**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade e estrutura genética de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.)
J. F. Macbr. em áreas em processo de restauração florestal e
remanescentes de Mata Atlântica**

Miklos Maximiliano Bajay

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2014**

Miklos Maximiliano Bajay
Biólogo

**Diversidade e estrutura genética de *Piptadenia gonoacantha* (mart.) J.f. Macbr.
em áreas em processo de restauração florestal e remanescentes de Mata
Atlântica**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ BALDIN PINHEIRO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Bajay, Miklos Maximiliano

Diversidade e estrutura genética de *Piptadenia gonoacantha* (mart.) J.f. Macbr.
em áreas em processo de restauração florestal e remanescentes de Mata Atlântica /
Miklos Maximiliano Bajay.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de
2011. - - Piracicaba, 2014.
148 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Diversidade genética 2. Reflorestamento 3. SSR 4. cpSSR 5. AFLP I. Título

CDD 634.956
B165d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

DEDICATÓRIA

Dedico esse manuscrito à minha família,
à todos que estão comigo e acompanham minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Baldin Pinheiro pela orientação, oportunidade, apoio e auxílio em todas as atividades do doutorado.

Aos colegas do Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento pela ótima convivência, troca de experiências e aprendizado mútuo.

À Profa. Maria Imaculada Zucchi, a quem sou imensamente grato pelo acompanhamento desde as minhas primeiras atividades acadêmicas no IAC, pela dedicação, suporte, confiança e apoio no meu crescimento acadêmico e pessoal.

À equipe Genética e Genômica da Conservação do projeto Biota, Carolina Grando, Marcos Siqueira, Alessandro Alves Pereira, Patricia Sanae Sujii, Vitor Antônio Côrrea Pavinato, Camila Menezes Trindade Macrini, Kaiser Dias Schwarcz, Fátima Donizete Pelissari Saturno, Elida de Aguiar Silvestre e Fabiano Lucas Araújo, pela oportunidade em integrar um grupo extremamente capacitado, do qual levarei muitos ensinamentos, tanto nos aspectos de troca de conhecimentos técnicos/científicos quanto nos aspectos de convivência, amizade e cooperação para o desenvolvimento das pesquisas.

Aos colaboradores deste trabalho, Prof. Dr. Pedro Henrique Santin Brancalion, Prof. Dr. Ricardo Ribeiro Rodrigues, Dra. Vera Lúcia Pimentel Salazar, Prof. Dr. Alexandre S. G. Coelho, Prof. Dra. Anete Pereira de Souza e a todas as pessoas e instituições, Unicamp e Apta Regional – Polo Centro Sul, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço aos funcionários do Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento, Domingos de Salvio Amaral e Marcio Araújo Silva e ao Seu Mario da Área de Relevante Interesse Ecológico Mata Santa Genebra, pela disponibilidade e auxílio em questões essenciais em todo o processo.

Agradeço também à Marcia Duarte Barbosa Silva e Jaqueline Bueno de Campos que contribuíram muito para a realização de etapas fundamentais a esta pesquisa.

À minha família pelo exemplo, incentivo, carinho e apoio, Terezinha, Sérgio, Árpád, e à minha esposa Mariana Ferreira Cisotto, pelo companheirismo, amor, suporte e colaboração ao longo dessa trajetória. Agradeço à Stephanie Karenina Bajay, que teve uma participação fundamental no desenvolvimento de todo o trabalho.

Aos membros integrantes da banca examinadora pela leitura e pela contribuição crítica no aperfeiçoamento do trabalho.

À CAPES pelo provimento de recursos financeiros essenciais para a realização do doutorado, possibilitando o desenvolvimento desta pesquisa tal como a participação em eventos de divulgação científica e cursos de aperfeiçoamento.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), todos os funcionários e corpo docente pela valiosa contribuição à minha formação.

EPÍGRAFE

“That is the simple secret of happiness:
 whatever you are doing,
 don't let past move your mind;
 don't let future disturb you.
 because the past is no more,
 and the future is not yet.
 To live in the memories,
 to live in the imagination,
 is to live in the non-existential.
and when you are living in the non-existential,
 you are missing that which is existential.”

Osho

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 Conservação da Mata Atlântica.....	29
2.2 Genética da restauração	32
2.3 Descrição da espécie	35
2.4 Marcadores Moleculares	38
2.5 Microssatélites.....	39
2.6 Microssatélites cloroplastidiais	42
2.7 Marcadores AFLP	43
2.8 Diversidade genética e parâmetros populacionais afins	45
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 Material experimental	51
3.2 Estação Ecológica dos Caetetus	52
3.3 Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra	54
3.4 Usina Ester, Cosmópolis	56
3.5 Reservatório municipal de Iracemápolis.....	58
3.6 Amostragem das populações	61
3.7 Extração e quantificação de DNA.....	62
3.8 Microssatélites.....	64
3.8.1 Construção da biblioteca genômica enriquecida com SSR.....	64
3.8.2 Sequenciamento da região de interesse dos plasmídeos	69
3.8.3 Desenho dos oligonucleotídeos de DNA.....	70
3.8.4 Caracterização e genotipagem dos microssatélites	71
3.8.5 Análise estatística dos microssatélites	72
3.9 Microssatélites cloroplastidiais	76
3.9.1 Caracterização e genotipagem dos cpSSR.....	76

3.9.3 Análise estatística dos marcadores cpSSR	77
3.10 Marcadores AFLP	78
3.10.1 Caracterização e genotipagem dos marcadores AFLP.....	80
3.10.2 Análise estatística dos marcadores AFLP	80
4 RESULTADOS	85
4.1 Extração e quantificação do DNA	85
4.2 Microssatélites	85
4.3 Microssatélites cloroplastidiais.....	104
4.4 Marcadores AFLP	111
5 DISCUSSÃO.....	121
6 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
REFERÊNCIAS	129

RESUMO

Diversidade e estrutura genética de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. em áreas em processo de restauração florestal e remanescentes de Mata Atlântica

A Mata Atlântica é considerada mundialmente um dos biomas prioritários para conservação, devido à elevada riqueza de sua biodiversidade. A preservação da vegetação natural deve estar associada à restauração florestal, de modo que se possa assegurar a continuidade desta rica biota. No Brasil, grande parte dos projetos de restauração florestal realizados até agora tem se preocupado apenas em buscar diversidade florística, contemplando uma baixa diversidade genética em sua implantação, o que têm criado muitos problemas relativos à viabilidade biológica de suas comunidades. O presente trabalho se propôs a realizar um estudo comparando a diversidade genética (utilizando marcadores SSR, cpSSR e AFLP) da espécie arbórea *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. em duas áreas em processo de restauração florestal e dois remanescentes naturais de floresta estacional semidecidual da Mata Atlântica do estado de São Paulo, Brasil. A partir da biblioteca genômica construída, foram obtidos 12 locos SSR. A heterozigosidade média esperada no equilíbrio de Hardy Weinberg ($H_E = 0,494$) foi maior do que a heterozigosidade observada ($H_O = 0,251$) em todas as populações, indicando taxa relativamente alta de endogamia ($F_{IS} = 0,342$). Os resultados obtidos com os locos cpSSR mostraram, ao todo, 16 haplótipos, dos quais 10 foram encontrados nos remanescentes de floresta nativa e oito nas áreas restauradas. As análises realizadas com os marcadores AFLP resultaram em 303 marcas polimórficas. Uma estrutura genética muito forte foi encontrada relativa às quatro populações, valores de F_{ST} foram 0,283, 0,83 e 0,177 em SSR, cpSSR e AFLP, respectivamente. Dez locos de AFLP que podem estar sujeitos a seleção foram encontrados. As análises de agrupamento delimitam claramente as amostras das quatro populações, evidenciando que não existe fluxo gênico significativo entre elas. *P. gonoacantha* apresentou auto correlação espacial nas quatro populações. Os três tipos de marcadores detectaram maior diversidade genética nos remanescentes naturais do que nas áreas restauradas. Apesar da menor diversidade apresentada pelas áreas restauradas em comparação com as áreas de remanescentes florestais, o tamanho efetivo populacional estimado para essas áreas permite a manutenção da variabilidade existente a curto prazo. As informações obtidas poderão servir para o manejo sustentado desta espécie, bem como para o planejamento de sua conservação.

Palavras-chave: Diversidade genética; Reflorestamento; SSR; cpSSR; AFLP

ABSTRACT

Genetic diversity and structure of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. in areas under forest restoration process and natural remnants of the Atlantic rain forest

The Atlantic Forest is considered one of the world biomes for conservation priority due to the high richness of its biodiversity. The preservation of natural vegetation should be associated to forest restoration, so that the continuity of this rich biota can be ensured. Recent studies and practices of reforestation in degraded areas have taken population genetics as a great ally. Several of the forest restoration projects carried out in Brazil so far has been concerned just with floristic diversity, contemplating low genetic diversity. This fact has created many problems related to the biological viability of their communities. The present project proposes to carry out a study on the diversity genetic structure of the arboreal species *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. In this study, we used six chloroplast simple-sequence repeats (cpSSRs), AFLP markers and the construction of an enriched SSR DNA library to investigate the genetic diversity of *P. gonoacantha*. This species was evaluated in two areas that are under forest restoration process and compared then with two natural remnants of semideciduous seasonal Atlantic Forest. 12 SSR markers were obtained and the average $H_o=0.251$ was smaller than the average $H_e=0.494$, evidencing a heterozygote deficit (average $F_{is}=0.342$). The samples shows a strong structure with a significant differentiation. F_{ST} values were 0.283, 0.83 and 0.177 for SSR, cpSSR and AFLP respectively. The cluster analyzes clearly demarcating the samples of the four populations. cpSSR markers showed 16 haplotypes, ten of them were found in the remaining native forest and eight in the restored areas. Ten AFLP *outliers* loci were found. The three types of markers detected a higher genetic diversity in natural remnant than in restored areas. Despite the lower diversity presented by the restored areas compared with areas of forest remaining, the effective population size estimated for these areas allows the maintenance of existing variability. The results of this study prove that there is greater genetic diversity in the remaining natural areas than in the areas undergoing a reforestation process. The information obtained may be used for the sustainable management of this species, as well as for conservation planning.

