₂ (50 mM); 8 µl de dNTP (2,5 mM); 4 µl de Rsa21 (10 µM); 0,5 µl de *Taq* DNA polimerase (5U); 20 µl de fragmentos selecionados e água MilliQ para completar um volume final de 100 µl. O programa utilizado para amplificação da reação foi: 95°C por 1 min, seguido de 25 ciclos de 94°C por 40 s, 60°C por 1 min, 72°C por 2 min e uma extensão final de 72°C por 5 min.

2.3.7. Clonagem em um vetor e transformação bacteriana

Os fragmentos amplificados gerados via PCR na etapa anterior foram destinados à ligação do vetor de clonagem *pGEM-T Vector System* (Promega). Em um tubo 1,5 ml foram adicionados os seguintes componentes para a reação de ligação: 2 µl de água MilliQ; 10 µl de tampão 10X; 1 µl do plasmídeo p-GEM-T; 6 µl do produto de amplificação e 1 µl de T4 DNA Ligase. A reação foi incubada *overnight* a 4°C.

O produto desta reação de ligação foi utilizado para transformar células bacterianas. Foram empregadas 50 µl de células competentes de *Escherichia coli* (cepa XL1-Blue) misturadas a 8 µl da ligação e 32 µl de tampão de transformação. Foi incubado 30 min no gelo e depois 10 min a temperatura ambiente. Após esta fase foi adicionado ao produto 450 µl do meio de cultura LB líquido e incubado a 37°C por 50 min.

O produto foi ressuspenso cuidadosamente e 100 µl plaqueado em placas *Petri* contendo meio de cultura LB sólido + ampicilina (100 mg/ml), 80 µl de IPTG + 80 µl de X-Gal. Foram mantidas de 18 a 20 h a 37°C para crescimento, e depois de colocadas 4 h na geladeira, foram selecionadas exclusivamente as colônias brancas. Estas colônias indicavam presença de fragmentos de DNA clonado de *C. lillo* introduzido no plasmídeo. As colônias azuis indicavam ausência do inserto.

Para o controle positivo da reação de ligação foi utilizado um fragmento de DNA contendo vários nucleotídeos adenina no extremo 3'. O vetor pGEM-T contém nucleotídeos timina nos dois extremos para aumentar as chances da ligação bem como prevenir o fechamento do plasmídeo na região de clonagem. Se as colônias brancas obtidas fossem

menos de 50%, é um indicativo que as condições da ligação não foram ótimas.

O controle do processo de transformação consistiu de um vetor fechado (o vetor pGEM-T é linear), sem inserto na região de clonagem. Neste caso, todas as colônias deveriam ser brancas.

Para garantir que cada construção (vetor + fragmento) fosse mantida em condições apropriadas para futuros análises, as colônias brancas foram repicadas para uma placa tipo Elisa com meio de manutenção. Foram incubadas *overnight* a 37°C para crescerem e depois colocadas no freezer -80°C.

2.3.8. Extração plasmidial

Os clones transformados contendo os insertos foram então submetidos à extração do DNA plasmidial para posterior sequenciamento. Em uma microplaca alta foi colocado 1 ml de meio LB líquido contendo ampicilina (100 mg/ml) e inoculado 2 µl de cada colônia com o auxílio de pipeta multicanal. A placa foi selada com adesivo e furada para aeração durante o crescimento em agitador a 37°C, 300 rpm, durante 22 h. Depois de centrifugar por 6 min a 2025 g, para sedimentar as células, o sobrenadante foi descartado. Na sequência foi adicionado 240 µl de GTE, a placa foi selada com adesivo e as células foram ressuspensas agitando no vortex por 2 min. Foram repetidos os passos de centrifugação e agitação, e então foram transferidos 60 µl de cada suspensão de células para placa tipo Elisa contendo RNase (10 mg/ml). Foi adicionado 60 µl de NaOH 0,2M – SDS 1% e depois de selar a placa com adesivo foi misturado 10 vezes por inversão. Em seguida foi adicionado 60 µl de KOAc 3M e também misturado. Depois de remover o adesivo, a placa foi incubada em estufa a 90°C por 30 min, esfriada em gelo por 10 min e centrifugada por 4 min a 2700 g.

Com a finalidade de purificar o plasmídeo, foi fixada com fita adesiva uma placa filtro Millipore em cima de uma placa tipo Elisa e depois de transferir todo o volume para a placa filtro, foi centrifugada por 4 min a 2700 g. Ao filtrado foi adicionado 90 µl de isopropanol, misturado e submetido a uma centrifugação de 2700 g por 45 min. O pellet plasmidial foi lavado com 180 µl de etanol 70% gelado, centrifugado, e depois de descartar o sobrenadante, deixou-se a placa secar por 60 min à temperatura ambiente. Seguidamente a extrato plasmidial foi ressuspensado em 60 µl de água MilliQ por 12 h e colocado no freezer -20°C.

Para controle da extração plasmidial, 2 µl de uma amostra aleatória foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, corrido a 120 V durante 2 h e corado com brometo de etídeo.

2.3.9. Sequenciamento e purificação

O DNA plasmidial foi amplificado via PCR utilizando-se iniciador complementar à seqüência do vetor. A amplificação de uma microplaca foi realizada na ESALQ segundo o seguinte protocolo: a reação de PCR foi preparado ao abrigo da luz e consistiu de 4,6 µl água MilliQ; 2 µl de tampão Save Money; 1 µl de iniciador T7 (5 µM); 4 µl de DNA plasmidial e 0,4 µl de Big Dye (vs.3.1). O programa de amplificação foi de 96°C por 2 min, seguido de 26 ciclos de 96°C por 45 s, 50°C por 30 s e 60°C por 4 min.

Na seqüência o produto desta amplificação foi purificado para eliminar interferentes ou excessos de reagentes da reação de sequenciamento e deixar as amostras prontas para a eletroforese. Para a purificação foi adicionado 80 µl de isopropanol 65% e deixado em repouso durante 15 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida foi centrifugado por 45 min a 2700 g e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Depois adicionou-se 200 µl de etanol 70% gelado e foi centrifugado por 5 min a 2700 g. Uma vez descartado o sobrenadante foi dado um spin até 168 g, com a placa invertida em papel toalha. Depois a placa foi deixada secar por uma hora ao abrigo da luz e enviada para ser sequenciada no Instituto Agrônômico de Campinas, Centro Apta Citrus Sylvio Moreira em colaboração com o Dr. Marco Aurélio Takita, em sequenciador 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Posteriormente foram sequenciadas e purificadas mais duas microplacas no LFDGV do Centro de Ciências Agrárias da UFSC, segundo o seguinte protocolo: para a reação de sequenciamento foi usado 1,4 µl de água MilliQ; 0,6 µl de iniciador SP6 (5 µM); 4 µl de DNA plasmidial e 4 µl de DYEnamic ET Terminator reagent premix. O programa de amplificação foi de 95°C por 20s, 50°C por 15s e 60°C por 60s. A purificação foi diferente à anterior só no primeiro passo, onde foi adicionado a cada reação 1 µl de acetato de amônio 7,5 M e 28 µl de etanol absoluto. Ao final da purificação, o pellet plasmidial foi ressuspenso em 10 µl de *loading solution* e colocado a 4°C *overnight*. Depois foi realizada a corrida no sequenciador automático MegaBace (GE) e seguidamente foram analisados os resultados das seqüências.

2.3.10. Desenho dos iniciadores

O desenho dos iniciadores específicos para cada região que flanqueia as sequências repetitivas foram realizados com os programas *Chromas* v2.3.3, *BatchPrimer3* v1.0, *Primer3* v0.4.0 e *PrimerPremier5* v5.0. Foram consideradas as seguintes características: (i) a ausência de complementaridade entre si mesmo e os pares de iniciadores, (ii) o conteúdo de G+C entre 40% e 60%, (iii) a temperatura de anelamento para a reação de PCR entre 45°C e 60°C, (iv) o tamanho dos iniciadores de 18 a 22 pb e (v) tamanho dos produtos de amplificação entre 100 – 300 pb.

2.3.11. Triagem dos iniciadores

Foi testada a temperatura de anelamento ideal de cada iniciador sintetizado em 12 amostras de *C. lilloi*, incluído aquela da qual foi extraída o DNA para desenvolver a biblioteca genômica, visando identificar simultaneamente locos de amplificação visível e polimórficos. Depois de otimizar os componentes e concentrações da reação de PCR, o protocolo finalmente usado foi: 4,46 µl de água MilliQ; 1,3 µl de tampão 10X; 1,04 µl de dNTPs (2,5 mM); 1 µl de MgCl₂ (25 mM); 0,2 µl de *Taq* polimerase (5U); 1 µl de cada iniciador (3 µM) e 3 µl de DNA (4 ng/µl), em um volume final de 13 µl. As reações foram montadas em placas de 96 poços e amplificadas em aparelho termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf) nas seguintes condições: 94°C por 3 min seguidos por 30 ciclos de 94°C por 1 min, gradiente de temperatura testada entre 45°C e 60°C por 1 min, 72°C por 1 min e finalmente 72°C por 7 min.

Os produtos da amplificação foram submetidos a gel desnaturante de poli(acrilamida 4%), corridos durante 1 h a 55W e corado com nitrato de prata (CRESTE; TULMANN-NETO; FIGUEIRA, 2001). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação com padrões obtidos com DNA *ladder* 10 bp (Invitrogen). As leituras dos géis foram realizadas logo após a secagem dos mesmos e escaneados para documentação dos resultados.

2.4. Análise de dados

A caracterização genética de cada iniciador desenhado e polimórfico foi realizada em 50 indivíduos provenientes de uma população natural coletada no Parque Nacional Baritú (província de Salta, Argentina). As estimativas obtidas foram: número médio de alelos por loco (A); heterozigosidade observada (H_o); heterozigosidade esperada (H_e) e índice de fixação (F_{IS}). Todas estas estimativas foram realizadas com auxílio de programa Fstat 2.9.3.2 (GOUDET, 2002).

2.5. Resultados e discussão

2.5.1. Digestão do DNA

A enzima de corte frequente *RsaI* utilizada na digestão do DNA gerou uma grande quantidade de fragmentos de diferentes tamanhos, como era esperado. A maior concentração do DNA digerido apresentou-se entre os 500 pb e 2500 pb. Na imagem do gel somente a linha número 5 corresponde a *C. liloi* (Figura 3). Para construção de uma biblioteca genômica é indispensável dispor um DNA de boa qualidade e quantidade.

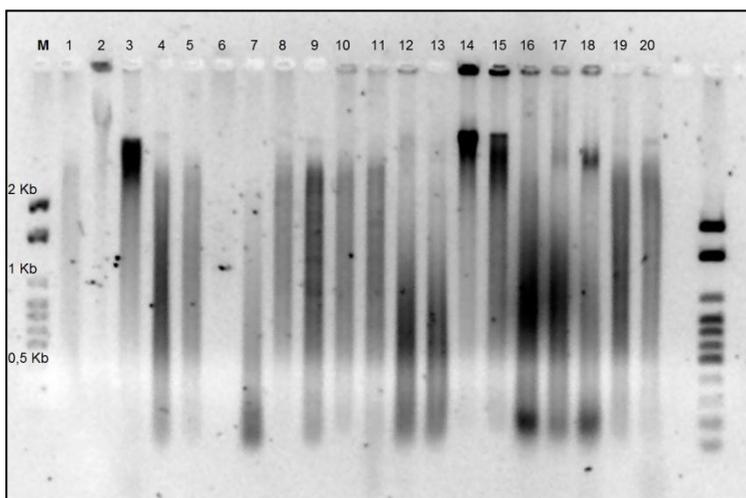


Figura 3. Padrão de digestão de DNA de *Cedrela liloi* (amostra n° 5) feito pela enzima *RsaI*. Marcador de peso molecular ladder 100 pb (Norgen).

Depois da purificação dos fragmentos ligados aos adaptadores foi importante correr um gel de agarose antes de proceder com a etapa de enriquecimento da biblioteca genômica. Na figura 4 observa-se um arraste de DNA de tamanho entre 500 pb e 1000 pb, indicando que o processo de purificação foi um sucesso.

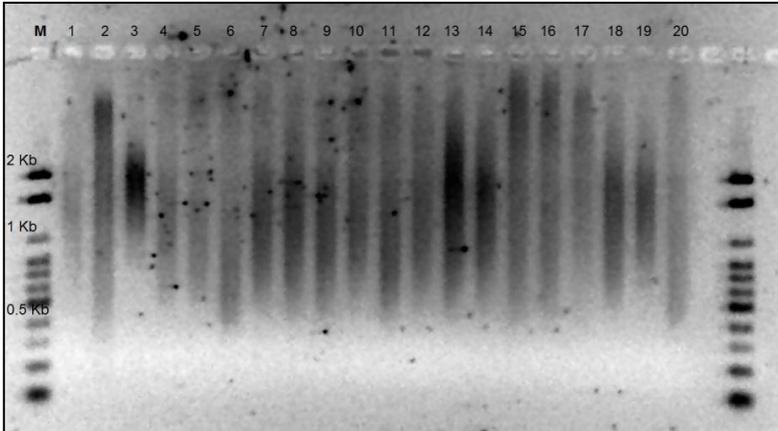


Figura 4. Resultado da purificação dos fragmentos ligados aos adaptadores. A amostra n° 5 corresponde a *C. lilloi*. Marcador de peso molecular ladder 100 pb (Norgen).

