

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E SELEÇÃO DE PRIMERS DE cpDNA PARA *Ficus bonijesulapensis* (MORACEAE)¹

FÁBIO DE ALMEIDA VIEIRA^{2*}, JOSÉ AUGUSTO DA SILVA SANTANA², RUBENS MANOEL DOS SANTOS³,
CRISTIANE GOUVÊA FAJARDO⁴, GABRIELA APARECIDA DE OLIVEIRA COELHO³, DULCINEIA DE
CARVALHO³

RESUMO - As relações filogenéticas, quando associadas às distribuições geográficas (filogeografia), contribuem para o entendimento dos processos de diversificação e permitem testar as hipóteses da história biogeográfica das espécies. Esta pesquisa teve como objetivo selecionar métodos de extração de DNA para a sua amplificação e testar primers de DNA cloroplastidial (cpDNA), visando a inferência filogeográfica de *Ficus bonijesulapensis*. A análise comparativa dos métodos de extração baseou-se no protocolo de CTAB e no protocolo de Moog e Bond. Após a extração, o DNA foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando pares de primers universais para amplificação das sequências específicas do cpDNA. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em géis de agarose, corados com brometo de etídio, visualizados em luz ultravioleta e fotografados. O método de extração de Moog e Bond mostrou-se mais eficiente na amplificação do DNA. Este método será utilizado no estudo filogeográfico por ser um método de extração de DNA de alta qualidade, além de econômico, prático e rápido, comparado ao método CTAB. Os primers de cpDNA testados que apresentaram melhor desempenho na amplificação foram HA, SG, BF, Q16, F32, FV, DT, CS e JA. O método de extração e os primers selecionados irão subsidiar o estudo filogeográfico, importante para identificar os centros de diversidade genética e indicar áreas prioritárias para a conservação da espécie.

Palavras-chave: DNA de cloroplasto. CTAB. Moog e Bond, Regiões não codificantes.

DNA EXTRACTION PROTOCOLS AND cpDNA PRIMERS TO *Ficus bonijesulapensis* (MORACEAE)

ABSTRACT - Phylogeography has become a powerful approach for elucidating contemporary geographical patterns of evolutionary subdivision within species and species complexes. The aim of this paper was to evaluate the extracted quality of DNA and amplification of noncoding chloroplast DNA for phylogeography studies in *Ficus bonijesulapensis*. The comparative analysis of protocol DNA extraction was based in the CTAB method and protocol from Mogg and Bond. DNA samples were assessed for successful PCR amplification of universal primers for the amplification of noncoding regions of cpDNA. Amplified DNA was separated by electrophoresis, stained with ethidium bromide and photographed under UV light. The protocol Moog e Bond produced the best DNA quality. This method will be used because it produces a high quality DNA in a short time and is less expensive. The primers HA, SG, BF, Q16, F32, FV, DT, CS and JA provided the strongest support for the inferred phylogeography, genetic diversity centers and for successful management in tree-conservation programmes.

Keywords: DNA chloroplastidial. CTAB. Moog and Bond, Noncoding regions.

*Autor para correspondência.

¹Recebido para publicação em 03/10/2009; aceito em 13/09/2010.

²Unidade de Ciências Agrárias, UFRN, Caixa Postal 7, 59280-000, Macaíba - RN; vieirafa@ufrnet.br

³Departamento de Ciências Florestais, UFLA, Caixa Postal 3037, 37200-000, Lavras - MG; dulce@ufla.br

⁴Pós-Graduação em Ecologia, UFRN, 59014-100, Natal - RN; genegoista@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Ficus bonijesulapensis R.M. Castro (Moraceae), conhecida como gameleira, é uma espécie arbórea de Floresta Estacional Decidual com distribuição geográfica descontínua, sendo restrita a afloramentos de rocha carbonática (CASTRO; RAPINI, 2006). O nome científico da espécie foi assim determinado em referência ao município Bom Jesus da Lapa no Estado da Bahia, local onde foi amostrado o exemplar utilizado para a primeira descrição botânica da espécie (coleta *type*). A cidade possui relevância regional, pois é visitada por muitos peregrinos católicos que acreditam que as grutas calcárias de Bom Jesus da Lapa têm propriedades milagrosas (CASTRO; RAPINI, 2006).

