

Dupe

Aplicação das Seqüências dos Espaçadores Internos Transcritos do DNA Ribossomal Nuclear para Estudos Filogenéticos com o Gênero *Passiflora* (Passifloraceae)

Nicole de Miranda Scherer

Orientadora: Profa. Loreta Brandão de Freitas

Relatório apresentado à Comissão de Bacharelado do Departamento de Genética para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, ênfase Molecular, Celular e Funcional UFRGS

Porto Alegre, 1999

345083

UFRGS
Instituto de Biociências
Biblioteca Setorial

Nº Sist: 315083

Registro: 14325

Nº Obra: 9147

Data: 10/06/02

Nº Chamada: B10 B10 133

Agradeço à minha família pelo estímulo, apoio e sobretudo amor; à minha orientadora por ter resistido minhas peripécias e devaneios; à Valéria e ao Nelson por conseguirem manter a calma e me afastarem dos perigos; à Carla por todos os dias que passou junto ao seqüenciador e pela paciência; a todo o pessoal do laboratório pela ajuda e pelas festas; ao professor Salzano pelo grande exemplo de vida; ao Arthur Boss por salvar meus arquivos; e ao meu amigo Henry por segurar a corda até o último momento e não me deixar cair na minha atrapalhão.

Dedico este trabalho à
minha maninha Catarina e
aos meus pais, Elza e
Claudio

Introdução

1.1 – Marcador Molecular

Os estudos filogenéticos contribuem para a taxonomia dos organismos e a compreensão de sua história evolutiva.

Para se inferir as relações filogenéticas entre organismos aparentados, pode-se utilizar vários métodos, como por exemplo a comparação morfológica e de características ecológicas, bioquímicas, citogenéticas e moleculares. Cada um destes métodos emprega parâmetros, com base nos quais são feitas as comparações e que correspondem a características que variam de forma adequada para cada tipo de parentesco a ser analisado.

O método mais moderno no estudo da evolução dos organismos é o que utiliza informações encontradas diretamente no veículo da herança genética — as moléculas de DNA — por meio de seqüências marcadoras com níveis de conservação próprios dependendo da questão taxonômica em análise.

Os estudos com marcadores moleculares não são, entretanto, suficientes por si sós. Eles são úteis no esclarecimento de filogenias já estudadas com outros marcadores e oferecem informações complementares para a resolução de questões filogenéticas que restaram mal resolvidas com o emprego de outros marcadores.

O DNA ribossomal nuclear é encontrado em todos os organismos vivos, em várias cópias no genoma, e é conhecido por ser bastante

conservado, exercendo uma função essencial para a manutenção da célula na tradução do RNA em proteínas.

Os genes que formam as sub-unidades 18S, 5,8S e 26S dos ribossomos estão separados no DNA por duas regiões espaçadoras, que são transcritas junto com o gene, mas não incorporadas ao transcrito maduro, sendo excisadas em um evento de auto-*splicing*. Estas regiões são conhecidas como *Internal Transcribed Spacer* – ITS, mais precisamente ITS 1 e ITS 2 (fig. 1).

A região ITS, assim como os outros componentes da família multigênica do nrDNA, é altamente repetida no genoma nuclear. O nrDNA completo está presente em mais de mil cópias arranjadas em repetições em *tandem* em um ou mais *loci* cromossômicos. Este grande número de cópias promove a fácil detecção, amplificação e seqüenciamento do nrDNA. O pequeno tamanho da região espaçadora (ITS1 + ITS2 < 700pb em Angiospermas) e a presença de seqüências flanqueadoras altamente conservadas permitem que esta região seja facilmente amplificada inclusive de material proveniente de Herbário, usando primers eucarióticos universais. Além disso, esta família gênica sofre rápida evolução em concerto via *crossing-over* desigual e conversão gênica. Esta propriedade promove uniformidade intragenômica das unidades repetitivas, inclusive entre nrDNA localizados em cromossomos não-homólogos. Como resultado, o seqüenciamento direto do nrDNA amplificado por PCR torna-se possível, sem a necessidade de clonagem destes fragmentos. (Baldwin, 1995)

Estes espaçadores têm demonstrado ser uma fonte útil de características para estudos filogenéticos em muitas famílias de

