

Validação do marcador molecular ISSR para detecção de diversidade genética em *Plathymania reticulata* Benth.

Lucimara Cruz de Souza¹, Adelson Lemes da Silva Júnior¹, Fábio Demolinari de Miranda², Mariana Cruz de Souza¹, Sustanis Horn Kunz³, Alécia Gonçalves Pereira¹

¹ Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. Alegre, ES, Brasil. E-mail: lucimaracruz@yahoo.com (ORCID: 0000-0001-5795-7960); adelsonlemes@yahoo.com.br (ORCID: 0000-0003-0940-8398); scruz.mariana@gmail.com (ORCID: 0000-0002-7621-7439); alexiagp@gmail.com (ORCID: 0000-0002-1017-1132)

² Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Exatas Naturais e da Saúde/Departamento de Biologia. Alegre, ES, Brasil. E-mail: fademolinari@yahoo.com.br (ORCID: 0000-0002-2344-4398)

³ Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias/Departamento de Ciências Florestais e da Madeira. Jerônimo Monteiro, ES, Brasil. E-mail: sustanis@gmail.com (ORCID: 0000-0001-6937-7787)

RESUMO: A espécie *Plathymania reticulata* Benth., apresenta grande potencial ecológico sendo utilizada no reflorestamento de áreas degradadas, além do alto valor econômico devido sua madeira de ótima qualidade. Uma técnica para fornecer subsídios para programas de conservação e manejo nesta espécie, além da utilização para estudos de diversidade genética é a seleção de marcadores moleculares. Assim, o objetivo deste estudo foi a seleção de *primers* ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) para determinação da estrutura genética, além da quantificação da diversidade genética em uma população natural de *P. reticulata*, fornecendo dados para estudos de conservação e reflorestamento. A amostragem englobou 15 indivíduos em um fragmento florestal, no município de Guaçuí/ES. Foram selecionados cinco *primers*, os quais geraram um total de 85 bandas, das quais 56 eram polimórficas. Constatou-se alta diversidade genética fundamentada nos valores do índice de diversidade de Nei ($H' = 0,383$) e índice de Shannon ($I = 0,550$). O número de agrupamentos genéticos obtido no dendrograma pelo método UPGMA corroborou com a análise bayesiana revelando dois grupos. Os marcadores ISSR se mostraram eficientes e permitiram identificar a diversidade genética na população amostrada.

Palavras-chave: conservação; reflorestamento; variabilidade genética; vinhático

Validation of molecular marker ISSR for detection of genetic diversity in *Plathymania reticulata* Benth.

ABSTRACT: The species *Plathymania reticulata* Benth., has great ecological potential being used for the reforestation of degraded areas, and the high economic value due to its wood of excellent quality. A technique to provide subsidies for conservation and management programs in this species, besides the use for studies of genetic diversity is the selection of molecular markers. Thus, the purpose of this study was the selection of primers ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) to determine the genetic structure, as well as quantification of genetic diversity in a natural population of *P. reticulata* providing data for conservation and reforestation studies. The sample comprised 15 individuals in a forest fragment in the municipality of Guaçuí/ES, Brazil. Five primers were selected, which generated a total of 85 bands, of which 56 were polymorphic. It found high genetic diversity based on the values of Nei's diversity index ($H' = 0.383$) and Shannon index ($I = 0.550$). The number of genetic clusters obtained in the dendrogram by UPGMA corroborated with Bayesian's analysis revealed two groups. ISSR were efficient and have identified the genetic diversity in the population sampled.

Key words: conservation; reforestation; genetic variability; vinhático

Introdução

A espécie *Plathymenia reticulata* Benth., conhecida popularmente como vinhático, pertence à família Fabaceae e possui vasta distribuição nos estados brasileiros. Trata-se de uma espécie diploide ($2n = 26$), com fecundação cruzada, dispersão anemocórica e polinização entomófila realizada principalmente por abelhas e vespas (Warwick & Lewis, 2003). Além disso, é caracterizada como decídua, heliófita, podendo atingir até 40 m de altura e 150 cm de diâmetro no estágio reprodutivo (Lacerda et al., 2002).