Keywords: Genetic diversity; Ecological Restoration; SSR; cpSSR; AFLP

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem apresentando as cristas lineares e longitudinais do tronco (A) e detalhe dos frutos de *P. gonoacantha* (B)35
- Figura 2 - Imagem das folhas alternas, compostas bipinadas, com 30 a 50 pares de folíolos de *P. gonoacantha* (A); imagem com visão mais ampla do tronco e do topo de um exemplar de pau-jacaré (B)35
- Figura 3 - Área de ocorrência natural de *P. gonoacantha* no Brasil36
- Figura 4 - Mapa da Estação Ecológica dos Caetetus (CAE), situada entre os municípios de Gália e Alvinlândia, os pontos brancos representam os pontos de coleta. Google Earth 201352
- Figura 5 - Vista da Floresta Estacional Semidecidual da Estação Ecológica dos Caetetus (CAE). Foto: Marcos Vinícius Bohrer Monteiro Siqueira53
- Figura 6 - Mapa da Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra (MSG), os pontos brancos representam os pontos de coleta. Google Earth 201355
- Figura 7 - Foto de uma das áreas de coleta em remanescente florestal natural: Área de Relevante Interesse Ecológico Mata Santa Genebra (MSG). Zona de amortecimento. Foto: Flávio Grieger55
- Figura 8 - Mapa do reflorestamento do reflorestamento da Usina Ester (COS), à margem do Rio Jaguari, Cosmópolis, os pontos brancos representam os pontos de coleta. Google Earth 201357
- Figura 9 - Reflorestamento Usina Ester (COS), à margem do Rio Jaguari, Cosmópolis. Foto: Gabriele Marina Preiskorn.....58
- Figura 10 - Mapa do reflorestamento do entorno do reservatório de água para abastecimento público do município de Iracemápolis (IRA), os pontos brancos representam os pontos de coleta. Google Earth 2013.....59
- Figura 11 - Reflorestamento instalado no entorno da área ciliar da represa de Iracemápolis (IRA). Foto: Gabriele Marina Preiskorn60
- Figura 12 – Mapa indicando as populações estudadas62

- Figura 13 - Perfil de gel de agarose 1% corados com Syber Green®, mostrando a quantificação de 60 amostras de *P. gonoacantha*. Padrões (DNA do bacteriófago Lambida) utilizados estão nas últimas cinco bandas e correspondem a 12,5, 25, 50, 100 e 200 ng 64
- Figura 14 - Perfil de gel obtido pelo sistema de eletroforese LICOR, correspondente ao loco Pgo15 na população IRA. Entre as linhas tracejadas está a região de amplificação desse loco 72
- Figura 15 - Histograma das frequências alélicas dos 12 locos de SSR, estimados para cada uma das quatro populações utilizadas no estudo. O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X indica o tamanho do alelo 88 e 89
- Figura 16 - Estimativa do número de clusters (K) mais adequado para o conjunto de amostras analisado. Metodologia proposta proposto por Evanno et al. (2005) 96
- Figura 17 - Teste de atribuição feito pela análise bayesiana, baseado nos 12 locos microssatélites em *P. gonoacantha*. Cada uma das 4 cores indica um cluster baseado em semelhanças genotípicas. O eixo das ordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada cluster (Q) ... 96
- Figura 18 - Padrão de divergência genética entre 4 populações *P. gonoacantha*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base na distância genética de Nei (1978). Correlação cofenética igual a 0,84 97
- Figura 19 - Representação da média do coeficiente de parentesco na população de CAE em função das classes de distância (indicadas pela distância máxima). Barras indicam o desvio padrão do coeficiente de parentesco. Linhas pontilhadas e tracejadas indicam os valores críticos (superior e inferior, respectivamente) de rejeição (VC95%) da hipótese nula de ausência de estruturação genética espacial 99
- Figura 20 - Número de pares de indivíduos em cada classe de distância 99
- Figura 21 - Representação da média do coeficiente de parentesco na população de MSG em função das classes de distância (indicadas pela distância máxima). Barras indicam o desvio padrão do coeficiente de parentesco. Linhas pontilhadas e tracejadas indicam os valores críticos (superior e

inferior, respectivamente) de rejeição (VC95%) da hipótese nula de ausência de estruturação genética espacial.....	100
Figura 22 - Número de pares de indivíduos em cada classe de distância	100
Figura 23 - Representação da média do coeficiente de parentesco na população de COS em função das classes de distância (indicadas pela distância máxima). Barras indicam o desvio padrão do coeficiente de parentesco. Linhas pontilhadas e tracejadas indicam os valores críticos (superior e inferior, respectivamente) de rejeição (VC95%) da hipótese nula de ausência de estruturação genética espacial.....	102
Figura 24 - Número de pares de indivíduos em cada classe de distância	102
Figura 25 - Representação da média do coeficiente de parentesco na população de IRA em função das classes de distância (indicadas pela distância máxima). Barras indicam o desvio padrão do coeficiente de parentesco. Linhas pontilhadas e tracejadas indicam os valores críticos (superior e inferior, respectivamente) de rejeição (VC95%) da hipótese nula de ausência de estruturação genética espacial.....	103
Figura 26 - Número de pares de indivíduos em cada classe de distância	103
Figura 28 - Padrão de polimorfismo encontrado na genotipagem dos géis do LICOR. A: <i>primer</i> ccmp01 em MSG com polimorfismo de 2pb. B: <i>primer</i> ccmp06 em IRA com polimorfismo de 1pb (indicado pelas setas azuis são os alelos de menor peso molecular e vermelhas são os alelos com maior peso molecular).....	104
Figura 29 - Estimativas do número de clusters (K) mais adequado para o conjunto de amostras analisado. Metodologia de Pritchard et al. (2000) em (A) e metodologia proposta proposto por Evanno et al. (2005) em (B)	108
Figura 30 - Teste de atribuição feito pela análise bayesiana, baseado nos seis locos microssatélites cloroplastidiais em <i>P. gonoacantha</i> . Cada uma das 4 cores indica um cluster baseado em semelhanças genotípicas. O eixo das ordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada cluster (Q).....	108

Figura 31 - Análise de agrupamento UPGMA, utilizando a dissimilaridade de Jaccard para indicar a variabilidade e frequência dos genótipos avaliados em cada população	109
Figura 32 - Rede de haplótipos. Os traços na figura entre os haplótipos representam os passos mutacionais.....	110
Figura 33 - Análise de agrupamento <i>Neighbor Joining</i> , utilizando a dissimilaridade de Jaccard para indicar a variabilidade dos genótipos avaliados. <i>Bootstraps</i> representados como porcentagens em seus respectivos nós	110
Figura 34 - Estimativas do número de clusters (K) mais adequado para o conjunto de amostras analisado. Metodologia proposta proposto por Evanno et al. (2005)	115
Figura 35 - Teste de atribuição feito pela análise bayesiana, baseado nas oito combinações de <i>primers</i> AFLP em <i>P. gonoacantha</i> . Cada uma das 5 cores indica um cluster baseado em semelhanças genotípicas. O eixo das ordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada cluster (Q)	115
Figura 36 - Dendrograma obtido pelo método <i>Neighbor Joining</i> através do coeficiente de similaridade de Jaccard para as amostras das quatro populações de <i>P gonoacantha</i>	116
Figura 37 - Cenário apresentado para os 10 locos candidatos que estão sofrendo seleção direcional ou disruptiva (região em vermelho), dos locos neutros (região em cinza) e para locos que estão sofrendo seleção balanceadora, considerando as quatro populações de <i>P. gonoacantha</i>	117
Figura 38 - Dendrograma obtido pelo método <i>Neighbor Joining</i> através do coeficiente de similaridade de Jaccard para as quatro populações de <i>P gonoacantha</i> , utilizando somente os 10 locos candidatos sobre seleção direcional ou disruptiva.....	118
Figura 39 - Estimativa do número de clusters (K) mais adequado para o conjunto de amostras analisado. Metodologia proposta proposto por Evanno et al. (2005)	119

Figura 40 - Teste de atribuição feito pela análise bayesiana, baseado nos 10 AFLP locos outliers em *P. gonoacantha*. Cada uma das 3 cores indica um cluster baseado em semelhanças genotípicas. O eixo das ordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada cluster (Q) 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Locais de coleta e quantidade de indivíduos estudados por população...	61
Tabela 2 - <i>Primers</i> cpSSR de angiospermas dicotiledôneas, número de bases, temperatura de anelamento (T) e amplitude alélica	76
Tabela 3 - Sequências das 14 combinações de primers da <i>EcoRI</i> e <i>MseI</i>	80
Tabela 4 - Marcadores SSR sintetizados, com os respectivos motivos, amplitude alélica (SR), porcentagem de CG e classificação do motivo	86
Tabela 5 - Número de alelos por loco e por população	90
Tabela 6 - Riqueza alélica (R) por loco e por população.....	91
Tabela 7 - Riqueza de alelos privados por loco e por população. Entre parênteses é apresentado o desvio padrão nos valores médios por população.....	91
Tabela 8 - Heterozigozidade esperada por loco e por população. Em parênteses está indicado o intervalo de confiança a 95% das médias populacionais	92
Tabela 9 - Heterozigozidade observada por loco e por população. Em parênteses está indicado o intervalo de confiança a 95% das médias populacionais	93
Tabela 10 - Coeficiente de endogamia (F_{IS}) por loco e por população.....	93
Tabela 11 - Estimativa das estatísticas F de Wright, de R_{ST} nas quatro populações de <i>P. gonoacantha</i> . Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade	94
Tabela 12 - Matriz de F_{ST} par a par entre as quatro populações analisadas.....	94
Tabela 13 - P-valor do Teste Exato de Fisher para aderência ao EHW por loco e por população. $\alpha = 0.001$ (correção de Bonferroni). Marcados com asterisco estão os locos que aderem às proporções esperadas. NA indica que os respectivos locos são monomórficos.....	95
Tabela 14 - P-valor da análise de gargalo genético das populações usando o modelo SMM e TPM, através dos testes de sinal e Wilcoxon. Em asterisco estão as populações que apresentam evidências de gargalo genético recente	97
Tabela 15 - P-valor da análise de gargalo genético por loco para as populações nos modelos SMM e TPM. Em asterisco estão os locos que apresentam	

excesso ou <i>déficit</i> de heterozigosidade em relação ao equilíbrio deriva-mutação. NA indica que os respectivos locos são monomórficos.....	98
Tabela 16 - Estimativas de estrutura em micro-escala das populações	101
Tabela 17 - AMOVA entre os 367 indivíduos distribuídas nas quatro populações, indicando Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL), Componentes de Variação (CV) e Porcentagem de Variação (PV)	105
Tabela 18 - Matriz de F_{ST} par a par entre as quatro populações analisadas	105
Tabela 19 - Estimativas do número efetivo de alelos (n_e) e índice de diversidade de Nei (h) e de Shannon (I) nas quatro populações. Entre parênteses está indicado o desvio padrão dos parâmetros analisados	106
Tabela 20 - Estimativas do número efetivo de alelos (n_e), índice de diversidade de Nei (h) e de Shannon (I), diversidade intrapopulacional (H_s), diversidade total (H_T) e diferenciação genética entre populações (G_{ST}) por loco cpSSR .	106
Tabela 21 - Descrição dos 16 haplótipos, suas frequências em cada população e em qual população o haplótipo é observado	107
Tabela 22 - Combinações de <i>primers EcoRI</i> e <i>MseI</i> utilizadas para caracterização das populações de <i>P. gonoacantha</i>	111
Tabela 24 - Combinações de <i>primers EcoRI</i> e <i>MseI</i> utilizadas para caracterização do Índice de Shannon (LogBase = 2) das populações de <i>P. gonoacantha</i> . Entre parênteses está indicado o desvio padrão da estimativa, obtido através de 10.000 <i>bootstraps</i>	113
Tabela 25 - Estimativas de número efetivo de alelos (n_e), diversidade gênica (h), porcentagem de locos polimórficos (PL%). Desvio padrão entre parênteses	114
Tabela 26 - Análise de Variância Molecular de populações de <i>P. gonoacantha</i> , graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), componentes de variância (CV) e porcentagem da variação total (%VT)	114
Tabela 27 - Matriz de F_{ST} par a par entre as quatro populações analisadas	114
Tabela 28 – Locos AFLP <i>outliers</i> por combinação	117

Tabela 29 - Quantidade de locos candidatos sobre seleção direcional ou disruptiva, considerando os pares entre as quatro populações analisadas.....	120
---	-----

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é formado por um conjunto de formações florestais com fauna e flora muito exuberante, composto por biomas com rica diversidade. A destruição dessa cobertura florestal e sua conversão para outros usos do solo vêm ocorrendo de maneira alarmante (RIBEIRO et al., 2009).

