

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM
Cedrela fissilis Vell. OBTIDA
POR MARCADORES RAPD**

NAYARA SOARES ASSUNÇÃO

2004

NAYARA SOARES ASSUNÇÃO

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM
Cedrela fissilis Vell. OBTIDA
POR MARCADORES RAPD**

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Florestal da Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso Engenharia Florestal, para a obtenção do título de Engenheira Florestal.

Orientadora

Prof^ª. Dra. Dulcinéia de Carvalho

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Assunção, Nayara Soares

Divergência genética em *Cedrela fissilis* Vell. obtida por marcadores RAPD /
Nayara Soares Assunção. -- Lavras : UFLA, 2004.
29 p. : il.

Orientadora: Dulcinéia de Carvalho.

Monografia – UFLA.

Bibliografia.

1. *Cedrela fissilis* Vell. 2. Marcadores moleculares. 3. RAPD. 4. Divergência genética. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-634.9756

NAYARA SOARES ASSUNÇÃO

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM
Cedrela fissilis Vell. OBTIDA
POR MARCADORES RAPD**

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Florestal da Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso Engenharia Florestal, para a obtenção do título de Engenheira Florestal.

APROVADA em 16 de junho de 2004

Prof.^ª Dra. Dulcinéia de Carvalho
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Arne e Ana Maria.

Aos meus irmãos, Breno e Pablo.

Aos meus futuros sobrinhos (as)

Aos meus avós, tios e primos.

À meu noivo, Francislei.

A vocês, um simples obrigado é pouco.

Saibam que as alegrias de hoje são de vocês,
pois foram o seu amor, o estímulo e o carinho
as armas para mais esta conquista.

A minha companheira de todas as horas,

LELECA.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, proteção e por ter permitido mais esta vitória.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciências Florestais, pela oportunidade de realização deste curso.

A professora Dulcinéia de Carvalho, pelo incentivo, apoio, paciência e pelos grandes ensinamentos transmitidos.

Aos professores do Departamento de Ciências Florestais, pelos ensinamentos transmitidos e amigável convivência.

Aos colegas do Laboratório de Melhoramento Florestal, Regiane, Anderson, Marcinha, pelo convívio e amizade. Em especial aos amigos Ana Luiza (Aninha), Marina, Anderson, Lígia (in memoria) pela força e incentivo.

À Joema Souza Rodrigues Póvoa, pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao meu noivo Francislei Vitti Raposo, pelo incentivo, carinho e ajuda, nos momentos mais difíceis.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Florestais, que souberam dar a sua contribuição neste trabalho, minha gratidão.

A todos que não foram citados, mas nem por isso esquecidos, e que contribuíram de alguma maneira para o êxito desse trabalho.

...Quantas chances desperdicei
Quando o que eu mais queria
Era provar pra todo mundo
Que eu não precisava
Provar nada pra ninguém. ...

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 A Espécie <i>Cedrela fissilis</i>	3
2.2 Marcadores moleculares no estudo de populações.....	4
2.3 Marcadores moleculares	5
3 MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Coleta do material genético	8
3.2 Extração de DNA.....	8
3.3 Amplificação do DNA.....	10
3.4 Eletroforese	11
3.5 Análise dos dados moleculares e obtenção das similaridades genética	12
..	
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5 CONCLUSÕES	21
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
ANEXO	27

RESUMO

Divergência genética em *Cedrela fissili* Vell. obtida por marcadores RAPD. Lavras: UFLA, 2004. 45p (Monografia – Graduação em Engenharia Florestal)

Para a elaboração de estratégias de conservação genética e também para a utilização de espécies visando o melhoramento, é necessário o conhecimento da diversidade genética das populações. Esta diversidade pode ser obtida pela utilização de marcador molecular como o RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), os quais apresentam vantagens como a simplicidade, a rapidez, o baixo custo, além de, possibilitar uma ampla amostragem do genoma. Neste contexto, o presente trabalho foi realizado para determinar a divergência genética em *Cedrela fissilis* Vell. utilizando marcadores RAPD. Para isto, foram utilizados 19 indivíduos adultos, oriundos da Mata do Galego, situada no município de Luminárias no Sul de Minas Gerais. A extração de DNA e as reações de RAPD seguiram o protocolo de Nienhuis et al., (1995). Os produtos da amplificação separados foram por eletroforese em gel de agarose, corados e fotografados. Posteriormente, estes foram analisados quanto à presença ou ausência de bandas, formando uma matriz, que foi utilizada para o cálculo das distâncias genéticas e para a construção de um dendrograma. Foram amplificados 59 fragmentos de DNA, utilizando 13 oligonucleotídeos, sendo 7 fragmentos monomórficos e 52 polimórficos. A distância genética média foi de 36,9% e a amplitude das distâncias variou de 7% a 68%. A maior similaridade foi obtida entre os indivíduos 1 e 19 e a maior divergência entre os genótipos 8 e 9. Pelo método de Tocher foram obtidos cinco grupos distintos. Estes dados revelam a alta divergência observada na população analisada corroborando com os resultados obtidos por Póvoa (2002) e Gandara (1996), revelando ser esta uma espécie promissora para futuros programas de conservação e melhoramento genético florestal.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da variabilidade genética de populações é de fundamental importância para o estabelecimento de práticas conservacionistas e para o sucesso de programas de melhoramento. Entre as alternativas para se determinar este parâmetro, destaca-se principalmente em espécies florestais a utilização de marcadores moleculares.