Angiospermas. O pequeno grupo de nucleotídeos disponíveis para análise em ambos os espaçadores é em muitos grupos compensado pelos altos níveis de variação encontrados em ITS1 e ITS2. A maior parte da variação entre seqüências de ITS de Angiospermas é atribuída a mutações de ponto. Há que se observar contudo, que as seqüências de ITS não retém sinais evolutivos suficientes e tampouco podem ser facilmente alinhadas para o exame das relações entre espécies de diferentes famílias de plantas (Baldwin, 1995). As relações mais bem analisadas com estes marcadores são as entre espécies de um mesmo gênero, considerando-se inclusive que a ausência de variação entre indivíduos de mesma espécie, confirmada em estudos intraespecíficos com *Passiflora suberosa* realizados com estes marcadores (Muschner, 1998), permite que seja utilizado apenas um indivíduo de cada espécie para a análise interespecífica.

1.2 – Gênero *Passiflora*

Mais conhecidos no Brasil como Maracujás – do Tupi-Garani: fruto de sugar (Giavina-Bianchi e cols., 1997) – os frutos de *Passiflora* podem ser de vários tamanhos e cores, sendo que os mais conhecidos são os de *P. edulis* (maracujá-de-suco ou maracujá-azedo), utilizado na culinária e produzido em grande escala para a indústria de sucos, e *P. alata* (maracujá-doce), utilizada na indústria farmacêutica para a extração de princípios ativos calmantes.

A família Passifloraceae, da ordem Violales (Cronquist, 1981) possui 12 gêneros distribuídos principalmente nos trópicos, nas Américas, na Ásia e na África, sendo que no Brasil só são encontrados quatro desses gêneros: *Passiflora*, *Mitostemma*, *Tetrastylis* e *Dilkea*. O gênero *Passiflora* é o maior deles, sendo descritas, atualmente, 445 espécies (Cervi, 1997).

O caráter monofilético do gênero *Passiflora* é sustentado pela presença de uma corona de filamentos nas flores, presença de gavinhas axilares, flores especializadas em decorrência da co-evolução com insetos polinizadores e nectários extra-florais. As flores podem ser brancas, verdes, vermelhas, azuis ou purpúreas, com a corona e o perianto diversamente orientados e desenvolvidos. Variações no aspecto da corona de filamentos constituem um caráter taxonômico significativo, quase tão importante quanto a morfologia floral e foliar (Judd et al., 1999).

Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral aplicar as seqüências de ITS-1 e ITS-2 na análise das relações filogenéticas entre espécies brasileiras do gênero *Passiflora*.

2.2 – Objetivos Específicos

O presente estudo teve como objetivos específicos:

- Verificar e analisar a variabilidade das seqüências nucleotídicas dos espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear (ITS 1 e ITS 2) entre diferentes espécies brasileiras do gênero *Passiflora*;
- Verificar a presença de variação interespecífica na seqüência do gene 5,8S;
- Relacionar os resultados obtidos e a taxonomia atual do gênero;
- Comparar os resultados aqui obtidos com outros estudos realizados nas mesmas espécies;

Quadro 1: Sequências dos *primers* utilizados no PCR e seqüenciamento

<i>Primers</i> para PCR	<i>Primers</i> para seqüenciamento
<i>Primer</i> 92: 5'AGGTTTCCGTAGGTGAAC 3'	<i>Primer</i> 74: 5'GCTACGTTCTTCATCGAT 3'
<i>Primer</i> 75: 5'TATGCTTAAACTCAGCGGG3'	<i>Primer</i> ITS3: 5'ATCGATGAAGAACGTACG3'

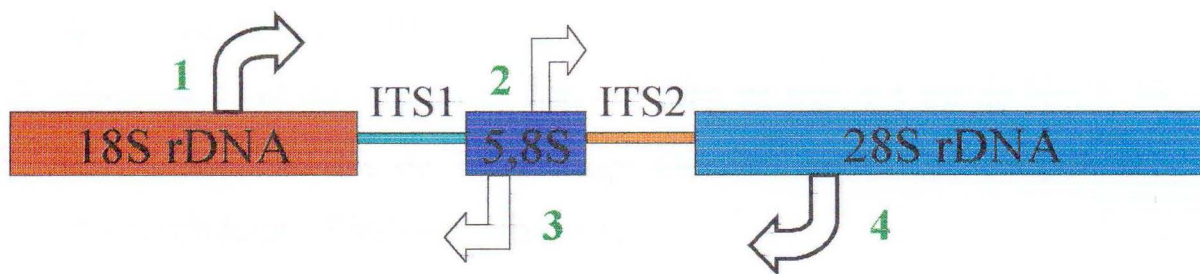


Figura 1: representação esquemática do DNA ribossomal com os espaçadores gênicos ITS1 e ITS2. Os números em verde referem-se aos primers utilizados para PCR e seqüenciamento. 1- *Primer* 92; 2- *Primer* ITS3; 3- *Primer* 74; 4- *Primer* 75.