Para confirmar a presença do DNA plasmidial após a sua extração das colônias brancas, foi realizado um gel de agarose 1%. Foi observado entre duas e três bandas específicas, o esperado depois deste processo (Figura 5). As três bandas correspondem ao tipo de conformação estrutural que o DNA plasmidial dupla-fita pode apresentar. Ele pode correr no gel como uma molécula aberta, linear, e por isso sua migração através da matriz será mais rápida, aparecendo como uma banda de menor tamanho. Todavia, o plasmídeo pode estar fechado, circular, e por consequência ele vai migrar no gel a uma velocidade menor, indicado pela banda de tamanho intermédio. Porém, essa estrutura circular pode sofrer uma contorção sobre si mesmo e ocasionar uma migração mais lenta devido ao maior atrito e porque estas moléculas são conduzidas através dos poros do gel menos eficientemente do que as moléculas menores. Então, às vezes aparece uma terceira banda mais próxima da origem de corrida, como pode ser observado na primeira linha (MONTEIRO, 2009).

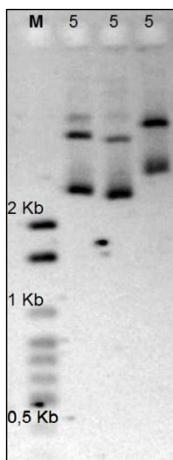


Figura 5. Presença de bandas específicas correspondentes ao DNA plasmidial de três amostras (n° 5) purificadas de *C. lilloi*. Marcador de peso molecular ladder 100 pb (Norgen).

2.5.2. Sequenciamento e desenho dos iniciadores

Em total foram sequenciados com sucesso 258 clones, 96 deles na ESALQ e 162 clones no LFDGV. No primeiro caso foram encontrados 26 sequências microssatélites, não obstante, em geral todas elas apresentaram motivos com poucas repetições (Tabela 1). Foram observados 20 locos com regiões repetitivas perfeitas, duas repetições compostas, três sequências imperfeitas e uma repetição composta-imperfeita .

Tabela 1. Motivos repetitivos dos 26 locos microssatélites desenhados para *C. lilloi* a partir de 96 clones sequenciados pela ESALQ e seus correspondentes produtos de amplificação.

Locos	Motivo repetitivo	Produtos de amplificação
Clilloi03	(TC) ₄	Monomórfico
Clilloi09a	(CTC) ₃	Monomórfico
Clilloi09b	(TAT) ₃	Polimórfico
Clilloi12	(CTT) ₅	Monomórfico
Clilloi17	(CAT) ₃	Monomórfico
Clilloi18	(CTC) ₃	Monomórfico

Cliloi21	(TC) ₂ TG(TC) ₅	Polimórfico
Cliloi22	(TC) ₄	Monomórfico
Cliloi23	(AAC) ₂ AAG(AAC) ₁	Monomórfico
Cliloi26	(AAT) ₃	Monomórfico
Cliloi28	(CT) ₄	Monomórfico
Cliloi29	(TG) ₁₁	Polimórfico
Cliloi32	(AT) ₅	Não amplificou
Cliloi35	(CT) ₄	Monomórfico
Cliloi36	(AAT) ₅	Polimórfico
Cliloi40	(ATT) ₆ TTT(ATT) ₁	Monomórfico
Cliloi50	(CTC) ₄	Monomórfico
Cliloi63	(TA) ₇	Monomórfico
Cliloi64	(ATAC) ₃ (AT) ₄ AC(AT) ₃	Monomórfico
Cliloi68	(TA) ₄	Não amplificou
Cliloi69	(AAT) ₃	Monomórfico
Cliloi73	(TC) ₅	Não amplificou
Cliloi83	(AT) ₅	Não amplificou
Cliloi91	(TTTC) ₃	Monomórfico
Cliloi95	(AG) ₄ (GGC) ₂	Não amplificou
Cliloi96	(AC) ₈ (AT) ₉	Monomórfico

O loco Cliloi09 apresentou duas regiões repetitivas na mesma sequência, e foi possível desenhar dois iniciadores para cada uma delas. Por isso foram denominadas como Cliloi09a e Cliloi09b.

Em relação aos motivos repetitivos encontrados nas regiões microssatélites, foram observados 12 sequências de dinucleotídeos, nove trinucleotídeos, um tetranucleotídeo e duas sequências combinadas. Para a espécie *Swietenia macrophylla* foram desenvolvidos 10 locos microssatélites de sequências perfeitas consistente de 18 a 24 repetições dinucleotídicas AG (LEMES; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2002).

Quanto ao tipo de produtos amplificados pelos 26 pares de iniciadores desenhados, 17 apresentaram bandas monomórficas, quatro foram polimórficos e cinco iniciadores não amplificaram nenhum produto. Na figura 6 podem observar-se os produtos de amplificação visíveis de três iniciadores (Cliloi09b, Cliloi12 e Cliloi64), quando testados com 12 indivíduos diferentes de *C. lilloi* sob uma gradiente de temperatura.

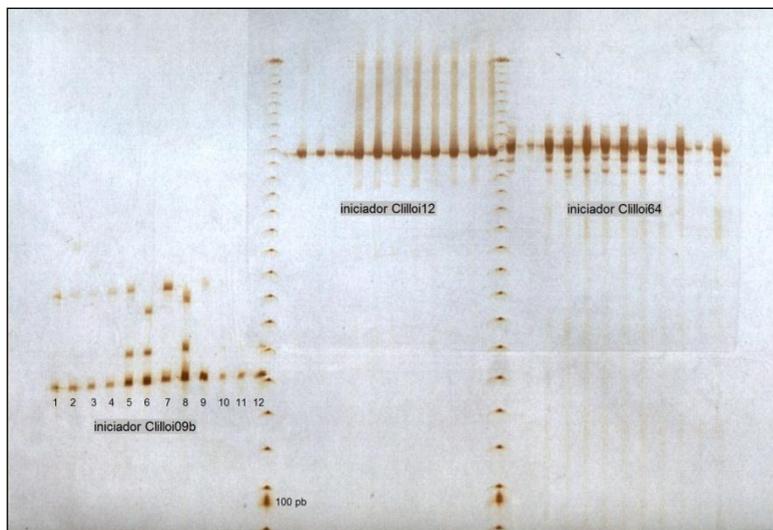


Figura 6. Gel de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata. Foi testada a temperatura de anelamento ideal em 12 indivíduos de *C. lilloi* para os iniciadores Cliloi09b, Cliloi12 e Cliloi64. Somente o iniciador Cliloi09b apresentou polimorfismo entre as temperaturas 50,2°C (linha nº 5) e 53,4°C (linha nº 8). O ladder utilizado foi de 10 pb (Invitrogen).

Os números 1 a 12 indicam uma temperatura diferente, sendo o 1 = 48°C e 12 = 56,4°C. No caso do iniciador Cliloi09b, foi observada uma amplificação polimórfica entre as linhas nº 5 e nº 8, as quais corresponderam às temperaturas de anelamento de 50,2°C e 53,4°C, respectivamente. Os iniciadores Cliloi12 e Cliloi64 foram monomórficos em todas as temperaturas testadas.

Este procedimento foi repetido para todos os iniciadores. Finalmente, os quatro que apresentaram produtos de amplificação visíveis e polimórficos (Cliloi09b, Cliloi21, Cliloi29 e Cliloi36) foram selecionados para próxima fase da caracterização.

No curso de desenvolvimento de marcadores microssatélites realizado na ESALQ, foram enriquecidas as bibliotecas genômicas de muitas espécies vegetais. Depois foi confirmado que todas essas bibliotecas, inclusive a de *C. lilloi*, tiveram uma baixa porcentagem de seqüências repetitivas. Por essa razão foi repetido o processo de

enriquecimento das bibliotecas genômicas, visando à obtenção de melhores sequências repetitivas. Finalizado este procedimento, os professores do curso informaram que as porcentagens de sequências microssatélites aumentaram substancialmente em todas as espécies avaliadas.

No LFDGV foram extraídos e sequenciados o DNA plasmidial de 162 novos clones de *C. lilloi*. Foi encontrado um total de 11 sequências com microssatélites, das quais 10 foram perfeitas e uma composta. Quanto aos motivos repetitivos, foram observados sete sequências de dinucleotídeos, três de trinucleotídeos e uma tetranucleotídea. Os 11 iniciadores desenhados amplificaram produtos monomórficos de tamanho esperado (Tabela 2).

Tabela 2. Motivos repetitivos dos 11 locos microssatélites desenhados para *C. lilloi* a partir de 162 clones sequenciados no LFDGV e seus correspondentes produtos de amplificação.

Locos	Motivo repetitivo	Produtos de amplificação
Cliloi111	(GCT) ₄	Monomórfico
Cliloi113	(TC) ₁₂ (CA) ₆	Monomórfico
Cliloi132	(CT) ₈	Monomórfico
Cliloi148	(TGAT) ₃	Monomórfico
Cliloi166	(TG) ₈	Monomórfico
Cliloi173	(TG) ₇	Monomórfico
Cliloi206	(TTA) ₅	Monomórfico
Cliloi214	(GA) ₆	Monomórfico
Cliloi220	(AAG) ₅	Monomórfico
Cliloi249	(TG) ₆	Monomórfico
Cliloi256	(AG) ₁₅	Monomórfico

Neste re-enriquecimento das bibliotecas genômicas foram desenhados menos da metade dos iniciadores do que feito no sequenciamento anterior (11 e 26 locos, respectivamente) porque os critérios de seleção dos locos foram mais rigorosos. Desta vez, foi realizada uma triagem mais exigente das características das regiões microssatélites, tendo em consideração um maior número de sequências repetitivas dinucleotídeas e preferencialmente perfeitas (BAJAY, 2009).

Com estas novas exigências, tentou-se incrementar as chances de encontrar mais locos polimórficos do que observado anteriormente.

Contudo, o resultado não foi satisfatório já que os 11 locos amplificaram produtos monomórficos. Assim, pode-se levantar a hipótese de que a baixa eficiência na obtenção de locos polimórficos seja explicada por uma característica biológica inerente da espécie e não por problemas técnicos associados à metodologia de desenvolvimento dos microssatélites.

Embora tenham sido sequenciados em total 258 clones, a porcentagem total de sequências microssatélites observadas foi muito baixa (14%). Similares resultados foram observados para *Carapa guianensis* (Meliaceae) onde sequenciaram 189 clones e obtiveram 19 regiões microssatélites (10%) aptas para o desenho de iniciadores (VINSON et al., 2005). Finalmente esses autores conseguiram somente cinco iniciadores com um polimorfismo médio de 4,2 alelos por loco. Por outro lado, Hernández et al. (2007) sequenciaram 200 clones de *Cedrela odorata* e obtiveram 160 sequências repetitivas de microssatélites (80%). Dentro do mesmo gênero, Gandara (2009) sequenciou 168 clones em *C. fissilis* e desenhou iniciadores para 83 sequências de microssatélites (49,4%). Trabalhando com outra espécie da família Meliaceae, White e Powell (1997a) sequenciaram 60 clones em *Swietenia humilis* e encontraram 41 regiões repetitivas (68%) aptas para o desenho de iniciadores. Em outra espécie do mesmo gênero, *S. macrophylla*, foram sequenciados 126 clones e obtiveram 43 sequências de microssatélites (34%) com boas características para o desenho de iniciadores específicos (LEMES; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2002). Na espécie *Acca sellowiana* (Myrtaceae), Santos et al. (2008) conseguiram sequenciar 98 clones, dos quais 56% continham sequências repetitivas.

2.5.3. Caracterização e transferibilidade de iniciadores microssatélites

Em função do baixo número de iniciadores polimórficos desenvolvidos para *C. lilloi*, a alternativa para completar a quantidade mínima requerida de oito locos, foi considerar a transferibilidade de iniciadores microssatélites. Foram testados seis iniciadores polimórficos transferidos com sucesso por Inza et al. (2007) para a espécie *C. lilloi* (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados da transferibilidade de marcadores microssatélites desenvolvidos em quatro espécies diferentes da família Meliaceae e que foram testados em *C. lilloi*.