Estas técnicas moleculares impulsionaram e revolucionaram a caracterização genética de populações naturais de espécies tropicais, após 1970. Com o desenvolvimento inicial de marcadores bioquímicos, baseado no polimorfismo de isoenzimas e pelo desenvolvimento posterior dos marcadores moleculares, baseados no polimorfismo ao nível de DNA, torna-se possível analisar a diversidade molecular em populações naturais de forma rápida e precisa. Essas metodologias diferenciam pela técnica utilizada para revelar a variabilidade ao nível de DNA, e assim variam quanto à habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custos, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade (Milach, 1998).

Um dos marcadores moleculares mais empregados no estudo de populações naturais são os RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA). A sua utilização deve-se ao fato de serem tecnicamente mais simples, facilitando desta forma, o estudo de um grande número de locos e fornecendo uma amostragem aleatória mais ampla do genoma Lynch e Milligan, (1994).

Entre as inúmeras espécies arbóreas existentes, a *Cedrela fissilis*, conhecida como cedro, se destaca por possuir madeira nobre com grande diversidade de uso e por apresentar grande importância em programas de conservação ambiental. Como é uma espécie encontrada naturalmente em baixas

densidades populacionais, necessita de grandes áreas para a sua preservação e conseqüentemente este fato determina a preservação de um amplo contingente de outras espécies florestais.

Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo determinar a divergência genética de uma população de *Cedrela fissilis* Vell. por meio de marcadores moleculares RAPD.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 - A Espécie *Cedrela fissilis*.

Encontrada das florestas da Argentina às da Costa Rica, do nível do mar a cerca de 800 metros de altitude, a espécie *C. fissilis* conhecida popularmente como cedro é classificada como de ampla adaptação em toda a América Latina (Mattos, 1980; Pennington & Styles, 1981). Contudo, é uma espécie uniformemente rara (Bawa & Ashton, 1991), ou seja, ocorre tipicamente em populações de baixa densidade (menos de um indivíduo por hectare). Apresenta dicogamia (protoginia), onde suas flores unissexuais amadurecerem em épocas diferentes. Portanto, considerada como uma espécie alógama (Styles, 1972; Carvalho, 1994). Sua polinização é entomófila, sendo as mariposas e as abelhas seus prováveis agentes polinizadores (Morellato, 1991; Carvalho, 1994).

Dentre as principais espécies, cuja madeira é considerada leve, o cedro é a que apresenta maior diversidade de utilização. Com uma densidade aparente de $0,53 \text{ g/cm}^3$ é indicada para móveis finos, folha faqueadas decorativa, molduras, construções internas como venezianas, rodapés e outros (Mainieri & Chimelo, 1989). Estas características nobres da madeira provocaram a sua intensa e irracional exploração no passado e nos dias atuais (Pinazzo, 1992), colocando a espécie sob severa erosão genética devido a perdas de muitas populações e indivíduos (FAO, 1996).

Por ser uma espécie que ocorre em baixas densidades, é vista com grande interesse por ambientalistas como uma espécie indicadora para a definição de áreas de reserva genética por necessitar de grandes áreas para a sua conservação, possibilitando a conservação de espécies que ocorram em maior densidade (Kageyama & Gandara, 1993).

2.2 - Marcadores moleculares no estudo de populações naturais

A conservação de recursos genéticos dos biomas tropicais é um dos tópicos mais pertinentes na atualidade. Isto, em decorrência das elevadas taxas de destruição devido à expansão da fronteira agrícola, onde extensas áreas contínuas de vegetação vêm sendo substituída por monoculturas, reflorestamentos monoespecífico e pastagens. A conservação e o manejo da biodiversidade, mesmo em áreas protegidas, constituem-se em desafios complexos que requerem conhecimento básico sobre a distribuição e abundância de espécies, suas interações mutualísticas sua biologia e a estrutura genética de suas populações (Nitelner et al., 1992).

Portanto, o sucesso de qualquer programa de pré-melhoramento ou de conservação é dependente do conhecimento da quantidade de variação presente na espécie de interesse. Caracteres morfológicos e agronômicos, usados para a medição da diversidade genética em determinadas populações de indivíduos possuem uma grande dificuldade na identificação de grupos taxonômicos discretos. Esta dificuldade deve-se ao fato de que a grande maioria dos caracteres vegetais são influenciados por fatores ambientais, exibindo variação contínua e um alto grau de plasticidade fenotípica. Para tentar solucionar estes problemas, técnicas moleculares têm sido utilizadas para monitorar a variabilidade genética (Parker et al., 1998).

Os recentes avanços na biologia molecular abriram novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies e para os estudos de Biologia populacional como um todo. Pela primeira vez a variação encontrada em plantas e animais pode ser analisada no DNA. Diferenças na seqüência genética podem ser diretamente observadas e descritas com um grau de precisão impraticável há pouco tempo atrás. Os marcadores moleculares são uma destas técnicas.

2.3 - Marcadores moleculares

Um marcador pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente de um gene expresso (proteínas e caracteres morfológicos) ou de um segmento específico de DNA, cuja sequência e função podem ou não ser conhecidas e possuem comportamento de acordo com as leis de Mendel (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Em uma definição mais abrangente, Sakyama (1993), relata que a palavra marcadores tem sido utilizada para designar fatores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos ou genéticos, passíveis de serem identificados e que permitem o estudo comparativo de genótipos e suas progênies.

No melhoramento, os marcadores podem ser utilizados como “etiquetas” para a identificação de alelos, a fim de que estes possam ser selecionados indiretamente. Além disso, os marcadores também podem ser utilizados para amostrar o genoma de uma espécie qualquer e a partir daí, determinar a diversidade genética de um grupo de indivíduos.