Materiais e Métodos

3.1 – Obtenção das Amostras

Amostras das espécies de *Passiflora* foram obtidas por meio de coletas em campo, ou por doações de colaboradores. O material coletado em campo foi conservado em sílica-gel para a secagem.

3.2 – Extração de DNA

A extração de DNA total das plantas seguiu o método de Roy *et al* (1992) modificado, que consiste em:

1. macerar 0,5 gramas de tecido com nitrogênio líquido (para evitar a ação de enzimas que possam interferir na qualidade do material extraído), em geral, até a obtenção de um material em pó, transferindo-o para tubos de microcentrífuga 1,7 ml;
2. adicionar 1 ml de tampão de lise (10 mM de tris, 1,4 ml de NaCl, 20 mM de EDTA, 2% de 2- β -mercaptoetanol - BME, 2% de polivinil polipirrolidona – PVP) e emulsionar;
3. incubar o homogenado por 30 min a 65°C em banho-maria com agitação;
4. dividir o material em dois volumes iguais e emulsionar o homogenado lisado com igual volume de clorofórmio - álcool isoamílico (24:1) e centrifugar a 12000 rpm por 15min; recolher a fase aquosa em um tubo novo e agitar gentilmente até obter uma fase clara e homogênea;
5. adicionar igual volume de isopropanol gelado e 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e estocar a 4°C por 12 a 24 horas;

6. retirar o DNA com auxílio de um bastão de vidro e lavá-lo com etanol 70% gelado;
7. ressuspender o DNA em água ultra-pura autoclavada por, 24 horas à temperatura ambiente, quantificar e congelar a amostra.

3.3 – Amplificação por PCR

Os *primers* utilizados para a reação de PCR eram complementares a regiões terminais dos genes 18S (*primer 92*) e 26S (*primer 75*) próximas aos espaçadores (quadro 1, fig. 1). O fragmento amplificado por PCR continha cerca de 700pb e incluía uma pequena região dos genes 18S e 26S nas extremidades, o espaçador ITS 1, o gene 5,8S completo, e o espaçador ITS 2. A amplificação por PCR seguiu o seguinte protocolo:

- Reação:

200 ng de DNA genômico

Tampão 1X

0,2 mM dNTP

1 mM de cada *primer*

25 mM de MgCl₂

1,25 U de Taq polimerase GIBCO-BRL

água destilada estéril para um volume final de 25 µl

- Condições de amplificação (30 ciclos idênticos):

94°C por 45 s para desnaturação;

58°C por 1 min para anelamento;

72°C por 1 min e 30 s para alongamento;

Com uma desnaturação inicial de 94°C por 3 min e uma extensão final a 72°C por 10 min para extensão final.

Uma amostra de 5µl de cada produto da amplificação por PCR foi visualizada em gel de agarose 1% corado com EtBr, após eletroforese horizontal, para a confirmação do sucesso da reação.

3.4 – Purificação enzimática dos produtos de PCR

Antes do seqüenciamento os fragmentos amplificados por PCR passam por uma reação de purificação para a retirada do excedente dNTPs e *primers*, utilizando as enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina.

3.5 – Seqüenciamento de DNA

Na primeira etapa do projeto as amostras eram seqüenciadas manualmente pelo método de Sanger, utilizando-se S³⁵ como marcador radioativo. As amostras marcadas para os quatro nucleotídeos eram aplicadas em um gel de poliacrilamida e submetidas a eletroforese vertical. Após a eletroforese o gel era fixado e seco, para posterior exposição de um filme de raio X a este gel. A leitura das seqüências era feita com o auxílio de um transiluminador de luz branca.

A segunda etapa do trabalho foi realizada em seqüenciador automático ABI PRISM 310, seguindo os protocolos que acompanham o aparelho e o kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems), com marcação por fluorescência.