P. reticulata possui importância econômica por apresentar madeira de alta qualidade, leve, dura e resistente, sendo amplamente utilizada para construção naval e civil, mobiliário de luxo, estacas, esteios e mourões (Carvalho, 2009). Apresenta ainda potencial ecológico, sendo utilizada em restauração e recuperação de ambientes degradados por ser uma espécie pioneira, capaz de fixar nitrogênio, com boa deposição de folhas sobre o solo, além de dispersar suas sementes a longas distâncias e adaptar-se a terrenos mais pobres (Pilon & Durigan, 2013).

Os indivíduos da espécie encontram-se amplamente distribuídos na Floresta Atlântica, um dos biomas mais biodiversos e de importância global, mas que devido às ações antrópicas sua cobertura vegetal vem sendo reduzida e fragmentada (Varjabedian, 2010). Essa constante pressão antrópica ocasiona a perda da variabilidade genética, comprometendo a manutenção dos ecossistemas envolvidos. Como resultado à essa devastação houve um crescente desequilíbrio na diversidade genética, qualificando a Floresta Atlântica como um bioma com acentuado número de espécies ameaçadas (Cunha et al., 2011).

Diante desse contexto, dados importantes que auxiliarão em estratégias para a conservação das espécies vegetais estão sendo revelados por meio dos estudos de genética de populações (Galetti Jr. et al., 2008). Além disso, diversas pesquisas têm sido direcionadas aos estudos de restauração de áreas degradadas, a fim de expandir a cobertura florestal. Tais estudos são embasados em técnicas de manejo, que envolve dentre outras atividades, a identificação de indivíduos com características genéticas satisfatórias para serem utilizados como matrizes para coletas de sementes. Uma ferramenta eficaz para revelar tais dados são os marcadores moleculares de DNA (Higa & Silva, 2006; Rodrigues et al., 2009).

Dentre os marcadores, o marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), que amplifica regiões entre sequências microssatélites via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é amplamente utilizado em estudos referentes à caracterização genética, por apresentar baixo custo e alta reprodutibilidade (Ng & Tan, 2015).

Dessa forma, mediante às concepções ecológicas e econômicas, o trabalho teve como objetivo a validação dos marcadores moleculares ISSR para estudos de diversidade genética da espécie *P. reticulata*, em uma área de Floresta Estacional Semidecidual Submontana, na região sul do

Estado do Espírito Santo. Os resultados possibilitarão o levantamento de informações necessárias para estudos de conservação e reflorestamento, a fim de, revelar o potencial dos indivíduos da espécie para serem utilizados como árvores matrizes para coleta de sementes.

Material e Métodos

Local de estudo

Amostras foliares de 15 indivíduos de *P. reticulata* foram coletadas em um fragmento florestal de aproximadamente 93 hectares, entre as coordenadas 20°53' latitude Sul e 41°42' de longitude Oeste, no município de Guaçuá-ES.

Segundo a classificação de Köppen, o clima da região se enquadra no tipo *Cfa* (subtropical, com verão quente), com temperatura média anual de 19 °C e precipitação anual em torno de 1.246 mm (Alvares et al., 2013). A área está localizada próxima a Usina Hidrelétrica Rosal, pertencente à empresa CEMIG, e é contemplada pela fitofisionomia Floresta Estacional Semidecidual Submontana.

Extração de DNA e ensaios de PCR

As amostras foliares foram acondicionadas em sacos de papel contendo sílica gel, identificados, e encaminhados ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular – UFES, Alegre/ES. Posteriormente, as amostras foram transferidas para sacos de alumínio, armazenadas em *freezer* -30 °C por 24 horas e submetidas ao processo de liofilização.

O DNA genômico total foi isolado e purificado usando o método CTAB (Brometo de Cetiltrimetilamônio) proposto por Doyle & Doyle (1990). A concentração e pureza do DNA total foram estimadas por espectrofotometria no aparelho NanoDrop (*Thermo Scientific* 2000C), em seguida, o DNA foi diluído para a concentração final de 10ng μL^{-1} e armazenado em *freezer* -20 °C para uso posterior.

