

Diversidade genética e técnicas biotecnológicas

Laudete Maria Sartoretto*

Paulo Celso Mello Farias**

Resumo

Considerado o país da megadiversidade, o Brasil detém hoje, a maior diversidade biológica do planeta, tanto em relação às potencialidades genéticas quanto em relação ao número de espécies nos ecossistemas. A biodiversidade, juntamente com os fatores abióticos, são responsáveis pela manutenção do equilíbrio e da estabilidade dos ecossistemas sendo considerada uma fonte inestimável de recursos econômicos. Porém, a crescente pressão social e a utilização desordenada dos recursos naturais pela população têm levado à degradação biótica e a fragmentação dos *habitats*, causando redução da diversidade genética e mudanças no microclima. Dessa forma, o uso destas ferramentas representa um grande avanço na avaliação de populações florestais, as quais poderão ser utilizadas no monitoramento da variabilidade genética, na identificação de indivíduos ou famílias divergentes e construção de mapas genéticos, uma vez que a conservação da biodiversidade representa um dos maiores desafios deste século.

Palavras-chave: Biodiversidade. Biotecnologia. Técnicas moleculares.

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade ou diversidade biológica refere-se à variedade de vida no planeta terra, incluindo: a variedade genética dentro das populações e espécies; a variedade de espécies da flora, da fauna e de microrganismos; a variedade de funções ecológicas desempenhadas pelos organismos nos ecossistemas; e a variedade de comunidades, *habitats* e ecossistemas formados pelos organismos (DIAS, 2000).

A expressão biodiversidade ou diversidade biológica foi adotada no final da década de 1980 e define variações em todos os níveis de organização e relação entre organismos. O Brasil é considerado hoje o país da megadiversidade, uma vez que detém a maior diversidade biológica do planeta, tanto em relação às potencialidades genéticas quanto em relação ao número de espécies e de ecossistemas (ODALIA-RÍMOLI et al., 2000). Além disso, apresenta notável participação (20%) dos estoques de água doce no mundo, absorvendo ainda imensos estoques de carbono, os quais são de extrema importância na regulação do clima regional e global (VERÍSSIMO, 2006).

Quanto ao número total de espécies, Becker, Ramos e Moura (2006) destacam que o Brasil está em primeiro lugar em número de plantas, com 55 mil espécies vegetais e em relação aos anfíbios, com 517 espécies, sendo 294 endêmicas do território brasileiro. Quanto a mamíferos, o país está em segundo lugar mundial, com 524 espécies, em terceiro lugar em relação a aves, com 1.667 espécies, e em quarto lugar no que se refere a répteis, com 468 espécies.

A diversidade biológica brasileira está representada também pela grande variedade de biomas continentais: a Amazônia, como a maior floresta tropical remanescente, com 40% das florestas tropicais do planeta; o Cerrado, incluindo campos rupestres, com cerca de 2 milhões de Km²; a Mata Atlântica, que se

* Engenheira Agrônoma; Doutora em Ciências Biológicas; Professora e Pesquisadora da Universidade do Oeste de Santa Catarina *Campus* de Xanxerê; Bairro Jardim Universitário, CEP 89820-000, Xanxerê, SC.

** Engenheiro Agrônomo; Doutor em Biotecnologia Vegetal; Pesquisador da Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália Km 8, s/n, *Campus* Carreiros, Pró-Reitoria de Infraestrutura, CEP: 96201-900, Rio Grande, RS; mellofarias@yahoo.com.br

estende do sul ao nordeste, em uma área de cerca de 1,1 milhão de Km²; a Caatinga, com vastas extensões semiáridas, incluindo as matas decíduas e remanescentes de florestas úmidas, com uma área de mais de 844 mil Km²; o Pampa, restrito ao Rio Grande do Sul, que se define por um conjunto de vegetação de campo em relevo de planície, com uma área de mais de 176 mil Km², o Pantanal Mato-grossense, que representa a mais significativa área úmida conhecida, com cerca de 150 mil Km² em território brasileiro (ITAQUI, 2002).