Espécies de desenvol. dos SSRs	Total SSRs	Não Amp.	Resol. Insatisf.	Mono mórf.	Polimórf.	Ref.
<i>Swietenia humilis</i>	8	5	1	2	0	White e Powell (1997)
<i>S. macrophylla</i>	10	6	1	2	Sm51 (1)	Lemes et al. (2002)
<i>Cedrela fissilis</i>	9	3	1	4	CF66 (1)	Gandara (2009)
<i>C. odorata</i>	9	0	5	0	Ced2, Ced41, Ced54, Ced65 (4)	Hernández et al. (2007)
	36	14	8	8	6	

Fonte: Inza et al. (1997), com modificações.

Para cada um deles foi ajustada a temperatura de anelamento mediante uma gradiente de temperatura como já foi descrito. Depois de analisar e confirmar o nível de polimorfismo dos seis locos, foram selecionados cinco iniciadores que apresentaram produtos de amplificação com resolução satisfatória. Os mesmos consistiram do iniciador CF66 desenvolvido para *Cedrela fissilis* Vell. por Gandara (2009), o iniciador Sm51 desenvolvido para *Swietenia macrophylla* King por Lemes, Brondani e Grattapaglia (2002) e os iniciadores Ced2, Ced54 e Ced65 desenvolvidos para *Cedrela odorata* L. por Hernández et al. (2007).

Dos quatro locos polimórficos desenvolvidos para *C. lilloi*, o loco Clilloi21 foi finalmente descartado porque apresentou somente dois alelos em 16 indivíduos.

A Tabela 4 apresenta uma caracterização dos oito iniciadores utilizados neste trabalho, três desenvolvidos para *C. lilloi* e cinco transferidos, testados entre 47 e 50 indivíduos provenientes de uma população natural (Parque Nacional Baritú).

O número de alelos por loco variou de quatro, manifestados pelos locos Clilloi36, Sm51 e CF66, a nove, revelados pelo loco Clilloi09b. A média de alelos por loco foi de 5,25. As estimativas dos valores de heterozigidade observada (H_o) variaram de 0,191 (Clilloi29) a 0,633

(Ced65), apresentando uma média de 0,488. As estimativas dos valores de heterozigosidade esperada (H_e) variaram de 0,214 (Cliloi29) a 0,713 (Cliloi09b), com média de 0,508.

Quatro locos apresentaram um valor de H_o superior ao esperado no equilíbrio de Hardy-Weinberg (Sm51, CF66 Ced2 e Ced54), gerando um valor negativo do índice de fixação (F) e indicando um excesso de heterozigotos nestes locos. Os restantes quatro locos manifestaram uma maior proporção de heterozigosidade esperada em relação ao observado. Isso ocasionou valores positivos do F , revelando um déficit de indivíduos heterozigotos para os locos Cliloi09b, Cliloi29, Cliloi36 e Ced65.

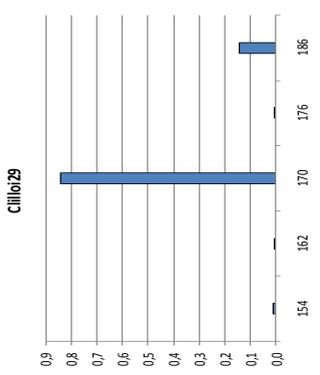
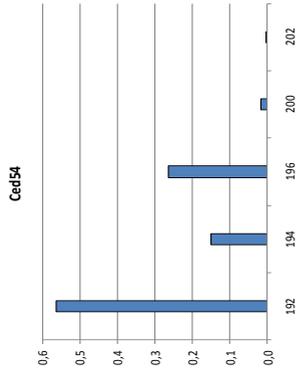
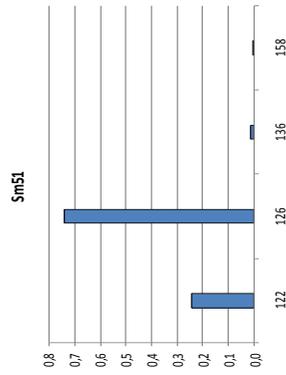
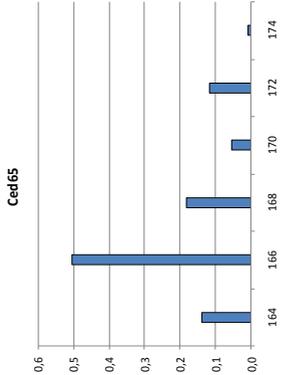
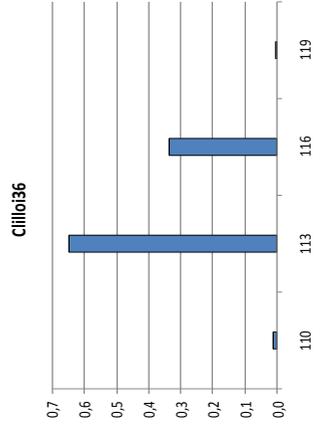
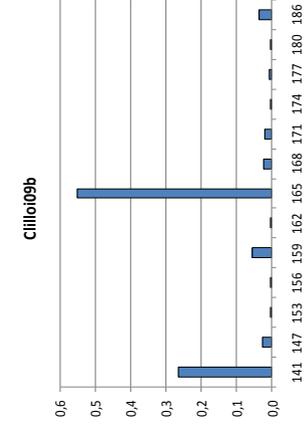
Três dos oito locos (Cliloi09b, CF66 e Ced65) amplificaram duas regiões simultaneamente, sendo uma delas monomórfica e de tamanho inferior às bandas polimórficas.

O padrão de distribuição de frequências alélica de todos os locos analisados não foi uniforme (Figura 7). Muitos alelos tiveram uma frequência alta, e alguns acima de 0,7 como nos locos Cliloi29, CF66, Sm51 e Ced2.

Tabela 4. Índices de diversidade genética para três locos microsatélites desenvolvidos e cinco transferidos para *Cedrela tilioi*, testados em indivíduos provenientes de uma população natural (Parque Nacional Barittu).

Locos	Motivo repetitivo	Sequência dos iniciadores (5' - 3')	Ta (°C)	Tamanho dos fragmentos (pb)	N	A	Ho	He	F
Cillloi09b	(TAT)3	F: CCGCAACTCCAATCTTTTGG R: GATAATGAGGTGGTGCCAGAG	52	141 – 86	48	9	0,625	0,713	0,124
Cillloi29	(TG)11	F: TCCTTAGGGTTTTAGAGCAATC R: GCAAAAGGAAITGTCATGG	52	154 – 84	447	5	0,191	0,214	0,106
Cillloi36	(AAT)5	F: AAGAGCTGCCCTTTTGGTTG R: GGTCGGTGAAGAGATAAGCAA	60	110 – 19	448	4	0,417	0,491	0,151
Sms51	(AG)22	F: GCAATTCAGAAAGAAACC R: CTGTAGGCGATAACAATCAG	50	122 – 58	448	4	0,417	0,404	-0,031
CF66	(AG)n	F: CAGCAGTTCTGAAACAGTAA R: ATTCAGCAACTTGAGAGC	50	198 – 12	550	4	0,38	0,358	-0,061
Ced2	(GA)20	F: TTTGGCTTTGAGAAACCTTGT R: AACTTTCGAAITGGTTAAGG	50	142 – 54	448	6	0,625	0,619	-0,009
Ced54	(GA)15(A)6 G(GA)5	F: GATCTACCCACTTGAAAAA R: GCTCATATTTGAGAGGCCAAT	45	192 – 02	550	5	0,62	0,617	-0,005
Ced65	(GA)7(CA)14	F: GAGTGAGAAAGAAATCGTGATAGC R: GAGGTTGCATCAGGTCCTTGG	45	166 – 74	449	5	0,633	0,646	0,021
Média						5,25	0,488	0,508	0,037
DS						1,67	0,163	0,171	0,08

Caracterização de oito locos microsatélites mostrando o nome dos locos, motivo repetitivo e as respectivas sequências F (*Forward*) e R (*Reverse*) dos iniciadores. Temperatura de anelamento otimizada (Ta), amplitudes alélicas (pb), número de amostras (N), número de alelos (A), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He) e coeficiente de endogamia (F). DS: desvio padrão.



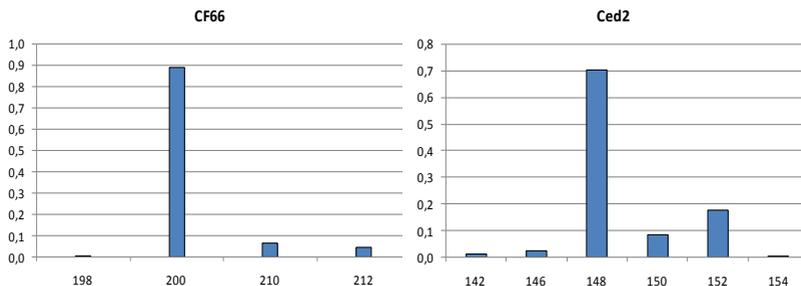


Figura 7. Distribuição de frequências alélicas dos oito locos microssatélites estimados em 140 indivíduos de *Cedrela lilloi*. Eixo X: tamanho dos alelos em pares de base; Eixo Y: frequência alélica.

Comparando a magnitude dos tamanhos dos alelos (pb) de cada loco transferido em relação à distribuição na espécie em que foi desenvolvida, encontrou-se que os alelos observados nos locos Sm51, Ced2 e Ced65 localizaram-se no extremo esquerdo da distribuição alélica do loco original. No entanto, os alelos do loco CF66 apareceram preferencialmente do lado direito da cauda da distribuição de alelos do loco original. Por último, os alelos do loco Ced54 foram vistos no meio da distribuição original.

Em alguns locos foram observados vários alelos de baixa frequência ($<0,05$), os quais foram considerados como alelos raros.

Geralmente, a taxa de amplificação diminui na medida em que aumenta a divergência genética entre as duas espécies (OLIVEIRA et al., 2006). Por exemplo, dentro da família *Myrtaceae*, Zucchi et al. (2002) transferiram 346 locos microssatélites desenvolvidos em espécies de *Eucalyptus* para o gênero *Eugenia*, e encontraram que 10 iniciadores (2,9%) amplificaram locos polimórficos, 30% deles exibiram ampliações inespecíficas e 67,2% dos iniciadores não amplificaram nenhum produto. No presente estudo, todos os locos que foram transferidos de outras espécies para *C. lilloi* amplificaram produtos com baixo polimorfismo. Este fato poderia estar vinculado aos resultados encontrados por Muellner, Pennington e Chase (2009) onde estabelecem que *C. lilloi* é uma espécie evolutivamente distante das outras espécies da família Meliaceae. Na transferibilidade, a chance de amplificar

exitosamente uma sequência de DNA heterólogo (espécie alvo) está inversamente relacionado com a distância evolutiva entre as duas espécies (JARNE; LAGODA, 1996).

Uma situação diferente aconteceu com espécies de *Tabebuia* (Bignoniaceae). Quando foram transferidos 10 locos microssatélites de *T. aurea* para *T. roseo-alba*, nove amplificaram produtos com polimorfismo de entre cinco e 13 alelos por loco (FERES et al., 2009).

Ellegren, Primmer e Sheldon (1995 apud GOLDSTEIN; POLLOCK, 1997) indicaram que as variações polimórficas encontradas entre as espécies envolvidas na transferibilidade podem ser explicadas devido ao viés de verificação: no desenvolvimento de microssatélites em uma espécie tendem a serem selecionados os locos mais polimórficos ou compridos. Devido a que tamanho e polimorfismo de um microssatélite estão positivamente correlacionados, a soma destas características resulta em locos mais polimórficos do que a média. Então, o elevado grau de polimorfismo detectado em uma espécie pode não ser encontrado no correspondente loco de outra espécie após a transferibilidade, como foi observado neste trabalho. Ainda mais, apesar de ser uns dos locos mais informativos, Cliloi09b foi desenhado a partir de uma sequência repetitiva muito curta (TAT)₃. Este fato é uma contradição, pois Goldstein e Pollock (1997) mencionam que o comprimento das repetições está correlacionado positivamente com a variabilidade esperada.

Na transferibilidade de locos de *Arabidopsis thaliana* para o gênero aparentado *Arabis*, cerca de 50% dos locos amplificaram produtos polimórficos. Porém, depois de analisar as sequências microssatélites de *Arabis*, foi encontrado que havia grandes diferenças no número de repetições, eram mais curtas em relação às sequências de *Arabidopsis*. Com isto, nas espécies que foram transferidos os locos, o nível de variabilidade era muito menor (VAN TREUREN et al., 1997).

2.6. Conclusões

Somente foi possível desenvolver três locos polimórficos para *C. lilloi*, desenhados a partir de 37 sequências microssatélites obtidas após sequenciar 258 clones.

Foi constatado pelos professores da ESALQ que o re-enriquecimento das bibliotecas genômicas de todas as espécies vegetais envolvidas no desenvolvimento de microssatélites nesta Instituição, conseguiram ótimas sequências repetitivas, exceto *C. lilloi*. Com isso,

fica rejeitada a possibilidade de uma falência no protocolo aplicado como provável causa do baixo número de microssatélites observado.