Inicialmente testes de amplificações via PCR foram realizadas em cinco amostras com 28 *primers* ISSR da *University of British Columbia* (marcadores denominados UBC 802; 807; 808; 809; 810; 811; 812; 813; 814; 815; 816; 818; 822; 824; 825; 827; 829; 833; 834; 836; 840; 842; 849; 852; 855; 856; 868 e 891). Os cinco *primers* que produziram melhor perfil de amplificação nas amostras foram selecionados para as análises moleculares nos 15 indivíduos.

Os ensaios de PCR foram realizados em um volume final de 20 μl por amostra contendo: tampão 1X (10 mM Tris-HCl (pH 8.5) e 50 mM de KCl), MgCl_2 (2,5 mM), dNTP (1 mM), *primer* (0,2 μM), 1 unidade de Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA genômico.

As amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystem, modelo Veriti, nas seguintes condições: 5 minutos a 94 °C, 35 ciclos constituídos por três etapas (45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 52 °C e 90 segundos a 72 °C), uma etapa final de 7 minutos a 72 °C e resfriado a 4 °C.

Eletroforese

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em voltagem de 100

V por aproximadamente 5 horas. A corridas eletroforéticas foram realizadas em TBE 1X (Tris - Ácido bórico - EDTA). O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado com marcador de peso molecular (*Ladder*) de 100 pares de base.

Após a eletroforese, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,50 µg/mL) e fotografados sob luz UV em fotodocumentador (ChemiDoc MP Imaging System – Bio Rad). Os iniciadores ISSR foram então comparados e avaliados quanto ao perfil de amplificação exibido.

Análises estatísticas

A partir da análise dos géis fotodocumentados, uma matriz binária foi elaborada considerando presença (1) e ausência (0) dos fragmentos amplificados. Análises descritivas dos dados incluindo número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP) e porcentagem de bandas polimórficas (PBP) também foram realizadas. Posteriormente, os dados da matriz de presença/ausência foram submetidos a análises intrapopulacionais por meio de softwares estatísticos.

A comparação genética entre os pares de indivíduos foi estimada por meio dos índices de dissimilaridade baseados na complementaridade do coeficiente de Jaccard. Em seguida, foi determinado o número de agrupamentos genéticos pelo método *Unweighted Pair-Group Method Average* (UPGMA). O ponto de corte para o dendrograma obtido foi estabelecido pelo método proposto por Mojema (1977), cuja fórmula é descrita como $P_c = m + kdp$, com valor de $k = 1,25$. O ajuste entre a matriz de distância e o dendrograma foi verificado pelo coeficiente de correlação cofenética (CCC). Todas as análises descritas acima foram realizadas com o programa GENES (Cruz, 2013).

Outro parâmetro utilizado para verificar o número de grupos (K) nos quais os indivíduos estão estruturados, foi realizado por meio da inferência Bayesiana utilizando o programa STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al., 2000). O número de grupos estabelecidos foi de $K = 1$ a $K = 4$ conforme metodologia descrita por Evanno et al. (2005) e a definição do K mais provável foi realizada segundo os critérios propostos pelo mesmo autor. Para cada valor de K foram realizadas 20 corridas com 10.000 interações de Monte Carlo, via Cadeias de Markov (MCMC). As análises foram realizadas usando o software STRUCTURE HARVESTER (Earl & Vonholdt, 2012).

A partir dos dados obtidos com os marcadores dominantes, a diversidade genética foi estimada pelo índice de diversidade genética de Nei (H') (Nei, 1973) e o índice de Shannon (I) (Shannon & Weaver, 1949) por meio do programa POPGENE versão 1.3 (Yeh et al., 1997).

Resultados e Discussão

Dos 28 *primers* testados, cinco foram selecionados para as análises moleculares (Tabela 1) por possuírem número considerável de locos e um bom perfil de amplificação.