Juntamente com os fatores abióticos, a diversidade genética é responsável pela manutenção do equilíbrio e estabilidade dos ecossistemas, e constitui fonte inestimável de recursos econômicos. Dessa forma, a diversidade genética, além do seu valor intrínseco, agrega valor ecológico, genético, social, econômico, científico, educacional, cultural, recreativo e estético (DIAS, 2000).

De acordo com Cabrera e Willink (1980), muitas espécies vegetais e animais brasileiras são de grande importância para a economia mundial, destacando-se inúmeras espécies alimentícias, medicinais, frutíferas, forrageiras, oleaginosas e madeireiras, entre outras de interesse atual ou potencial.

Além disso, o desenvolvimento tecnológico recente, especialmente em relação às novas biotecnologias, abriu inúmeras oportunidades para investimento no aproveitamento sustentável dos recursos genéticos e da diversidade biológica em áreas de interesse químico, farmacêutico, agrícola e industrial. A importância da valorização da biodiversidade reside não apenas na preservação dos ecossistemas, mas também como fonte natural de produtos para a exploração sustentada e o consumo humano (ODALIA-RÍMOLI et al., 2000; KAGEYAMA; LEPSCH-CUNHA, 2001).

2 FATORES QUE LEVAM À PERDA DA BIODIVERSIDADE

A crescente pressão social e a utilização desordenada dos recursos naturais pela população, por meio da exploração produtiva, visando a obter mais alimentos, gerar mais lucros e adquirir bens para satisfação de suas necessidades, tem levado à degradação biótica e à fragmentação dos *habitats* (SIMINSKI et al., 2004).

A fragmentação é o isolamento de áreas contínuas de florestas por intermédio da transformação da paisagem circundante em outras formas de ocupação e uso da terra, com consequências negativas para a conservação da diversidade biológica (ALMEIDA et al., 2001). O maior impacto do processo de fragmentação florestal, causado pela exploração predatória, é a drástica redução da diversidade genética e mudanças no microclima, resultante da redução do número total de indivíduos, redução do tamanho da população e o isolamento espacial de remanescentes populacionais dentro de uma região (YOUNG; BOYLE, 2000), podendo acarretar uma limitação evolutiva para as espécies que os compõem (SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2004).

A perda da biodiversidade pela degradação das florestas aparece sob a forma de erosão do solo, danos aos *habitats* silvestres e degradação das áreas de bacias, deterioração da qualidade da vida e redução das opções de usos dos recursos para a promoção do desenvolvimento local (SIMINSKI et al., 2004). Nesse deste contexto, torna-se premente a adoção de estratégias que visem à conservação e à utilização sustentável da biodiversidade, bem como a consequente conservação genética de fragmentos florestais, pois sem variabilidade genética e a sua interação com o ambiente, é impossível a obtenção de genótipos superiores por meio do melhoramento genético (BARBOSA; NETO; BERED, 1998).

3 TÉCNICAS MOLECULARES E O SEU USO NA AVALIAÇÃO E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE

O advento de técnicas bioquímicas e moleculares baseadas na análise de polimorfismo de isoenzimas e fragmentos de DNA, possibilitaram a rápida proliferação do uso de marcadores moleculares no estudo

de aspectos básicos de genética vegetal, bem como em programas de melhoramento genético (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FERREIRA, 2001).

Dessa forma, as técnicas moleculares apresentadas e discutidas a seguir, possuem a capacidade de amostrar o genoma em diferentes regiões, codificantes ou repetitivas, conservadas ou altamente mutáveis, podendo ser divididas em dois grupos: técnicas baseadas na amplificação de sequências de DNA e técnicas baseadas em digestão e/ou hibridização de ácidos nucleicos.

