

Review

A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas

Daniela R. Lacerda¹; Maria D. P. Acedo¹; José P. de Lemos Filho² & Maria B. Lovato¹

¹ Departamento de Biologia Geral e ² Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Caixa Postal 486. CEP: 30123-970. Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: dlacerda@dedalus.lcc.ufmg.br

Abstract

The RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique has been widely used in genetic studies of plant species, since the beginning of the 90's when it was first described. Several works have demonstrated the utility of this methodology to get insight into the genetic diversity and structure of natural populations aiming at conservation of the studied species. Other applications related to conservation, such as hybrid detection and species identification, can be found in the literature. The RAPD technique produces molecular markers through the use of small primers with arbitrary sequences and, because of that, it is specially useful for investigating species which had not been described genetically. This technique is also very useful to analyze rare or threatened species, since it is fast and shows a high potential to detect polymorphism even when small amount of genomic DNA is available. The present review discusses the main advantages and limitations of the RAPD technique, aiming to show why it is an important tool in population and conservation genetics.

Keywords: RAPD, Molecular markers, Genetic diversity, Population genetics, Plant conservation.

Introdução

Até cerca de 15 anos atrás, as isoenzimas representavam os principais tipos de marcadores usados para análise de variação genética em populações de plantas (Hamrick & Godt, 1989). Com o surgimento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), em meados da década de 80, houve uma verdadeira revolução em termos de pesquisas genéticas (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Newton et al., 1999). Os avanços dos estudos moleculares trouxeram um aumento significativo dos conhecimentos na área de Genética de Populações, com diversas aplicações em estudos evolutivos, permitindo avaliar a diversidade genética diretamente ao nível de DNA, livre de influências do ambiente ou do estágio de desenvolvimento do organismo analisado.

Entretanto, a necessidade de conhecimentos prévios sobre a seqüência de nucleotídeos da espécie a ser estudada, os custos elevados para a obtenção destes conhecimentos e para a realização das análises, limitaram durante alguns anos a aplicação das novas técnicas desenvolvidas baseadas em PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Foi com o desenvolvimento de técnicas de amplificação de DNA utilizando *primers* (iniciadores) pequenos e de seqüência arbitrária que o uso da PCR se difundiu por todo o mundo, permitindo a análise genética de diversas espécies à um custo relativamente baixo e de forma bastante simplificada (Hadrys et al., 1992). No início da década de 90,

três grupos desenvolveram ao mesmo tempo e independentemente esta metodologia de análise, com algumas diferenças entre eles. Welsh & McClelland (1990) desenvolveram o que chamaram de AP-PCR (Arbitrarily Primed - PCR), uma técnica que utiliza *primers* de seqüência arbitrária com cerca de 20 nucleotídeos, corrida eletroforética em géis de poliacrilamida e visualização das bandas por autoradiografia. Em 1991, Caetano-Anóles et al. publicaram uma técnica similar denominada DAF (DNA Amplification Fingerprinting), que também utiliza géis de poliacrilamida, mas se baseia no uso de *primers* bem menores (entre 5 e 8 nucleotídeos). A técnica que acabou tornando-se a mais popular das três foi descrita por Williams et al., ainda em 1990, e recebeu o nome de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

Características principais da técnica de RAPD

A técnica de RAPD consiste na amplificação de DNA genômico em PCR utilizando *primers* de seqüência arbitrária com 10 nucleotídeos. Tipicamente utiliza-se apenas um tipo de *primer* em cada reação, sendo este normalmente formado por diferentes combinações das quatro bases nitrogenadas, com um conteúdo de G+C entre 50 e 70% (Fritsch & Rieseberg, 1996). O princípio da técnica é muito simples: o *primer* se liga à seqüências complementares em fitas opostas do DNA alvo e ocorre a amplificação *in vitro* do segmento de DNA entre dois *primers* adjacentes com o auxílio da enzima *Taq* polimerase. Os sítios de ligação dos *primers* devem estar separados por no má-