Por tanto, deve-se incrementar o número de clones a sequenciar para garantir uma maior cobertura do genoma de *C. lilloi* e aumentar as chances de conseguir boas sequências de microssatélites.

A transferibilidade de iniciadores entre espécies relacionadas é uma ferramenta útil quando não se conhece a priori o genoma da espécie alvo. Neste trabalho foi contemplada essa característica para cobrir a falta de iniciadores específicos. Na análise preliminar, estes iniciadores heterólogos demonstraram um nível de polimorfismo muito baixo em comparação às espécies originais.

3. ESTIMATIVAS DE DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA

Os objetivos da presente seção foram: a) estimar a diversidade genética de três populações naturais de *C. lilloi* e b) analisar a sua estrutura genética.

3.1. Materiais e Métodos

3.1.1. Locais de coleta e preparo do material

Foram selecionados três locais de coleta separadas mais de 50 km entre elas, são os seguintes (Figura 8):

El Siambón. Está localizado na província de Tucumán, Departamento de Tafí Viejo, (Latitude S 26°41' - Longitude O 65°27') a uma altitude de 1400 m e trata-se de uma propriedade que pertence aos monges da Ordem Beneditina. Segundo os registros, a última exploração de cedro neste local foi realizada há uns 40 anos atrás. Embora o estado sucessional ecológico destas populações seja avançado, existem também clareiras com presença de gado bovino. Por isso, Inza (2010) classificou a estas populações de cedro como sendo perturbadas.

San Andrés. Está localizado na província de Salta, Departamento de Orán, (Latitude S 23°04' - Longitude O 64°50') a uma altitude de 1700 m. Este Bosque Montano de 21.250 hectares pertence atualmente a uma comunidade de aborígenes e a exploração de madeiras é considerada mínima, só com fins de uso doméstico. Neste caso, Inza (2010) classificou estas populações como pouca perturbada.

Baritú. Está localizado também na província de Salta, Departamento Santa Victoria, (Latitude S 22°29' - Longitude O 64°44') a uma altitude de 1620 m e é um Parque Nacional com uma superfície de aproximadamente 72.500 hectares. Desde sua criação, no ano 1974, não foi registrado nenhum tipo de exploração florestal. Porém, esse período de tempo estima-se maior porque muitos lugares provavelmente são praticamente inacessíveis devido a sua topografia montanhosa. Estas populações de cedro têm sido classificadas por Inza (2010) como não perturbadas.

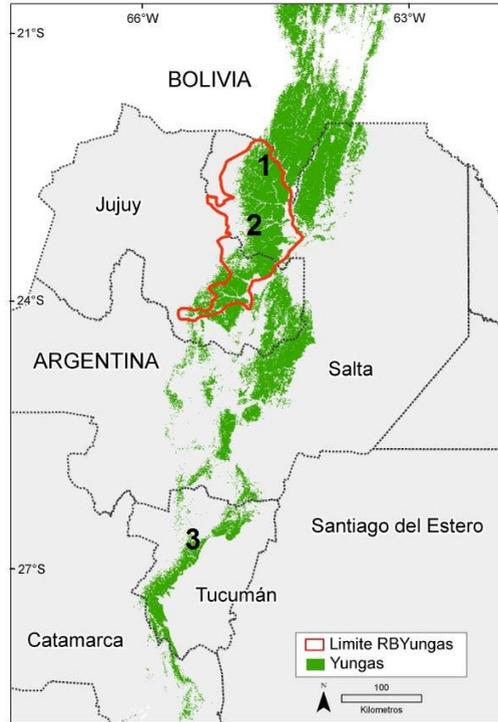


Figura 8. Mapa da Selva de Yungas mostrando os pontos de coleta de cada população. Nº 1: Baritú, Nº 2: San Andrés, Nº 3: El Siambón. A área marcada em linha vermelha corresponde ao limite da Reserva Biosfera de Yungas. Fonte: (BROWN; MALIZIA; LOMÁSCOLO, 2006).

Foram colhidas amostras de folhas de 50 árvores adultas de *C. lilloi* das populações de Baritú e San Andrés, e de 40 indivíduos em El Siambón. Para evitar a coleta de plantas aparentadas, cada amostra foi colhida a uma distancia mínima de 100 m entre plantas e acondicionadas em sacos plásticos como descrito no capítulo 1. Foram trazidas até o LFDGV somente as folhas das amostras da população de Baritú. O material vegetal das populações de San Andrés e El Siambón foi recepcionado e processado no Laboratório de Marcadores Moleculares do Instituto de Recursos Biológicos do INTA Castelar (Buenos Aires), a cargo da Dr. Noga Zelener. As amostras foram maceradas com auxílio do aparelho *TissueLyser* (Qiagen) e enviadas para o LFDGV em tubos

de 2 ml, onde em seguida foi extraído o DNA genômico segundo a metodologia descrita no capítulo 1.

A quantificação do DNA foi feita no espectrofotômetro NanoDrop1000 (Thermo Scientific) e todas as amostras foram diluídas para 5 ng/μl para serem utilizadas nas reações de PCR.

3.1.2. Amplificação do DNA e detecção dos produtos

Para analisar a diversidade e estrutura genética das três populações, foram utilizados os seguintes locos microssatélites, descritos na Tabela 5:

Tabela 5. Locos microssatélites utilizados para analisar as três populações de *C. lilloi*. Apresentam-se as respectivas temperaturas de anelamento (Ta) e amplitude alélica em pares de bases (pb).

Locos	Ta (°C)	Tamanho dos fragmentos (pb)
Clilloi09b	52	141 – 186
Clilloi29	52	154 – 184
Clilloi36	60	110 – 119
Sm51	50	122 – 158
CF66	50	198 – 212
Ced2	50	142 – 154
Ced54	45	192 – 202
Ced65	45	166 – 174

A reação de amplificação via PCR foi composta de 4,46 μl de água MilliQ; 1,3 μl de tampão 10X; 1,04 μl de dNTPs (2,5 mM); 1 μl de MgCl₂ (25 mM); 0,2 μl de *Taq* polimerase (5U); 1 μl de cada iniciador (3 μM) e 3 μl de DNA (5 ng/μl), em um volume final de 13 μl. As reações foram montadas em placas de 96 poços e amplificadas em aparelho termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf) nas seguintes condições: 94°C por 3 min seguidos por 30 ciclos de 94°C por 1 min, temperatura específica de cada iniciador por 1 min, 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 7 min.

Os produtos da amplificação foram submetidos a gel desnaturante de poliacrilamida 4% em cuba vertical, corridos durante 1 h a 55 W e corado com nitrato de prata (CRESTE; TULMANN-NETO; FIGUEIRA, 2001). Os tamanhos dos fragmentos foram estimados por comparação

com padrões obtidos com DNA *ladder* 10 bp (Invitrogen). As leituras dos géis foram realizadas logo após a secagem dos mesmos e escaneados para documentação dos resultados.

3.2. Análises dos dados

A partir dos dados gerados foi estimada a diversidade e estrutura genética das populações por meio dos seguintes parâmetros: frequências alélicas, heterozigotidade observada (H_o) e esperada (H_e) (NEI, 1978), número de alelos por loco (A), número efetivo de alelos (A_e), os índices de fixação de Wright (1951, 1965): estatísticas F_{IS} que mostra a deficiência ou excesso de indivíduos heterozigotos em cada população, o F_{IT} que exhibe essa informação no contexto da média do grupo populacional e o F_{ST} que mede a diferenciação genética entre as populações, foram calculados através dos estimadores f , F e θ de Weir e Cockerham (1984), respectivamente. Todavia, foi calculado a estatística G_{ST} de Nei (1973), uma estimativa do F_{ST} para locos multialélicos e o G'_{ST} (HEDRICK, 2005), uma medida padronizada da diferenciação genética. Estas estimativas foram obtidas com auxílio do programa Fstat 2.9.3.2 (GOUDET, 2002) e GenAlex 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). A aderência das frequências gênicas e genotípicas de cada loco às esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificada por meio do Teste Exato de Fisher. Para esta análise e para o cálculo das distâncias genéticas foi utilizado o programa TFPGA 1.3 (MILLER, 1997). Para determinar a presença de alelos nulos ou erros na genotipagem foi utilizado o programa Micro-Checker (Van OOSTERHOUT et al., 2004).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Diversidade genética

A análise da diversidade genética populacional pode desviar-se das proporções dadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) por causa de vários erros durante a genotipagem, por exemplo: dominância de alelos de menor tamanho, bandas fantasmas (“*stuttering*”) causada pela enzima *Taq* polimerase durante a amplificação, e alelos nulos (van OOSTERHOUT et al., 2004). Estas falhas na leitura dos produtos de amplificação podem provocar uma deficiência ou excesso na estimação de genótipos particulares.

Para detectar a presença de alelos nulos foram realizadas 1000 reamostragens dos genótipos com um nível de significância de 95%.

Quando se utilizam iniciadores heterólogos (transferidos de outras espécies) é muito provável encontrar na espécie alvo, altas incidências de alelos nulos ou frequências genotípicas diferentes das esperadas no EHW (ROBINSON; HARRIS, 1999). Contudo, na presente análise não foi observado um desvio estatisticamente significativo entre ambos os valores de homozigotos observados e esperados. Portanto, foi descartada a presença de alelos nulos e também de outros erros de genotipagem nos oito locos polimórficos usados para analisar as três populações.

A porcentagem de locos polimórficos (P) nas três populações foi 100%. No presente estudo considera-se como um loco polimórfico aquele em que a frequência do alelo mais comum não ultrapassa 99%.

Outro aspecto considerado na análise genética foi o desequilíbrio de ligação. Com auxílio do programa Fstat foi testada a significância da associação entre pares de locos em cada amostra por meio do estatístico G. Os genótipos dos dois locos são associados aleatoriamente muitas vezes e o estatístico é re-calculado sobre esses dados para gerar o valor P do teste. Para um nível de significância de 5%, o número de permutações para cada par de locos que o programa realiza é $[20 \times 3 \text{ populações} \times 8 \text{ locos} \times (8-1)/2] = 1680$ permutações. Finalmente, o Fstat utiliza a correção de Bonferroni para ajustar o nível de significância 5% em função do número de testes a serem realizados. Portanto, o valor P limite para considerar dois locos como em desequilíbrio de ligação é $[0,05/(28 \text{ pares de locos} \times 3 \text{ populações})] = 0,000595$. Isto significa que cada valor P gerado para cada combinação de locos deve ser comparado com 0,000595 e não com 0,05 para definir a significância do teste.

Depois de avaliar as 28 possíveis combinações de locos nas três populações, nenhum dos pares de locos analisados estava em desequilíbrio de ligação (todos os valores P são maiores do que 0,000595). Assim, é possível inferir que todos os pares estão em equilíbrio de ligação (Apêndice A). Isto indica que todos os locos estão localizados em cromossomos diferentes ou suficientemente afastados um do outro de modo tal que as probabilidades de uma combinação ocorrer em um indivíduo é igual ou menor do que 0,0595%. Esta informação é relevante, pois o equilíbrio de ligação garante a transmissão independente e mendeliana dos locos através das gerações. Caso contrário, é necessário excluir tais locos das análises.

As estimativas de diversidade genética foram analisadas com base em 36 a 40 indivíduos na população El Siambón e entre 47 e 50 indivíduos nas populações de Baritú e San Andrés (Tabela 6). O presente estudo é considerado inédito para *C. lilloi* ao demonstrar

valores preliminares da sua diversidade genética usando marcador microsatélite em três populações naturais da Argentina.

Os valores médios totais de heterozigidade observada (H_o) e esperada (H_e), foram de 0,406 e 0,416, respectivamente. O índice de fixação médio total ($F_{IS}=0,037$) não manifestou valores significativamente diferentes de zero. Estes resultados sugerem ocorrência de cruzamentos aleatórios dentro das populações. A menor heterozigidade observada na população El Siambón ($H_o = 0,315$) em relação às outras duas poderia estar vinculada ao histórico de distúrbios do ecossistema florestal dessa região. Esta população também apresentou o menor número médio de alelos por loco (2,75).

Tabela 6. Análise da diversidade genética para três populações de *Cedrela lilloi* obtidos a partir de oito locos microsatélites.