Existem quatro classes de marcadores, que podem ser utilizados em vegetais: marcadores morfológicos, marcadores citológicos, marcadores bioquímicos e marcadores moleculares.

Um marcador morfológico consiste de um caráter qualitativo de alta herdabilidade, normalmente determinado por um único alelo. Os marcadores morfológicos são, em geral, fenótipos de fácil identificação visual, como nanismo, cor de pétala e morfologia foliar. Esses marcadores contribuíram, significativamente, para o desenvolvimento teórico da análise de ligação gênica e para a construção das primeiras versões de mapas genéticos. Porém, apresenta uma série de problemas, entre eles, o fato de sofrerem grande influência do ambiente. Mas, o principal problema é o fato de que essa classe de marcadores

ocorre em número reduzido, e sua expressão, em sua maioria, só pode ser observada em nível de planta adulta (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Com relação aos marcadores bioquímicos, estes consistem no uso de proteínas de reserva das sementes e isoenzimas. Ao que diz as isoenzimas, estas são definidas como um grupo de múltiplas formas moleculares de uma mesma enzima, que ocorrem em uma espécie, como resultado da presença de mais de um gene, codificando as cadeias polipeptídicas (Moss, 1982). É um marcador relativamente barato, tecnicamente acessível, embora, apresente a desvantagem de ser pouco variável, principalmente, quando se analisa populações de genótipos altamente aparentados. Além disso, também pode haver interação com outros genes, uma vez que isoenzimas são produtos gênicos. O seu uso, nos dias atuais é uma ferramenta auxiliar nos estudos de genética e melhoramento de plantas, com aplicações nas áreas de genética de populações, identificação de cultivares e genética evolutiva (Oliveira, 2000; Póvoa, 2002; Melo Junior, 2003).

O poder de detecção da variabilidade existente diretamente ao nível de DNA só foi alcançado com o desenvolvimento de várias técnicas de biologia molecular. A primeira das técnicas utilizada baseou-se na ação de enzimas de restrições, as quais reconhecem uma seqüência de DNA e clivam a molécula em sítios específicos. Estes marcadores foram chamados de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Foi utilizado por Botstein et al. (1980) para a análise genômica tornando-se ferramenta útil e importante para várias áreas da Biologia.

O grande interesse pela utilização de marcadores de DNA têm sido por estes apresentarem várias características desejáveis, como herança mendeliana simples, ausência de efeitos epistáticos e por serem utilizados em qualquer fase de desenvolvimento da planta. Isso abre a possibilidade de acelerar o processo

de recombinação e seleção dos indivíduos desejados, o que, conseqüentemente reduz o tempo necessário para completar uma geração de melhoramento, aumentando a eficiência do programa (Ferreira & Gattapaglia, 1998).

Atualmente, são conhecidas mais de umas dezenas de procedimentos alternativos entre estes se destacam os marcadores RAPD. Willians et al.(1990) foram os primeiros a descrever este tipo de marcador, os quais são gerados pela amplificação de segmentos anônimos de DNA com um simples e curto oligonucleotídeo de seqüência arbitrária. Welsh e McClelland (1990), na mesma época publicaram um trabalho utilizando o mesmo princípio do RAPD e denominaram técnica de AP-PCR (Arbitrarily-Prime-Polimerase Chain Reaction). Porém, esta técnica utilizando oligonucleotídeos arbitrários, ficou mais conhecida como RAPD. Inúmeras são as vantagens de oferecidas por estes marcadores, como exemplo: a técnica não utiliza radioatividade, não requer o conhecimento prévio da seqüência alvo a ser amplificada, necessita de pequenas quantidades de DNA, além de ser aplicável a qualquer espécie. Aliadas a estas vantagens estão o baixo custo, facilidade e rapidez no emprego da técnica.

Embora haja poucos estudos comparando diferentes tipos de marcadores, a maioria das comparações sugere que os marcadores RAPD e isoenzimas revelam padrão similar de divergência genética, mais que os RAPDs tendem a fornecer marcas relativamente específicas de populações, raças e espécies (Pekall et al., 1998). Estas características podem ser importantes para os estudos de populações visando a conservação genética.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material genético

O material para o presente estudo é originário de um fragmento florestal de aproximadamente 77 ha, conhecido como mata do Galego, localizado no município de Luminárias, nas Fazendas Barreiro e Morro Grande, às margens do Rio Ingaí, nas coordenadas 21°29'S e 44°55'W (Figura 1A e B). Possui representações de Floresta Estacional Semidecidual Aluvial e Floresta Estacional Semidecidual Montana, devido ao desnível de cerca de 121 m da borda da mata até o rio, o que proporciona um gradiente ambiental e vegetacional. O clima da região é caracterizado por verão úmido e inverno seco, com temperaturas médias mensais variando entre 21,8° C em janeiro e 16,0° C em julho e precipitação média anual é de 1.517 mm (Oliveira Filho et al., 1994).

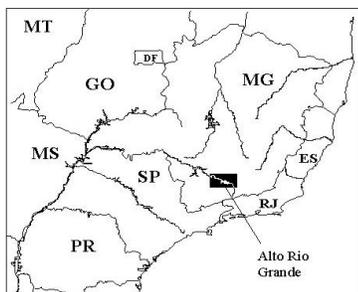
Para a amostragem dos indivíduos de *Cedrela fissilis*, toda a área do fragmento foi levantada, de modo a amostrar indivíduos reprodutivos. A coleta das folhas foi efetuada com o auxílio de bicicleta florestal, podão e atiradeira (estilingue), devido à altura dos indivíduos (em torno de 20-30 m).