ximo 3 a 4 mil pares de bases, uma vez que a *Taq* polimerase não é capaz de percorrer segmentos maiores nas condições normalmente usadas durante a amplificação (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Fritsch & Rieseberg, 1996). Por serem pequenos, é grande a possibilidade de que os *primers* encontrem diversas regiões do genoma para se ligarem, fazendo com que diversos fragmentos de tamanhos diferentes resultem de uma reação (Williams et al., 1990). A quantidade de fragmentos a serem produzidos para uma análise é virtualmente ilimitada, dependendo apenas do número de *primers* utilizados. Um “perfil RAPD” será formado pelo conjunto dos produtos de amplificação de diversos *primers* diferentes. A separação dos produtos amplificados pode ser feita em gel de agarose (em concentrações que variam de 0,8 a 2%), corado com brometo de etídio, ou em gel de poliacrilamida.

De acordo com Williams et al. (1990), alterações de uma única base no sítio de ligação do *primer* podem inviabilizar o anelamento impedindo a amplificação do fragmento correspondente, o que não significa que todos os fragmentos amplificados resultem de um pareamento perfeito entre *primer* e sítio de ligação. Outros tipos de polimorfismo podem ser decorrentes de deleções de sítios e inserções ou deleções entre dois sítios de anelamento adjacentes, provocando a ausência de amplificação ou a amplificação de um fragmento de tamanho diferente, aparecendo como uma nova banda no gel. De qualquer forma, o polimorfismo detectado por estes marcadores tem natureza binária, ou seja, um determinado fragmento ou banda está presente ou ausente no gel (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Bandas de tamanhos diferentes são consideradas locos diferentes.

Marcadores RAPD são dominantes, o que significa que indivíduos homocigotos dominantes para um determinado loco e indivíduos heterocigotos não podem ser diferenciados a partir do perfil de amplificação uma vez que ambos serão representados pela presença de uma banda no gel. Marcadores RAPD são considerados neutros e aparentemente estão distribuídos ao acaso por todo o genoma (Williams et al., 1993), representando desde seqüências de cópia única até seqüências altamente repetitivas (Williams et al., 1990; Ferreira & Grattapaglia, 1995). Chalmers et al., (1992), realizando experimentos de hibridização pela técnica de *Southern blot*, concluíram que o polimorfismo genético detectado por estes marcadores revelou apenas um alelo por loco, o qual correspondia ao produto amplificado visualizado em gel. Aagaard et al. (1998) concordam com esta conclusão de Chalmers et al. (1992), entretanto acreditam que o alelo nulo possa corresponder a uma espécie de “grupo de alelos”, ou seja, diversos tipos diferentes de mutação podem resultar na ausência de amplificação representada pela falta da banda no gel.

Vantagens e limitações da técnica de RAPD

Entre as vantagens frequentemente citadas para a técnica de RAPD, pode-se destacar: simplicidade, rapidez, baixo custo, demanda de quantidades mínimas de DNA para realização das análises, possibilidade de estudo de espécies sobre as quais não se tem nenhum tipo de informação genética e espécies com pouco ou nenhum polimorfismo em locos isoenzimáticos.

O fato da técnica de RAPD demandar uma quantidade mínima de DNA por reação (cerca de 10 a 25 ng), torna esta análise especialmente atraente para o estudo genético de plantas,

dado às dificuldades encontradas para a obtenção de DNA em grande quantidade e de boa qualidade para as amplificações em muitas espécies (Romano & Brasileiro, 1999). Da mesma forma, também torna a técnica interessante para o estudo de espécies raras ou ameaçadas, nas quais pode ser bastante complicado obter amostras de tecido em quantidade suficiente para a extração de maior quantidade de DNA (Brauner et al., 1992; Rossetto et al., 1995; Black-Samuelsson et al., 1997). Diversos autores (e.g. Rossetto et al., 1995; Fritsch & Rieseberg, 1996) consideram que a técnica de RAPD, por demandar pouca quantidade de DNA para as análises e pela grande possibilidade de se detectar polimorfismo genético, seja especialmente recomendada para estudos de populações raras ou ameaçadas. Outra característica que torna a técnica de RAPD interessante para o estudo de espécies ameaçadas é a velocidade com que informações genéticas relevantes podem ser produzidas. Através da técnica de RAPD é possível conhecer a diversidade e a estrutura genética de populações de uma espécie ameaçada com poucas semanas de trabalho laboratorial. Tais informações podem ser prontamente utilizadas como ferramenta auxiliar no delineamento de estratégias de conservação *in situ* ou *ex situ*. Em muitas situações envolvendo conservação, a tomada de decisões em curto prazo pode ser importante.