A Mata Atlântica, distribuída ao longo da costa atlântica, se destaca como uma das áreas com maior diversidade biológica no mundo (DIRZO e RAVEN, 2003), mas foi alvo de intensa destruição da sua vegetação nativa decorrente de ações humanas desordenadas. O processo de ocupação antrópica reduziu este bioma a remanescentes florestais cercados de pastagens, estradas, áreas agrícolas e urbanas entre outras formas de uso da terra. Com a maior parte da população concentrada em cidades de até 200 km da costa, a Mata Atlântica continua sofrendo perda de áreas florestais e biodiversidade (DEAN, 1996). Estudos apontam que mais da metade dos municípios brasileiros terão problemas de escassez de água, sendo que uma das principais causas é o desmatamento de matas ciliares (ANA, 2011).

A cobertura florestal original de Mata Atlântica, foi desmatado 86,7% devido à exploração dos recursos florestais e da terra (SOS MATA ATLÂNTICA, 2014). A vegetação remanescente está distribuída em arquipélagos de fragmentos florestais pequenos, degradados e com baixa conectividade. Cerca de metade dessa área remanescente é composta por mata secundária (RIBEIRO et al., 2009).

Além do desmatamento, a caça, o fogo, o corte seletivo da vegetação e outros impactos antropogênicos também apresentam efeitos sinérgicos sobre a degradação e extinção de espécies na Mata Atlântica (CANALE et al., 2012). Esse bioma deve ter prioridade para se gerar ações de conservação, devido ao seu grande número de espécies endêmicas e sua intensa perda de hábitat, que o coloca entre as regiões "hotspots" para a conservação do mundo (MYERS et al., 2000).

Essa desvalorização ambiental trouxe ao Brasil o título de país com maior impacto ambiental absoluto do mundo (BRADSHAW et al., 2010). O entendimento da elevada importância das florestas tropicais para o país conduziu a um crescimento de iniciativas de conservação da biodiversidade, valorização e fornecimento de serviços ambientais adequados a um modo de vida mais sustentável.

Os fragmentos de populações remanescentes da Mata Atlântica geralmente se encontram fragilizados pelo isolamento e tamanho populacional reduzido. A preocupação com a sobrevivência desses fragmentos desperta o interesse em avaliar as consequências genéticas da fragmentação de habitat nessas comunidades.

Esse crescimento da demanda por proteção ambiental, por vezes, não é acompanhado por estratégias claras e bem desenvolvidas para promover a efetiva conservação e manejo dos fragmentos de remanescentes florestais e de fragmentos reflorestados. Identifica-se, portanto, a necessidade de estudos que permitam o estabelecimento de programas de manejo e conservação das áreas florestais, principalmente as da Mata Atlântica, bioma extremamente ameaçado.

Os esforços voltados à conservação dos recursos biológicos têm por objetivo compensar e mitigar as altas taxas de erosão de recursos genéticos e consequente perda de componentes da biodiversidade. Três formas de conservação devem ser consideradas a fim de se promover a sustentabilidade desses recursos: conservação *in situ*, *on farm* e *ex situ*.

A restauração de ambientes degradados através do reflorestamento, contribui muito para a redução do processo de degradação causado pelos impactos da atividade antrópica no meio ambiente, permitindo a proteção dos recursos hídricos, recuperação de fragmentos florestais em áreas de menor aptidão agrícola e implantação de corredores biológicos em matrizes de terras agrícolas. Além de propiciar condições favoráveis ao retorno de sítios com elevada diversidade biológica e estabilidade das condições físicas do ambiente (RODRIGUES et al., 2011).

No entanto, supõe-se que grande parte dos projetos de restauração florestal foi implantada a partir de sementes provenientes de um número reduzido de matrizes. Essa baixa variabilidade genética pode não fornecer um “pool” gênico necessário para a sobrevivência dessas populações em longo prazo, comprometendo a sustentabilidade dessas áreas, caso não sejam adotadas medidas de manejo adaptativo.

A genética de populações utiliza informações geradas através de dados moleculares que são muito importantes para a restauração ecológica e para a ecologia da restauração, auxiliando no reconhecimento de alguns dos aspectos que compreendem o crescimento de uma população, assim como sua dinâmica populacional.

A genética da conservação utiliza ferramentas biotecnológicas que podem servir para a preservação da biodiversidade. O estudo da variabilidade genética possibilita acessar informações a respeito da diversidade genética em ambientes com históricos de formação distintos como fragmentos reflorestados e fragmentos de remanescentes naturais.

A variabilidade genética é uma condição necessária, tanto para a ocorrência das mudanças evolutivas nos organismos, como para a manutenção das populações nos ambientes em constantes modificações. A estimativa de fluxo gênico entre populações é importante para a compreensão dos padrões de diversidade e estrutura genética de uma espécie.

Dentre as técnicas disponíveis para se determinar os padrões de variabilidade genética por marcadores moleculares, destacam-se os microssatélites nucleares e cloroplastidiais e os marcadores AFLP. Os microssatélites nucleares são muito úteis devido ao alto nível de polimorfismo, possibilitando a estimativa da variabilidade genética e estimativa indireta de fluxo gênico, enquanto os microssatélites cloroplastidiais são importantes para obter informações sobre a história evolutiva da espécie. Os marcadores AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) possibilitam uma alta cobertura genômica.

A hipótese central desse estudo é que os projetos de reflorestamento da Mata Atlântica realizados no estado de São Paulo foram realizados com baixa diversidade dentro de cada espécie. A falta de variabilidade genética pode trazer consequências para a sobrevivência das populações reintroduzidas nessas áreas.

As estimativas sobre a diversidade genética dos marcadores moleculares escolhidos para o desenvolvimento desse estudo são complementares e possibilitam uma discussão aprofundada sobre a variabilidade genética nas áreas reflorestadas em comparação com remanescentes de vegetação nativa.

Desse modo, o presente trabalho propôs testar essa hipótese, através de estimativas da diversidade e estrutura genética de uma espécie nativa e comum da Mata Atlântica, *Piptadenia gonoacantha*.

O estudo destes parâmetros na espécie foi realizado através da avaliação de duas populações em áreas de remanescente florestal comparadas com populações de duas áreas em processo de restauração, utilizando marcadores moleculares microssatélites nucleares, microssatélites cloroplastidiais e AFLP.

P. gonoacantha foi utilizada como modelo porque se enquadra no perfil de análise do presente estudo uma vez que apresenta distribuição natural em grande parte do bioma da Mata Atlântica no estado de São Paulo. A espécie é recomendada para reflorestamentos destinados a recomposição de áreas degradadas em APP (área de preservação permanente), porque apresenta rápido crescimento e é muito importante nos primeiros estágios de sucessão ecológica.

Essa proposta está vinculada ao projeto BIOTA/FAPESP: Taxonomia, Sistemática e Filogeografia; “Biologia da conservação de espécies nativas da Mata Atlântica com potencial fitoterápico: Uma abordagem genética sobre restaurações florestais” (Processo 11/50296-8). O presente estudo utiliza a espécie *P. gonoacantha* para investigar a diversidade genética de áreas restauradas em comparação com remanescentes naturais de Mata Atlântica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Conservação da Mata Atlântica

A Mata Atlântica abrangia originalmente, no início do século XVI, uma área equivalente a 1.315.460 km² distribuída por 17 estados brasileiros: São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí. Atualmente, a cobertura de suas florestas foi reduzida a pequenos e desconectados fragmentos de remanescentes de vegetação nativa em diferentes estágios de regeneração (PUTZ et al., 2011). Da cobertura original, apenas 7% estão bem conservados em fragmentos acima de 100 hectares e 12% são fragmentos de floresta nativa com área superior a 3 hectares (SOS MATA ATLÂNTICA, 2014).

Apesar da drástica redução do seu bioma, a Mata Atlântica representa uma das áreas mais ricas em biodiversidade do planeta, sendo decretada Reserva da Biosfera pela Unesco, Patrimônio Nacional pela Constituição Federal de 1988 e considerada um "hotspot" mundial para a conservação devido à ameaça que toda sua riqueza faunística e de flora estão sujeitas. Estima-se que cerca de 35% das espécies vegetais do Brasil ocorrem na Mata Atlântica, ou seja, mais de 20.000 espécies, muitas delas endêmicas e ameaçadas de extinção.

No que diz respeito à diversidade de macrofauna, os números também são surpreendentes. Os levantamentos realizados apontam cerca de 2040 espécies, sendo 849 espécies de aves, 370 espécies de anfíbios, 200 espécies de répteis, 270 de mamíferos e 350 de peixes. Das 633 espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção, 383 ocorrem na Mata Atlântica. Toda essa riqueza ameaçada coloca a região da Mata Atlântica como altamente prioritária para a conservação da biodiversidade mundial (SOS MATA ATLÂNTICA, 2014).

A composição da vegetação na Mata Atlântica é formada por um mosaico de formações florestais definidas como Floresta Ombrófila Densa, Ombrófila Mista, Estacional Semidecidual, Estacional Decidual, Ombrófila Aberta e alguns ecossistemas associados com os campos de altitude, manguezais e restingas (RODRIGUES, et al. 2009).

A região da Mata Atlântica, além de abrigar uma rica biodiversidade, representa um importante aporte de serviços ambientais essenciais a mais de 62% da população brasileira, tais como regulação do fluxo de mananciais hídricos, proteção da fertilidade do solo, controle do equilíbrio climático, preservação do patrimônio histórico e cultural, belezas cênicas entre outros. São mais de 120 milhões de brasileiros vivendo em 3.284 municípios no domínio deste bioma, onde são gerados aproximadamente 70% do PIB (Produto Interno Bruto) brasileiro (IBGE, 2014).

Neste contexto, foi fundamental a implantação de áreas protegidas, como as Unidades de Conservação, para assegurar a conservação dos remanescentes de vegetação nativa, preservando áreas representativas da diversidade biológica e cultural da Mata Atlântica. As contribuições das esferas federais, estaduais, municipais e privadas do país, permitiram o crescimento das áreas protegidas na Mata Atlântica, apesar da maior parte dos remanescentes naturais ainda estarem sem proteção. No entanto, áreas protegidas envolvem custos de conservação locais, em termos de restrições de uso do solo, ao passo que gera benefícios de conservação tanto locais como globais (RING, 2008).

Apesar do avanço das áreas protegidas, estratégias alternativas para conservação da biodiversidade podem ser adotadas visando à ampliação da conservação e recuperação ambiental na Mata Atlântica. A Lei da Mata Atlântica (Lei 11.428) de 2006, que regulamenta o uso e a exploração de seus remanescentes florestais e recursos naturais, representa um importante instrumento de incentivo ao uso sustentável da biodiversidade. No Brasil já existem mais de 600 RPPNs (Reservas Particulares do Patrimônio Natural) reconhecidas na Mata Atlântica. Outras estratégias como promoção da recuperação de áreas degradadas e incentivo ao pagamento pelos serviços ambientais prestados também podem contribuir de maneira significativa para o implemento de ações de conservação nesse bioma.