As seqüências de DNA obtidas para as espécies analisadas foram alinhadas com o auxílio do programa Clustal W (Thompson e cols., 1994) e analisadas pelo método de Neighbor-Joining, *complete deletion*, a partir de distâncias genéticas de Kimura-2 parâmetros, com o uso do programa MEBoot (pacote MEGA).

Resultados

Ao todo foram obtidos fragmentos de amplificação de 22 espécies brasileiras de *Passiflora* distribuídas em dois subgêneros (*Passiflora* e *Decaloba*), das quais doze foram seqüenciadas e entraram na análise. As dez espécies restantes foram seqüenciadas, mas excluídas da análise por estarem incompletas.

Das doze espécies utilizadas, onze foram analisadas para os dois espaçadores e uma (*P. alata*) apenas para ITS-1.

Das seqüências obtidas por seqüenciamento manual apenas uma (*P. misera*) foi incluída na análise final deste trabalho, como complementação de uma seqüência em que apenas um dos espaçadores estava completo com o seqüenciador automático. As outras seqüências utilizadas na análise foram obtidas com o seqüenciador automático. As seqüências manuais não foram utilizadas por não abrangerem toda a região analisada nas últimas amostras.

A análise foi feita com a seqüência completa de ITS-1 e incompleta de ITS-2 (20pb deste foram excluídos na extremidade próxima ao 26S, porque o seqüenciamento de quatro das espécies não alcançou o final do espaçador).

O comprimento das seqüências de ITS-1 variou entre 227 e 273 pb, e as seqüências de ITS-2 apresentam tamanho e variação menor, entre 193 e 227. O comprimento total do alinhamento de ITS-1 foi de 283 pb e o número de sítios informativos 218. Em ITS-2 o comprimento do

alinhamento foi de 211 pb e o número de sítios informativos, 164 pb. Quando os dois espaçadores são agrupados o comprimento fica em 494 pb, como esperado, mas o número de sítios informativos fica em 378 pb, menor (4 pb a menos) que a soma dos dois espaçadores. É provável que esta diferença de valores ocorra devido à aleatoriedade do alinhamento em regiões pouco conservadas dos espaçadores. Desta forma fazendo duas vezes o alinhamento desta seqüência podemos obter uma pequena variação no número de sítios informativos, mas não suficiente para alterar a análise.

Apenas um indivíduo por espécie foi incluído na análise. Este procedimento é justificado pela ausência de variação informativa em ITS entre indivíduos de uma mesma espécie (Muschner, 1998).

Análises foram feitas separadamente para os dois espaçadores (fig. 2 e 3), análise conjunta dos dois espaçadores (fig. 4) e análise do alinhamento de 76 pb da seqüência de 5,8S encontrada junto ao ITS-2 (fig. 5).