Por utilizar *primers* de seqüência arbitrária, a técnica de RAPD permite a realização de análises genéticas diretamente ao nível de DNA sem a necessidade de nenhum conhecimento prévio sobre a genética da espécie a ser estudada. Técnicas de análise de DNA que demandam o uso de *primers* específicos para a amplificação de determinadas seqüências dificilmente poderiam ser usadas para o estudo de um grande número de espécies sobre as quais praticamente não há nenhum tipo de informação sobre características genéticas, demográficas ou ecológicas, incluindo-se nesse grupo boa parte das arbóreas tropicais (Nason et al., 1997).

Trabalhando-se com a técnica de RAPD, é possível obter facilmente um grande número de marcadores, freqüentemente mais de 80, enquanto que estudos genéticos feitos através da utilização de isoenzimas dificilmente conseguem obter mais do que 30 locos para análise. Considerando-se que um número ilimitado de marcadores podem ser produzidos, bastando usar um grande número de *primers*, é possível encontrar marcadores RAPD polimórficos mesmo em espécies com níveis muito baixos de polimorfismo para locos isoenzimáticos (Hadrys et al., 1992). Heun et al. (1994) destacam que provavelmente a contribuição mais importante trazida por estes marcadores seja a possibilidade de determinar de forma mais acurada as relações entre indivíduos e populações semelhantes demais para serem diferenciados por isoenzimas. Para muitas espécies raras ou ameaçadas, com populações de tamanho pequeno, ou espécies de plantas que se reproduzem principalmente por auto-fecundação, as isoenzimas podem não revelar polimorfismo e, nesse caso, a técnica de RAPD aparece como uma alternativa bastante interessante (Brauner et al., 1992).

Além das vantagens já citadas da técnica de RAPD, em relação às isoenzimas, pode-se destacar ainda que enquanto estas refletem apenas regiões codificadoras, já que avaliam o produto final de alguns genes, a técnica de RAPD faz uma amostragem mais abrangente do genoma, refletindo regiões repetitivas e de seqüência única, regiões codificadoras e não-codificadoras (Hadrys et al., 1992; Lynch & Milligan, 1994; Fritsch &

Rieseberg, 1996). Em relação à técnica de RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), a técnica de RAPD é muito mais simples, requer uma quantidade menor de DNA para as análises e dispensa a utilização de compostos radioativos (Fritsch & Rieseberg, 1996).

Entre as limitações da técnica, duas podem ser consideradas as mais importantes. Uma delas se refere à característica dominante dos marcadores RAPD que não permite a diferenciação de indivíduos heterozigotos e, conseqüentemente, a obtenção de outras informações relevantes para estudos genéticos. Outra limitação, bastante avaliada durante os primeiros anos de aplicação da técnica de RAPD, é a questão da baixa repetibilidade de algumas bandas.