As amostras foliares foram transportadas em gelo e armazenadas em freezer (-18°C). A extração de DNA foi feita no menor prazo possível, no Laboratório de Melhoramento Florestal e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Florestais da UFLA.

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita de acordo com o procedimento descrito por Nienhuis et al. (1995). Inicialmente foi realizada a maceração de 0,3 g do material vegetal, juntamente com areia lavada (1,0g) e PVP - polivinilpirrolidona (0,01g). A utilização do PVP visa retardar a oxidação de metabólicos secundários. Após a maceração foi adicionado 700 μ L de tampão de extração [2% de CTAB; 100mM de tris (pH = 8,0); 20mM de EDTA (pH = 8,0); 1,4 M de NaCl e 1% de PVP]. O macerado foi colocado em “ependorfs” e encubado em banho-maria a 65°C, por 60 minutos.

Após o resfriamento, realizou-se a primeira extração dos ácidos nucléicos com 10 ml da mistura de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram homogeneizados por agitação, para a obtenção de uma emulsão, e posteriormente foram centrifugados a 12000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi pipetado, colocado em novo tubo, ao qual foram adicionados 70 μ L de solução CTAB 10%, 1,4 M NaCl, sendo homogeneizados e centrifugados a 12000 rpm por 10 minutos. Após este processo o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 600 μ L de isopropanol gelado, os quais foram acomodados no freezer por uma hora visando uma nova precipitação dos DNA's.



(A)



(B)

Figura 1 – Localização geográfica da região do Alto Rio Grande (A) e Parte da imagem de satélite do município de Luminárias, MG, mostrando um dos fragmentos estudados, onde localiza-se a Mata do Galego.

Os DNA's precipitados foram recolhidos em “eppendorfs”, os quais foram centrifugados novamente, por 10 minutos a 4000 rpm. A este material acrescentou-se 100µL de EtOH (70%) e centrifugou a 4000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadane foi retirado e o pellet foi seco em capela de fluxo laminar por aproximadamente 3 horas. Após a secagem, adicionou-se TE (100 µL) [1 mM Tris e 0,1 mM EDTA] para ressuspensão do DNA e, em seguida, realizou-se a quantificação.

3.3 Amplificação do DNA

O procedimento utilizado para a amplificação foi o de Nienhuis et al. (1995). Cada reação continha: 3,0 µL de DNA genômico, 0,59 µL de dNTP, 1,47 µL de um oligonucleotídeo iniciador, 0,167 µL da enzima Taq DNA polimerase, 1,28 µL de diluente Taq, 1,47 µL de tampão PCR e 6,79 µL de H₂O.

As reações foram realizadas em Termociclador GeneAmp PCR System 9700, programado para 45 ciclos, sendo o primeiro ciclo a 94°C, por 2 minutos para a desnaturação inicial; 15 segundos para desnaturação a 94°C; 30 segundos para anelamento do iniciador a 42°C, 30 segundos para extensão a 72°C e por fim 2 minutos, a 72°C para extensão final.. Para a geração de polimorfismo, foram utilizados 13 “primers”, adquiridos junto a “Operon Technologies”, Califórnia – Estados Unidos (Tabela 1).

3.4 Eletroforese

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1,0%, em tampão TBE (0,045 M Tris – Borato e 0,001 M EDTA), a 50 V por 2 horas. Posteriormente foram corados com brometo de etídio à concentração de 0,5 µL /mL, visualizados em transluminador de luz ultravioleta BioRad e fotografados.

TABELA 1 - Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do DNA de *Cedrela fissilis* Vell e suas respectivas seqüências.

Oligonucleotídeos	seqüência 5' → 3'
OPA9	GGGTAACGCC
OPA13	CAGCACCCAC
OPA14	
OPA15	TTCCGAACCC
OPA16	AGCCAGCGAA
OPB11	GGACTGCAGA
OPM2	ACAACGCCTC
OPM5	GGGAACGTGT
OPN20	GGTGCTCCGT
OPW2	ACCCCGCCAA

OPW3	GTCCGGAGTG
OPW4	CAGAAGCGGA
OPY15	AGTCGCCCTT

3.5 Análise dos dados moleculares e obtenção das similaridades genéticas

Durante a avaliação dos géis, cada banda polimórfica foi tratada como caráter único. Foi elaborada uma matriz de 0 e 1, a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) de bandas polimórficas. A estimativa da similaridade genética (sg_{ij}), entre cada par de genótipos, foi efetuada pelo coeficiente de Jaccard, por meio da seguinte expressão:

$$sg_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

sendo os significados de **a**, **b** e **c** apresentados na Tabela 2.

As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa NTSYS-PC 2.0 (Rohlf, 1992). Os erros associados a cada similaridade foram estimados de acordo com a expressão (Ekroch, Tivang & Nienhuis, 1992):

$$\text{Erro padrão estimado } (s_{sg}) = \sqrt{sg_{ij} \cdot \frac{1 - sg_{ij}}{(n - 1)}} =$$

em que n é o número total das combinações a, b e c cada par de famílias.

TABELA 2 – Presença (1) e/ou ausência (0) de bandas em cada par (ij) de linhagens

Genótipo j	Genótipo i	
	1	0
1	A (1,1)	B (0,1)
0	C (1,0)	D (0,0)

Posteriormente, foi realizada a representação simplificada das distâncias por meio de um dendrograma obtido pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA).

Os indivíduos geneticamente diferentes foram identificados nos dendrogramas a partir da estimativa do valor mínimo de similaridade, acima do qual os indivíduos são semelhantes, ou o valor máximo significativo de similaridade (sg_m). O sg_m foi estimado por meio do teste t, nos níveis de 1% e 0,1% de probabilidade, utilizando-se a seguinte expressão (Castanheira, 2001):

$$sg_m = 1 - (t \bar{x}_{sg})$$

onde t é o valor tabelado de t com n-2 graus de liberdade e s_{sg} o erro médio das comparações consideradas no dendrograma.