População	Locos	N	A	Ae	Ho	He	F _{IS}	EHW
Baritú	Clilloi09b	48	9	3,49	0,625	0,713	0,124	*
	Clilloi29	47	5	1,27	0,191	0,214	0,106	*
	Clilloi36	48	4	1,96	0,417	0,491	0,151	*
	Sm51	48	4	1,68	0,417	0,404	-0,031	**
	CF66	50	4	1,56	0,380	0,358	-0,061	**
	Ced2	48	6	2,63	0,625	0,619	-0,009	*
	Ced54	50	5	2,61	0,620	0,617	-0,005	**
	Ced65	49	5	2,83	0,633	0,646	0,021	ns
	Média	48,5	5,25	2,25	0,488	0,508	0,037	
DS	1,07	1,67	0,76	0,163	0,171	0,079		
El Siambón	Clilloi09b	39	5	1,73	0,308	0,422	0,271	*
	Clilloi29	39	2	1,29	0,256	0,224	-0,147	ns
	Clilloi36	38	3	2,03	0,553	0,508	-0,087	ns
	Sm51	40	2	1,78	0,450	0,439	-0,026	ns
	CF66	40	2	1,03	0,025	0,025	0,000	ns
	Ced2	36	2	1,46	0,278	0,313	0,113	ns
	Ced54	40	2	1,83	0,400	0,455	0,121	ns
	Ced65	40	4	1,29	0,250	0,227	-0,100	ns
	Média	39	2,75	1,56	0,315	0,327	0,017	

	DS	1,41	1,16	0,34	0,158	0,162	0,141	
San Andrés	Cliloi09b	49	10	2,59	0,612	0,614	0,002	ns
	Cliloi29	49	2	1,51	0,429	0,337	-0,273	ns
	Cliloi36	47	2	1,67	0,298	0,400	0,256	ns
	Sm51	49	2	1,48	0,408	0,325	-0,256	ns
	CF66	49	2	1,18	0,163	0,150	-0,089	ns
	Ced2	47	4	1,61	0,404	0,377	-0,071	ns
	Ced54	49	4	1,59	0,388	0,373	-0,041	ns
	Ced65	49	5	3,92	0,612	0,745	0,178	**
	Média	48,5	3,88	1,94	0,414	0,415	-0,037	
	DS	0,93	2,75	0,90	0,149	0,184	0,186	
<hr/>								
MÉDIA TOTAL	45,33	3,96	1,92	0,406	0,416	0,006		
SE	0,96	0,44	0,15	0,034	0,037	0,108		

N: número de indivíduos analisados; A: número de alelos por loco; Ae: número efetivo de alelos por loco; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; F_{IS} : coeficiente de endogamia. EHW: significância do Teste Exato para verificar estado em equilíbrio Hardy-Weinberg. ns = não significativo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$.

Para analisar a adesão das frequências genotípicas observadas às esperadas no EHW para locos multialélicos, o programa TFGPA utiliza o método Monte Carlo para dar uma aproximação do valor probabilístico verdadeiro. Foram construídas aleatoriamente novas frequências alélicas a partir dos dados originais e depois as probabilidades foram comparadas com os dados observados nas amostras. Foram realizadas 10.000 permutações por loco e a significância dos valores observados foi determinada como sendo a probabilidade de encontrar um valor p igual o menor do que 0,05.

Considerando os oito locos microssatélites analisados em 140 indivíduos, observou-se um total de 47 alelos, ranqueando de 110 pb a 212 pb. O loco que apresentou maior quantidade de alelos foi o Cliloi09b, com 13 alelos, e os locos com menor quantidade de alelos foram o Cliloi36, Sm51 e CF66, cada um com quatro alelos.

O número de alelos por loco (A) ou diversidade alélica em todos os indivíduos, variou entre dois e 10 (média de 3,96 por loco), sendo que o loco Cliloi09b apresentou o maior número de alelos nas três populações. Este valor é muito inferior ao encontrado em outras espécies de *Cedrela*. Em *C. odorata*, Hernández (2007) observou uma média de 21 alelos em nove locos; no entanto, em *C. fissilis* foi encontrado uma média de 14,6 alelos em oito locos quando analisados em 150 indivíduos (GANDARA, 2009). Em outras espécies da família Meliaceae também foram observados entre 10 e 15 alelos por loco (WHITE; POWELL, 1997a; LEMES; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 2002). Na mirtácea *Acca sellowiana* foram selecionados 13 iniciadores que amplificaram produtos polimórficos com uma média de 8,8 alelos por loco (SANTOS et al., 2008). Possivelmente a diferença respeito a *C. lilloi* no número de alelos por loco esteja vinculada ao uso de vários locos transferidos de outras espécies. A amplificação de locos homólogos em diferentes espécies geralmente produz um maior polimorfismo e alelos de maior tamanho na espécie na qual foram desenvolvidos e caracterizados os microssatélites do que na espécie transferida (JARNE; LAGODA, 1996).

A média de alelos por loco por população foi de 5,25 para Baritú, 3,88 para San Andrés e 2,75 para El Siambón. No entanto, esses valores para o número de alelos efetivo por loco (A_e) por população foram 2,25; 1,94 e 1,56, respectivamente. A medida A_e pondera a frequência do alelo mais comum, já que os alelos raros ($p \leq 0,05$) contribuem pouco na estimação da diversidade porque não estão presentes em todas as populações (BERG; HAMRICK, 1997). Por exemplo, na população de San Andrés, o loco Cliloi09b apresentou 10 alelos, porém o A_e foi de 2,59, indicando que vários alelos desse loco tiveram uma frequência inferior a 5% (Tabela 7). Esses alelos são conhecidos como alelos raros de uma população. No entanto, os alelos exclusivos ou privados, são os que somente ocorrem em uma população.

Tabela 7. Frequências alélicas dos oito locos microssatélites nas três populações.

Loco	Al. (pb)	B	S	A	Loco	Al. (pb)	B	S	A
Cillioi09b	N	48	39	49		136	0,031	--	--
	141	0,323	0,205	0,255		158	0,010	--	--
	147	0,052	--	0,020	CF66	N	50	40	49
	153	0,010	--	--		198	0,010	--	--
	156	0,010	--	--		200	0,780	0,988	0,918
	159	0,146	--	0,010		210	0,180	--	--
	162	--	--	0,010		212	0,030	0,013	0,082
	165	0,396	0,731	0,561		Ced2	N	48	36
	168	--	0,038	0,031	142		0,031	--	--
	171	0,021	0,013	0,020	146		0,031	--	0,032
	174	0,010	--	--	148		0,552	0,806	0,777
	177	--	--	0,020	150		0,146	--	0,085
	180	--	--	0,010	152		0,229	0,194	0,106
	186	0,031	0,013	0,061	154		0,010	--	--
Cillioi29	N	47	39	49	Ced54	N	50	40	49
	154	0,021	--	--		192	0,530	0,350	0,776
	162	0,011	--	--		194	0,270	--	0,153
	170	0,883	0,872	0,786		196	0,170	0,650	0,041
	176	0,011	--	--		200	0,020	--	0,031
	186	0,074	0,128	0,214		202	0,010	--	--
Cillioi36	N	48	38	47	Ced65	N	49	40	49
	110	0,031	--	--		164	--	0,075	0,327
	113	0,635	0,579	0,723		166	0,418	0,875	0,286
	116	0,323	0,421	0,277		168	0,408	0,038	0,071

	119	0,010	--	--		170	0,071	--	0,082
Sm51	N	48	40	49		172	0,082	0,013	0,235
		122	0,219	0,325	0,204		174	0,020	--
		126	0,740	0,675	0,796				

B = Baritú, S = El Siambón, A = San Andrés, N = número de indivíduos. Frequências alélicas em negrita indicam alelos exclusivos.

Na população de Baritú foram observados em total 15 alelos exclusivos e na população de San Andrés foram encontrados três alelos em um só loco. O maior número de alelos privados encontrados nos indivíduos de Baritú provavelmente se deve ao fato deste grupo proceder de um local não perturbado, como é o caso de um Parque Nacional. Nesse sentido, na população El Siambón, considerada como perturbada, não foi constatada a presença de alelos raros ou exclusivos provavelmente porque já foram perdidos durante as explorações de cedro ou porque o número de indivíduos amostrados foi inferior as outras duas populações, e com isso diminuiu a probabilidade de encontrar alelos em baixa frequência. Céspedes et al. (2003) encontraram que a fragmentação da floresta não afetou grandemente a diversidade em *Swietenia macrophylla* tanto como a perda de alelos raros.

A figura 9 mostra que a população de San Andrés tem um valor de diversidade genética intermédio ($H_o=0,414$) e não significativo com as populações de Baritú ($H_o=0,488$) e El Siambón ($H_o=0,315$). Não obstante, Baritú e El Siambón apresentaram diferenças significativas. Este padrão de distribuição da variabilidade genética coincide com o padrão de ocorrência de *C. lilloi* nas Yungas no sentido Norte-Sul. Inza et al. (2008) analisaram a diversidade genética de *C. lilloi* em 12 populações distribuídas ao longo das Yungas por meio de 129 locos AFLP polimórficos e encontraram também que os níveis de diversidade genética e a porcentagem de locos polimórficos diminuíram em sentido Norte-Sul (0,254 – 0,073 e 86,8% - 22,8%, respectivamente). Na região norte das Yungas, os ecossistemas florestais encontram-se bastante preservados devido à existência de várias Reservas e Parques, os quais formam parte da Reserva Biosfera de Yungas (Figura 7). No entanto, na região central e sul da Selva de Yungas, a floresta apresenta-se em geral fragmentada e é muito comum observar a presença de bosques isolados de superfícies variadas. Então, o nível médio de heterozigosidade

observada nas três populações é decorrente ou está associada a esta degradação ambiental antrópica de menor a maior magnitude no sentido Norte-Sul.

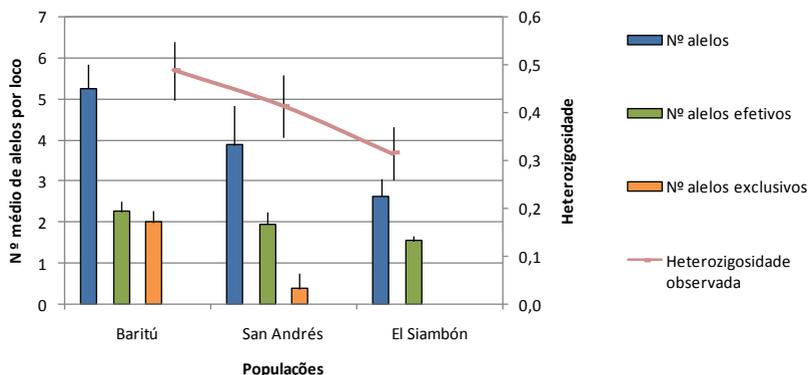


Figura 9. Distribuição do número médio de alelos e heterozigidade observada nas três populações. A barra representa o erro padrão.

3.3.2. Estrutura genética

As estatísticas F (F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}) foram calculadas a partir dos estimadores f , F e θ de Weir e Cockerham (1984), método baseado na análise de variância das frequências gênicas, com auxílio do programa Fstat (GOUDET, 2002). Os índices de fixação (F_{IS}) das três populações foram baixos em praticamente todos os locos, exceto para Cliloi09b e Cliloi36, sendo a média total de 0,035 (Tabela 8). Foram observadas estimativas moderadas dos coeficientes F_{IT} e F_{ST} para todos os locos, exceto para Ced54 e Ced65, os quais apresentaram valores elevados e similares entre si. Segundo White e Powell (1997a), a informação de alguns locos varia muito com respeito aos outros locos, indicando que as medidas de divergência populacional são dependentes do loco microssatélite selecionado.

Tabela 8. Estimativas dos valores de f , F e θ de Weir e Cockerham (1984) para as três populações considerando os oito locos microssatélites.

Loco	f (F_{IS})	F (F_{IT})	θ (F_{ST})
Cliloi09b	0,120	0,164	0,050
Cliloi29	-0,123	-0,098	0,022
Cliloi36	0,120	0,125	0,007
Sm51	-0,086	-0,075	0,010
CF66	-0,056	0,052	0,102
Ced2	0,007	0,058	0,052
Ced54	0,030	0,260	0,237
Ced65	0,092	0,303	0,232
Média	0,035	0,140	0,108
IC 95%*	-0,03 - 0,085	0,031 - 0,222	0,031 - 0,179

*Intervalo de confiança a 95% obtido por 15000 reamostragens (“bootstrap”) dos locos.

O nível médio de fixação de alelos dentro das populações ($F_{IS} = 0,035$) não é estatisticamente diferente do zero, indicando ausência de endogamia nos subgrupos. Este resultado indica que nas populações analisadas os cruzamentos entre indivíduos seriam ao acaso. Kageyama et al. (2003) consideraram a medida de índice de fixação como uns dos parâmetros mais importante na genética de populações já que permite medir o balanço entre homozigotos e heterozigotos nas populações.

Os valores médios de $F_{IT} = 0,140$ e $F_{ST} = 0,108$ são praticamente similares e moderadamente altos, o qual sugere que as populações estão estruturadas devido provavelmente à deriva genética. Kageyama et al. (op cit.) observaram um F_{IT} de 0,246 para *Cedrela fissilis* e adjudicaram esse valor à mesma causa. Gandara (2009) também encontrou elevados valores da mesma estimativa para *C. fissilis* (0,250) e um valor do F_{ST} similar ao presente estudo (0,102).