Os ambientes de ocorrência de *F. bonijesulapensis* são considerados críticos para a conservação, em virtude da extração das rochas principalmente pelas indústrias de cimento. Além disso, a Floresta Estacional Decidual sobre os afloramentos de rocha calcária possui considerável importância por apresentar fisionomia e florística próprias, destacando-se pela extrema raridade, bem distintas das demais formações do bioma da Caatinga (SANTOS et al., 2008). Portanto, é importante a indicação de locais que possuem populações com atributos genéticos significativos, capazes de garantir a manutenção das linhagens evolutivas (ESU's, *Evolutionary Significant Unit*) e discernindo entre as diferentes populações, quais seriam prioritárias para a conservação (MORITZ; FAITH, 1998).

Para isso, as relações filogenéticas, associadas às distribuições geográficas (filogeografia), têm sido utilizadas para o entendimento dos processos de diversificação, permitindo testar as hipóteses da história biogeográfica (BEHEREGARAY, 2008). Diferentemente do genoma nuclear, o DNA cloroplastidial (cpDNA) é geralmente de herança uniparental (em angiospermas é frequentemente maternal). Consequentemente, a estrutura genética dos marcadores de cpDNA depende do fluxo de gênico via dispersão de sementes, já a estrutura genética dos marcadores nucleares depende do fluxo de gênico via dispersão de sementes e de pólen (PETIT et al., 1993). Por isso, os estudos de filogeografia têm se baseado principalmente no polimorfismo do cpDNA, devido ainda à ausência de recombinação e à baixa taxa de mutação (NEWTON et al., 1999).

Para a aplicação das técnicas que visam obter o polimorfismo do cpDNA é necessário realizar a adequação da metodologia para a espécie que se pretende estudar, pois nem sempre o método de extração de DNA para uma espécie é funcional para outras espécies (CSAIKL et al., 1998). Os ajustes visam escolher o tecido vegetal a ser macerado para obtenção do DNA (folhas ou caule), o método de extração ideal para obter DNA de alta qualidade e os pares de primers de cpDNA (MOOG; BOND, 2003; SHAW et al., 2007; NOVAES et al., 2009). A ade-

quação de todas estas variáveis metodológicas são imprescindíveis por se conseguir resultados satisfatórios nos procedimentos de PCR e interpretação do polimorfismo do cpDNA.

Assim, este trabalho teve como objetivo selecionar métodos de extração de DNA para amplificação e testar primers universais de cpDNA, visando a inferência filogeográfica de *Ficus bonijesulapensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Para a definição do protocolo de extração de DNA e seleção de primers de cpDNA da espécie foram amostrados 13 indivíduos em Bom Jesus da Lapa (BA), nas coordenadas 13°02'35"S e 43°16'35"W, e 17 indivíduos em São Desidério (BA) nas coordenadas 12°22'52"S e 44°56'58"W. O número de indivíduos amostrados se refere ao tamanho populacional da espécie no afloramento de rocha calcária de cada local. A distância entre as duas populações é de aproximadamente 195 km. A amostragem dos indivíduos abrangeu a área de ocorrência dos indivíduos nos afloramentos de calcário. As amostras foliares foram condicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel, identificados, e encaminhados ao Laboratório de Conservação Genética de Espécies Arbóreas da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Em seguida estas foram armazenadas em freezer a -80 °C até o momento da extração do DNA.