Os cinco *primers* ISSR descritos na Tabela 1, foram utilizados para genotipar os quinze indivíduos de *P. reticulata* amostrados, obtendo-se um total de 85 bandas, sendo 56 polimórficas. O número de fragmentos amplificados por *primer*, conforme a Tabela 1 variou entre 13 (UBC 842) a 22 (UBC 812) com média de 17 bandas/*primer*. O iniciador UBC 834 foi o que revelou o maior número de bandas polimórficas (82,35%), enquanto o UBC 827 foi o menos informativo apresentando apenas 47,36% de bandas polimórficas. A Figura 1 exemplifica o perfil de amplificação obtido com o *primer* UBC 834.

Os polimorfismos detectados em estudos genéticos vegetais são de particular importância para a manutenção da variabilidade das espécies, bem como, sua sobrevivência frente as pressões ambientais (Cruz et al., 2011; Yeeh et al., 1996). Os iniciadores utilizados geraram um total de

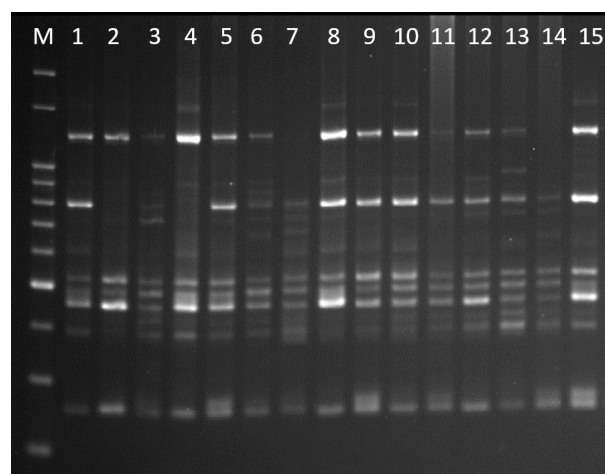


Figura 1. Fragmentos resultantes da amplificação dos 15 indivíduos de *P. reticulata* em gel de agarose 2% com a utilização do *primer* UBC 834. M = Marcador, *Ladder* 100 pb.

Tabela 1. Iniciadores utilizados, sequência de nucleotídeos, total de bandas amplificadas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por *primer* ISSR e parâmetros de diversidade genética utilizados.

<i>Primer</i>	Sequências (5'-3')*	NTB	NBP	PBP (%)	Parâmetros de diversidade
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	22	13	59,09	
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	19	9	47,36	$H' = 0,383$
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GT	17	14	82,35	
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	14	11	78,57	$I = 0,550$
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	13	9	69,23	
TOTAL		85	56	65,88	

* A= Adenina; T= Timina; C= Citosina; G= Guanina; Y = (C ou T). Índice de Nei (H'), Índice de Shannon (I).

65,88% de fragmentos polimórficos, mostrando eficiência em detectar polimorfismo em Vinhático.

Os dados obtidos corroboram com os resultados encontrados por outros autores em estudos com marcadores ISSR. Em análises de diversidade genética de *Hancornia speciosa* Gomes, foram utilizados seis *primers*, gerando 63 locos e apenas 30 (47,62%) apresentaram polimorfismo (Costa et al., 2015). Em estudos moleculares com *Elaeis guineensis*, Chagas et al. (2015) também selecionaram seis *primers*, onde encontraram um total de 68 locos, sendo 34 polimórficos.

Portanto, o número de fragmentos amplificados e as informações geradas com os cinco *primers* utilizados neste estudo, são considerados suficientes para avaliar e quantificar a diversidade genética nos 15 indivíduos amostrados, bem como estão de acordo com o esperado para estudos com marcadores ISSR.

Os valores de dissimilaridade permitem verificar o grau de divergência e semelhança genética entre pares de indivíduos, revelando dados importantes da estrutura genética da população (Cruz et al., 2011). Os valores de dissimilaridade obtidos entre os indivíduos com base no complemento do coeficiente de Jaccard, variou de 0,17 a 0,65 com média de 0,41 não evidenciando indivíduos idênticos em termos genéticos. A menor distância genética

foi entre os indivíduos 8 e 9 e a maior distância entre os indivíduos 11 e 13 (Tabela 2).

O agrupamento obtido pelo método UPGMA, a partir da matriz de dissimilaridade, revelou 2 grupos. Utilizando o método de Mojema (1977), foi estabelecido o ponto de corte de 91,44% (Figura 2).