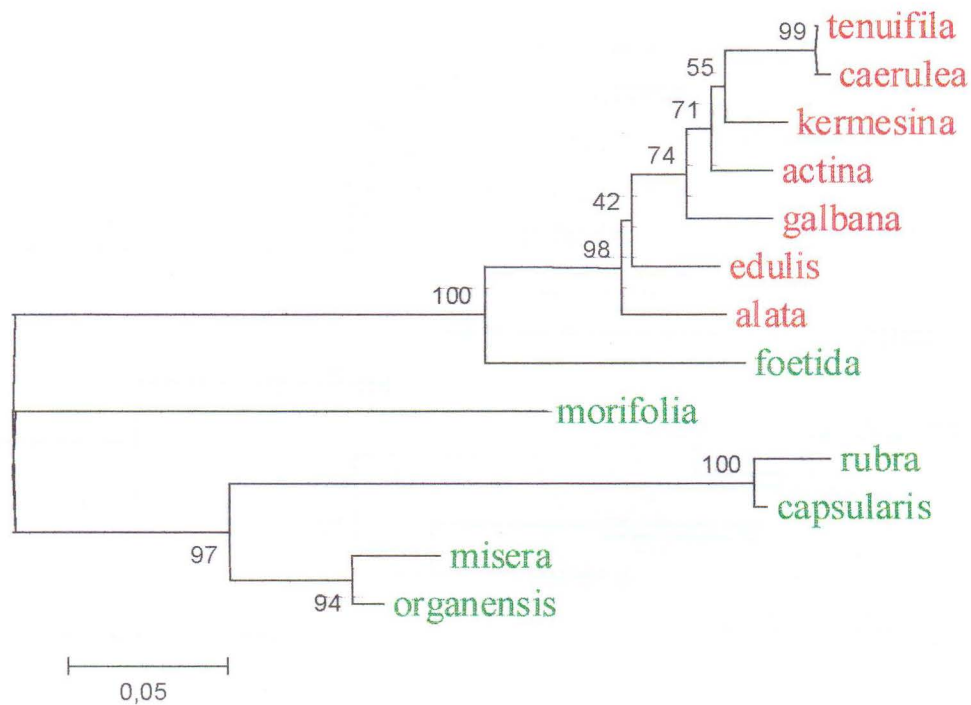


Figura 2: Arvore filogenética gerada a partir de seqüências de ITS-1 de 12 espécies de *Passiflora* com o programa MEBoot, pelo método de Neighbor-Joining, *Complete Delete*, distância de Kimura-2 parâmetros, 1000 Bootstraps.

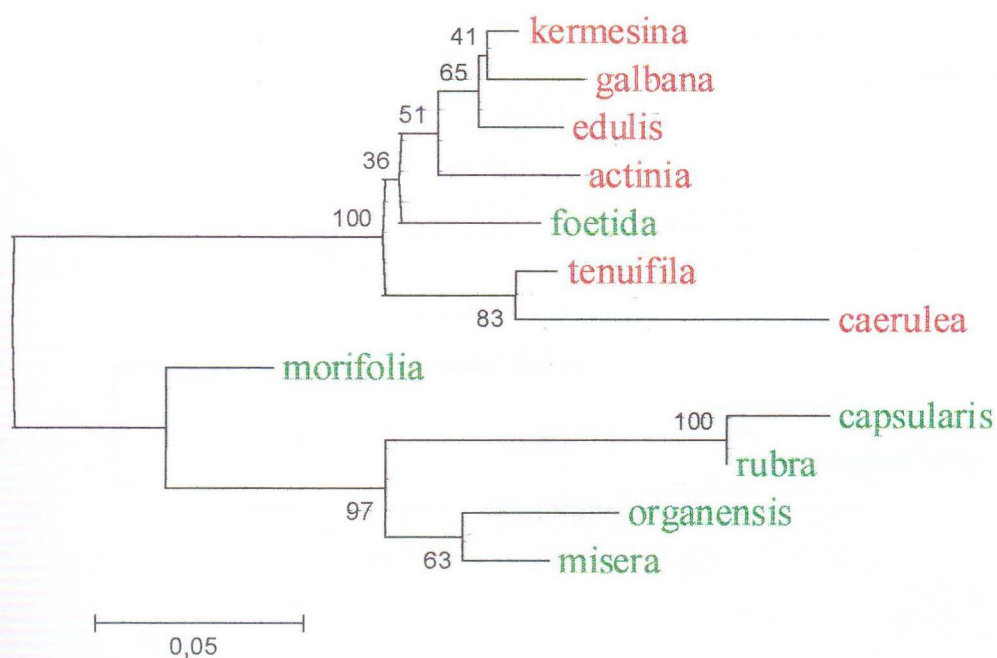


Figura 3: Arvore filogenética gerada a partir de seqüências de ITS-2 de 11 espécies de *Passiflora* com o programa MEBoot, pelo método de Neighbor-Joining, *Complete Delete*, distância de Kimura-2 parâmetros, 1000 Bootstraps.