A característica dominante da técnica de RAPD certamente traz alguns inconvenientes, principalmente do ponto de vista da análise estatística. Clark & Lanigan (1993), Lynch & Milligan (1994) e Stewart & Excoffier (1996) são alguns autores que tem procurado desenvolver metodologias de análise dos dados visando contornar o problema da dominância. Os dois primeiros baseiam suas análises na premissa de que a(s) população(ões) está(ão) em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Entretanto, apesar de vários autores trabalharem com esta premissa (e.g. Smith & Pham, 1996; Aagaard et al., 1998; Morden & Loeffler, 1999), esta pode não corresponder à realidade em muitas populações naturais, onde diferentes graus de endogamia ou auto-fecundação afastam a população do equilíbrio. Por outro lado, a análise de variância molecular (AMOVA - *analysis of molecular variance*), desenvolvida por Excoffier et al. (1992) para análise de haplótipos de DNA mitocondrial e adaptada por Stewart & Excoffier (1996) para analisar dados de RAPD, trabalha com fenótipos RAPD e dispensa qualquer premissa relacionada ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esta análise têm sido muito utilizada com dados de RAPD (Huff et al., 1993; Palacios & González-Candelas, 1997; Lacerda et al., 2001), mostrando-se uma ferramenta eficiente para determinar a diversidade e a estrutura genética das populações estudadas, permitindo inclusive a determinação de alguns índices da estatística F de Wright (1951) e sua significância. Um outro índice bastante utilizado com dados de RAPD (Yeh et al., 1995; Wolff et al., 1997; Lacerda et al., 2001), apesar de não ter sido criado com esta finalidade, é o índice de Shannon (Lewontin, 1972; King & Schaal, 1989). Estimado a partir das frequências de presença e ausência de bandas, o índice de Shannon mede a variação genética intrapopulacional (diversidade fenotípica), em analogia à heterozigotidade esperada, sem a necessidade de assumir que as populações estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estas e outras análises têm permitido extrair o máximo de informação a partir de dados de RAPD, apesar de sua característica dominante e sua natureza binária que fazem com que a quantidade de informação obtida por loco seja menor, quando comparada à marcadores co-dominantes como as isoenzimas e o RFLP (Fritsch & Rieseberg, 1996). Estimativas de frequências alélicas e genotípicas e de heterozigotidade só podem ser obtidas com precisão através da utilização de marcadores co-dominantes, limitando o uso da técnica de RAPD na determinação de importantes parâmetros da genética de populações como, por exemplo, sistema de acasalamento e grau de endogamia. Entretanto, a despeito desta limitação, alguns autores têm utilizado a técnica de RAPD para estimar taxas de cruzamento (e.g. Fritsch & Rieseberg, 1992). Kermit Ritland desenvolveu o programa

MLDT que estima taxa de fecundação cruzada (t) e coeficiente de endogamia (F) a partir de marcadores dominantes, incluindo RAPD (home-page: <http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html>).

A baixa repetibilidade de algumas bandas é freqüentemente citada na literatura como uma das principais limitações da técnica. Em função disso, diversos estudos foram realizados, principalmente entre 1991 e 1995, na tentativa de esclarecer melhor a natureza destes marcadores, avaliar os principais fatores que interferem na qualidade das amplificações, apontar as origens dos problemas mais comumente citados e sugerir protocolos considerados mais eficientes (e.g., Ellsworth et al., 1993; Heun & Helentjaris, 1993; Halldén et al., 1996; Rabouam et al., 1999). Muitos destes estudos destacam que alterações nas concentrações de cloreto de magnésio, DNA genômico, *primer* e *Taq* polimerase são as principais causas para o aparecimento de bandas consideradas artefatuais. Uma outra causa freqüentemente apontada de baixa repetibilidade é a competição entre os sítios de ligação dos *primers* por substrato e reagentes (Heun & Helentjaris, 1993; Ferreira & Grattapaglia, 1995; Halldén et al., 1996). Esta competição e bandas artefatuais decorrentes de rearranjos parecem ser ainda os problemas mais sérios da técnica (Nybom & Bartish, 2000). De qualquer forma, parece haver um consenso de que a realização de estudos prévios para a escolha dos *primers* mais adequados para a espécie alvo do estudo, o estabelecimento das concentrações ótimas dos reagentes e do programa de PCR e uma cuidadosa atenção aos detalhes reduzem bastante a possibilidade de se obter bandas de baixa repetibilidade (Hadrys et al., 1992; Heun & Helentjaris, 1993; Virk et al., 1995). Alguns autores têm optado pela utilização da técnica AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) que reúne muitas das vantagens do RAPD à uma maior repetibilidade, uma vez que utiliza *primers* maiores. Entretanto a AFLP, também apresenta característica dominante e é relativamente mais cara e trabalhosa do que a técnica de RAPD (Ferreira & Grattapaglia, 1995), limitando relativamente sua utilização.