O primeiro e maior grupo (G1) foi formado por 13 indivíduos e o segundo (G2) por apenas dois indivíduos (3 e 13). É possível observar que a matriz de dissimilaridade revelou dados ajustados ao dendrograma, visto que, os indivíduos com menor distância (8 e 9) foram agrupados no mesmo grupo (G1) e aqueles com maior distância (11 e 13) pertencem a agrupamentos diferentes (G1 e G2, respectivamente). Tal ajuste também pode ser confirmado pelo alto valor do coeficiente de correlação cofenética que foi de aproximadamente 85,97% (CCC= 0,8597) apresentando conformidade entre as representações gráficas das distâncias e a suas matrizes originais.

Por meio da análise Bayesiana o melhor K encontrado foi representado por dois grupos (K=2) (Figura 3), de acordo com a metodologia ΔK proposta por Evanno et al. (2005). Pode-se observar que embora tenha sido discriminado dois grupos distintos, é provável que os indivíduos possuam relação com ambos os grupos. Os resultados obtidos com o STRUCTURE estão em conformidade com o método UPGMA.

Tabela 2. Matriz de dissimilaridade genética entre os 15 indivíduos de *P. reticulata* calculada com base no complemento aritmético do índice de Jaccard.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	0														
2	0,18750	0													
3	0,51163	0,52381	0												
4	0,51064	0,52174	0,48980	0											
5	0,43750	0,44681	0,42000	0,22917	0										
6	0,57143	0,58333	0,45833	0,33333	0,22917	0									
7	0,40909	0,45455	0,48980	0,43137	0,33333	0,33333	0								
8	0,40426	0,41304	0,50943	0,33333	0,26923	0,33333	0,22917	0							
9	0,38636	0,35714	0,46939	0,34694	0,24490	0,31250	0,23913	0,17021	0						
10	0,42222	0,46667	0,43750	0,34694	0,28000	0,44231	0,38000	0,28000	0,25532	0					
11	0,54762	0,62791	0,55556	0,48936	0,38298	0,45652	0,45652	0,48000	0,40000	0,32558	0				
12	0,45652	0,50000	0,50000	0,41176	0,28000	0,34694	0,34694	0,28000	0,29167	0,32653	0,36364	0			
13	0,61111	0,61111	0,47222	0,56098	0,51163	0,52500	0,56098	0,53488	0,57143	0,50000	0,65789	0,53659	0		
14	0,42105	0,47368	0,54545	0,57143	0,46939	0,54167	0,37209	0,43750	0,38636	0,38636	0,47500	0,52083	0,54286	0	
15	0,46939	0,51020	0,45098	0,36538	0,26923	0,33333	0,33333	0,23529	0,24490	0,31373	0,41667	0,34615	0,45238	0,46939	0

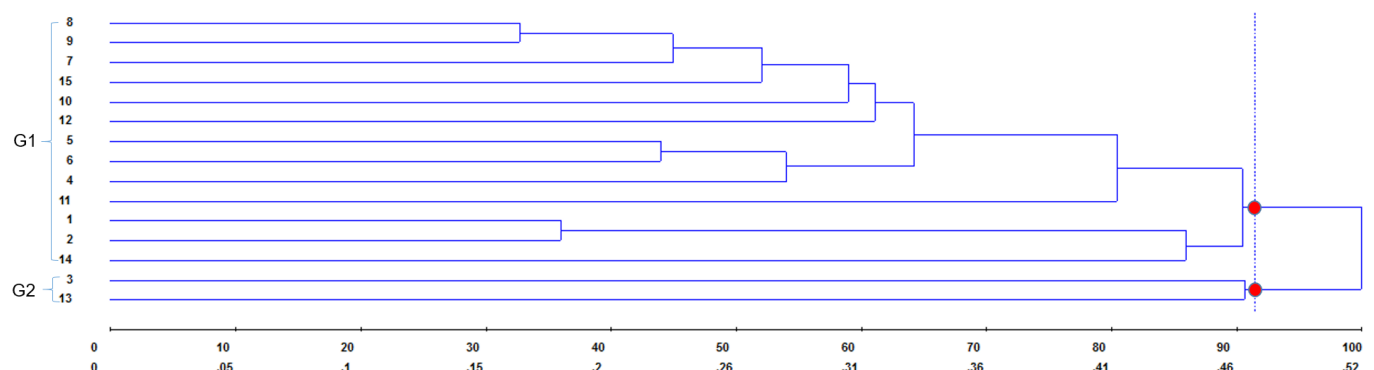


Figura 2. Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre 15 indivíduos de *P. reticulata*, obtido pelo método UPGMA no programa GENES, formando 2 grupos (G1, G2). Ponte de Corte (Pc): 91,44%.