Realizou-se também, a análise de agrupamento pelo método de otimização de Tocher, conforme citação de Rao (1952). Este método parte do princípio de que, a partir da matriz de dissimilaridade, é identificado o par de indivíduos mais próximo, formando o grupo inicial. Em seguida, é avaliada a possibilidade de inclusão de novos indivíduos no grupo, adotando-se o critério de que a distância média intragrupo é sempre inferior a qualquer distância intergrupo. A inclusão de um novo indivíduo sempre acarreta um acréscimo na distância média intragrupo. Assim a decisão de incluí-la depende desse acréscimo não superar um determinado limite não estabelecido (α). Em geral

esse limite é tomado como sendo o valor máximo de distância, no conjunto das menores distâncias de cada indivíduo. Para essa finalidade utilizou-se o programa GENES (Cruz, 2004).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fragmentos Amplificados

Para o estudo da divergência genética, utilizando o RAPD, foram empregados 13 primers, os quais geraram, pelo menos uma banda polimórfica entre os indivíduos (Tabela 3). No total foram gerados 59 produtos de amplificação, com uma média de 4,38 fragmentos. Destas, 52 foram polimórficas. O primer que apresentou o maior número de bandas polimórficas foi o OPY15, sete bandas. Enquanto o OPA14, apresentou apenas uma banda polimórfica. Este alto grau de polimorfismo apresentado confirma a grande heterozigose apresentada pelos genótipos, reforçando os resultados encontrados por Póvoa (2002), ao avaliar a mesma população porém, utilizando isoenzimas. Um exemplo do padrão de bandas encontrado nos genótipos é apresentado na Figura 2.

4.2 Avaliação da divergência genética

Os fragmentos polimórficos utilizados no estudo podem ser considerados suficientes para a avaliação da diversidade genética na espécie.

Conforme relata Trindade et al. (2001) ao avaliar uma frutífera nativa do cerrado (*Eugenia dysenterica*), seriam necessários apenas 33 locos para a análise da estrutura genética populacional da espécie. Para chegar a esta conclusão os autores realizaram ensaios preliminares, onde foram amostrados 25 genótipos com 36 locos RAPD utilizando 7 primers. Uma matriz binária 1 (presença) e 0 (ausência de banda) foi gerada e submetida a um processo de randomização por *bootstrap*, sendo estimado o coeficiente de variação associado ao número de fragmentos gerados, utilizando o coeficiente *Simple Matching* com 5000 permutações pelo uso do software Deboot (Coelho, 2000).

Em outro estudo, também com *E. dysenterica*, Zucchi (2002), utilizou oito primers os quais geraram 74 fragmentos, sendo 54 polimórficos. Estopa (2003) estimou a variabilidade entre as matrizes de candeia (*Eremanthus erythropappus*) utilizando 10 primers, que apresentaram 56 fragmentos polimórficos de DNA amplificados. Deve ser ressaltado, que pelo fato destas espécies ainda não serem domesticadas, tem se conseguido um grande polimorfismo com um número relativamente pequeno de iniciadores.

TABELA 3 – Relação do número de produtos amplificados por cada primers, com suas respectivas porcentagens de polimorfismo.

Primers	Nº de produtos amplificados	Nº de fragmentos polimórficos	Porcentagem de polimorfismo
OPA13	5	5	100
OPY15	10	7	70
OPN20	5	4	80
OPM2	5	5	100
OPB11	2	2	100
OPM5	3	3	100
OPA9	3	3	100

OPA15	1	1	100
OPW2	5	5	80
OPW3	6	5	83,3
OPW4	4	4	100
OPA16	5	5	100
OPA14	5	3	60

A partir dos 52 fragmentos de RAPD obtidos, foi estimada uma matriz de distância genética, pelo complemento de similaridade de Jaccard, relacionando todos os pares de indivíduos (Tabela 4). A distância genética média das 171 estimativas obtidas foi de 0,369 com uma amplitude de 0,07 a 0,68. As menores distâncias foram obtidas entre os indivíduos 1 e 19 e a maior entre os pares 8 e 9 (Tabela 4). Vale ressaltar que as menores distâncias estão associadas aos genótipos mais semelhantes e as maiores aos mais divergentes.

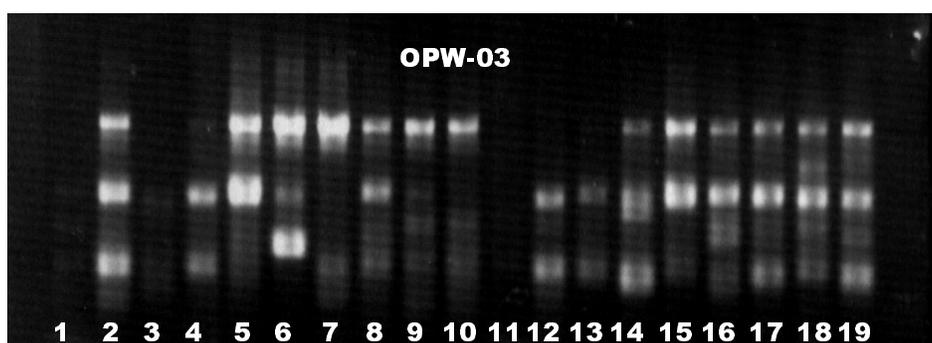
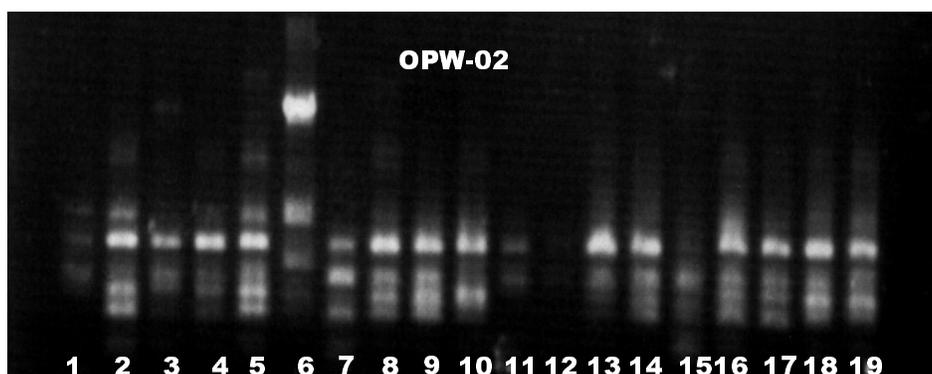