Extração de DNA

A análise comparativa dos métodos de extração baseou-se no protocolo de CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) e no protocolo de Moog e Bond (2003):

A) Protocolo CTAB

Aproximadamente 1 cm² de tecido foliar liofilizado para cada amostra foram macerados em 600 µL de tampão de extração (DOYLE; DOYLE, 1990), com modificações, adicionando-se 0,2% de β-mercaptanol, areia lavada e PVP (polivinilpirrolidona), em um almofariz. O tampão de extração constituiu de 2% de CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), 100 mM de Tris (pH 8,0), 20 mM de EDTA (pH 8,0), 1,4 M de NaCl e 1% PVP. O material macerado foi colocado em tubos no banho-Maria por 60 minutos a 65°C. A primeira extração dos ácidos nucléicos foi realizada com 600 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1), separando-se a fase orgânica da aquosa por centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, e coletando-se o sobrenadante. Este foi transferido para novo tubo, no qual adicionaram-se 50 µL de solução 10% CTAB e 1,4 M NaCl. À fase aquosa do novo tubo foram misturados 450 µL de isopropanol gelado, sendo precipitado por cerca de 3 horas no freezer. Após precipitação do DNA centrifugou-se novamente por 15 minu-

tos a 12000 rpm a uma temperatura de 4 °C. A este material acrescentou-se 100 µL de etanol 70%, antes da centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O pellet foi deixado em temperatura ambiente para secar. Posteriormente, os ácidos nucléicos foram solubilizados em tampão TE (100 µL) [1 mM de Tris e 0,1 mM EDTA].

B) Protocolo Moog e Bond

Cerca de 1 cm² de tecido foliar liofilizado para cada amostra foram maceradas em 600 µL de tampão de extração (MOOG; BOND, 2003), com algumas modificações, adicionando-se areia lavada e PVP. O tampão constituiu de 100 mM de Tris pH 8,0; 50 mM de EDTA 0,5 M pH 8,0; 500 mM de NaCl 5 M; 0,7% de SDS 7%; 50 µg.mL⁻¹ de Proteinase K (10 mg.mL⁻¹) e 50 µg.mL⁻¹ de RNase (10 mg.mL⁻¹). O material macerado foi colocado em microtúbulos de 1,5 mL, incubados em estufa a 37°C e deixados por aproximadamente 12 horas. Após este período, os tubos foram retirados da estufa, adicionou-se 320 µL de NaCl 5 M, e após serem agitados (vortex), centrifugou-se por 5 minutos a 12000 rpm. Após serem retirados da centrifuga, pipetou-se a fase superior (aquosa) para um novo microtubo e adicionou-se 800 µL de isopropanol gelado. As amostras foram então levadas ao freezer por 3 horas para precipitação do DNA. Após precipitação do DNA, centrifugou-se novamente por 10 minutos a 12000 rpm a uma temperatura de 4 °C. A este material acrescentou-se 500 µL de etanol 70% e centrifugou-se a 4000 rpm por 10 minutos (este procedimento foi realizado duas vezes). Fez-se então uma última lavagem, utilizando-se 500 µL de etanol 100%. O pellet foi deixado em temperatura ambiente para secar. Finalmente, os ácidos nucléicos foram solubilizados em tampão TE. O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% e corado em seguida em solução de brometo de etídio.

Seleção de primers e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a amplificação do cpDNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foram testados pares de primers universais descritos por Taberlet et al. (1991), Demesure et al. (1995), Dumolin-Lapegue et al. (1997) e Shaw et al. (2007), para amplificação das sequências específicas do cpDNA (Tabela 1). Após a quantificação e diluição do DNA, as reações de amplificação foram conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA). Foi utilizado um volume de aproximadamente 13 µL (PCR Mix) contendo: DNA (3 ng), tampão (10 mM de Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), primers (0,5 µM de cada), MgCl₂ (1,5 mM), soro albumina bovina-BSA (0,25 mg.mL⁻¹), dNTP (0,25 mM) e 1 unidade de Taq polimerase. A amplificação foi realizada seguindo o programa descrito em Grivet e Petit (2002): 4' a 94 °C, seguido de 30 ciclos com 45" de desnaturação a 94 °C, 45" de anelamento a 47

– 62 °C (dependendo do par de primer), 1 a 4' de extensão a 72 °C (dependendo do tamanho do fragmento a ser amplificado) e 10' de extensão final a 72 °C. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em géis de agarose 1,3%, corados com brometo de etídio, visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de extração de Moog e Bond mostrou-se mais eficiente na extração do DNA. O protocolo de Moog e Bond é mais rápido de ser executado, enquanto o protocolo de CTAB é mais trabalhoso, necessitando de maiores cuidados devido à volatilidade e toxicidade do β-mercaptoetanol. Normalmente, os estudos de genética de populações em plantas e animais, por meio de técnicas moleculares (CAVALCANTE; LIRA, 2010) envolvem a avaliação de um grande número de indivíduos, necessitando-se de métodos práticos e rápidos de extração de DNA (WHITLOCK et al., 2008). Além disso, os estudos moleculares dependem diretamente da qualidade do DNA extraído, e nem sempre os protocolos de rotina são reproduzíveis em todas as espécies vegetais.