O estado de São Paulo, desde o período de colonização do Brasil, passou por intensos processos de devastação que, através de ações antrópicas como desmatamento, exploração de espécies arbóreas e construção de rodovias, resultaram na perda de biodiversidade e na depleção dos recursos genéticos em seus ecossistemas florestais (MYERS et al., 2000).

A Floresta Estacional Semidecídua é uma das principais formações florestais do estado de São Paulo, faz parte da Mata Atlântica e apresenta grande importância social e ambiental (VELOSO et al., 1991). Este tipo de vegetação é caracterizado pela alta diversidade de espécies e alto grau de endemismos, no entanto a ocupação desordenada gerou intensa fragmentação da vegetação (MYERS et al., 2000).

Diversos estudos destacam os impactos negativos da fragmentação dos remanescentes da cobertura vegetal original para a manutenção da diversidade genética (YOUNG et al., 2000; LAURENCE; COCHRANE, 2001; TABARELLI et al., 2004). A maioria destes remanescentes encontra-se em péssimas condições de conservação (DURIGAN et al., 2000). Uma atenção especial deve ser tomada em relação ao manejo adequado dessas áreas naturais e aos processos de restauração florestal de áreas desmatadas.

Esses fragmentos florestais são isolados espacialmente entre si por uma matriz distinta da cobertura original (MADER, 1994; YOUNG et al., 1996). A conservação dos remanescentes florestais é muito importante para que a biodiversidade seja mantida, uma vez que a fragmentação prejudica o fluxo gênico entre os remanescentes, comprometendo o desenvolvimento do processo sucessional (SMITH-RAMÍREZ et al., 2007) e reduzindo a variabilidade genética dessas populações (CASCANTE et al., 2002). A taxa de crescimento das plantas, sucesso reprodutivo, estrutura mutualística entre planta-animal e estrutura demográfica das espécies também podem ser muito prejudicados devido aos processos de fragmentação (ROGRIGUES; NASCIMENTO, 2006; VIDAL, 2007).

Estudos genéticos de populações nessas áreas fragmentadas podem trazer novas perspectivas quanto à sobrevivência da vegetação remanescente ou reflorestada. As populações dessas áreas estão sujeitas a um aumento na taxa de auto fecundação e de cruzamento entre indivíduos aparentados, consequentemente elevando a endogamia (HANSON et al., 2008). A endogamia está associada com a redução da heterozigosidade e da adaptabilidade das espécies, aumentando a probabilidade de extinção dessas populações (MATTHIES et al., 2004; REED, 2005).

2.2 Genética da restauração

Para compensar a grande devastação da rica composição faunística e de flora da Mata Atlântica, muitos projetos de restauração florestal foram implantados em áreas degradadas. Essa atividade é essencial para a conservação *in situ* da biodiversidade, refazendo comunidades e estabelecendo corredores entre os fragmentos (REIS et al., 2003).

A conservação destas áreas fragmentadas está associada à regulação de mananciais hídricos, controle climático, proteção de encostas de serras e escarpas assim como a preservação da fertilidade do solo e do importante patrimônio natural e cultural (WHITMORE, 1998).

Com a redução das áreas florestais, a recuperação de ecossistemas degradados vem se tornando uma atividade crescente. As interferências humanas em áreas alteradas, buscando restabelecer os processos ecológicos, requerem esforços diferenciados, os quais dependem do histórico de degradação de cada situação, do mosaico ambiental e das características de seu entorno, expressando sua resiliência ou capacidade de auto-recuperação (RODRIGUES; GANDOLFI, 1996).

A restauração ecológica é o processo e prática de auxiliar a recuperação de um ecossistema que foi degradado, danificado ou destruído (SER, 2014). A restauração ecológica busca restabelecer a sustentabilidade das funções e processos ecológicos de um ecossistema, que ocupava originalmente um determinado local (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A restauração florestal tem apresentado rápida expansão no Brasil em função da demanda cada vez maior pela regularização ambiental das atividades produtivas e mitigação de impactos ambientais diversos (RODRIGUES et al., 2009).

A principal recomendação nos projetos de restauração ecológica é o respeito a diversidade natural dos ecossistemas. Alguns aspectos são fundamentais, como considerar a matriz predominante em que a área a ser restaurada está inserida, disposição, forma, estado de conservação e conectividade dos fragmentos florestais remanescentes e finalmente promover a sucessão ecológica por meio das técnicas de restauração adotadas (GANADE, 2001).

Os princípios básicos da restauração genética são uma das bases principais da conservação ambiental, no entanto, não têm recebido muita atenção por parte dos projetos de restauração florestal. Os novos projetos de restauração necessitam trabalhar as questões relacionadas à restauração da diversidade genética, conciliando com a tradicional abordagem da restauração da diversidade florística dessas comunidades (KAGEYAMA; GANDARA, 2004; RODRIGUES et al., 2009).

A restauração e conservação da Mata Atlântica são de fundamental importância para a preservação da biodiversidade. Levando-se em conta a necessidade de manter o nível de variabilidade genética encontrado nas populações naturais para que se efetive uma reconstrução florestal, estudos sobre o padrão de distribuição da variabilidade genética que ocorrem nos fragmentos reflorestados podem auxiliar na realização e desenvolvimento de planos de restauração.

O primeiro exemplo de reflorestamento, realizado na época do Império em 1861, foi na Floresta da Tijuca e Paineiras, Rio de Janeiro, e enfatiza o intuito inicial das ações de restauração florestal, de tão somente preservar mananciais que abasteciam a cidade, reconstituindo a cobertura vegetal com espécies nativas (DEAN, 1996). Os objetivos iniciais dos projetos de restauração eram de apenas preservar os recursos hídricos, solos e estabilização de encostas, baseados em um modelo produtivista que visava à produção de biomassa vegetal desconsiderando-se aspectos ecológicos e sucessionais.

Em contraponto a essas ações primárias de reflorestamento, estão surgindo novas metodologias que se utilizam de aspectos biológicos e ecológicos fundamentais à viabilidade das espécies nativas, considerando a diversidade genética dentro das espécies nas populações que serão reflorestadas (CAPOBIANCO, 2001).

O funcionamento de uma população não pode ser considerado isoladamente, pois depende das interações que ela mantém com as populações vizinhas. As teorias da biogeografia de ilhas e das metapopulações oferecem um arcabouço teórico valioso para relacionar padrão espacial, assim como processos ecológicos e genéticos (MOILANEN e HANSKI, 2001).

As populações que foram reflorestadas devem apresentar conectividade com outras áreas vizinhas contendo vegetação. Desta maneira possibilitando a chegada de propágulos e a formação do banco de sementes, que são responsáveis pela continuidade do processo sucessional. O fluxo gênico das espécies que ocorrem em populações que foram restauradas e estão isoladas, pode ficar extremamente comprometido, reduzindo o tamanho efetivo populacional (N_e) na imensa maioria dos casos. Com a interrupção do fluxo gênico, ocorre um aumento dos níveis de endogamia e também dos efeitos de deriva genética, ocasionando redução da variabilidade genética ao longo das gerações subsequentes (SEZEN et al., 2005).

A manutenção da variação genética em populações reflorestadas, que estão sob forte influência antrópica, requer não apenas taxas elevadas de fluxo gênico, mas também os propágulos devem ter sido originados de fontes diversas (SORK e SMOUSE 2006). A conectividade efetiva vai depender da eficiência dos vetores de dispersão de sementes em colonizar novas áreas e a dos vetores de polinização e dispersão de sementes em manter, ao longo do tempo, o fluxo gênico entre populações restauradas e os fragmentos florestais (HAMRICK, 2004)

Informações sobre a estruturação e diversidade genética permite a compreensão dos processos microevolutivos fundamentais à viabilidade das populações em questão. Variações no conjunto gênico, na distribuição espacial e no sistema de reprodução, podem ocorrer entre e dentro das populações geograficamente distintas, de acordo com as forças evolutivas às quais estão expostas (LOVELESS e HAMRICK, 1984).

Muitos avanços ainda são necessários na restauração florestal para se garantir que as florestas restauradas exerçam o efetivo papel de mantenedoras, junto com as florestas remanescentes, de biodiversidade. O grande desafio é fazer com que as florestas restauradas assumam gradualmente características próximas de florestas naturais através, principalmente, da interligação dos fragmentos remanescentes na paisagem (RODRIGUES et al., 2009).

2.3 Descrição da espécie

O gênero *Piptadenia* (Mimosoideae-Fabaceae) tem aproximadamente 80 espécies tropicais e subtropicais da América (LEWIS, 1987). Dentre essas espécies, encontra-se a *Piptadenia gonoacantha*, conhecida popularmente através dos seguintes nomes: pau-jacaré, angico-branco, monjolo, caniveteiro, casco-de-jacaré, camboeteiro, serreiro, icarapé, jacarezeiro e monjoleiro (CARVALHO, 2004).

P. gonoacantha é uma espécie arbórea, semicaducifolia, heliófita e seletiva higrófila, com 10-20 m de altura e 30-50 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), podendo atingir até 30 m de altura e 90 cm de DAP quando adulta. O tronco de sua árvore (Figura 1) apresenta cristas aculeadas e sua madeira é moderadamente pesada (LORENZI, 1992). A casca tem espessura máxima de 5 mm, sendo a casca externa, com cristas lineares longitudinais que se interligam por outras menores transversais, de caráter áspero nas árvores jovens e fissurada ao amadurecer. As ramificações (Figura 2) são dicotômicas e cimosas, sendo a copa irregular, estreita, umbeliforme e com acúleos nos ramos finos (CARVALHO, 2004).

Figura 1 - Imagem apresentando as cristas lineares e longitudinais do tronco (A) e detalhe dos frutos de *P. gonoacantha* (B)

Figura 2 - Imagem das folhas alternas, compostas bipinadas, com 30 a 50 pares de folíolos de *P. gonoacantha* (A); imagem com visão mais ampla do tronco e do topo de um exemplar de pau-jacaré (B)

O pau-jacaré é uma planta hermafrodita, cujo processo reprodutivo pode iniciar aos três anos de idade, se plantada em solo de fertilidade elevada. A época de floração e frutificação é variável conforme as características do estado em que ocorre, sendo que no estado de São Paulo, sua floração ocorre de outubro a janeiro e sua frutificação de junho a dezembro. O fruto de *P. gonoacantha* é um legume não moniliforme e deiscente, sua semente é ovalada, sem endosperma, não alada, plana e lisa. A dispersão do fruto é autocórica e a principal síndrome de polinização é entomofilia (CAVALHEIRO; AMEIXEIRO, 1992; KINOSHITA, et al., 2006). A semente do pau-jacaré apresenta comportamento ortodoxo, se mantendo viável em ambiente natural (CARVALHO, 2004).