Figura 2. Produtos de amplificação do DNA de *Cedrela fissilis* Vell. obtidos com os iniciadores OPW-02 e OPW-03.

Deve ser salientado também que a distância genética, estimada por meio de marcadores RAPD, baseia-se em um conjunto de fragmentos aleatórios de DNA, portanto a partir dos 52 fragmentos polimórficas, que constituíram uma amostra do genoma do cedro. Conseqüentemente, os fragmentos amostrados não se referem a caracteres de interesse econômicos. Em termos de escolha de matrizes para iniciar um programa de melhoramento deve-se buscar genitores divergentes, contudo esta divergência a que se refere deve ser principalmente obtida em relação aos caracteres morfológicos de interesse.

Para uma melhor visualização da divergência dos genótipos, realizou-se o agrupamento dos indivíduos pelo método de Tocher. De acordo com este critério foram formados cinco grupos. O primeiro está representado pelos genótipos 8, 9, 2, 18, 10, 5, 4, 13, 14, 17, 16, 7, 19; o segundo grupo pelos indivíduos 6 e 15; o terceiro por 1 e 11; e o quarto e o quinto grupo pelos indivíduos 12 e 3 respectivamente (Tabela 5). O que chama atenção é o fato de mais de 65% dos genótipos terem sido agrupados no primeiro grupo o que permite inferir que embora divergentes, os indivíduos apresentam um certo parentesco. Isto, em parte pode ser, possivelmente, conseqüência do processo de fragmentação que as florestas vem sofrendo durante décadas, ocasionando

cruzamentos entre indivíduos aparentados. No entanto, Póvoa (2002) ressalta que o fluxo gênico nesta população ainda persiste.

Posteriormente, também foi realizado o agrupamento utilizando o método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre os pares ponderados (UPGMA) e obtido o dendograma representado na Figura 3. Com esse procedimento, houve também a formação de grupos distintos praticamente na mesma seqüência anteriormente relatada para o método de Tocher.

Como pode ser observado na Figura 3, foi determinado por meio do teste de *t* um ponto de corte ao nível de 1% de probabilidade, denominado valor mínimo de similaridade, acima do qual os indivíduos são semelhantes (Castanheira, 2001). Observa-se, mais uma vez que é grande a divergência genética entre os indivíduos analisados. Resultados obtidos por Gandara (1996), trabalhando com uma amostra de 34 indivíduos de uma população de cedro, permitiram também constar altos valores de diversidade, bem como altas taxas de cruzamentos entre os indivíduos.

TABELA 4 – Matriz de distâncias genéticas (abaixo da diagonal) e erro padrão estimado (acima da diagonal) entre os 19 indivíduos de *Cedrela fissilis* Vell. analisados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1		0,05	0,06	0,06	0,06	0,04	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,06	0,05	0,06	0,06	0,06	0,04
2	0,16		0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
3	0,22	0,26		0,07	0,06	0,04	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
4	0,26	0,65	0,33		0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06
5	0,26	0,59	0,24	0,50		0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
6	0,08	0,32	0,11	0,24	0,35		0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06
7	0,25	0,38	0,33	0,38	0,42	0,31		0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
8	0,22	0,67	0,25	0,52	0,57	0,24	0,48		0,07	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07

9	0,21	0,65	0,29	0,45	0,55	0,27	0,52	0,68	0,07	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
10	0,19	0,50	0,32	0,41	0,45	0,34	0,41	0,63	0,61	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06
11	0,38	0,22	0,26	0,24	0,29	0,25	0,28	0,21	0,24	0,32	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05
12	0,32	0,31	0,23	0,30	0,34	0,27	0,35	0,36	0,30	0,29	0,29	0,07	0,06	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06
13	0,32	0,45	0,35	0,56	0,44	0,18	0,40	0,58	0,44	0,38	0,17	0,36	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06
14	0,24	0,43	0,33	0,48	0,48	0,13	0,33	0,50	0,38	0,37	0,17	0,29	0,63	0,06	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
15	0,17	0,29	0,26	0,32	0,41	0,46	0,61	0,38	0,41	0,36	0,21	0,33	0,33	0,27	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07
16	0,27	0,39	0,21	0,38	0,62	0,37	0,48	0,44	0,52	0,38	0,30	0,36	0,36	0,34	0,54	0,07	0,07	0,07	0,07
17	0,26	0,44	0,29	0,39	0,43	0,23	0,44	0,50	0,48	0,33	0,19	0,31	0,55	0,52	0,38	0,50	0,07	0,07	0,07
18	0,23	0,58	0,31	0,53	0,44	0,25	0,45	0,61	0,59	0,43	0,17	0,28	0,61	0,46	0,34	0,45	0,64	0,07	0,07
19	0,07	0,42	0,28	0,29	0,47	0,23	0,43	0,43	0,42	0,28	0,14	0,25	0,30	0,50	0,37	0,48	0,50	0,40	0,40