Nas populações naturais, os indivíduos raramente se distribuem homogeneamente no espaço. Desses indivíduos, nem todos participam efetivamente na reprodução para a formação da próxima geração, pois alguns são jovens e outros já ultrapassaram a idade reprodutiva. Então, mesmo em grandes populações, apenas um determinado número de

indivíduos participam do processo de reprodução. Esse fenômeno, onde só uma proporção dos alelos passa para a geração seguinte, provoca uma estruturação por deriva genética em longo prazo. Além do mais, entre os indivíduos que efetivamente participam da reprodução (tamanho efetivo de uma população, N_e), podem existir diferenças em fertilidade (variação individual na intensidade do florescimento e frutificação) e cruzamentos correlacionados devido a comportamento dos polinizadores. Estes fatores reduzem ainda mais o N_e (ROBINSON, 1998; HARTL, 1988).

Consequentemente, a desigual distribuição da variabilidade genética dentro das populações, causada pela deriva, pode ter provocado a diferenciação genética. Então, essa divergência encontrada entre as populações possivelmente seja decorrente das diferenças de riqueza alélica e heterozigosidade contidas nas amostras analisadas.

Outra causa não natural que provocaria as mesmas consequências, seriam os fatores antropogênicos de fragmentação florestal e corte seletivo de árvores. O avanço da agricultura leva ao isolamento espacial e redução do tamanho das populações e, por conseguinte, à perda de alelos por deriva genética em curto prazo e pode afetar a heterozigosidade nas gerações descendentes. Os alelos perdidos só podem ser restaurados por mutação ou por imigração a partir de outras populações (maior fluxo gênico). Uma vez que a densidade populacional foi fortemente reduzida, formam-se diferentes grupos de indivíduos. Isso induz uma estrutura genética espacial na forma de estrutura familiar porque as plantas vizinhas têm certo parentesco entre elas. Uma futura implicação genética disso seria a endogamia devido ao cruzamento de indivíduos descendentes aparentados, o qual provocaria um estreitamento da base genética cuja consequência negativa seria a depressão endogâmica (FINKELDEY; HATTEMER, 2007). Assume-se que o desmatamento é aleatório em relação à estrutura genética espacial. Se, por exemplo, o desmatamento está concentrado perto dos rios, e se a espécie tivesse diferentes ecótipos em condição de sequeiro e de várzea, a perda de variação pode ser mais crítico.

Provavelmente o corte seletivo do cedro na região de El Siambón produziu um efeito de gargalo genético nas populações e por isso foi encontrado o menor número de alelos por locos (2,75) e a mais baixa heterozigosidade média (0,315) das três populações. White, Boshier e Powell (1999) encontraram que quanto maior a fragmentação das populações de *Swietenia humilis*, maior é perda de diversidade genética, e particularmente de alelos de baixa frequência. Hall, Orrell e Bawa (1994) acharam elevados níveis de déficit de heterozigotos em

populações de *Carapa guianensis* (Meliaceae) e atribuíram esse motivo às intensas explorações. Esta ligação entre populações perturbadas e a redução da variabilidade genética também foi detectado para *S. macrophylla* (GILLIES et al., 1999; ANDRÉ et al., 2008). Contudo, talvez os 40 indivíduos coletados nesta população possam não ter sido representativos da variabilidade genética contida nessa população, mesmo como a maneira em que foi feita a amostragem (deriva genética por erro amostral). O número observado de alelos em uma amostra é amplamente dependente do tamanho da amostra.

O valor estimado total do F_{ST} ($\theta = 0,108$), indica que 10,8% da diversidade genética total está distribuída entre as populações e, por tanto, 89,2% está dentro das populações. Esta estima da diferenciação populacional é similar a outros estudos realizado com marcadores dominantes. Analisando 12 populações de *C. lilloi* com AFLP, foi encontrado que 86% da variabilidade genética estavam dentro das populações (INZA et al., 2008). Usando RAPD, Gillies et al. (1999) indicaram que 80% da variação estava distribuída dentro das populações de *S. macrophylla* na América Central.

O valor obtido na análise da diferenciação genética calculado a partir do G_{ST} de Nei (1973) foi 0,113, muito próximo do valor encontrado com a estimativa do Weir e Cockerham (1984), devido a que esses estimadores assumem o mesmo modelo de mutação de alelos infinitos para os microssatélites (NYBOM, 2004). Contudo, o G_{ST} subestima a diferenciação genética entre populações, devido a sua dependência da heterozigidade dentro das populações. Teoricamente, este valor deveria variar de 0 a 1, não obstante, o G_{ST} pode ser muito pequeno ainda entre populações com alelos completamente diferentes.

Para resolver este aspecto, Hedrick (2005) padronizou o G_{ST} de Nei (1973) em relação ao máximo valor que ele pode atingir dada a diversidade observada dentro das populações. Esse valor máximo de G_{ST} é uma função da heterozigidade esperada (H_s) e do número de populações amostradas k :

$$\hat{G}_{ST(\max)} = \frac{(k-1)(1-\hat{H}_s)}{k-1+\hat{H}_s} = \frac{(3-1)(1-0,416)}{3-1+0,416} = 0,483$$

Então, o G_{ST} padronizado (G'_{ST}), foi definido como sendo,

$$\hat{G}'_{ST} = \frac{\hat{G}_{ST}}{\hat{G}_{ST(\max)}} = \frac{0,113}{0,483} = 0,234$$

Este valor representa 23,4% da máxima diferenciação possível (48,3%) para o nível de homozigidade populacional observado no presente estudo. Todavia, como esta padronização garante que o G'_{ST} tenha um limite superior de 1, quer dizer então que 23,4% da variabilidade genética está entre as populações e 72,6% encontra-se dentro delas. Este método é importante porque em locos microssatélites existem muitos alelos, de forma que a heterozigidade esperada em EHW é sempre alta, e como o $G_{ST} < 1 - H_s$ (homozigidade esperada em EHW), este valor sempre será pequeno, e tanto menor quanto maior for a H_s (HEDRICK, 2005).

Esta medida padronizada é útil nas situações onde é preciso realizar comparações entre locos com diferentes taxas de mutações, tais como locos isoenzimáticos e de microssatélites, porque ajudaria a resolver problemas na interpretação dos níveis de diferenciação genética. Assim também o G'_{ST} permite esta comparação entre diferentes organismos que possam ter tamanho efetivo populacional muito diferente. Outro uso desta medida padronizada pode ser ao lidar com populações com alto grau de isolamento que foram separadas por longos períodos de tempo (por exemplo, há mais de 10.000 anos). Em outras situações, entretanto, a aplicação desta medida é desnecessária e, em alguns casos, directamente enganosa (MEIRMANS; HEDRICK, 2011; RYMAN; LEIMAR, 2008). Recentemente, outra medida de diferenciação genética foi desenvolvida por Jost (2008) para resolver dois problemas que ele encontrou no G_{ST} : o fato de que a heterozigidade esperada (H_e) impõe um limite sobre a máxima diferenciação possível e que este parâmetro não é uma medida adequada para descrever a diversidade. Ao invés de usar a H_e , Jost baseou a sua estatística D no número de alelos efetivos, o qual ele simplesmente denominou de “verdadeira diversidade”.

A análise das distâncias genéticas não viesada de Nei (1978) foi realizado com o programa TFPGA 1.3 (MILLER, 1997) e mostrou uma distância mínima de 0,056 e uma máxima de 0,116 entre os grupos em estudo. Na Tabela 9, debaixo da diagonal observam-se as distâncias genéticas entre cada par das populações e na parte de cima as distâncias geográficas dadas em km.

Tabela 9. Distâncias genéticas não viesada de Nei (1978) e geográficas em km (itálicas) para cada par de populações de *C. lilloi*.

Baritú	El Siambón	San Andrés	
*****	<i>470</i>	<i>68</i>	Baritú
<i>0,098</i>	*****	<i>402</i>	El Siambón
<i>0,056</i>	<i>0,116</i>	*****	San Andrés

Estes valores foram utilizados para construir uma representação gráfica das distâncias por meio do método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Com auxílio do programa TFPGA, vários conjuntos de dados a partir de 1000 reamostragens com reposição sobre os locos possibilitou gerar um dendrograma de maior confiança estatística. Neste processo, as informações sobre a árvore definida por cada novo conjunto de dados são então comparadas com aquelas da árvore definida pelos dados originais e o referido programa estima e reporta a proporção de dados permutados que resultam na formação de um nó (Figura 10).

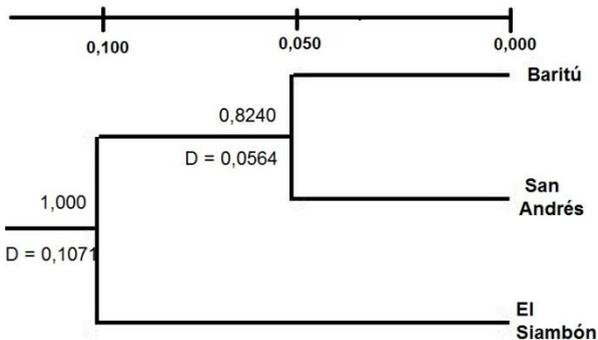


Figura 10. Dendrograma construído a partir das distâncias genéticas de Nei (1978). Na parte superior de cada nó está o valor de “bootstrap” e os valores abaixo do nó representam a distância genética de Nei.

Para quantificar a confiança estatística do grau da associação entre as distâncias genéticas e geográficas das populações, foi realizado o teste de Mantel utilizando o programa GenAlEx 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). Foi usado a estatística normalizada de Mantel, o

coeficiente de correlação r , para estimar se a matriz da distância genética está correlacionada com a matriz da distância geográfica. Este coeficiente ranqueia valores de -1 e $+1$ e pode ser usado para comparar resultados de diferentes variáveis ou estudos por meio de intervalos de confiança.

O coeficiente r das matrizes originais foi comparado com aquele obtido após 1000 permutações de uma matriz para testar a hipótese nula de não correlação linear entre as duas matrizes a um nível de significância estatística $\alpha = 0,05$. Em cada permutação a estatística r foi re-calculada e a significância do teste foi medida como sendo o número de vezes que o r calculado foi maior do que o r original, para finalmente gerar o valor p (FORTIN; GUREVITCH, 2001; FIELDING, 2007).

No presente estudo, foram observados os valores de $r = 0,802$ e $p = 0,329$, o qual indica que não existe correlação significativa entre as distâncias genéticas com as geográficas entre as populações. A Figura 11 mostra graficamente estes resultados.

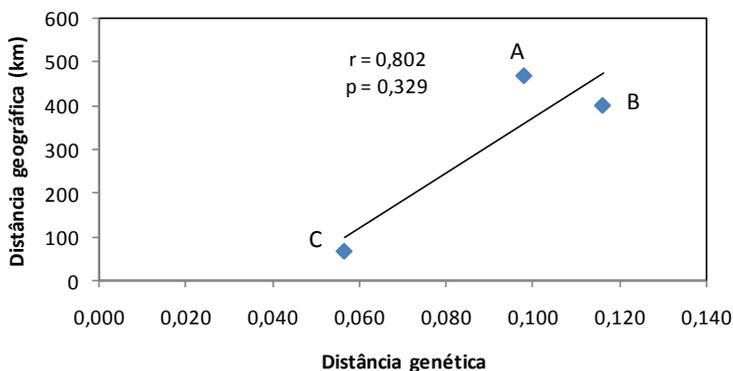


Figura 11. Teste de Mantel para avaliar a existência e a probabilidade de correlação entre as distâncias genéticas e geográficas. As letras correspondem às populações: A= Baritú-El Siambón, B= El Siambón-San Andrés e C= Baritú-San Andrés.

A distância espacial entre as populações não é suficiente para explicar as diferenças genéticas existentes entre elas. O fato de elas estarem separadas por dezenas ou centenas de km não significa que se diferenciaram só pelo isolamento por distância. As populações de Baritú e San Andrés estão mais próximas entre si (e distantes 68 km), mas

apresentam uma maior similaridade genética, condição que leva à formação de um agrupamento estreito (Figura 10). No entanto, a população El Siambón, presente nos grupos A e B, não somente encontra-se a aproximadamente 400 km de distância das outras duas, mas também compartilha pouca diversidade gênica, sendo a distância genética maior com San Andrés do que Baritú. Essas características teriam contribuído para que a correlação entre distância geográfica e distância genética fosse alta e positiva ($r = 0,802$; Figura 11).