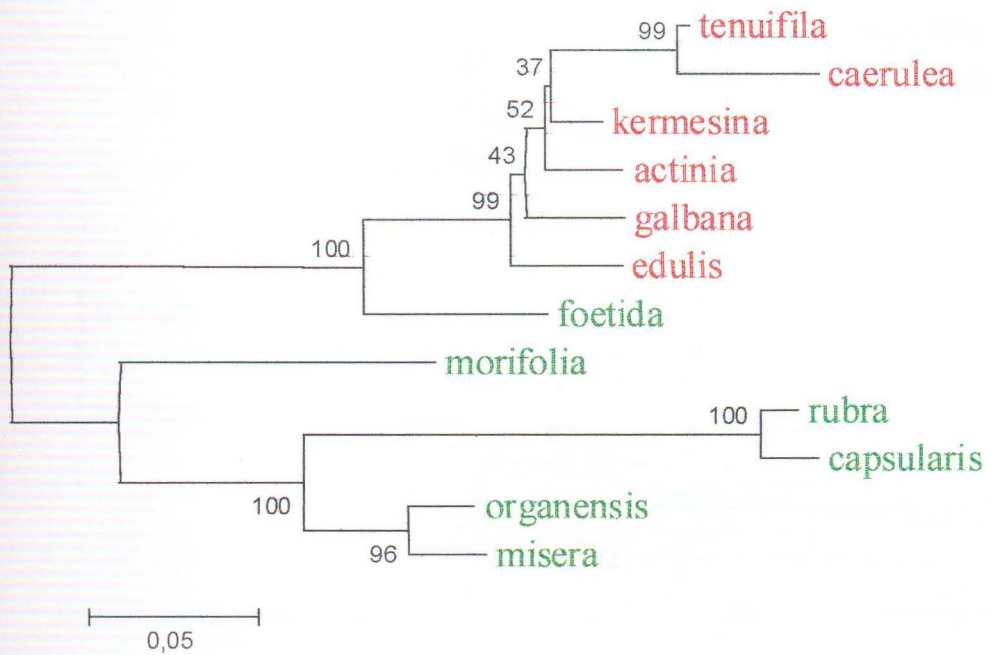


Figura 4: Arvore filogenética gerada a partir de seqüências dos dois espaçadores ITS de 11 espécies de *Passiflora* com o programa MEBoot, pelo método de Neighbor-Joining, *Complete Delete*, distância de Kimura-2 parâmetros, 1000 Bootstraps.

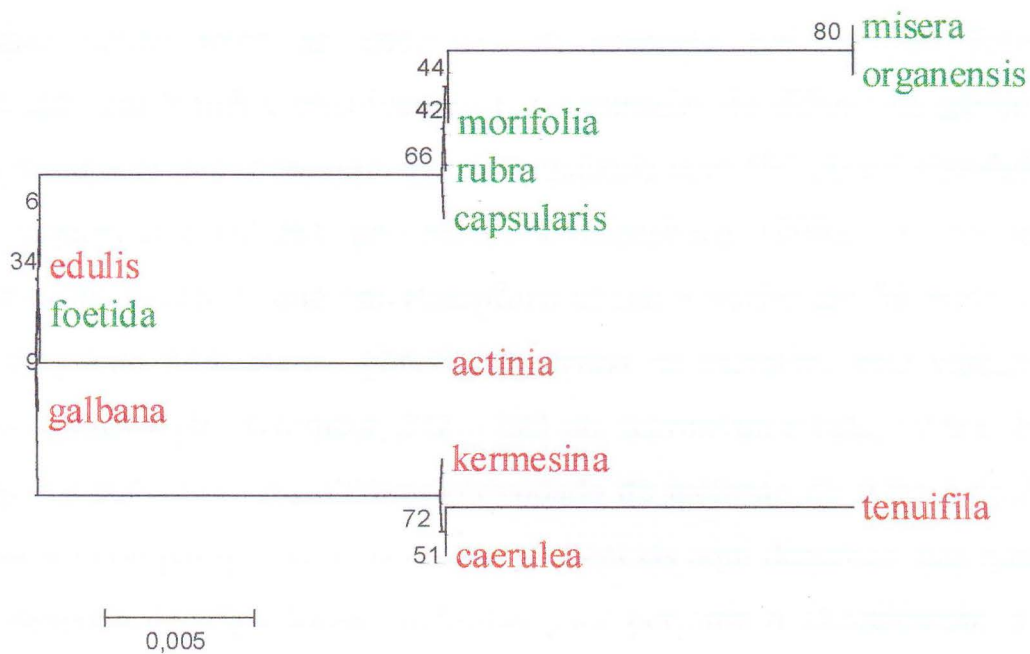


Figura 5: Arvore filogenética gerada a partir de seqüências de parte do gene 5,8S de 11 espécies de *Passiflora* com o programa MEBoot, pelo método de Neighbor-Joining, *Complete Delete*, distância de Kimura-2 parâmetros, 1000 Bootstraps.