Aplicações da técnica de RAPD

Desde seu surgimento em 1990, muitos estudos têm demonstrado a utilização da técnica de RAPD na realização de análises genéticas com diferentes finalidades em diversos grupos taxonômicos de plantas, animais e microorganismos. É provável que a principal utilização da técnica de RAPD na genética e conservação de plantas seja a determinação da diversidade e da estrutura genética em populações naturais. Diversos trabalhos ilustram esta aplicação da técnica na avaliação do *status* genético de populações de plantas de diversas famílias diferentes, visando não apenas a caracterização, como também a conservação destas espécies (e.g. Chalmers et al., 1992; Rossetto et al., 1995; Bonnin et al., 1996; Palacios & González-Candelas, 1997; Cardoso et al., 1998; Lacerda et al., 2001). Rossetto et al. (1995) realizaram um estudo utilizando a técnica de RAPD na análise dos 27 indivíduos remanescentes da espécie *Grevillea scapigera*. Os resultados obtidos permitiram selecionar um grupo de 10 plantas, que mantinha boa parte da variação genética detectada, para ser usado em um programa de recuperação da espécie. Cardoso et al. (1998) puderam identificar áreas de máxima diversidade entre populações naturais de *Caesalpinia*

echinata (o ameaçado “pau-brasil”), usando a técnica de RAPD como uma ferramenta preliminar para o estudo da espécie. A recomendação dada pelos autores, baseada na diversidade e na estrutura genética das populações analisadas, é que plantas de diferentes populações e de diferentes regiões deveriam ser usadas em um programa de recuperação. Trabalhando com populações naturais da espécie arbórea *Plathymenia reticulata*, Lacerda et al. (2001) puderam estabelecer os níveis de diversidade genética presente dentro e entre as populações. Apesar de não se tratar de uma espécie ameaçada, *P. reticulata* é característica do bioma Cerrado que se encontra muito ameaçado pela ação do homem e com poucas espécies avaliadas do ponto de vista genético. O estudo ressalta a importância da preservação dos fragmentos onde a espécie pode ser encontrada e se propõe a servir como referência para futuros estudos que visem avaliar os impactos da fragmentação de habitats na diversidade e na estrutura genética de populações naturais. Estudos de diversidade e estrutura genética em plantas, utilizando RAPD, tem sido tão frequentes que, recentemente, Nybom & Bartish (2000) publicaram uma revisão sobre o tema, correlacionando alguns padrões encontrados com características das espécies estudadas, a exemplo do que haviam feito Hamrick & Godt (1989) com trabalhos utilizando isoenzimas.