Quando uma espécie ocupa uma ampla distribuição geográfica, como é o caso de *C. lilloi*, é normal encontrar elevada variação genética entre populações de diferentes regiões, especialmente se o fluxo alélico é inexistente ou quase inexistente. Talvez por isso, Grau, Zapater e Neumann (2006) encontraram dificuldade para definir taxonomicamente alguns exemplares de *C. lilloi* na região sul das Yungas devido a que possuíam características não bem definidas e intermediárias entre esta espécie e *C. balansae*. Essas diferenças morfológicas podem ser devidas aos processos de adaptação ao ambiente local, por ação da seleção natural. Precisamente, na amostra da população mais latitudinal, El Siambón, foi possível observar uma maior diferenciação genética com respeito às duas populações da região norte das Yungas, a qual ficou refletida no dendrograma (Figura 10). No entanto, fatores antropogênicos já discutidos como a perda de alelos por deriva genética, provavelmente causado pelo desmatamento irracional e fragmentação das florestas em áreas não protegidas, devem contribuir fortemente para explicar a divergência encontrada entre as três populações estudadas.

Por causa destas modificações no ecossistema, *C. lilloi* encontra-se catalogada na Lista Vermelha de Espécies em Perigo de Extinção da IUCN como uma espécie ameaçada de extinção em um futuro imediato. Um dos resultados mais comuns das alterações ambientais induzidas pela atividade humana é que em geral a maioria, ou todas as populações, das espécies ameaçadas de extinção estão subdivididas. Nesses casos, se uma população de tamanho pequeno está associada a uma reduzida variabilidade genética, a capacidade da descendência dessa população para adaptar-se a novas condições ambientais diminui. Como consequência, a repetição deste ciclo por várias gerações pode levar a uma extinção local da espécie.

Como paradoxo, esta característica torna-se vantajosa para fins de conservação (CABALLERO et al., 2010). A ocorrência de uma espécie em grandes áreas geográficas é importante porque diferentes variantes alélicas serão fixadas em tantos grupos isolados quanto possível, tornando-se um reservatório de variação genética. Não obstante, o

isolamento completo leva ao aumento das taxas de endogamia local com a possível consequência da depressão por endogamia. Assim, um certo grau de fluxo gênico deve ser mantido através da migração de indivíduos entre as subpopulações ou por meio da metodologia silvícola conhecida como Enriquecimento da Mata Nativa (DEL CASTILLO et al., 2005). Estes procedimentos seriam mais relevantes para a população El Siambón, onde foi observada baixa heterozigosidade esperada e número de alelos por loco, a fim de maximizar a diversidade genética dessa população em longo prazo. O material que seria introduzido para a restauração dessa população, deveria proceder de locais com condições ecológicas similares, porém não necessariamente geograficamente próximas, a fim de poder capturar genótipos (alelos) diferentes. O uso de uma mistura de genótipos regionais poderia garantir um melhor resultado devido a que os novos indivíduos já estariam adaptados a esse ambiente em particular (FALK; KNAPP; GUERRANT, 2001).

De outro lado, uma população cuja viabilidade não está sob risco iminente, poderia ser conservada *in situ* para a manutenção da maior diversidade possível de alelos responsáveis pela adaptação a situações ecológicas particulares. Essa estratégia pode ser particularmente apropriada para as populações de Baritú e San Andrés, onde os valores de heterozigosidade e número de alelos por locos são relativamente elevados. Além disso, os indivíduos destas populações podem ser a matéria prima para os programas de melhoramento de *C. lilloi*, pois estes aproveitam a variação genética contida entre e dentro dessas populações para formar a populações base ou mesmo melhoradas. Conservar uma base genética ampla ao início do melhoramento é importante porque favorece o surgimento de novas combinações alélicas que não existem nas populações naturais, visando aumentar a performance e a produtividade do material melhorado (CORNELIUS; UGARTE-GUERRA, 2010).

Todas estas informações geradas neste trabalho são de grande utilidade para o INTA, que possui um programa de domesticação de espécies do gênero *Cedrela*, cuja finalidade principal é gerar tecnologias para o melhoramento e cultivo destas espécies e para estabelecer estratégias de conservação ou recuperação dos ecossistemas degradados.

Em um nível internacional existem outros projetos de pesquisa sobre as espécies de *Cedrela*. No ano 2006, o Bioversity International e o Centro de Pesquisas Florestais do Instituto Nacional da Espanha para a Agricultura e Tecnologia de Alimentos (CIFOR-INIA) uniram esforços para apoiar a conservação e uso da biodiversidade dos ecossistemas florestais. Um dos principais resultados desta parceria foi a criação de

uma rede para a conservação e uso sustentável dos recursos genéticos florestais na América Latina (LAFORGEN), cujo objetivo principal foi identificar temas prioritários para pesquisa na região e definir formas de abordar as questões mais urgentes que constituem uma ameaça aos recursos genéticos florestais. O LAFORGEN age como uma rede que visa conectar profissionais de institutos de pesquisa de vários países da América Latina que estão trabalhando com os recursos genéticos florestais com foco em áreas prioritárias compartilhadas.

Em um dos projetos, MAPFORGEN, estuda-se a distribuição e habitat natural de 100 espécies de árvores nativas economicamente importantes da América Latina e do Caribe, bem como a biologia reprodutiva destas espécies e as ameaças que enfrentam, com o objetivo de determinar seu estado de conservação *in situ* e *ex situ*. Algumas das espécies prioritárias identificadas e selecionadas por LAFORGEN incluem seis espécies do gênero *Cedrela* spp., entre elas *C. lilloi*. O INTA forma parte desta rede através da participação de vários expertos em pesquisas florestais. Consequentemente, os resultados deste estudo poderiam contribuir no conhecimento da espécie e aportar dados concretos sobre a sua diversidade genética e potenciais áreas de conservação.

3.4. Conclusões

O presente estudo é considerado inédito para a espécie *C. lilloi* porque pela primeira vez foi desenvolvido e utilizado marcadores moleculares microssatélite para analisar a diversidade genética de três populações naturais da Argentina.

Os oito locos microssatélites testados em 140 indivíduos de *C. lilloi* apresentaram uma moderada a baixa diversidade alélica, com exceção do loco Clilloi09b, quem teve em média o maior número de alelos.

O nível de heterozigosidade esperada média encontrada nas três populações permitiu inferir um ranking de maior (Baritú) a menor (El Siambón) diversidade genética. Essa variação corresponde com a distribuição natural das populações amostradas no sentido Norte-Sul dentro da região de Yungas. Em relação a isso, deveriam ser consideradas às populações do norte com maior potencial para usos de conservação porque albergariam maior variabilidade genética da espécie.

A estimação da endogamia intrapopulacional (F_{IS}) não foi diferente do zero, indicando que não existem excesso nem deficiência de

heterozigotos nas três populações. A endogamia a nível grupal (F_{IT}) foi significativo e atribuível à perda de alelos por deriva genética. Esse mesmo fator também teria originado um valor de divergência genética (F_{ST}) moderado entre as populações.

A análise das distâncias genéticas permitiu observar que as duas populações localizadas na região norte das Yungas são geneticamente mais similares entre si, e distantes da única população do sul.

Para o programa de melhoramento de *C. lilloi* desenvolvido pelo INTA, uma recomendação surgida a partir dos dados deste trabalho, seria incorporar, preferencialmente, indivíduos “plus” das populações localizadas na região norte das Yungas. Elas apresentaram a maior diversidade gênica e riqueza alélica, o qual garante uma base genética mais ampla do material a ser melhorado.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉ, T. et al. Post-logging loss of genetic diversity in a mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) population in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, 255: 340–345, 2008.

ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. 1. ed. Malden, MA, USA: Blackwell Publishing. 2007, 645 p.

ASCHERO, V. Biología reproductiva e importancia de la polinización en *Cedrela lilloi*. In: BROWN, A.; PACHECO, S. (Eds). **Ecología y producción de cedro (género Cedrela) en las Yungas australes**. Ediciones del Subtrópico. Tucumán, Argentina, 2006, Cap. 4, pp: 41-50.

BERG, E.E.; HAMRICK, J.L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Can. J. For. Res.** 27: 415-424, 1997.

BAJAY, M. Construção de bancos enriquecidos em microssatélites de eucariotos. Curso prático e teórico, 6-16 de set de 2009, 7 f. Notas de aula.

BHARGAVA, A.; FUENTES, F.F. Mutational dynamics of microsatellites. **Molecular biotechnology**, 44, 250-266, 2010.

BROWN, A.D. et al. Una estrategia de conservación para las selvas subtropicales de montaña (Yungas) de Argentina. **Ecotropicos**, 15: 147-159, 2002.

BROWN, A.; MALIZIA, L.R. Las Selvas Pedemontanas de las Yungas. **Ciencia Hoy**, V. 14, nº 83 p: 52-63, 2004.

BROWN, A.; MALIZIA, L.R.; LOMÁSCOLO, T. Reserva de la Biósfera de las Yungas: armando el rompecabezas entre todos. In: ARAYA ROSAS, P.; CLÜSENER-GODT, M. **Reservas de la Biosfera. Un espacio para la integración de conservación y desarrollo.** Experiencias exitosas en Iberoamérica. 2006, pp: 15.

BROWN, A.; PACHECO, S. Importancia del género *Cedrela* en la conservación y desarrollo sustentable de las Yungas australes. In: BROWN, A.; PACHECO, S. (Eds). **Ecología y producción de cedro (género Cedrela) en las Yungas australes.** Ediciones del Subtrópico, Tucumán, Argentina 2006, Cap. 1, pp: 9-18.

BUTCHER, P.A.; GLAUBITZ, J.C.; MORAN, F. Aplicaciones de los marcadores Microsatélites en la Domesticación y Conservación de Árboles Forestales. FAO. **Recursos Genéticos Forestales**, N° 27, 1999.

CABALLERO, A. et al. Management of genetic diversity of subdivided populations in conservation programmes. **Conserv Genet**, 11: 409–419, 2010.

CABRERA, A. L. **Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Regiones Fitogeográficas Argentinas.** Editorial ACME., Tomo II, Fascículo 1. Buenos Aires, Argentina, 1994, 85 p.

CALLEN, D.F. et al. Incidence and origin of "Null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics** 52: 922-927, 1993.

CHAMBERS, G.K.; MACAVOY, E.S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 126: 455-476, 2000.

CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microsatellite Markers for Population and Conservation Genetics of Tropical Trees. **American Journal of Botany**, Vol. 83, No. 1: 51-57, 1996.

CIOFI, C. et al. Genotyping with microsatellite markers. In: KARP, A.; ISAAC, P.G. ; INGRAM, D.S. (eds.). **Molecular Tools for Screening Biodiversity**. Chapman and Hall, London, 1998, pp. 195-201.

CÉSPEDES, M. et al. Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica. **Molecular Ecology**, 12: 3201–3212, 2003.

CORNELIUS, J.; UGARTE-GUERRA, J. Introducción a la genética y domesticación forestal para la agroforestería y silvicultura. Lima, Perú. Centro Mundial para la Agroforestería (ICRAF). 2010, 124 p. Notas de clase.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology**, v. 18, p. 1-8, 2001.

DAYANANDAN, S.; BAWA, K.S.; KESSELI, R. Conservation of Microsatellites among Tropical Trees (Leguminosae). **American Journal of Botany** 84(12): 1658–1663, 1997.

DE LA TORRE, A. et al. Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian Amazon. **Forest Ecology and Management**, 255: 334-339, 2008.

DEL CASTILLO, E.M. et al. Investigaciones botánicas y silvícolas sobre *Cedrela* (Meliaceae) en Argentina. **Actas del XII Congreso Forestal Mundial. Bosques para el planeta**. Québec, Canadá. Setiembre 2003.

DEL CASTILLO, E.M.; ZAPATER, M.A.; GIL, M.N. Distribución, ecología y silvicultura de los cedros en la selva subtropical de Salta y Jujuy. **3º Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano**, Corrientes, Argentina 6-9 Setiembre, 2005.

DEL CASTILLO, E.M. et al. **Selva de Yungas del Noroeste Argentino (Jujuy, Salta y Tucumán). Recuperación Ambiental y Productiva: Lineamientos Silvícolas y Económicos para un Desarrollo Forestal Sustentable**. Ediciones INTA. Jujuy, Argentina. 2005, 45 p.

DIGILIO, A.P.L.; LEGNAME, P.R. Los árboles indígenas de la provincia de Tucumán. *Opera Lilloana* XV: 55, 1966.

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

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature reviews. Genetics**, 5(6): 435-445, 2004.

ELLEGREN, H.; PRIMMER, C.R.; SHELDON, B.C. Microsatellite evolution: directionality or bias in locus selection. **Nat Genet** 11: 360-362, 1995.

FALK, D.A.; KNAPP, E.E.; GUERRANT, E.O. **An introduction to restoration genetics**. Society for Ecological Restoration, Plant Conservation Alliance Bureau of Land Management, US Department of Interior, Environmental Protection Agency, 2001. 30 p.