Discussão

A variação no tamanho da seqüência de ITS-1 nas espécies analisadas do gênero *Passiflora* é muito maior do que em outros gêneros já analisados para este marcador (*Hypochaeris*, 248 – 256 pb, Cerbah e cols. 1998; *Asarum*, 254 – 258 pb, Kelly 1998; *Lactuca*, 248 – 253 pb, Koopman e cols.; *Artemisa*, 249 – 253 pb., Kornkven e cols. 1998). Variações semelhantes às descritas no presente trabalho só foram encontradas em estudos envolvendo a comparação de diferentes gêneros (Tribo **Astereae**: *Brachyscome*, menor seqüência com 196 pb e *Calendula*, maior seqüência com 261 pb, Noyes e Rieseberg 1999). O mesmo observa-se para ITS-2, que em *Passiflora* chega a variar em 30 pares de bases, enquanto para alguns gêneros descritos na literatura esta variação chega a apenas 1 pb (*Artemisa*, 222 – 223 pb, Kornkven e cols. 1998). Na maioria dos trabalhos com ITS a necessidade de inclusão de *gaps* é muito pequena em comparação com as nossas seqüências aqui descritas, nas quais várias dezenas de *gaps* foram incluídas para permitir o alinhamento das regiões homólogas.

Esta enorme variação no comprimento da seqüência de ITS-1 é devida a um evento de inserção ou deleção. Entretanto a análise desta seqüência adicional sugere a hipótese de que ela tenha sido originada por uma duplicação da seqüência inicial do espaçador. De qualquer forma, não se pode tirar nenhuma conclusão mais concreta, sem a inclusão de um grupo externo na análise.

A falta de um grupo externo também causou problemas para o posicionamento de *P. morifolia*, que apresentou valores de *bootstrap* muito

baixos em todas as análises, demonstrando pouca consistência para qualquer agrupamento.

É importante salientar que eventos de inserção/deleção são muito raramente descritos para ITS, e a maior parte da variação é devida a mutações de ponto, o que evidencia a importância desta descoberta em *Passiflora*.

A seqüência adicional encontrada em ITS-1 fornece um bom suporte para os dois grandes subgrupos encontrados: um referente ao sub-gênero *Passiflora* e outro ao sub-gênero *Decaloba*. Estes dois grupamentos também são consistentes em ITS-2. Os valores de *bootstrap* para os dois grupamentos chega a 100, o que significa que podemos ter total confiança nestes resultados. Apenas *P. morifolia* apresenta valores de *bootstrap* muito baixos, tornando seu grupamento inconsistente.

A grande questão destes dois grupamentos é a inclusão de *P. foetida*, descrita inicialmente como pertencente a *Decaloba*, junto às espécies do sub-gênero *Passiflora*. Estes resultados suportam a tese que vem sendo defendida por vários autores sobre o posicionamento desta espécie (Feuillet e MacDougal, resultados não publicados) e é coerente com outros resultados obtidos com marcadores moleculares de cpDNA (Lorenz, 1999) e citogenética (Marcelo Guerra Fo., comunicação pessoal).

Ao compararmos as árvores construídas a partir de ITS-1 e ITS-2 independentemente, com a árvore da combinação dos dois espaçadores, podemos verificar que a participação de ITS-1 no resultado final é bem mais significativa do que a de ITS-2, inclusive mantendo a estrutura da árvore montada. Mesmo assim, o aumento nos valores de *bootstrap*, que

determina a confiabilidade do grupamento formado gerado pela análise das duas seqüências em conjunto, confirma a necessidade do uso dos dois marcadores para um trabalho de melhor qualidade.

O alinhamento dos 76 pares de bases finais do gene 5,8S indicou 5 mutações de ponto, e quando submetido à análise (fig. 4), dá suporte para as relações filogenéticas encontradas por meio das seqüências dos espaçadores, principalmente no que diz respeito à divergência entre os dois sub-gêneros e o posicionamento de *P. foetida* junto às espécies do sub-gênero *Passiflora*. Estes resultados também são de grande valia, já que até o momento pouca atenção havia sido dada a este gene, sendo que alguns trabalhos chegam a justificar a exclusão desta seqüência da análise devido à ausência de variação entre as espécies estudadas (Kelly, 1998). No entanto o que se verifica é que a variação observada entre as espécies de *Passiflora* é bastante significativa, tendo sido encontrado inclusive um indício de hibridização ou heterozigose em uma destas bases variáveis (anexo 1).