A técnica de RAPD também tem sido usada para o estabelecimento de relações filogenéticas e diferenciação de espécies próximas (Arnold et al., 1991; Linfante & Aguinalde, 1996; Wolff & Morgan-Richards, 1998) bem como para a detecção de híbridos (Daehler & Strong, 1997; De Greef & Triest, 1999; Kuehn et al., 1999). Por produzir um grande número de marcadores, a técnica de RAPD permite encontrar alguns específicos de gêneros, espécies, subespécies ou raças, tornando a técnica interessante para o estabelecimento de relações taxonômicas (Hadrys et al., 1992; Aagaard et al., 1995). A diferenciação de espécies ao nível molecular e a identificação de híbridos podem ser importantes para o delineamento de programas de conservação, uma vez que, entre outras coisas, auxiliam decisões sobre alocação de recursos financeiros e permite sugerir cautelas a serem tomadas quanto à translocação de indivíduos. Daehler & Strong (1997), por exemplo, mostram como a técnica de RAPD foi utilizada para identificar híbridos (na natureza e em casa de vegetação) entre a planta nativa *Spartina foliosa* e a introduzida *S. alterniflora* (Califórnia, USA) e sugerir estratégias de conservação da espécie nativa. Quatro *primers* RAPD permitiram a identificação de marcadores espécie-específicos e a comprovação da ocorrência de hibridização entre *S. foliosa* e *S. alterniflora* e entre o híbrido e *S. foliosa*. Em função de competição com a espécie invasora, introgressão e competição com os híbridos, *S. foliosa* estava sujeita à risco severo em algumas regiões dentro de sua área de ocorrência. Os autores sugeriram que *S. alterniflora* não fosse introduzida em outras localidades e que a translocação da espécie nativa fosse feita com cautela, pois os híbridos, morfológicamente semelhantes à espécie nativa, poderiam ser propagados acidentalmente. Lacerda (2000) identificou marcadores RAPD específicos para *Plathymenia reticulata* e *P. foliolosa*, duas espécies arbóreas que, por sua grande similaridade morfológica, são de difícil identificação a partir de coleções de herbário (Heringer & Ferreira, 1973; Lewis, 1987). O estudo indicou ainda uma possível ocorrência de fluxo gênico entre as duas espécies, uma vez que uma das populações analisadas de *P. foliolosa* apresentou marcadores

característicos de *P. reticulata*. Outros estudos deverão ser feitos para comprovar se esta população pode ser apontada como parte de uma zona híbrida entre *P. reticulata* e *P. foliolosa*. Os marcadores espécie-específicos encontrados poderão servir como futura referência para a identificação de indivíduos destas duas arbóreas.

Por sua rapidez e simplicidade, alguns autores (Virk et al., 1995; Heun & Helentjaris, 1993) consideram a técnica de RAPD também muito adequada para a avaliação da diversidade genética em bancos de germoplasma. Outras aplicações da técnica de RAPD incluem: produção de *fingerprintings* (Wilde et al., 1992), construção de mapas genéticos (Williams et al., 1990) e estudos de origem de poliplóides (Brochmann et al., 1998).

Os exemplos relatados ilustram algumas das principais aplicações da técnica de RAPD na biologia da conservação. As revisões de Hadrys et al. (1992) e Fritsch & Rieseberg (1996) também fazem algumas considerações sobre a aplicação da técnica de RAPD em ecologia molecular e genética da conservação.

Conclusão

A técnica de RAPD mostra-se especialmente indicada para a realização de estudos em espécies desconhecidas geneticamente, por utilizar *primers* pequenos e de seqüência arbitrária, e espécies raras ou ameaçadas, por demandar pequena quantidade de material para as análises, por ter grande potencial para detectar polimorfismo genético e por permitir a obtenção rápida de resultados. Por seu custo relativamente baixo, a técnica de RAPD é uma ferramenta acessível à muitos laboratórios, permitindo a estimativa de importantes parâmetros genéticos em curto tempo. A caracterização genética de populações e espécies de plantas, ameaçadas ou não, é um passo complementar importante para o delineamento de estratégias de conservação *in situ* ou *ex situ*.

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES, FAPEMIG e PELD/CNPq pela concessão de bolsas e pelo financiamento das pesquisas conduzidas no Laboratório de Genética de Populações do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Referências

- Aagaard, J. E.; Volmer, S. S.; Sorensen, F. C. & Strauss, S. H. 1995. Mitochondrial DNA products among RAPD profiles are frequent and strongly differentiated between races of Douglas-fir. **Molecular Ecology**, **4**:441-447.
- Aagaard, J. E.; Krutovskii, K. V. & Strauss, S. H. 1998. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. **Heredity**, **81**: 69-78.
- Arnold, M. L.; Buckner, C. M. & Robinson, J. J. 1991. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana

- irises. **Proceeding of the National Academy of Science of USA**, **88**: 1398-1402.
- Black-Samuelsson, S.; Eriksson, G.; Gustafsson, L. & Gustafsson, P. 1997. RAPD and morphological analysis of the rare plant species *Vicia pisiformis* (Fabaceae). **Biological Journal of Linnean Society**, **61**: 325-343.
- Bonnin, I.; Huguet, T.; Gherardi, M.; Prospero, J. M. & Olivieri, I. 1996. High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. **American Journal of Botany**, **83**: 843-855.
- Brauner, S.; Crawford, D. J. & Stuessy, T. F. 1992. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae. **American Journal of Botany**, **79**: 1436-1439.
- Brochmann, C.; Xiang, Q.; Brunsfeld, S. J.; Soltis, D. E. & Soltis, P. S. 1998. Molecular evidence for polyploid origins in *Saxifraga* (Saxifragaceae): the narrow arctic endemic *S. svalbardensis* and its widespread allies. **American Journal of Botany**, **85**: 135-143.
- Caetano-Anollés, G.; Bassam, B. J. & Gresshoff, P. M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. **Biotechnology**, **9**: 553-556.
- Cardoso, M. A.; Provan, J.; Powell, W.; Ferreira, P. C. G. & Oliveira, D. E. 1998. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**, **7**: 601-608.
- Chalmers, K. J.; Waugh, R.; Sprent, J. I.; Simons, A. J. & Powell, W. 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. **Heredity**, **69**: 465-472.
- Clark, A. G. & Lanigan, C. M. S. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs. **Molecular Biology and Evolution**, **10**: 1096-1111.
- Daehler, C. C. & Strong, D. R. 1997. Hybridization between introduced smooth cordgrass (*Spartina alterniflora*; Poaceae) and native California cordgrass (*S. foliosa*) in San Francisco Bay, California, USA. **American Journal of Botany**, **84**: 607-611.
- De Greef, B. & Triest, L. 1999. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for hybrid detection in *Scirpus* from the river Schelde (Belgium). **Molecular Ecology**, **8**: 379-386.
- Ellsworth, D. L.; Rittenhouse, K. D. & Honeycutt, R. L. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. **Biotechniques**, **14**: 214-217.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E. & Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, **131**: 479-491.
- Ferreira, M. E. & Grattapaglia, D. 1995. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2ª. ed. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN, 220 pp.
- Fritsch, P. & Rieseberg, L. H. 1992. High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. **Nature**, **359**: 633-636.
- Fritsch, P. & Rieseberg, L. H. 1996. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Smith, T. B. & Wayne, R. K. (Ed.). **Molecular genetic approaches in conservation**, New York: Oxford University Press, pp. 54-73.
- Hadrys, H.; Balick, M. & Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology**, **1**: 55-63.
- Halldén, C.; Hansen, M.; Nilsson, N.; Hjerdin, A. & Säll, T. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, **93**: 1185-1192.
- Hamrick, J. L. & Godt, M. J. W. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brow, A. H. D.; Clegg, M. T.; Kahler, A. L. & Weir, B. S. (Ed.) **Plant population genetics, breeding and genetic resources**, Sunderland: Sinauer Associates Inc. pp. 43-63.
- Herlinger, E. P. & Ferreira, M. B. 1973. Árvores úteis no cerrado (I): Vinhático – o gênero *Plathymenia* Benth. *P. foliolosa* Benth. e *P. reticulata* Benth. vinhático da mata e vinhático do campo (par vicariante). **Cerrado**, **5**: 28-34.
- Heun, M. & Helentjaris, T. 1993. Inheritance of RAPDs in F₁ hybrids of corn. **Theoretical and Applied Genetics**, **85**: 961-968.
- Heun, M.; Murphy, J. P. & Phillips, T. D. 1994. A comparison of RAPD and isozyme analyses for determining the genetic relationships among *Avena sterilis* L. accessions. **Theoretical and Applied Genetics**, **87**: 689-696.
- Huff, D. R.; Peakall, R. & Smouse, P. E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. **Theoretical and Applied Genetics**, **86**: 927-934.
- King, L. M. & Schall, B. A. 1989. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. **Evolution**, **43**: 1117-1119.
- Kuehn, M. M.; Minor, J. E. & White, B. N. 1999. An examination of hybridization between the cattail species *Typha latifolia* and *Typha angustifolia* using random amplified polymorphic DNA and chloroplast DNA markers. **Molecular Ecology**, **8**: 1981-1990.
- Lacerda, D.R. 2000. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Plathymenia reticulata* e *P. foliolosa* (vinhático do campo e vinhático da mata) e diferenciação molecular das duas espécies**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- Lacerda, D. R.; Acedo, M. D. P.; Lemos Filho, J. P. & Lovato, M. B. 2001. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, **10**: 1143-1152.
- Lewis, G. P. 1987. **Legumes of Bahia**. Kew, Royal Botanic Gardens. 369 pp.
- Lewontin, R. C. 1972. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, **6**: 381-398.