Para a espécie *Ficus bonijesulapensis*, o método Moog e Bond se destaca em relação ao protocolo de CTAB devido à extração de DNA de alta qualidade, obtendo-se melhores resultados na amplificação do DNA para a maioria dos primers (Figura 1). Nas células vegetais a presença de polissacarídeos, fenóis e compostos secundários é o principal problema encontrado no isolamento e purificação do DNA, podendo inibir a ação da Taq polimerase no processo de amplificação do DNA (JIN et al., 1997). Além da praticidade e melhor qualidade do DNA extraído, o método Moog e Bond apresenta menor custo, comparado ao método CTAB.

Os primers de cpDNA testados que apresentaram melhor desempenho na amplificação foram HA, SG, BF, Q16, F32, FV, DT, CS, e JA (Tabela 1).

O uso da reação da polimerização em cadeia (PCR) proporciona a amplificação dos segmentos do cpDNA de interesse, que são delimitados por dois iniciadores (ou primers), comumente com 20 bases na sequência (Tabela 1), que são complementares a dois sítios de nucleotídeos, um em cada fita do DNA, posicionados inversamente a uma distância geralmente não superior a 4 kb. As variações nos nucleotídeos do DNA devido à mutação (deleção, inserção ou inversão) podem ser detectadas por meio de diferentes métodos. Para isso, a variação genética do cpDNA tem sido revelada, na maioria das vezes, através de métodos de digestão de enzimas de restrição do cpDNA inteiro (LUMARET et al. 2002) ou de regiões específicas do cpDNA (NOVAES et al., 2010), utilizando pares de primers universais descri-

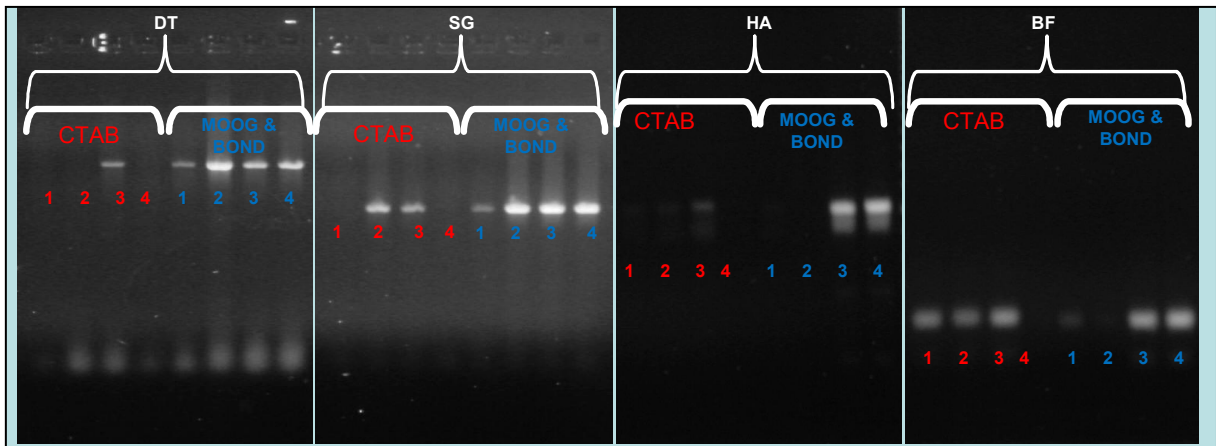


Figura 1. Comparação entre os protocolos de extração de DNA pelo método CTAB e Moog e Bond e primers de cpDNA (DT, SG, HA e BF) por análise eletroforética. Utilizaram-se os mesmos quatro indivíduos na comparação que apresentaram desempenho na amplificação, conforme os primers da Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos primers universais de cpDNA usados neste estudo, o tamanho esperado do fragmento amplificado em pares de bases (pb) e o desempenho na amplificação.