3.1 ISOENZIMAS

Isoenzimas são definidas por um grupo de múltiplas formas moleculares da mesma enzima, que ocorre em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas (MOSS, 1982). A análise de isoenzimas é a maneira mais direta e rápida de avaliar genotipicamente muitos locos em um grande número de indivíduos. O princípio básico da técnica reside no uso de eletroforese e na migração diferencial de moléculas com cargas e tamanhos diferentes em gel de amido, e na visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos (SOLFERINI; SELIVON, 2001). Por ser um marcador codominante, todos os alelos são evidenciados no gel, exceto os nulos. Assim, parte-se da premissa que diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico são resultantes de diferenças ao nível de sequências de DNA, que codificam tais enzimas. E, se os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, assume-se que essas diferenças possuem base genética e sejam herdáveis (MURPHY et al., 1990). Isso permite estimar prontamente parâmetros, como: frequências gênicas e genotípicas, a heterozigosidade observada e a esperada, testar se a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW), a proporção de locos polimórficos e os coeficientes de endogamia; podendo, também, testar modelos de isolamento por distâncias (SOLFERINI; SELIVON, 2001).

3.2 MARCADORES DERIVADOS DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

A classe de marcadores identificados por amplificação do DNA baseia-se na reação da polimerase em cadeia ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Essa técnica envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima polimerase. As etapas básicas da PCR envolvem desnaturação do DNA, anelamento de oligonucleotídeos (*primers*) e extensão das cadeias de DNA que estão sendo amplificadas. Esses *primers* são sintetizados em laboratório de maneira que sua sequência de nucleotídeos seja complementar a sequências específicas que flanqueiam a reação-alvo (MILACH, 1998; MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001). Técnicas desenvolvidas a partir da PCR, como RAPD, SSR e AFLP estão sendo de extrema importância em estudos da variabilidade genética.

3.2.1 *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*

A técnica denominada RAPD (WILLIAMS et al., 1990) é relativamente simples, rápida e de baixos custos. Essa técnica trouxe uma verdadeira "democratização" da análise de polimorfismo molecular, ao permitir a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas. Diferentemente das demais técnicas de PCR, esta utiliza um único *primer* composto por 10 pares de bases de sequências arbitrárias com, no mínimo, 50% de conteúdo GC (CRUZ; MILACH, 1998; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), e o número

esperado de produto amplificado é função do comprimento do genoma e do número máximo de bases, passível de ser amplificado pelo DNA polimerase em uso (VIEIRA; VELLO; SILVA-FILHO, 2004).

Marcadores RAPD têm natureza binária e segregam como alelos mendelianos dominantes, havendo apenas dois fenótipos moleculares, presença ou ausência de bandas. O polimorfismo detectado por RAPD é gerado por mutações ou por rearranjos entre os dois sítios, ou no próprio sítio de hibridização do *primer*. Diferenças em apenas um par de bases (mutações de ponto) podem ser suficientes para inibir a amplificação (VIEIRA; VELLO; SILVA-FILHO, 2004). Portanto, a presença de um determinado marcador no padrão de bandas de dois indivíduos indica que ambos compartilham o mesmo alelo naquele loco. Por outro lado, a ausência da banda representa o fenótipo recessivo, não sendo possível a distinção entre homocigoto e heterocigoto (ALMEIDA et al., 2001). Apesar dessas limitações, os marcadores RAPD apresentam boa aceitação para: construção de mapas genéticos; seleção indireta de outros caracteres, isto é, seleciona-se com base na presença do alelo em população segregante e, com isso, traz-se o fenótipo de interesse; análise de estrutura genética de populações desde que respeitadas certas premissas; *DNA fingerprinting*; identificação de regiões específicas do genoma, usando, por exemplo, as marcas como sondas, visando à atribuição de grupos de ligação aos cromossomos da espécie; identificação de híbridos somáticos e caracterização de bancos de germoplasma ou coleções de recursos genéticos (VIEIRA; VELLO; SILVA-FILHO, et al., 2004). A técnica de RAPD abriu amplas possibilidades para a biologia da conservação, desde plantas a mamíferos, possibilitando, ainda, um estudo rápido de populações ameaçadas de extinção.