A espécie ocorre principalmente na Floresta Pluvial da encosta Atlântica (Lorenzi, 1992). Apresenta ampla distribuição ao longo de oito estados brasileiros, desde áreas ao nível do mar, nos litorais das regiões Sul e Sudeste, até áreas com 1.300 metros de altitude na região serrana de Minas Gerais (Figura 3). O padrão de distribuição espacial dessa espécie é agregado, com maior densidade de indivíduos nas clareiras, onde ocorre maior incidência de luz no ambiente (CARVALHO, 2004).

Figura 3 - Área de ocorrência natural de *P. gonoacantha* no Brasil

O pau-jacaré exerce a função de espécie secundária inicial no processo sucessional (LEITE; TAKAKI, 1994), podendo servir em sistemas agroflorestais tanto para sombreamento em cafezais como para cercas vivas ou arborização de culturas (CORREA, 1984; BAGGIO; CARVALHO, 1990). Essa espécie é muito usada na restauração de áreas de mata ciliar, em solos não sujeitos a inundação (SALVADOR; OLIVEIRA, 1989; RIBEIRO; FERREIRA, 2000) e para recuperação de terrenos erodidos e de baixa fertilidade, uma vez que possuem sistema radicular profundo, conseguindo sobreviver em solos degradados (RIBEIRO; FERREIRA, 2000).

P. gonoacantha é uma espécie fixadora de nitrogênio e tem uma importância muito grande no processo sucessional florestal, sobretudo em solos calcários, onde se caracteriza como um competidor melhor adaptado em relação às espécies geralmente encontradas na sucessão inicial da Mata Atlântica em solos ácidos (*Tibouchina* spp.) (AIDAR et al., 2001).

O pau-jacaré possui utilidade como produto madeireiro para uso em serraria, como, por exemplo, fabricação de brinquedos, embalagens, construção civil em vigamentos, e obras não expostas como armações de móveis, miolo de portas e acabamentos internos (LELLES, 1978). A madeira desta espécie também destaca-se quanto ao uso energético, sendo considerada uma das melhores essências brasileiras para lenha e carvão devido à sua facilidade em queimar, durabilidade de sua combustão e a durabilidade em seu depósito (CARVALHO, 2004).

Outros usos a que se podem destinar os produtos de *P. gonoacantha* são: produção de papel e celulose; produção de forragem para alimentação animal, apresentando de 15% a 25% de proteína bruta (LEME et al., 1994); utilização de seus recursos florais por abelhas, por apresentar grande potencial apícola, com produção de néctar e pólen em suas flores melíferas (REIS et al., 1992; PIRANI; CORTOPASSI-LAURINO, 1993); uso de tanino para fabricação de curtume (GONÇALVES; LELIS, 2000); uso paisagístico devido aos seus atributos ornamentais (LORENZI, 1992) e seu uso como planta medicinal utilizando suas propriedades contra infecções pulmonares causadas por *Mycobacterium kansasii* (RAMOS et al., 2008).

Apesar dos potenciais usos econômicos dessa espécie, há poucas informações a respeito de seu estado de conservação e do perfil genético ao longo do território em que se distribui. Identifica-se, portanto, a necessidade de ampliar estudos a respeito da diversidade, estrutura genética e sistema reprodutivo desta espécie. Essas informações também podem ser fundamentais para a criação e manutenção de áreas reflorestadas com *P. gonoacantha*.

2.4 Marcadores Moleculares

Com a descoberta do código genético e da molécula de DNA, a genética se tornou uma ferramenta fundamental no esclarecimento de questões envolvendo conservação dos recursos naturais. Ao longo do tempo, as técnicas foram aprimoradas no sentido de desvendar os mecanismos genéticos presentes nos complexos sistemas dos seres vivos (MARTINELLI, 2001).

Os marcadores moleculares são definidos por Ferreira e Grattapaglia (1998) como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondendo a regiões expressas ou não do genoma). A sequência de nucleotídeos e a função de um marcador molecular podem ou não ser conhecidas. Esses marcadores apresentam inúmeras vantagens, uma vez que podem ser obtidos em grande número e não sofrem influência de fatores ambientais. Tais técnicas avaliar a variabilidade genética permitem diretamente em nível de DNA dentro do conjunto gênico de espécies cultivadas e não cultivadas.

O incremento tecnológico na área de marcadores moleculares tem sido fascinante e extremamente rápido. A tecnologia de DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase), abriram caminho para uma mudança no paradigma genético básico da inferência do genótipo a partir do fenótipo, para a análise genética da variação na sequência de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares são ótimas ferramentas para caracterizar a diversidade genética das populações reflorestadas e naturais, fornecendo informações sobre a variabilidade genética do DNA, sem influência ambiental.

2.5 Microssatélites

Microssatélites, ou sequências simples repetidas (SSR), são compostos por sequências de poucos pares de bases de DNA (2 – 6 pb) de comprimento repetidas em *tandem*, abundantes e dispersos por todo o genoma dos organismos eucarióticos (AGARWAL et al., 2008). A frequência de microssatélites em um organismo é inversamente correlacionada ao tamanho do genoma (MORGANTE et al., 2002).

O atributo principal dos locos microssatélites é seu nível elevado de diversidade alélica (MCCOUCH et al., 1997). Devido a erros que podem ocorrer durante a replicação do DNA, diferentes indivíduos de uma mesma espécie podem apresentar um número variado de repetições dentro de um mesmo microssatélite, os quais constituem diferentes alelos (ALZATE-MARIN et al., 2005).

Como outras classes de DNA repetitivo, os microssatélites possuem altas taxas de mutação. Elas variam entre 10^{-7} e 10^{-4} por loco por gameta por geração, sendo significativamente mais altas que as taxas de substituição de bases em outras regiões do genoma (10^{-10} a 10^{-9}). As elevadas taxas de mutação são causadas primariamente por alterações no número das unidades de repetição, sendo que a maioria dessas alterações resulta de mudanças no número integral de cópias das unidades de repetição (ELLEGREN, 2004).

A origem dos microssatélites no genoma provavelmente não ocorre aleatoriamente. Estas sequências podem surgir espontaneamente através de eventos de *indel* ou pela inserção de formas primárias de SSR via transposons em regiões receptivas do genoma (BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006).

O principal mecanismo que origina o polimorfismo desses marcadores é o deslize (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação. Entretanto, novos alelos podem ser gerados também por recombinação, através de *crossing-over* desigual ou conversão gênica, por se tratarem de sequências repetidas em tandem mais longas (GOLDSTEIN, 1999).

Durante a replicação de uma região repetitiva, as fitas de DNA separam-se e associam-se novamente de forma incorreta. Assim, seriam geradas cópias de trechos de DNA (alelos) com diferentes tamanhos ou números de repetições de um determinado motivo no próximo ciclo de replicação, por meio da inserção ou deleção de uma unidade de repetição (SCHLÖTTERER; TAUTZ, 1992).

A distribuição, a frequência e as classes de microssatélites variam entre as diferentes classes de organismos. As repetições mais abundantes são os dinucleotídeos, sendo que, em plantas, os motivos mais comuns são AT/TA, enquanto em humanos e muitos mamíferos os motivos CA são mais frequentes (SCHLÖTTERER; TAUTZ, 1992).

Os motivos dos microssatélites podem ser classificados como: perfeitos, ou seja, sem interrupção (ATATATATATATAT); imperfeitos, quando interrompidas por nucleotídeos fora do motivo, (ATATATATATGGATATATAT); compostos, quando dois ou mais motivos estão adjacentes, (ATATATATATCACACACACACA) (OLIVEIRA et al., 2006). Os motivos são em sua maioria dinucleotídeos ou trinucleotídeos; tetranucleotídeos e pentanucleotídeos são mais raros.

Esses marcadores são encontrados preferencialmente em regiões não codificadoras, mas, em menor frequência bem menor, também são encontrados nas regiões codificadoras (SCHLÖTTERER; TAUTZ, 1992).

Devido a esta distribuição preferencial nas regiões não codificadoras, os microssatélites podem ser considerados marcadores seletivamente neutros, o que é muito importante para estudos em genética de populações naturais. O alto polimorfismo desses marcadores é uma vantagem em estudos de fluxo gênico, padrões de diferenciação e níveis de endogamia entre populações (KASHYAP et al., 2006).

Os marcadores moleculares SSR apresentam características altamente desejáveis: são marcadores codominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados no gel e são altamente multialélicos. Esses marcadores são amplificados via PCR, o que facilita sua obtenção mesmo com pouca quantidade de DNA e permitem a caracterização genética dos organismos em fases precoces de desenvolvimento (embriões, sementes e plântulas). Também mostram padrão de herança mendeliana, além de apresentarem elevado conteúdo de informação de polimorfismo (RAFALSKI et al., 1996).

Microssatélites são marcadores ideais para análises de diversidade genética em genética da conservação (POWELL et al., 1995, RAJORA et al., 2000), construção de mapas genéticos de alta resolução, identificação de locos controladores de características de interesse e seleção assistida por marcadores (DEVEY et al., 1996). Locos específicos também são usados frequentemente para o *fingerprinting* de DNA (HAYDEN et al., 2001).

Microsatélites também são muito úteis nos estudos de populações com efeito de gargalo genético (LUITKART et al., 1999), bem como estudos de parentesco (MORIN et al., 1994) e identificação forense de indivíduos (PAETKAU et al., 1994).

O estudo do efeito de gargalo genético e a sua detecção tornam-se importantes na conservação, pelo fato deste aumentar os riscos da extinção da população, ao promover redução no número efetivo, além do número de alelos e redução dos locos polimórficos (PIRY et al., 1999).

Para se amplificar uma região contendo microsatélites, são utilizadas as sequências de DNA que flanqueiam os microsatélites para a construção de *primers* (iniciadores), que serão usados na amplificação dos locos microsatélites, usando o método de reação de amplificação em cadeia, mediado por polimerases (PCR). Assim é possível obter uma amplificação específica da região que contém a sequência SSR. O polimorfismo entre as bandas é decorrente dos números diferentes de elementos simples repetidos, que são representados por diferentes tamanhos nos fragmentos amplificados. Os produtos da amplificação por PCR são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, ou em gel de agarose ultrapura, ou por sequenciador automático. Cada tamanho de fragmento diferente de DNA representa um alelo daquele loco específico.

O polimorfismo de um loco microsatélite é resultado do número de repetições do motivo que o caracteriza. Portanto, os diferentes alelos que um loco microsatélite distinguem-se uns dos outros pelo número de repetições que apresentam (OLIVEIRA et al., 2006).

O desenvolvimento de *primers* específicos para os locos de microsatélites de cada espécie é frequentemente realizado a partir da construção de bibliotecas genômicas. Dentre os vários protocolos diferentes de enriquecimento, o protocolo desenvolvido por Billotte et al. (1999) se destaca por sua eficiência e relativa baixa demanda de recursos.

Entretanto, a conservação de sítios microsatélites entre espécies relacionadas ocorre frequentemente, possibilitando aproveitar *primers* (heterólogos), que foram desenvolvidos para uma espécie e que podem ser aplicados em espécies filogeneticamente próximas (ALVES et al., 1998). Principalmente se a transferência for feita entre espécies do mesmo gênero (AUREA, 2008).