- Linfante, Z. D. & Aguinalgalde, I. 1996. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers for the study of taxonomical relationships among species of *Asphodelus* sect. *Verinea* (Asphodelaceae). **American Journal of Botany**, **83**: 949-953.
- Lynch, M. & Milligan, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, **3**: 91-99.
- Morden, C. W. & Loeffler, W. 1999. Fragmentation and genetic differentiation among subpopulations of the endangered Hawaiian mint *Haplostachys haplostachya* (Lamiaceae). **Molecular Ecology**, **8**: 617-625.
- Nason, J. D.; Aldrich, P. R. & Hamrick, J. L. 1997. Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. In: Laurence, W. F. & Bierregaard Jr. R. O. (Ed.) **Tropical Forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities**, Chicago: University of Chicago Press, pp. 304-320
- Newton, A. C.; Allnutt, T. R.; Gillies, A. C. M.; Lowe, A. J. & Ennos, R. A. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, **14**: 140-146.
- Nybom, H. & Bartish, I. V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, **3/2**: 93-114.
- Palacios, C. & González-Candelas, F. 1997. Analysis of population genetic structure and variability using RAPD markers in the endemic and endangered *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae). **Molecular Ecology**, **6**: 1107-1121.
- Rabouam, C.; Comes, A. M.; Bretagnolle, V.; Humbert, J.; Periquet, G. & Bigot, Y. 1999. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. **Molecular Ecology**, **8**: 493-503.
- Romano, E. & Brasileiro A. C. M. 1999. Extração de DNA em plantas: soluções para problemas comumente encontrados. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, **9**: 40-43.
- Rossetto, M.; Weaver, P. K. & Dixon, K. W. 1995. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). **Molecular Ecology**, **4**: 321-329.
- Smith, J. F. & Pham, T. V. 1996. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). **American Journal of Botany**, **83**: 717-726.
- Stewart, C. N. Jr. & Excoffier, L. 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). **Journal of Evolutionary Biology**, **9**: 153-171.
- Virk, P. S.; Ford-Lloyd, B. V.; Jackson, M. T. & Newbury, H. J. 1995. Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. **Heredity**, **74**: 170-179.
- Welsh, J. & McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, **18**: 7213-7218.
- Wilde, J.; Waugh, R. & Powell, W. 1992. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. **Theoretical and Applied Genetics**, **83**: 871-877.
- Williams, J. G. K.; Kubelik, A. R.; Livak, K. J.; Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, **18**: 6531-6535.
- Williams, J. G. K.; Hanafey, M. K.; Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, **218**: 704-740.
- Wolff, K.; El-Akkad, S. & Abbott, R. J. 1997. Population substructure in *Alkanna orientalis* (Boraginaceae) in the Sinai Desert, in relation to its pollinator behaviour. **Molecular Ecology**, **6**: 365-372.
- Wolff, K. & Morgan-Richards, M. 1998. PCR markers distinguish *Plantago major* subspecies. **Theoretical and Applied Genetics**, **96**: 282-286.
- Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. **Annals of Eugenetics**, **15**: 395-420.
- Yeh, F. C.; Chong, D. K. X. & Yang, R. -C. 1995. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. **Journal of Heredity**, **86**: 454-460.