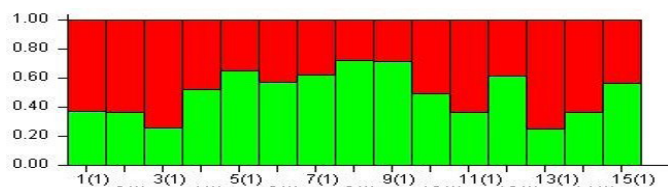


Figura 3. Gráfico de barras obtido pelo software STRUCTURE onde são mostrados os dois grupos identificados pela análise ($k = 2$). Os números na horizontal correspondem aos indivíduos amostrados.

As estimativas da diversidade genética revelaram um valor de 0,383 para o índice de diversidade genética de Nei e 0,550 para o índice de diversidade de Shannon (Tabela 1), valores que podem estar relacionados com a dispersão anemocórica e a fecundação cruzada da espécie (Lacerda et al., 2002). De acordo com a literatura o índice de Shannon pode variar entre 0 e 1, sendo que, quanto maior o valor, maior será a diversidade genética da população (Lewontin, 1972). Assim o valor encontrado (0,550) sugere que *P. reticulata* apresenta altos níveis de variação genética intrapopulacional, assim como observado para outras espécies arbóreas em que foram utilizadas metodologias similares.

Em estudos de diversidade genética com *Prosopis cineraria* (L.) Druce (Fabaceae), por exemplo, foi encontrado valores de 0,301 e 0,438 para a diversidade de Nei e índice de Shannon, respectivamente (Sharma et al., 2011). Análises de diversidade genética em Sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess) revelaram valores de 0,31 para o índice de diversidade de Nei e 0,47 para o índice de Shannon, considerados pelos autores como alta diversidade genética (Borges et al., 2016).

Os indivíduos analisados revelaram potencial para serem utilizados como matrizes para coleta de sementes, pois conservam uma satisfatória diversidade genética intrapopulacional fundamentada nos valores de diversidade de Nei, índice de Shannon e pela formação de grupos distintos pelo método UPGMA e análise Bayesiana.

Dessa forma, os resultados obtidos permitirão subsidiar estratégias de conservação e reflorestamento com a espécie, fornecendo assim, base para programas de melhoramento genético.

Conclusões

Os marcadores ISSR selecionados foram eficientes para revelar e quantificar a diversidade genética intrapopulacional em *P. reticulata*.

Os indivíduos analisados apresentaram alta diversidade genética e potencial para serem utilizados como matrizes para coleta de sementes em trabalhos futuros.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Espírito Santo-UFES, Alegre/ES, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido.