Conforme ressalta Bawa e Ashton (1991), espécies com características como o cedro, ou seja, com mecanismos de dispersão à longa distância, estão pouco sujeitas à perda de diversidade genética dentro de populações, fato este já confirmado também em outras espécies arbóreas tropicais raras como *Pithecellobium pedicellare* (O'Maley e Bawa, 1987), *Hevea brasiliensis* (Paiva, 1992), *Myracrodruon urundeva* (Lacerda, 1997), *Cedrela fissilis* (Gandara, 1996), *Genipa americana* (Sebbenn, 1997), *Machaerium villosum* (Giudice Neto, 1999) e *Copaifera langsdorffii* (Oliveira, 2000) em que os valores encontrados foram 0,95, 0,85, 0,64, 0,49, 0,75, 0,81, 0,74, 0,92, respectivamente.

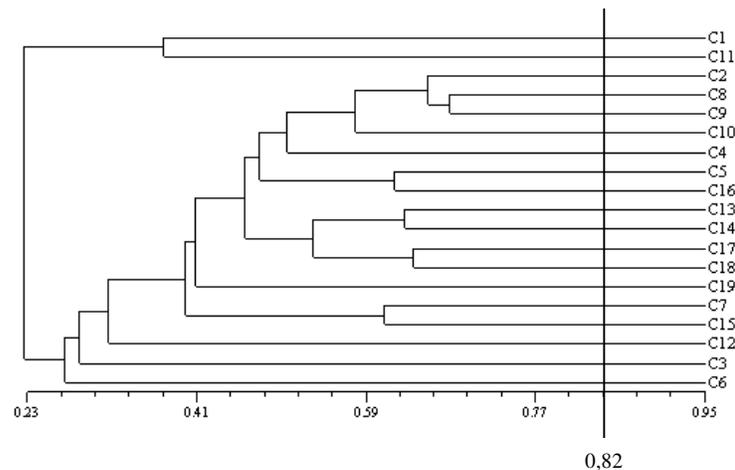


FIGURA 3 – Padrão de similaridade genética obtida entre os 19 indivíduos de *Cedrela fissilis Vell* , definido pelo critério de agrupamento UPGMA, com base na média dos índices de Jaccard.

Na literatura, são encontrados dados relativos a comparações entre marcadores isoenzimáticos e moleculares. Em muitos se tem observado estimativas distintas obtidas pelos diferentes marcadores, mostrando uma certa superioridade em favor dos dados oriundos dos marcadores ao nível de DNA (Bucci et al. (1997), Ayres & Ryan (1999), Ciampi (1999), Buso et al. (1998) e Jenczewski et al. (1999). Porém, no geral, os resultados têm constatado a eficiência dos marcadores RAPDs para a análise da estrutura genética de populações diplóides e revelados padrões semelhantes aos marcadores isoenzimáticos (Isabel et al., 1995; Aagard et al., 1998; Zucchi 2002).

Pode-se constatar grande coerência entre os resultados observados neste trabalho e os obtidos por Póvoa (2002), ressaltando mais uma vez a grande divergência observada em espécies de *Cedrela* o que ainda justifica a implantação de programas conservacionistas visando à preservação da variabilidade existente.

TABELA 5 – Agrupamento dos indivíduos *Cedrela fissilis Vell.* pelo método de Tocher.

Grupos	Indivíduos
I	8, 9, 2, 18, 10, 5, 4, 13, 14, 17, 16, 7, 19
II	6 e 15

III	1 e 11
IV	12
V	3

5 CONCLUSÕES

- A população de *Cedrela fissilis*Vell. estudada apresenta alta divergência entre os indivíduos adultos.
- A maior divergência foi observada entre os genótipos 8 e 9 a menor entre os indivíduos 1 e 19 .
- As distâncias genéticas classificaram os indivíduos em cinco grupos distintos, sendo 68% dos genótipos analisados encontrado no grupo I.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGARD, J.E.; KRUTOVSKI, K.V.; STRAUSS, S.H. RAPD and allozymes exhibit similar levels of iversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. **Heredity**, v.81, p.69-78, 1998.

AYRES, D.R.; RYAN, F.J. Genetic diversity ans structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* anda its congener *W. bolanderi* (Asteradeae) using RAPD and allozym e techniques. **American Journal of Botany**, v.86, p.344-353, 1999.

BAWA, K. S.; ASHTON, P. S. Conservation of rare trees in tropical rain forests: a genetic perspective. In: HOISINGER, D.; FALK, A. (Ed.) **Genetics and conservation of rare plants**. St Louis, MO. p. 62-74. 1991.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetic** v.32, p.314-331, 1980.

BUCCI, G.; VENDRAMIN, G.G.; LELLI, L.; VICARÁIO, F. Assessing the genetic divergence of *Pinusleucodermis* Ant endangered populations: use of molecular markers for conservation purposes. **Theoretical and Applied Genetics**, n.95, p.1138-1146, 1997.

BUSO, G.S.; RANGEL, P.H.; FERREIRA, M.E. Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryzaglumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. **Molecular Ecology**, v.7, p.107-117, 1998.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo – PR: EMBRAPA – CNPF, 1994. 640p.