Primer	Abreviatura	Sequência 5' – 3'	pb	Amplificação
<i>trnH</i> <i>psbA</i>	HA	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC	495	SIM
<i>trnS</i> <i>trnG</i>	SG	GCC GCT TTA GTC CAC TCA GC GAA CGA ATC ACA CTT TTA CCA C	844	SIM
<i>rpl 20</i> <i>rps 12</i>	20-12	CGY YAY CGA GCT ATA TAT CC ATT AGA AAN RCA AGA CAG CCA AT	884	NÃO
<i>psbB</i> <i>psbF</i>	BF	GTT TAC TTT TGG GCA TGC TTC G CGC AGT TCG TCT TGG ACC AG	853	SIM
<i>trnQ</i> <i>rps16</i>	Q16	GCG TGG CCA AGY GGT AAG GC GTT GCT TTY TAC CAC ATC GTT T	1046	SIM
<i>ndhF</i> <i>rpl32</i>	F32	GAA AGG TAT KAT CCA YGM ATA TT CCA ATA TCC CTT YYT TTT CCA A	960	SIM
<i>trnT</i> <i>psbC</i>	TC	GCC CTT TTA ACT CAG TGG TA GAG CTT GAG AAG CTT CTG GT	3236	NÃO
<i>trnF</i> <i>trnV</i>	FV	CTC GTG TCA CCA GTT CAA AT CCG AGA AGG TCT ACG GTT CG	3511	SIM
<i>trnV</i> <i>rbcL</i>	VL	CGA ACC GTA GAC CTT CTC GG GCT TTA GTC TCT GTT TGT GG	3850	NÃO
<i>trnC</i> <i>trnD</i>	CD	CCA GTT CAA ATC TGG GTG TC GGG ATT GTA GTT CAA TTG GT	3167	NÃO
<i>trnD</i> <i>trnT</i>	DT	ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG	1213	SIM
<i>psbC</i> <i>trnS</i>	CS	GGT CGT GAC CAA GAA ACC AC GGT TCG AAT CCC TCT CTC TC	1611	SIM
<i>trnS</i> <i>trnf_M</i>	Sf _M	GAG AGA GAG GGA TTC GAA CC CAT AAC CTT GAG GTC ACG GG	1254	NÃO
<i>psbJ</i> <i>petA</i>	JA	ATA GGT ACT GTA RCY GGT ATT AAC ART TYG ARA AGG TTC AAT T	1040	SIM
<i>trnT</i> <i>trnF</i>	TF	CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	1754	NÃO
<i>trnH</i> <i>trnK</i>	HK	ACG GGA ATT GAA CCC GCG CA CCG ACT AGT TCC GGG TTC GA	1831	NÃO
<i>trnK</i> <i>trnQ</i>	K2Q	TAA AAG CCG AGT ACT CTA CCG TTG CTA TTC GGA GGT TCG AAT CCT TCC	3075	NÃO

tos por Taberlet et al. (1991), Demesure et al. (1995), Dumolin-Lapegue et al. (1997) ou Shaw et al. (2007).

O modo conservativo de evolução do cpDNA sugere que qualquer mudança em estrutura, arranjo ou conteúdo do genoma pode ter implicações filogenéticas significativas. Atualmente, observa-se o crescimento de estudos filogeográficos em plantas que utilizam microsátélites de cpDNA (MAGRI et al., 2007; FAY et al., 2009) ou o sequenciamento de pequenas regiões do cpDNA, como regiões intergênicas não codificantes (RAMOS et al., 2009; COLLEVATTI et al., 2009; NOVAES et al., 2010). Na região Neotropical, estudos recentes têm utilizado o polimorfismo do cpDNA para inferir sobre os padrões espaciais e temporais da fragmentação e dispersão das populações de plantas como consequência das variações climáticas durante a época do Pleistoceno (CAETANO et al., 2008; RAMOS et al. 2009; COLLEVATTI et al., 2009; NOVAES et al., 2010).