3.2.2 **Microssatélite ou Simple Sequence Repeats (SSR)**

Os microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR) são marcadores que consistem de pequenas sequências com um ou quatro nucleotídeos de comprimento, repetidas inúmeras vezes lado a lado e utilizam dois pares de *primers* específicos (20 a 30 bases) complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. O polimorfismo revelado pela SSR em um loco é em razão das diferenças no número de vezes (n) em que, por exemplo, um dinucleotídeo $(AG)_n$ se repete naquele loco (FERREIRA, 2001). Em vegetais, os sítios de microssatélites são largamente distribuídos; o elemento mais comum é o dinucleotídeo AT (MORGANTE; OLIVIERI, 1993). Assim, cada microssatélite, independentemente do elemento repetido, constitui um loco genético altamente variável, multialélico de grande conteúdo informativo. Cada segmento, amplificado de tamanho diferente, representa um alelo diferente. Locos SSR possuem expressão codominante, pois ambos os alelos de um indivíduo heterocigoto são visualizados e altamente multialélicos, em uma população em que potencialmente todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). SSR se apresenta como uma ferramenta extremamente eficiente na identificação e diferenciação de indivíduos, em coleções *ex situ* de germoplasma para verificar a identidade de dois acessos tidos como duplicados. Em coleções *in situ* de germoplasma, pode-se estudar a estrutura genética das populações mantidas naquelas condições, assim como em experimentos de seleção assistida e análise de *pedigrees* (FERREIRA, 2001).

3.2.3 **Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)**

A técnica AFLP é uma combinação de RFLP e PCR, envolvendo quatro etapas: digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte frequente; ligação de adaptadores específicos amplificação seletiva de fragmentos com *primers* específicos; e separação dos fragmentos por eletroforese em gel de poliacrilamida. O polimorfismo obtido com a AFLP baseia-se em diferenças entre genótipos na

distribuição dos sítios de restrição e na amplificação diferencial de fragmentos, possuindo, assim, grande capacidade para detecção de variabilidade genética em nível de DNA (MILACH, 1998).

Além de ser uma técnica simples, rápida e de baixo custo, a AFLP destaca-se por sua capacidade multiplex, ou seja, o elevado número de marcadores polimórficos analisados em um único gel, pelo poder de detecção de variabilidade genética e pela robustez do ensaio quando comparado ao ensaio RAPD. Marcadores AFLP são, portanto, "dominantes" e possuem natureza binária, não sendo possível discriminar genótipos heterozigotos dos homozigotos. Essa técnica pode ser utilizada na análise da variabilidade genética, análise de bancos de germoplasma, testes de identidade/paternidade e estudos populacionais (FERREIRA, 2001).

3.3 TÉCNICAS BASEADAS EM RESTRIÇÃO E HIBRIDIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA

Com a descoberta de enzimas de restrição, a possibilidade de transferência de fragmentos de DNA de um gel de eletroforese para membranas, permitindo a reutilização destes fragmentos de DNA em outros ensaios (SOUTHERN, 1975) e o desenvolvimento de novos métodos de marcação radioativa e luminescente, permitiu o desenvolvimento de uma nova classe de marcadores. Estes se baseiam na hibridização de sequências de DNA e destinam-se ao estudo da genética e melhoramento de plantas (FERREIRA, 2001).