FERES, J.M. et al. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. **Molecular Ecology Resources**, 9: 434-437, 2009.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 2da ed. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, Brasil, 1996. 221 p.

FIELDING, A. **Cluster and classification techniques for the biosciences**. 1. ed. US: Cambridge University Press, 2007. 246 p.

FINKELDEY, R.; HATTEMER, H.H. **Tropical forest genetics**. 1. ed. Germany: Springer-Verlag, 2007. 315 p.

FORTIN, M.J.; GUREVITCH, J. Mantel test. Spatial structure in field experiments. In: SCHEINER, S.M.; GUREVITCH, J. (ed.) **Design and analysis of ecological experiments**. Oxford University Press, US, 2001, Cap. 16, pp: 308-326.

FUJIMORI, S. et al. A novel feature of microsatellites in plants: a distribution gradient along the direction of transcription. **FEBS Letters** 554: 17-22, 2003.

GANDARA, F.B. **Diversidade genética de populações de cedro (*Cedrela fissilis* Vell. Meliaceae) no Centro-Sul do Brasil**. 2009. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil.

GILLIES, A.C.M. et al. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. **Heredity**, 83, 722–732, 1999.

GILLIES, A.C.M. et al. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. **Molecular Ecology** 6(12): 1133-1145, 1997.

GOLDSTEIN, D.B.; POLLOCK, D.D. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. **Journal of Heredity**, 88: 335-342, 1997.

GOUDET, J. Fstat (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate F-statistics. **J Heredity** 86: 485–486, 2002.

GOUVÊA, C.F.; DORNELAS, M.C.; MARTINELLI-RODRIGUEZ, A.P. Floral Development in the Tribe Cedreleae (Meliaceae, Sub-family Swietenioideae): *Cedrela* and *Toona*. **Annals of Botany** 101: 39–48, 2008.

GRAU, H.R. Regeneration patterns of *Cedrela lilloi* (Meliaceae) in northwestern Argentina subtropical montane forests. **Journal of Tropical Ecology** 16:227-242, 2000.

GRAU, A.; ZAPATER, M.A.; NEUMANN, R.A. Botánica y distribución del género *Cedrela* en el noroeste de Argentina. In: BROWN, A.; PACHECO, S. (Eds). **Ecología y producción de cedro (género Cedrela) en las Yungas australes**. Ediciones del Subtrópico, Tucumán, Argentina, Cap.2, pp: 19-30, 2006.

HALL, P.; ORRELL, L.C.; BAWA, K.S. Genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Am J Bot** 81: 1104–1111, 1994.

HARTL, D.L. **Primer of population genetics**. 2. ed. Universidad de Michigan: Sinauer Associates, 1988. 305 p.

HEDRICK, P.W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, 59(8), 1633-1638, 2005.

HERNÁNDEZ, G. **Genetic diversity and mating system analysis of *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) populations under different human dominated landscapes and primary forests.** 2008. 74 f. *Magister Scientiae* en Manejo y Conservación de Bosques Naturales y Biodiversidad. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE, Turrialba, Costa Rica.

HERNÁNDEZ, G. et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cedrela odorata* L. (Meliaceae), a high value neotropical tree. **Conserv. Genet.** Volume 9, Num 2: 457-459, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA. Sendero de pedemonte y Yungas. In: INTA Expone 2005, Famaillá, Argentina. Disponible em: http://www.inta.gov.ar/famailla/ie/senderos/pedemonte_yungas.htm> Acceso em 23 de setembro de 2010.

INZA, M.V. **Diversidad genética molecular de poblaciones nativas de *Cedrela lilloi* del Noroeste argentino.** 2010. 160 f. Tesis (Maestría en Recursos Naturales) Escuela para Graduados Alberto Soriano, Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

INZA, M.V. et al. Diversidad genética molecular en poblaciones nativas fragmentadas de *Cedrela lilloi* del Noroeste argentino. **XXIV Jornadas Científicas de la Asociación de Biología de Tucumán.** Tafí del Valle, Tucumán, 8, 9 y 10 de noviembre, 2007.

INZA, M.V. et al. Diversidad genética molecular de Cedro coya (*Cedrela lilloi*) en las Yungas. **III Congreso Nacional de Conservación de la Biodiversidad.** Facultad de Ciencias Exactas de la UBA. Buenos Aires, 11-14 agosto 2008.

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **TREE**, V. 11, N° 10: 424-429, 1996.

JOST, L. G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, 17: 4015-4026, 2008.

KAGEYAMA, P.Y. et al. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, 64: 93-107, 2003.

LANGRIDGE, P.; CHALMERS, K. The principle: identification and application of molecular markers. In: LÖRZ, H.; WENZEL, G. (Eds). **Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement**. Springer-Verlag, Cap. I.1, p: 3-22, 2007.

LOVELESS, M.D.; GULLISON, R.D. Genetic variation in natural mahogany populations in Bolivia. In: LUGO, A.; FIGUEROA COLÓN, J.; ALAYÓN, M. (Eds.). **Big-leaf mahogany. Genetics, ecology and management**. Springer Link, Cap. 2, p: 9-28, V. 159, 2003.

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. **Journal of Heredity** 93(4): 287-291, 2002.

LI, Y.C. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, 11: 2453-2465, 2002.

MALIZIA, L.; BLUNDO, C.; PACHECO, S. Diversidad, estructura y distribución de bosques con cedro en el noroeste de Argentina y sur de Bolivia. In: BROWN, A.; PACHECO, S. (Eds). **Ecología y producción de cedro (género Cedrela) en las Yungas australes**. Ediciones del Subtrópico, Tucumán, Argentina, Cap. 7, pp: 83-104. 2006.

MALONE, G.; ZIMMER, D.P. Marcadores moleculares. In: ZIMMER, D.P; COSTA DE OLIVEIRA, A.; MALONE, G. (Org). **Ferramentas da biotecnología**. Editora Gráfica Universitaria, Pelotas, UFPEL, Cap. 4, 2005, p: 77-113.

MEIRMANS, P.G.; HEDRICK, P.W. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. **Molecular Ecology Resources**, 11: 5-18, 2011.

MILLER, M.P. Tools for population genetics analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997.

MINETTI, J.M. Aprovechamiento forestal de cedro en las Yungas de Argentina. In: BROWN, A.; PACHECO, S. (Eds). **Ecología y producción de cedro (género Cedrela) en las Yungas australes**. Ediciones del Subtrópico, Tucumán, Argentina Cap. 11, pp: 143-154. 2006.

MONTEIRO, M. Construção de bancos enriquecidos em microssatélites de eucariotos. Curso prático e teórico, 6-16 de set de 2009, 7 f. Notas de aula.

MOXON, E.R.; WILLS, C. DNA Microsatellites: agents of evolution?. **Scientific American**, 72-77, 1999.

MUELLNER, A.N.; PENNINGTON, T.D.; CHASE, M.W. Molecular phylogenetics of Neotropical Cedreleae (mahogany family, Meliaceae) based on nuclear and plastid DNA sequences reveal multiple origins of "*Cedrela odorata*". **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 52: 461–469, 2009.

NAMKOONG, G.; KOSHY, M.P. Application of genetic markers to forest tree species. Appendix 2. **Draft report to IPGRI of the project**

“Developing Decision-making Strategies on Priorities for Conservation and Use of Forest Genetic Resources”. 2001, pp: 17.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 70:3321–3323, 1973.

----- Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89, p. 583-590, 1978.

NOVICK, R.R. et al. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology** 12, 2885-2893, 2003.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, 13: 1143–1155, 2004.

OLIVEIRA, E.J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29, 294-307, 2006.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**. 6, 288-295, 2006.

PICCA, A. et al. Marcadores moleculares. In: ECHENIQUE, U.; RUBINSTEIN, C.; MROGINSKY, L. (Eds.). **Biotecnologia y mejoramiento vegetal**. Cap. 4, p: 61-68. Parte II, 2004. Disponível em: <http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap4.pdf> Acesso em 12 de outubro de 2010.

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**;

fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Editora UFV. Viçosa, MG, Brasil, 1998, Cap. 7, pp: 329-379.

ROBINSON, J.P.; HARRIS, S.A. Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective. In: GILLET, E.M. (ed.). **Which DNA Marker for Which Purpose?**. Chapter 12, 1999.

RYMAN, N.; LEIMAR, O. Effect of mutation on genetic differentiation among nonequilibrium populations. **Evolution** 62-9: 2250-2259, 2008.

SALGUEIRO, F. et al. Characterization of nuclear microsatellite loci in South American Araucariaceae species. **Molecular Ecology Notes** 5: 256, 2005.

SANTOS, K.L. et al. Isolation and characterization of microsatellite markers in *Acca sellowiana* (Berg) Burret. **Molecular Ecology Resources**. 8: 998-1000, 2008.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. **Genetics**. 139:457-462, 1995.

STEINKELLNER, H. et al. Conservation of (GA)_n microsatellite loci between *Quercus* species. **Molecular Ecology**, 6: 1189-1194, 1997.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, 4: 535–538, 2004.

VAN TREUREN, R. et al. Evolution of microsatellites in *Arabis petraea* and *Arabis lyrata*, outcrossing relatives of *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Biol. Evol.** 14: 220-229, 1997.

VILLAFañE, J.P. Reserva de Biosfera de las Yungas. **Ambiente Ecológico**, Ed. 85 / set-dic 2002.

VINSON, C.C. et al. Development of microsatellite markers for *Carapa guianensis* (Aublet), a tree species from the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, 5: 33–34, 2005.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating f-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, 38: 1358–1370, 1984.

WHITE, G.; POWELL, W. Isolation and characterisation of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology** 6: 851-860, 1997a

WHITE, G.; POWELL, W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. **Molecular Ecology** 6:1195-1197, 1997b

WHITE, G.M.; BOSHER, D.H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology** 8:1899-1909, 1999.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann. Eugenics**, 15: 395-420. 1951

-----, The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, 19: 395-420. 1965.

ZAPATER, M.A.; DEL CASTILLO, E.M. Revisión de las especies argentinas del género *Cedrela* (Meliácea). **XXIX Jornadas Argentinas de Botánica**, San Luis, Octubre de 2003.

ZAPATER, M.A., DEL CASTILLO, E.M.; PENNINGTON, T.D. El Género *Cedrela* (Meliaceae) en la Argentina. **Darwiniana** 42(1-4): 347-356, 2004.

ZUCCHI, M.I. et al. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes** 2: 512-513, 2002.

5. APÊNDICE A

Valores P para o desequilíbrio genotípico das 28 combinações de locos nas três populações, baseado em 1680 permutações. O nível de significância de 5% foi ajustado para 0,000595.

Combinação dos locos	Baritú	El Siambón	San Andrés	Total
Cliloi09b X Cliloi29	0.22262	0.50774	0.01071	0.02738
Cliloi09b X Cliloi36	0.24762	0.82798	0.49226	0.55774
Cliloi09b X Sm51	0.05119	0.48274	0.21429	0.07143
Cliloi09b X CF66	0.07976	0.39940	0.24286	0.07857
Cliloi09b X Ced2	0.06429	0.24821	0.30357	0.06250
Cliloi09b X Ced54	0.35298	0.41488	0.27083	0.25238
Cliloi09b X Ced65	0.11071	0.38333	0.97024	0.62440
Cliloi29 X Cliloi36	0.10595	0.63095	0.58452	0.26071
Cliloi29 X Sm51	0.00536	0.70417	1.00000	0.01548
Cliloi29 X CF66	0.00833	1.00000	0.72619	0.01964
Cliloi29 X Ced2	0.03095	0.18036	0.03929	0.00536
Cliloi29 X Ced54	0.34881	0.90714	0.22262	0.41964
Cliloi29 X Ced65	0.29940	0.62679	0.18810	0.24405
Cliloi36 X Sm51	0.01786	0.31845	0.27917	0.03988
Cliloi36 X CF66	0.00655	0.52679	1.00000	0.09643
Cliloi36 X Ced2	0.05119	0.18512	0.75417	0.11845
Cliloi36 X Ced54	0.01071	0.81786	0.99702	0.40000
Cliloi36 X Ced65	0.50952	0.27083	0.05833	0.10893
Sm51 X CF66	0.00536	1.00000	1.00000	0.00952

Sm51 X Ced2	0.05357	0.46071	0.86369	0.16845
Sm51 X Ced54	0.17917	0.21250	0.15833	0.08869
Sm51 X Ced65	0.00655	1.00000	0.69940	0.13988
CF66 X Ced2	0.08869	1.00000	0.93869	0.41488
CF66 X Ced54	0.08393	1.00000	0.14286	0.05179
CF66 X Ced65	0.08869	1.00000	0.51190	0.21607
Ced2 X Ced54	0.66429	0.68929	0.96964	0.93810
Ced2 X Ced65	0.15893	0.37202	0.33690	0.15179
Ced54 X Ced65	0.20298	0.41726	0.89524	0.55655