2.6 Microssatélites cloroplastidiais

Enquanto os microssatélites nucleares apresentam herança biparental e são transmitidos aos descendentes pelos gametas masculinos e femininos, os microssatélites citoplasmáticos geralmente apresentam herança uniparental. Os microssatélites cloroplastidiais, na maioria das angiospermas, apresenta herança maternal, sendo transmitidos apenas pelos gametas femininos. Devido a essas características, estudos utilizando microssatélites com diferentes modos de herança permitem a avaliação das contribuições relativas da migração do pólen e de sementes no fluxo gênico total (MARTINS et al, 2011).

A estimativa do nível de fluxo gênico que ocorre nas populações fornece meios para prever os efeitos gerados pela fragmentação e verificar se as áreas reflorestadas possuem conectividade com os remanescentes florestais. O fluxo gênico pode ser calculado de maneira indireta (fluxo gênico histórico), através da distribuição da diversidade genética entre populações ou diretamente (fluxo gênico contemporâneo), através da detecção da movimentação de genótipos ou alelos imigrantes (HAMRICK; NASON, 2000).

A utilização de marcadores com base em DNA cloroplastidial vem auxiliando no entendimento do fluxo gênico, da ecologia, da evolução e da estrutura genética das populações naturais (EBERT; PEAKALL, 2009), devido a algumas características deste genoma: DNA circular e pequeno, que é facilmente obtido a partir do tecido foliar (PETIT et al., 2005); predominantemente não recombinantes, efetivamente haplóides e apresentam taxa de evolução molecular relativamente lenta, embora a taxa de mutação seja maior do que regiões não codificadoras do genoma (RAUBESON et al., 2007).

Os microssatélites de cloroplasto, também conhecidos como *chloroplast simple sequence repeats* ou pela sigla “cpSSR”, foram primeiramente desenvolvidos por Powell et al. (1995) e são geralmente repetições curtas em tandem de mononucleotídeos. Caracterizam-se como importante fonte de informações na biologia vegetal, principalmente para estudos a níveis populacionais.

O polimorfismo dos locos microssatélites cloroplastidiais varia entre as espécies, elevando a variabilidade intraespecífica destes marcadores cpSSR (EBERT; PEAKALL, 2009), mas normalmente apresentam de 8 a 15 repetições de motivos mononucleotídeos.

Microsatélites cloroplastidiais já foram desenvolvidos em gramíneas (PROVAN et al., 2004) e coníferas (VENDRAMIN et al., 1996). As dicotiledônias também foram contempladas com *primers* cloroplastidiais universais desenvolvidos por Weising & Gardner (1999), tendo como alvo regiões não codificadoras do cpDNA.

Os marcadores microsatélites cloroplastidiais (cpSSR) foram desenvolvidos para serem aplicados em um grande contingente de espécies.

Estudos com base no cpDNA também podem auxiliar na detecção de pontos de estrangulamento genético em uma população devido a efeitos evolutivos como efeito fundador e deriva genética, uma vez que a herança uniparental do genoma cloroplastidial tende a reduzir o tamanho populacional efetivo em comparação com o genoma nuclear (AGARWAL et al., 2008; EBERT; PEAKALL, 2009).

As informações dos marcadores cpSSR sobre a diversidade e estrutura genética entre e dentro das populações, fornecem uma visão particular sobre os processos evolutivos fundamentais, complementando informações obtidas por marcadores genéticos nucleares. Os marcadores cloroplastidiais são importantes indicadores de subdivisão e diferenciação populacional em estudos de genética de populações (PETIT et al., 2005).

Marcadores cpSSR e SSR são ferramentas muito importantes para delinear estratégias efetivas de conservação e manejo de espécies arbóreas tropicais (TARAZI et al., 2009) proporcionando à espécie e ao ecossistema a expressão de seu potencial evolutivo.

2.7 Marcadores AFLP

A técnica de AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*) é utilizada para a detecção de polimorfismo de fragmentos de restrição genômicos através da amplificação por PCR. AFLP combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição, empregando a velocidade e praticidade da detecção do polimorfismo via PCR. Entretanto, as enzimas de restrição, reagentes necessários para o emprego da técnica, são de custo relativamente alto.

Apesar dessa técnica ser aplicada em qualquer organismo, ela é recomendada para análises intraespecíficas ou envolvendo espécies evolutivamente próximas (KARP et al., 1996). Quando são analisados organismos de espécies muito distintas, o polimorfismo observado pode ser muito variável e os marcadores obtidos serão

menos homólogos, visto que sua evolução é muito rápida (MUELLER; WOLFENBARGER, 1999).

Esses marcadores são muito utilizados em estudos de genética de populações e permitem a obtenção de um grande número de marcas distribuídas aleatoriamente no genoma (VOS et al., 1995).

O polimorfismo obtido através dos marcadores AFLP está relacionado com a complexidade do genoma e com os nucleotídeos seletivos dos *primers* na PCR. Mutações de ponto, inversões, deleções e inserções resultam na perda ou ganho de sítios de restrição, reconhecido pelas enzimas utilizadas, ou essas mutações podem alterar as sequências que seriam reconhecidas pelos *primers* que conduzem a PCR a partir dos adaptadores. A principal desvantagem é que esses marcadores são dominantes e não permitem a detecção de heterozigotos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Além da abordagem tradicional (Teoria da Neutralidade) em genética de populações foi feito o estudo da genômica populacional através do “*scan genômico*” comparativo.

A genômica de populações pode ser definida como o uso de ampla amostragem do genoma (*genome scan*) para identificar e separar locos sobre efeito específico (sobre seleção, mutação, acasalamentos preferenciais e recombinação) de locos sobre efeito amplo (sobre deriva genética, efeito de gargalo, fluxo gênico e endogamia) com o objetivo de aumentar nosso entendimento sobre eventos micro evolutivo (*short term-evolution*) (BLACK et al., 2001).

Esses estudos necessitam de numerosos marcadores de DNA e de genotipagem em larga escala, o que nos permite amostrar grande parte do genoma; e de estratégias de amostragem populacional que nos permitem associar gradientes de pressões seletivas (variação de estresse abiótico/biótico) com a variação genética. Dessa forma é possível identificar regiões genômicas de comportamento diferencial e associar essas variações, por meio de testes estatísticos, com eventos de seleção local as quais estão sujeitas as populações da espécie estudada (STAPLEY et al., 2010; ALLENDORF et al., 2010).

A utilização de marcadores AFLP permite a amostragem genômica necessária para estudos de adaptação. Desde o início da genômica de populações, os marcadores AFLP foram propostos para a realização de *scan genômico* de organismos não-modelos. Os marcadores AFLP estão sendo utilizados para um

estudo inicial que podem ser refinados com a descoberta de SNPs dentro de blocos AFLP e o estudo dos genes/regiões que esses SNPs se encontram em estudos de genômica comparativa. (ALLENDORF et al., 2010).

A ampla amostragem genômica (*genome scan*) com marcadores AFLP, através da genotipagem de aproximadamente 147 indivíduos de *Haumania danckelmaniana* e 80 indivíduos de *Haumania liebrechtsiana*, permitiu detectar o fluxo gênico entre essas duas espécies e enfatizar a importância da introgressão/hibridização na evolução das plantas em florestas tropicais (LEY; HARDY et al., 2013).

A genotipagem de 15 populações de *Neochlamisus bebbianae* (“leaf beetle”), coletadas em duas plantas-hospedeiras distintas, com 415 locos AFLP permitiu relacionar locos “outliers” (15% dos locos) com a planta-hospedeira em que a população do inseto foi coletada. Através desse estudo foi possível refinar as estimativas populacionais com a retirada dos locos “outliers” e detectar regiões genômicas com comportamento diferencial com potencial para se chegar em genes candidatos relacionados com a adaptação planta-hospedeira (EGAN et al., 2008). Outro estudo semelhante, considerando a relação planta-hospedeira e variações ambientais abióticas permitiu relacionar marcas AFLP com variação nas condições abióticas (amostragem em escalas geográficas distintas). Entretanto os autores ressaltam a necessidade de utilizar métodos estatísticos mais refinados para relacionar a variação na distribuição das marcas com as variações ambientais sob as quais as populações amostradas se encontram (MANEL et al., 2009).

2.8 Diversidade genética e parâmetros populacionais afins

Nas populações naturais, a distribuição da variação genética é influenciada por quatro fatores evolutivos principais: deriva genética; seleção natural; fluxo gênico e mutação. Somente a mutação é capaz de criar novos alelos. Os outros três fatores apenas rearranjam essa variação dentro e entre as populações.

O sistema de reprodução da espécie, o tamanho da população e a distribuição geográfica também são fatores importantes que influenciam nos padrões de distribuição das frequências alélicas (HAMRICK; GODT, 1990).

A diversidade genética é o fator fundamental para que ocorra a evolução. A seleção natural funciona selecionando as variantes dentro das populações em relação à adaptação ao ambiente (TORGGLER et al., 1995). Quanto maior a diversidade

genética em uma população, maiores são suas chances de sobrevivência ao longo do tempo evolutivo. A manutenção da variabilidade genética nas populações é a base da conservação das espécies e a caracterização da diversidade genética é fundamental para o estabelecimento de práticas conservacionistas realmente efetivas (YEEH et al., 1996).

A estrutura da diversidade genética e seu padrão espacial dentro das populações são componentes importantes dos processos evolutivos de populações naturais de plantas (EPPERSON, 1990). A degradação dos habitats e fragmentação das populações naturais podem trazer consequências irreversíveis para a conservação das espécies, devido à redução da variabilidade genética e da capacidade de adaptação às mudanças ambientais (BARRET; KOHN, 1991).

A fragmentação das populações naturais pode reduzir o tamanho efetivo populacional devido a gargalos genéticos e efeito fundador. Esses fenômenos favorecem a perda e fixação aleatória de alelos pela deriva genética, especialmente os mais raros, sendo mais efetivo do que a perda de heterozigosidade (FUTUYMA, 2003).

O processo da deriva genética é interpretado como uma flutuação aleatória na frequência alélica, que pode resultar na fixação ou perda de alelos. O processo ocorre em toda população natural, mas é mais intenso em populações com tamanho efetivo populacional reduzido. A deriva genética resulta na perda de variação genética dentro das populações e no aumento da divergência genética entre elas (FUTUYMA, 2003).

A mutação introduz continuamente variabilidade genética nas populações, sendo contrabalanceada pela deriva genética e pela seleção natural (COLE, 2003).

Os modelos propostos para explicar o papel das mutações na evolução de marcadores moleculares são: IAM (*Infinite Alleles Model*) (KIMURA; CROW 1964), SMM (*Stepwise Mutation Model*) (KIMURA; OHTA; 1978) e TPM (*Two-Phase Model*) (DI RIENZO et al., 1994).

No modelo IAM, cada nova mutação, cria um novo alelo a uma taxa μ , então, alelos idênticos compartilham o mesmo ancestral e são idênticos por descendência (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). Esse modelo não admite homoplasia e só é útil se considerarmos que alelos idênticos são em estado e não devido à ancestralidade comum (ELLEGREN, 2004). A rigor, o excesso de heterozigosidade (ou déficit) tem sido demonstrado apenas para locos que envolvem esse modelo. As estatísticas F de Wright (1931) estão em conformidade com esse modelo mutacional.