3.3.1 *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

O polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA (RFLP) é evidenciado pela fragmentação do DNA, por meio do uso de enzimas de restrição e observado por hibridização desses fragmentos, com sequências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A variabilidade detectada através de RFLP reflete as variações nas sequências de DNA, as quais são a base da diversidade dentro de uma espécie. A base genética do polimorfismo é o reflexo de inserções ou deleções ou, ainda, substituições de base na sequência de nucleotídeos que é reconhecida por uma determinada enzima de restrição, alterando, dessa forma, o número de sítios de clivagem e, como consequência, o tamanho do fragmento (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2001). Marcadores RFLP são em geral codominantes, isto é, permitem a identificação de alelos maternos e paternos em indivíduos heterozigotos.

Embora a técnica AFLP seja bastante robusta, envolvendo o DNA (nuclear, mitocondrial e/ou de cloroplasto), adequada para análise da variabilidade genética intra e interespecífica e mesmo intergenérica, trata-se de uma técnica trabalhosa, de custo elevado e moroso para obtenção de dados, portanto, de baixa acessibilidade (FERREIRA, 2001).

3.3.2 **Minissatélites**

Marcadores minissatélites ou *Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)* são sequências de DNA cuja unidade repetitiva é observada lado a lado inúmeras vezes em um loco, e que se repetem também em vários outros locos no genoma. Constituem, na verdade, uma variação da RFLP, diferindo desta na etapa de hibridização, em que seleciona clones de múltipla cópia que possibilitam a amostragem de vários locos do genoma em um único ensaio. São marcadores tipicamente codominantes, mas em geral analisados como marcadores dominantes em estudos de diversidade genética em populações naturais (FERREIRA, 2001).

De modo geral, é uma técnica de alto conteúdo informativo, e capacidade multiplex um dos seus maiores atributos. Dezenas de locos são amostrados em uma única reação, com boa parte deles apresentando

polimorfismo entre indivíduos de uma mesma população. Em sua revisão, Ferreira e Grattapaglia (1998) descrevem que os marcadores minissatélites têm sido utilizados no melhoramento de plantas para a identificação de variedades, cultivares e clones, na análise de diversidade genética e na determinação de paternidade.

4 CONCLUSÃO

As técnicas biotecnológicas hoje disponíveis oferecem subsídios para a análise, conservação, preservação e melhoramento das espécies que compõem a biodiversidade, tendo em vista que diversas metodologias foram desenvolvidas nos últimos anos, com inúmeras aplicações tanto na área agrícola quanto na área médica. A crescente demanda global nesses setores, aliada à importância da preservação das florestas nativas e da biodiversidade, tornou essencial a adoção de estratégias biotecnológicas, as quais permitem uma análise genética mais acurada, contribuindo dessa forma, na indicação de metodologias para ações de manejo e recuperação de áreas degradadas.

Genetic diversity and biotechnological techniques

Abstract

Considered the country of mega-diversity, Brazil has today, the largest planet's biological diversity, so much in relation to the genetic potential as compared to the number of ecosystems species. Biodiversity, along with abiotic factors, are responsible for maintaining balance and stability of ecosystems and is considered an invaluable source of economic resources. However, the increasing social pressure and uncontrolled use of natural resources by the population, have led to biotic degradation and fragmentation of habitats, causing reduced genetic diversity and changes in microclimate. Thus, the use of these tools represents a major advance in the assessment of forest populations, which may be used in monitoring the genetic variability, identification of individuals or different families and construction of genetic maps, since the conservation of biodiversity is one of main challenges of this century.

Keywords: Biodiversity. Biotechnology. Molecular techniques.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Carlos et al. Técnicas de avaliação da diversidade genética. In: GARAY, I.; DIAS, B. (Ed.). **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais**. Petrópolis: [s.n.], 2001.

ARIAS, Maria Cristina; INFANTE-MALACHIAS, Maria Elena. RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismo no DNA. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: [s.n.], 2001.

BECKER, Fernando Gertum; RAMOS, Ricardo Aranha; MOURA, Luciano Azevedo. **Biodiversidade das regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria Nacional de Biodiversidade e Florestas, 2006.