Literatura Citada

- Alvares, C.A.; Stape, J.L.; Sentelhas, P.C.; Gonçalves, J.L. de M.; Sparovek, G. Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- Borges R.C.; Santos, F.M.G.; Maia, M.C.C.; Lima, P.S.C.; Valente, S.E.S. Investigating genetic diversity in sapucaia using inter simple sequence repeat markers. *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n. 3, gmr.15038565, 2016. <https://doi.org/10.4238/gmr.15038565>.
- Carvalho, P. E. R. Vinhático - *Plathymenia reticulata*. Colombo: Embrapa Florestas, 2009. 11p. (Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 231). <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2010/46380/1/CT231.pdf>. 10 Set. 2016.
- Chagas, K.P.T.; Souza, R.F.; Fajardo, C.G.; Vieira, F.A. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 10, n. 1, p.147-152, 2015. <https://doi.org/10.5039/agraria.v10i1a5133>.
- Costa, D.F. da; Vieira, F. de A.; Fajardo, C.G.; Chagas, K.P.T. das. Genetic diversity and ISSR initiators selection in a natural population of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015. <https://doi.org/10.1590/0100-2945-246/14>.
- Cruz, C.D. Genes - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v.35, n.3, p.271-276, 2013. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>.
- Cruz, C.D.; Ferreira, F.M.; Pessonni, L.A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. 1.ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011. 620p.
- Cunha, A.A.; Freitas, A.; Veiga, F.; Prem, I.; Gavaldão, M.; May, P.H.; Seehusen, S.E. Pagamentos por serviços ambientais na Mata Atlântica: lições aprendidas e desafios. 2.ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011. 280p.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, n.1, p.13-15, 1990. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18.
- Earl, D.A.; Vonholdt, B.M. Structure Harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, v. 4, n. 2, p. 359–361, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.
- Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
- Galetti Jr., P.M. Genética da conservação brasileira. In: Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. (Eds.). *Fundamentos de genética da conservação*. Ribeirão Preto: Editora SBG, 2008. p. 244-274.
- Higa, A. R.; Silva, L. D. Pomares de sementes de espécies nativas - situação atual. In: Higa, A. R.; Silva, L. D. (Eds.). *Pomar de sementes de espécies florestais nativas*. Curitiba: FUPEF, 2006. p. 13-40.

- Lacerda, D.R.; Lemos Filho, J.P.; Acedo, M.D.P.; Lovato, M.B. Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathymentia foliolosa* and *P. reticulata* (Mimosoideae), inferred using RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution*, v.235, n.1-4, p.67-77, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00606-002-0227-8>.
- Lewontin, R.C. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, New York, v. 6, p. 381-398, 1972. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9063-3_14.
- Mojema, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. *The Computer Journal*, v. 20, n.4, p. 359-363, 1977. <https://doi.org/10.1093/comjnl/20.4.359>.
- Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>.
- Ng, W.L.; Tan, S.G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *ASM Science Journal*, v. 9, n.1, p. 30-39, 2015. <https://goo.gl/Ek7m6a>. 04 Set. 2016.
- Pilon, N. A. L.; Durigan, G. Critérios para indicação de espécies prioritárias para a restauração da vegetação de cerrado. *Scientia Forestalis*, v.41, n.99, p. 389-399, 2013. <http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/leitura.asp?Article=10&Number=99>. 12 Set. 2016.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, n.2, p. 945-959, 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835412>. 04 set. 2016.
- Rodrigues, R. R.; Brancalion, P. H. S.; Isernhagen, I. (Orgs.). Pacto para a restauração ecológica da Mata Atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal. São Paulo: LERF/ESALQ; Instituto BioAtlântica, 2009. 256p. <http://www.lerf.esalq.usp.br/divulgacao/produtos/livros/pacto2009.pdf>. 10 Set. 2016.
- Shannon, C.E.; Weaver, W.A. The mathematical model of communication. Urbana: University of Illinois Press, 1949. 125p.
- Sharma, S.K.; Kumar, S.; Rawat, D.; Kumaria, S.; Kumar, A.; Rao, S.R. Genetic diversity and gene flow estimation in *Prosopis cineraria* (L.) Druce: A key stone tree species of Indian Thar Desert. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 39, n. 1, p. 9-13, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.12.018>.
- Varjabedian, R. Lei da Mata Atlântica: retrocesso ambiental. *Estudos Avançados*. v.24, n.68, p.147-160, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000100013>.
- Warwick, M.C.; Lewis, G.P. Revision of *Plathymentia* (Leguminosae - Mimosoideae). *Edinburgh Journal of Botany*, v.60, n.2, p. 111-119, 2003. <https://doi.org/10.1017/S0960428603000106>.
- Yeoh, Y.; Kang, S.S.; Chung, M.G. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Theaceae) in Korea based on allozyme studies. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, v. 37, n. 1, p. 141-146, 1996. <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/1996/2/bot372-08.pdf>. 04 Set. 2016.
- Yeh, F.C.; Boyle, T.J.B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, v. 129, p.156-157, 1997.