CONCLUSÕES

O método de extração de Moog e Bond é mais eficiente na extração do DNA de *Ficus bonijesulapensis*. Os primers de cpDNA testados que apresentam melhor desempenho na amplificação são HA, SG, BF, Q16, F32, FV, DT, CS e JA. O método de extração e os primers selecionados irão subsidiar o estudo filogeográfico, importante para identificar os centros de diversidade genética e indicar áreas prioritárias para a conservação da espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG e ao CNPq, pelo financiamento concedido.

REFERÊNCIAS

- BEHEREGARAY, L. B. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 17, p. 3754-3774, 2008.
- CAETANO, S. et al. The history of Seasonally Dry Tropical Forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). **Molecular Ecology**, v. 13, n. 17, p. 3147-3159, 2008.
- CASTRO, R. M.; RAPINI, A. Four new species of Moraceae from Bahia, Brazil. **Neodiversity**, v. 1, n. 2, p. 13-20, 2006.
- CSAIKL, U. M. et al. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic Studies. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 16, p. 69-86, 1998.
- CAVALCANTE, M.; LIRA, M.A. Variabilidade genética em *Pennisetum purpureum* Schumacher. **Revista Caatinga**, v.23, n.2, p.153-163, 2010.
- COLLEVATTI, R. G.; RABELO, S. G.; VIEIRA, R. F. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae), an endangered Cerrado shrub species. **Annals of Botany**, v. 104, n. 4, p. 655-664, 2009.
- DEMESURE, B.; SODZI, N.; PETIT, R. J. A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. **Molecular Ecology**, v. 4, n. 1, p. 129-131, 1995.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1990.
- DUMOLIN-LAPEGUE, S.; PEMONGE, M. H.; PETIT, R. J. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 4, p. 393-397, 1997.
- FAY, M. F. et al. Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) with a focus on north-western Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms. **Annals of Botany**, v. 104, n. 3, p. 517-525, 2009.
- GRIVET, D.; PETIT, R. J. Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 8, p. 1351-1362, 2002.
- JIN, H. J. et al. Inhibition of Taq DNA polymerase by seaweed extracts from British Columbia, Canada and Korea. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, n. 4, p. 383-388, 1997.
- LUMARET, R. et al. Phylogeographical variation of chloroplast DNA in holm oak (*Quercus ilex* L.). **Molecular Ecology**, v. 11, n. 11, p. 2327-2336, 2002.
- MAGRI, D. et al. The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 24, p. 5259-5266, 2007.
- MOOG, R. J.; BOND, J. M. A cheap, reliable and rapid method of extracting high-quality DNA from plants. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 4, p. 666-668, 2003.

MORITZ, C.; FAITH, D. P. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 4, p. 419-429, 1998.

NEWTON, A. C. et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, n. 4, p. 140-145, 1999.

NOVAES, R. M. L.; RODRIGUES, J. G.; LOVATO, M. B. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 1, p. 86-96, 2009.

NOVAES, R. M. L. et al. Phylogeography of *Plathy-
menia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 7, p. 985-998, 2010.

PETIT, R. J.; KREMER, A.; WAGNER, D. B. Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. **Heredity**, v. 71, n. 6, p. 630-641, 1993.

RAMOS, A. C. S.; LEMOS-FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Phylogeographical structure of the Neotropical Forest Tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from Cerrado. **Journal of Heredity**, v. 100, n. 2, p. 206-216, 2009.

SANTOS, R. M. et al. Estrutura e florística de um remanescente florestal na Fazenda Ribeirão, município de Juvenília, MG, Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 4, p. 154-162, 2008.

SHAW, J. et al. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, v. 94, n. 3, p. 275-288, 2007.

TABERLET, P. et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, v. 17, n. 5, p. 1105-1109, 1991.

WHITLOCK, R. et al. A high-throughput protocol for extracting high-purity genomic DNA from plants and animals. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 4, p. 736-741, 2008.