O modelo SMM considera que cada mutação cria um novo alelo através de ganho ou perda de uma repetição com probabilidade igual a $\mu/2$ em ambas as direções. Assim, os alelos de tamanhos muito diferentes serão mais divergentes daqueles com tamanhos similares (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). A restrição do modelo SMM é que este leva em conta o tamanho dos alelos (ELLEGREN, 2004). As estatísticas de Slatkin (1995) utilizam alternativas do modelo SMM para estimação de parâmetros populacionais.

Entretanto, para marcadores microssatélites, o modelo TPM, segundo Di Rienzo et al. (1994) seria o mais apropriado a ser utilizado, pois incorpora o modelo SMM, e tem capacidade de captar melhor a variação promovida pela mutação, assumindo que certa fração das mutações ocorre através de múltiplas unidades de repetição.

A diversidade genética de um determinado marcador codominante corresponde à probabilidade de ocorrência de polimorfismo entre indivíduos tomados ao acaso (RAFALSKY et al., 1996).

A média aritmética do número de locos polimórficos pelo número total de locos (porcentagem de locos polimórficos) é muito importante para caracterizar diversidade genética das populações com marcadores codominantes. O Índice de Shannon é uma estimativa da proximidade genética entre os indivíduos da população e também é fundamental para descrever a diversidade genética das populações com dados desse tipo de marcadores molecular.

O número médio de alelos por loco (diversidade alélica) é um bom parâmetro para estudar perda de diversidade genética e potencial evolutivo das populações, porém é altamente dependente do tamanho amostral, podendo causar viés comparativos caso sejam comparadas populações com diferentes tamanhos amostrais (ALLENDORF e LUIKART, 2007). No caso das populações apresentarem tamanhos amostrais diferentes, as estimativas de riqueza alélica devem ser corrigidas através de métodos de padronização com base no menor tamanho amostral, como rarefação ou subamostragem randomizada repetida (LEBERG, 2002).

O padrão de diversidade genética entre e dentro das populações é conhecido como estrutura genética das populações. A diversidade genética total da população pode ser particionada em componentes intra e inter populacional. Para tanto, a diversidade gênica é definida como a heterozigosidade esperada (H_E) sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O parâmetro H_E corresponde a probabilidade de dois gametas, tomados ao acaso de uma população, terem alelos diferentes em um determinado loco, sendo definida como a diversidade genética de Nei (1973). O parâmetro H_o representa a taxa real de indivíduos heterozigotos na população estudada. Assim tem-se que:

$$H_E = 1 - \sum p_i^2$$

Na expressão descrita acima, p_i = frequência alélica do i -ésimo alelo. A estimativa média dessas estimativas é calculada pela média aritmética entre todos os locos analisados.

A heterozigosidade média esperada é definida para cada população pela média aritmética de todos os locos estudados. Este parâmetro é pouco sensível ao tamanho amostral e bastante informativo, sendo boa medida diversidade genética.

A relação entre essas estatísticas define o índice de fixação de Wright (F_{IS}), que é um desvio da proporção dos indivíduos heterozigotos observados em relação aos heterozigotos esperados, segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (WRIGHT, 1978).

O F_{IS} é o valor médio do índice de fixação de alelos dentro de populações, e caracteriza o nível médio de endogamia ao nível populacional. As estatísticas-F permitem ainda a caracterização da distribuição da diversidade genética entre as populações (F_{ST}) e o coeficiente de fixação total encontrado nas amostras (F_{IT}).

F_{ST} é uma estimativa do coeficiente de endogamia devido à diferenciação entre as subpopulações em relação à população total (divergência das frequências alélicas entre as populações) (FRANKHAM et al., 2008).

$$F_{IS} = (H_E - H_o) / H_E$$

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS}) (1 - F_{ST})$$

Uma metodologia foi desenvolvida por Excoffier et al. (1992) para a análise da distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações, através da análise de variância molecular (AMOVA) e se mostrou muito adequada para marcadores dominantes, pois não depende de pré-suposições específicas. A matriz de distância entre todos os pares de haplótipos (genótipos) é utilizada para a análise

de variância hierarquizada produzindo estimativas de componentes de variância análogas às estatísticas F de Wright.

Para determinar os agrupamentos formados pelas amostras sem definir as populações, existem pacotes estatísticos baseados na inferência bayesiana. Esses pacotes permitem a determinação do coeficiente de ancestralidade (Q) e divergência genética (F_{ST}) através do método MCMC.

Um parâmetro muito importante para a conservação dos recursos naturais é o tamanho efetivo populacional (N_E), que segundo Wright (1931), é o número de indivíduos reprodutivos em uma população ideal que teria a mesma intensidade de dispersão de frequências alélicas sob deriva genética ou a mesma intensidade de endogamia que a população sob análise. O N_E permite a estimativa e comparação com o tamanho mínimo viável ou mínimo adequado, o qual assegura que a população mantenha a viabilidade ao longo do tempo e que exista sustentabilidade genética na sua descendência (VENCOVSKY, 1992).

Segundo HARTL (2008), existem três tipos de tamanhos efetivos populacionais, classificados com base no parâmetro utilizado para medir sua magnitude: tamanho efetivo de endogamia, calculado a partir de mudanças no coeficiente de endogamia médio; tamanho efetivo de variância, calculado a partir de mudanças na variância de frequências alélicas; e tamanho efetivo de autovalor, calculado a partir de taxas de perda de heterozigosidade. O mais disseminado e utilizado dos três é o tamanho efetivo de endogamia (FINKELDEY e HATTEMER, 2007).

O tamanho efetivo de população influencia diretamente na manutenção da estrutura genética de uma população ao longo das gerações. Nesse sentido, estimativas sobre o N_E são fundamentais para calcular a população mínima viável para traçar as estratégias de conservação de uma espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material experimental

As coletas foram realizadas em indivíduos jovens e adultos de quatro áreas inseridas na Mata Atlântica do estado de São Paulo: duas áreas de remanescentes florestais naturais e duas áreas em processo de restauração florestal, com plantio de espécies da floresta estacional semidecidual.

As áreas de remanescentes naturais foram: Estação Ecológica de Caetetus (CAE), nos municípios de Gália e Alvinlândia, e a Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra (MSG), no município de Campinas.

A Estação Ecológica de Caetetus (CAE) possui um dos maiores remanescentes de mata estacional semidecídua ainda presentes no estado de São Paulo (DURIGAN, 2000) e a Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra (MSG) é a uma maiores das florestas urbanas no Brasil (GUIRAO; FILHO, 2011). As duas áreas provavelmente são representativas da maior diversidade genética de *P. gonacantha* que pode ser encontrada no estado.

As duas áreas que sofreram os processos mais antigos de restauração florestal no estado de São Paulo foram escolhidas para o estudo: um trecho de mata ciliar na Usina Ester, situado na Bacia Hidrográfica do Rio Jaguari, no município de Cosmópolis (COS) que possui 55 anos desde seu reflorestamento e o entorno do reservatório municipal de abastecimento de água do município de Iracemápolis (IRA), cujo reflorestamento é mais recente, feito a 25 anos, com técnicas de restauração mais modernas. Ambas as áreas tiveram um plantio com alta diversidade de espécies arbóreas, com predominância de espécies nativas regionais e possuem um histórico semelhante de formação, inseridas em uma matriz de cana-de-açúcar.

3.2 Estação Ecológica dos Caetetus

A Estação Ecológica dos Caetetus (CAE), situada no município de Gália e Alvinlândia (SP), se situa próximo à cabeceira do Rio Peixe, constituindo um dos maiores remanescentes de área contínua de Floresta Estacional Semidecidual no estado de São Paulo (Figura 4 e Figura 5). A temperatura média anual é de 22° C. Sua altitude média é 530 metros e apresenta pluviosidade média anual em torno de 1.480 mm (DURIGAN et al., 2000).

Ao longo de seus aproximadamente 2.178,84 ha de área, percorrem córregos tributários do rio Paranapanema, além de cachoeiras e lagos naturais. Estão preservados trechos de vegetação em bom estado de conservação, com mata alta e estratificação complexa (DURIGAN et al., 2000).

Figura 4 - Mapa da Estação Ecológica dos Caetetus (CAE), situada entre os municípios de Gália e Alvinlândia, os pontos brancos representam os pontos de coleta. Google Earth 2013

Figura 5 - Vista da Floresta Estacional Semidecidual da Estação Ecológica dos Caetetus (CAE). Foto: Marcos Vinícius Bohrer Monteiro Siqueira

A área contínua representativa de Floresta Estacional Semidecidual que originalmente revestia o Planalto Ocidental Paulista foi reduzida a 6% de sua cobertura original, devido a um histórico intenso de destruição da vegetação natural entre os rios Paranapanema e Peixe. O crescimento das lavouras cafeeiras, bem como outros processos de ocupação da região, foram os responsáveis por praticamente dizimar o ecossistema nativo em um raio de aproximadamente 200 km do remanescente natural (DURIGAN et al., 2000).

Devido à relevância da preservação da vegetação nativa da região pelos seus atributos naturais particulares, a área foi estabelecida como Estação Ecológica em 6 de fevereiro de 1987 (Decreto Nº 26.718). Isto fez parte de um programa institucional, cujo objetivo era estabelecer novas categorias de manejo de Unidades de Conservação da natureza, em consonância com a proteção de importantes porções territoriais de propriedade do Governo do Estado de São Paulo, que abrigavam ecossistemas complexos e frágeis.

A partir da instituição da área como Estação Ecológica passou-se, efetivamente, a assegurar a preservação de significativa amostra de remanescentes de floresta latifoliada e seu contingente de biodiversidade e espécies ameaçadas de extinção, como o mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*), um dos primatas mais ameaçados de extinção no mundo.

3.3 Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra

A segunda área utilizada para o estudo de remanescentes florestais naturais foi a Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra (MSG), com altitude média de 670m e temperatura média anual de 21,6°C (FJPO, 2010). Localizada entre as coordenadas 22° 49' 20" S e 47° 06' 40" W, a ARIE Mata de Santa Genebra está inserida no Distrito de Barão de Geraldo, ao norte do município de Campinas (SP) e possui uma de suas faces em divisa com o município de Paulínia (Figura 6 e Figura 7).

Com seus 251,77 ha de área e nove quilômetros de perímetro, a Mata de Santa Genebra abriga o maior remanescente de Mata Atlântica do município de Campinas, sendo considerada a segunda maior floresta urbana do Brasil, ficando atrás apenas da Floresta da Tijuca no Rio de Janeiro. O histórico da sua criação, gestão e ações de preservação permite compreender a importância ecológica, social e econômica desta floresta urbana (GUIRAO; FILHO, 2011).

A área florestal da Mata de Santa Genebra pertencia a uma grande fazenda de café da região e foi doada em 1981 para a Prefeitura Municipal de Campinas, sob a condição de que a mata deveria permanecer preservada. A Prefeitura Municipal de Campinas criou a Fundação José Pedro de Oliveira para administrar e conservar a área, que passou a compor a Reserva Florestal Mata de Santa Genebra, de modo que a área fosse somente destinada para fins de pesquisa científica. Em 1983 a área foi tombada pelo Conselho de Defesa do Patrimônio Histórico, Artístico, Arqueológico e Turístico do Estado de São Paulo (CONDEPHAAT) e em 1985 foi declarada ARIE, uma Unidade de Conservação de Uso Sustentável, cujo objetivo é compatibilizar a conservação da natureza com o uso sustentável de parcela dos seus recursos naturais.