- CABRERA, Angel Lulio; WILLINK, Abraham. **Biogeografia da América Latina**. 2. ed. Washington: OEA, 1980.
- CRUZ, Renata Pereira; MILACH, Sandra Cristina Kothe. Análise de RAPD. In: MILACH, S. C. K. (ED.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: [s.n.], 1998.
- DIAS, Bráulio Ferreira de Souza. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: **desafios e oportunidades**. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br/publicações/padct/bio/cap1/prob.html>>. 2000. Acesso em 10 nov. 2004.
- FERREIRA, Marcio Elias. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: GARRAY, Irene; DIAS, Bráulio Ferreira de Souza. (Ed.). **Conservação da Biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Petrópolis: Vozes, 2001.
- FERREIRA, Marcio Elias; GRATTAPAGLIA, Dário. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa-Cenargen, 1998.
- ITAQUI, José. **Quarta Colônia – Inventários Técnicos Flora e Fauna**. Santa Maria: Condesus, 2002.
- KAGEYAMA, Paulo Yoshio; LEPSCH-CUNHA, Nadja Maria. Singularidade da Biodiversidade nos trópicos. In: GARAY, Irene; DIAS, Bráulio Ferreira de Souza. (Ed.). **Conservação de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Petrópolis: Vozes, 2001.
- MATIOLI, Sergio Russo; PASSOS-BUENO, Maria Rita. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, Sergio Russo (Ed.). **Biologia Molecular e evolução**. Ribeirão Preto: [s.n.], 2001.
- MILACH, Sandra Cristina Kothe. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S. C. K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: [s.n.], 1998.
- MORGANTE, Michele; OLIVIERI, Angelo. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v. 3, p. 175-182, 1993.
- MOSS, Donald William. **Isoenzymes**. London & New York: Capman & Hall. 1982.
- MURPHY, Ryan; et al. 1990. Proteins I: isozyme electrophoresis. In: HILLS, David; MORITZ, Craig (Ed.). **Molecular Systematics**. Sinauer Associates, Sunderland MA. 1990.

NETO, José Fernandes; BERED, Fernanda. Marcadores moleculares e diversidade genética no melhoramento de plantas. In: MILACH, Sandra Cristina Kothe (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: [s.n.], 1998. P. 29-40.

ODALIA-RÍMOLI, et al. Biodiversidade, biotecnologia e conservação genética em desenvolvimento local. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, n. 1, p. 21-30, 2000.

SIMINSKI, Alexandre; et al. Sucessão florestal secundária no município de São Pedro de Alcântara, litoral de Santa Catarina: estrutura e diversidade. **Ciência Florestal**, v. 14, n. 1, p. 21-33, 2004.

SOLFERINI, Vera Nisaka; SELIVON, Denise. Polimorfismo de isoenzimas. In: MATIOLI, Sérgio Russo. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: [s.n.]. 2001.

SOUTHERN, Edwin Mellor. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, p. 503-517, 1975.

SOUZA, Lina Maria Farina Inglez; KAGEYAMA, Paulo Yoshio; SEBBENN, Alexandre Magno. Estrutura genética em populações de *Chorisia speciosa* St. Hill (Bombacaceae). **Scientia Forestalis**, n. 65, p. 70-79, 2004.

VERÍSSIMO, Adalberto. **Estratégias e mecanismos financeiros para florestas nativas no Brasil**. 2006. Disponível em: <http://www.docpark.net/FAO-fo/Esp/Nativa_B>. Acesso em: 15 de Nov. 2010.

VIEIRA, Maria Lúcia Carneiro; VELLO, Natal Antonio; SILVA-FILHO, Márcio de Castro. Genética e Melhoramento Vegetal. In: MIR, Luis (Org.). **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004

WILLIAMS, John; et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

YOUNG, Andrew; BOYLE, Timothy. Forest Conservation Genetics: Principles and Practice. **Conservation Genetics**, v. 3, p. 211-212, 2002.