Além da intensa variação no tamanho das seqüências e do número de mutações de ponto, é possível observar a grande ocorrência de seqüências repetitivas de um mesmo nucleotídeo e algumas seqüências repetidas invertidas, que estariam relacionadas com a estrutura secundária assumida pela molécula mRNA durante sua maturação. Segundo Baldwin (1995) a estrutura secundária assumida pelos espaçadores seria de fundamental importância para a maturação do rRNA, na formação do *loop* de auto-*splicing*. Este seria um dos fatores que promovem uma relativa conservação destas seqüências, o que permite que os ITSs sejam usados como marcadores para este tipo de análises. Além disso, a alta conservação dos genes flanqueadores também permite a fácil identificação das regiões extremas dos espaçadores e sua edição para o alinhamento.

Conclusões

O presente trabalho confirma mais uma vez a utilidade destes espaçadores como marcadores para filogenia de grupos próximos, como espécies de um gênero, bem como para corroborar resultados de outros estudos e esclarecer questões mal resolvidas na taxonomia convencional.

Confirma também a presença de variação filogeneticamente informativa no gene 5,8S. Propõe assim que estas seqüências também sejam incluídas nas análises futuras para aumentar a consistência dos resultados.

Referências Bibliográficas

- BALDWIN, B. G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. **Mol. Phyl. Evol.** 1: 3-16.
- BALDWIN, B. G., SANDERSON, M. J., PORTER, M. J., WOJCIECHOWSKI, M. F. CAMPBELL, C. S. & DONOGHUE M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. **Ann. Miss. Bot. Gard.** 82: 247-277.
- CERBAH, M., SOUSA-CHIES, T., JUBIER, M. F., LEJEUNE, B. & SILJAK-YAKOVLEV, S. 1998. Molecular Phylogeny of the Genus *Hypochoeris* Using Internal Transcribed Spacers of Nuclear rDNA: Inference for Chromosomal Evolution. **Mol. Biol Evol.** 15(3): 345-354.
- CERVI, A.C. 1997. *Passifloraceae* do Brasil. estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **Fontqueria** 45: 1-92.
- CRONQUIST, A. 1981. An integrate system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press. New York.
- GIAVINA-BIANCHI, Jr, P. F.; CASTRO, F.M.M.; MACHADO, M. S. L. & DUARTE, J. S. 1997 Occupational respiratory allergic disease induced by *Pasiflora alata* and *Rhamnus purshiana*. **Ann. Allergy Asthma Immunol.** 79: 449-459.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A. & STEVENS, P. F. 1999. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. Sinauer Ass. Inc., Sunderland. 419 p.
- KELLY, L. M. 1998. Phylogenetic relationships in *Asaum* (Aristolochiaceae) based on morphology and ITS sequences. **Am. J. Bot.** 85(10): 1454-1467.
- KOOPMAN, W.J.M., GUETTA, E., VAN DE WIEL, C. C. M., VOSMAN, B., & VAN DEN BERG, R. G. 1998. Phylogenetic relationship among *Lactuca* (Asteraceae) species and related genera based on ITS-1 DNA sequences. **Am. J. Bot.** 85(11): 1517-1530.

- KORNKVEN, A. B., WATSON, L. E. & ESTES, J. R. 1998. Phylogenetic analysis of *Artemisia* section *Tridentatae* (Asteraceae) based on sequences from the Internal Transcribed Spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Am. J. Bot.** **85(12)**: 1787-1795.
- LORENZ, A.P. 1999. Análise de seqüências de cpDNA e seu papel na reconstrução filogenética do gênero *Passiflora* (Passifloraceae). **Relatório de Bacharelado em Ciências Biológicas, Ênfase em Molecular, Celular e Funcional da UFRGS.** 19 p.
- MUSCHNER, V. C. 1999. Análise filogenética das seqüências ITS1 e ITS2 em duas formas morfológicas de *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). **Relatório de Bacharelado em Ciências Biológicas, Ênfase em Genética da UFRGS.** 30 p.
- NOYES, R. D. & RIESEBERG, L. H. 1999. ITS sequence data support a single origin for North American Astereae (Asteraceae) and reflect deep geographic divisions in *Aster* s. L. **Am. J. Bot.** **86(3)**: 398-412.
- ROY, A., FRASCARIA, N., MACKAY, J. & BOUSQUET, J. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). In: *Betula alleghaniensis*. **Theor. App. Gen.** **85**: 173-180.
- THOMPSON, D. L., HIGGIS, D. G. & GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Ac. Res.** **22**: 4673-4680.