CASTANHEIRA, A.L.M. **Marcadores RAPD na avaliação do potencial de métodos de condução de população segregante de feijão.** 2001. 76p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CIAMPI, A. N. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microsatélites, AFLP e seqüenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no Cerrado.** 1999. 109p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP.

COELHO, A.S.G. **Dboot: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de *bootstrap* com número variável de marcadores (software).** Goiânia:UFG, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal, 2000.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística.** Viçosa:UFV, 1997,442p.

ESTOPA, R.A **Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC) Mac Leish’).** Lavras: UFLA, 2003, 46p.

FAO. **Databook on endangered tree and shrub species and provenances.** Roma: Food and Agriculture Organization. 1986. 524p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

GANDARA, F. B. **Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae).** 1996. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Campinas, Campinas, SP.

GIUDICE-NETO, J del. **Estrutura genética por isoenzimas em populações naturais de jacarandá paulista (*Macherium villosum* Vog.).** 1999. 128p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Sp.

ISABEL, N.; BEAULIEU, J. BOUSQUET, J. Complete congruence between gene diversity estimatives derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci em black spruce. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v.92, p.6369-6373, 1995.

JENCZEWSKI, J.-M.P.; RONFORT, J. Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* (leguminosae) based on allozyme markers and quantitative traits. **American Journal of Botany**, v.86, p.677-678, 1999.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: CONGRESSO DE ECOSSITEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3., 1993. **Anais...** Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1993. p.115-125.

LACERDA, C. M. B. de. **Diversidade genética por isoenzimas em populações naturais de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Freire, F. & M. F. Allemão) Anacardeaceae no semi-árido**. 1997. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, n.3, p.91-99, 1994.

MAINIERI, C.; CHIMELO, J. P. **Fichas de características das madeiras brasileiras**. São Paulo: IPT- Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1989. 418p.

MATTOS, J. R. **Contribuição ao estudo do cedro – *Cedrela fissilis* Vell.** Porto Alegre, RS: Instituto de Pesquisas de recursos Naturais Renováveis “AP”, 1980. 54p. Publicação IPRNR”AP” n. 4.

MELO JUNIOR, A.F.de. **Variabilidade genética em populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) caracterizada por meio de isoenzimas**. 2003. 82p. Universidade Federal de Lavras.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 141p.

MITTERMEIER, R.A.; AYRES, J.M.; WERNER, T.; FONSECA, G.A.B. O país da megadiversidade. **Ciência Hoje**, v.14, n.81, p.20-27, 1992.

MORAES, P. L. R. **Estrutura genética de população de *Cryptocarya moschata* Nees e Martius Ex Nees (Lauraceae)**. 1997. 190p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/ Biologia Vegetal) – Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro.

MORELLATO, L. P. C. **Estudo da fenologia de árvores e lianas de uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil**. 1991. 176p. Tese (Doutorado) - Universidade de Campinas/Instituto de Biologia, Campinas, SP.

MOSS, D.W. **Isoenzymes**. 1982, Capman & Hall, London & New York.

NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; CCKROCH, P.; SANTOS, J. dos. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD markers. **Journal of the American Society for horticultural Science**, Alexandria, v.120, n.2, p.300-306, 1995.

O' MALLEY, D. M.; BAWA, K. S. Mating system of a tropical rain forest tree species. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 74, n. 8, p. 1143-49, Aug. 1987.

OLIVEIRA, A. F. **Estrutura genética de populações naturais de *Copaifera langsdorffii* Desf. a partir de isoenzimas**. 2000. 114p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PAIVA, J. R. **Variabilidade enzimática em populações naturais de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. De Juss.) Muell. Arg.]**. 1992. 142p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C; FUERST, P.A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v.79, n.2, p.361-382, 1998.

PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume e genera: implications for the transferability of SSRs in plants. **Molecular Biology and Evolution**, v.15, n.10, p.1275-1287, 1998.

PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. T. Meliaceae. **Flora Neotropica**. New York: New York Botanical Garden, 1981. 470p. Monograph, v. 28.

PINAZZO, J. Especies forestales del Paraguay en peligro de extinción. **Revista Florestal**, Assunción, v. 8, n. 1, p. 14-15, 1992.

PÓVOA, J.S.R. **Distribuição da variação genética de *Cedrela fissilis* Vell., em fragmentos florestais, no Sul de Minas Gerais por meio de isoenzimas**. 2002. 95p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SAKYAMA, N. S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.20, n.10, p.1203-1211, out. 1993.

SEBBENN, A. M. **Distribuição da variação genética de populações de jequitibá-rosa [*Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze] por caracteres quantitativos e isoenzimas**. 2001. 210p. Tese (Doutorado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

STYLES, B.T. The flower biology of the Meliaceae and its bearing on tree breeding. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 21, n. 5, p. 175-182, 1972.

ROHLF, F.J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis sistem**. New York, 1992, 470p.

TRINDADE, M.G.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G., ZUCCHI, M.I. Determinação do número de marcadores RAPD para estudos de estrutura genética em *Eugenia dysenterica* utilizando o método *bootstrap* (compact disc). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMNETO DE PLANTAS, 1. Goiânia, 2001. **Anais...**Goiânia. Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2001.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990

ZUCCHI, M.I. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC. utilizando marcadores RAPD e SSR. 2002, 130p Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

7 ANEXO

	Página
TABELA 1A Matriz de 0 e 1 obtida pelo padrão de bandas dos indivíduos	28

TABELA 1A - Matriz de 0 e 1 obtida pelo padrão de bandas dos indivíduos

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0
1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0
0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0

1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1
0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

continua....

Continuação TABELA 1A

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1
0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1
0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1

0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1