Em 1992, o CONDEPACC (Conselho de Defesa do Patrimônio Artístico e Cultural de Campinas) tombou a área como patrimônio natural do município, visando minimizar problemas relacionados à incêndios criminosos, extração de madeira, caça, especulação imobiliária e loteamentos clandestinos (SERRÃO, 2002).

Figura 6 - Mapa da Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra (MSG), os pontos brancos representam os pontos de coleta. Google Earth 2013

Figura 7 - Foto de uma das áreas de coleta em remanescente florestal natural: Área de Relevante Interesse Ecológico Mata Santa Genebra (MSG). Zona de amortecimento. Foto: Flávio Grieger

A Mata de Santa Genebra possui um entorno diversificado, com cultivos agrícolas, bairros residenciais (Bosque de Barão), condomínios fechados em situação de irregularidade e duas rodovias de fluxo intenso que tangenciam a mata (SP 332 e SP 138-146). Diante das diversas pressões, impactos e da atual situação de

isolamento do fragmento da MSG, é cada vez mais evidente a necessidade de intervenções e ações de manejo para uma devida preservação deste importante remanescente de Mata Atlântica.

A Mata de Santa Genebra é considerada uma Floresta Estacional Semidecidual (cerca de 85% de sua área), com alguns trechos ocupados por Floresta Hidrófila ou Mata de Brejo (15%) nas regiões mais baixas, de solo permanentemente alagado e com vegetação predominantemente arbórea. A vegetação apresenta-se como um mosaico heterogêneo em suas características fisionômicas, florísticas e estruturais, devido ao histórico de perturbações antrópicas no passado e devido aos efeitos de borda do presente (LEITÃO-FILHO; MORELLATO, 1995).

A rica biodiversidade do remanescente da Mata de Santa Genebra atrai o interesse de pesquisadores de diversas universidades e institutos de pesquisa do Brasil e do exterior, preocupados com a proteção e preservação das características naturais da Mata Atlântica e suas espécies características.

3.4 Usina Ester, Cosmópolis

A primeira área de restauração localiza-se no município de Cosmópolis – SP (COS), nas dependências de uma empresa sucroalcooleira, Usina Ester, entre as coordenadas 22° 39' S e 47° 12' W, a 585 m de altitude e temperatura média anual de 21°C (Figura 8 e Figura 9).

O processo de restauração de um trecho de mata ciliar na Usina Ester, situado na Bacia Hidrográfica do Rio Jaguari, teve início em 1955, a partir de um projeto de reflorestamento para substituir um pasto ralo à margem direita do rio, e teve uma duração de 5 anos. Esta área é formada por uma faixa de vegetação ao longo de 25 ha, onde foram plantadas 71 espécies arbustivas e arbóreas, privilegiando espécies finais da sucessão florestal e espécies nativas da região, mas também utilizando nativas não regionais e algumas espécies exóticas. O plantio foi realizado sem a preocupação com espaçamento ou alinhamento (NOGUEIRA, 1977, NOGUEIRA, 2010).

Estima-se que o local onde o reflorestamento foi realizado tenha sido desmatado por volta de 1900 e permaneceu sem composição arbórea até o plantio em 1955 (NOGUEIRA, 1977). Atualmente, passados 59 anos do reflorestamento, a

composição vegetativa da área alcança 30 metros de altura e apresenta um sub-bosque denso, onde ocorre regeneração natural.

A área de estudo encontra-se numa matriz agrícola ausente de fragmentos florestais próximos, com alguns poucos remanescentes degradados ao longo da faixa de Mata Ciliar do rio Jaguari.

Figura 8 - Mapa do reflorestamento do reflorestamento da Usina Ester (COS), à margem do Rio Jaguari, Cosmópolis, os pontos brancos representam os pontos de coleta. Google Earth 2013

Figura 9 - Reflorestamento Usina Ester (COS), à margem do Rio Jaguari, Cosmópolis. Foto: Gabriele Marina Preiskorn

3.5 Reservatório municipal de Iracemápolis

A segunda área em processo de restauração estudada (Figura 10 e Figura 11) encontra-se no entorno do reservatório municipal de abastecimento de água do município de Iracemápolis (IRA), localizada no município de Iracemápolis sob as coordenadas geográficas 22° 35' S e 47° 31' W, situada a uma altitude de 605 metros (SIQUEIRA, 2002).

O reflorestamento está localizado na microbacia do Ribeirão Cachoeirinha, às margens do reservatório de abastecimento público do município de Iracemápolis, o qual passou por uma forte estiagem na década de 80, prejudicando o abastecimento de água do município. Tal acontecimento levou a prefeitura de Iracemápolis decisão de implantar um trabalho de reflorestamento ao longo da faixa de mata ciliar na represa que abastece o município (RODRIGUES et al., 1992).

A área de estudo, anteriormente utilizada por culturas de cana de açúcar, teve seu reflorestamento iniciado em 1988 sendo finalizado em 1990 com cerca de 1100 mudas plantadas por hectare, escolhidas a partir de um levantamento florístico e fitossociológico.

No processo de restauração florestal, foram utilizadas mudas de 140 espécies arbóreas, dando preferência às espécies nativas em remanescentes florestais da região (Floresta Estacional Semidecidual) e espécies frutíferas não regionais, para facilitar o fluxo de propágulos por zoocoria. Algumas espécies exóticas agressivas foram plantadas na borda do reflorestamento, visando minimizar os impactos provenientes do entorno de plantações de cana-de-açúcar (RODRIGUES et al., 1992).

Figura 10 - Mapa do reflorestamento do entorno do reservatório de água para abastecimento público do município de Iracemápolis (IRA), os pontos brancos representam os pontos de coleta. Google Earth 2013

Figura 11 - Reflorestamento instalado no entorno da área ciliar da represa de Iracemápolis (IRA). Foto: Gabriele Marina Preiskorn

O plantio desta área foi realizado numa faixa de 50 m no entorno do reservatório de água e em uma faixa de 30 m na margem do formador do reservatório, rio Ribeirão Cachoeirinha, áreas de preservação permanente (RODRIGUES et al., 1992). Utilizou-se a metodologia de combinação das espécies em módulos de nove indivíduos (6 indivíduos de espécie pioneira, 2 de secundárias iniciais e 1 de secundária tardia ou clímax), com espaçamento 4x4 m e 3x3 m, com o intuito de reproduzir a estrutura de matas ciliares da região e com base nos conceitos de sucessão secundária (SIQUEIRA, 2002).

Atualmente, após 26 anos do reflorestamento, a vegetação da Floresta Estacional Semidecidual em formação apresenta aproximadamente 15m de altura, com indivíduos regenerantes no sub-bosque e com o solo da floresta coberto por serrapilheira. O reflorestamento está delimitado pelo reservatório de um lado, e por uma estrada de terra e plantações de cana de açúcar do outro lado.

O município de Iracemápolis tem somente 5,6% de cobertura vegetal, sendo que essa cobertura é preenchida principalmente por plantações de cana (85% da área total). O reflorestamento do entorno do reservatório de água representa aproximadamente 12% dos remanescentes de floresta nativa do município (BRANCALION, et al., 2014)

3.6 Amostragem das populações

A amostragem foi feita de maneira aleatória, evitando-se apenas coletar amostras de indivíduos muito próximos, com o objetivo de atingir grande parte da extensão da distribuição da espécie nas áreas de coleta.

Ao todo, foram coletados 367 indivíduos (Tabela 1). Foram coletadas 88 amostras na área reflorestada de Cosmópolis e 96 em Iracemápolis, com indivíduos espaçados em pelo menos 10 metros de distância um dos outros. Nas áreas de remanescente foram coletadas 94 amostras na Mata Santa Genebra e 89 em Caetetus, buscando estimar a diversidade genética em toda a área de estudo. Todas as amostras tiveram o DAP de sua árvore anotado e a localização espacial das árvores determinada com a utilização de um aparelho GPS (etrex 30 - Garmin).

Durante o momento das coletas em campo, as amostras dos materiais vegetais foram embaladas em sacos de papel identificados com o número da árvore de origem e foram armazenadas em um recipiente de metal inox com nitrogênio, para a melhor conservação do material, até serem encaminhadas ao freezer -80°C do Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento da ESALQ/USP (Piracicaba).

Tabela 1 - Locais de coleta e quantidade de indivíduos estudados por população

População	Nº de Indivíduos
Estação Ecológica dos Caetetus (CAE)	89
Reserva Municipal de Santa Genebra (MSG)	94
Usina Ester, Cosmópolis (COS)	88
Reservatório municipal de Iracemápolis (IRA)	96
TOTAL	367

Cada uma das 4 populações foi identificada com um sigla: CAE para Estação Ecológica dos Caetetus; MSG para a Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra; COS para o reflorestamento da Usina Ester em Cosmópolis e IRA para o reflorestamento do entorno do reservatório municipal de Iracemápolis. As análises estatísticas contendo representações gráficas coloridas dos resultados dos marcadores moleculares utilizados no estudo foram feitas assumindo a cor vermelha para CAE; amarelo para MSG; verde para COS e azul para IRA.

Na Figura 12 podemos visualizar um mapa localizando as populações geograficamente. MSG e as duas áreas em processo de restauração estão mais próximas, enquanto que CAE está mais afastada das demais populações.

Figura 12 – Mapa indicando as populações estudadas

3.7 Extração e quantificação de DNA

Foram coletadas folhas jovens recém-expandidas, as quais foram armazenadas em nitrogênio líquido e desidratadas em estufa a 50°C por 12 horas. Em seguida, realizou-se a moagem do material liofilizado em moinho elétrico, utilizando cerca de 500mg de folhas liofilizadas por indivíduo. Após a obtenção do material macerado, utilizou-se para a extração de DNA, o protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990) com modificações propostas por Jobes et al. (1995). Aproximadamente 30mg do material macerado foi transferido para um microtubo de 2mL, onde imediatamente foram adicionados 800µL de tampão de extração CTAB 3% (brometo de cetiltrimetilamonio), contendo: TRIS (tris- (hidroximetil-aminometano)) - HCl 0,1 M pH 8,0; NaCl 1,2 M; CTAB 3%; EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 30 mM pH 8,0 e βmercaptoetanol a 1%. Os tubos foram agitados e incubados em banho maria durante 60 minutos a 65°C. A cada 15 minutos os tubos foram invertidos lentamente para que houvesse uma homogeneização. Durante este período, o EDTA inibe a atividade enzimática das nucleases, quelando os seus cofatores, que são os íons de magnésio. O CTAB é o detergente que solubiliza as membranas. Após o banho-maria, foram adicionados 500µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24/1), os tubos foram

agitados levemente por 5 minutos e centrifugados durante 5 minutos a 14000 rpm. O clorofórmio desnatura as proteínas que se precipitam, pois são insolúveis na fase aquosa aonde se encontra o DNA da amostra. O sobrenadante foi transferido para novos tubos (cerca de 700µL), onde foram adicionados também 700µL de isopropanol gelado, misturando levemente até formar um precipitado. Os tubos foram levados ao congelador (-18°C) por 30 minutos, e depois centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi posto a secar em temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se 500µL de etanol 70% para remover as impurezas do precipitado, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 5 minutos e o etanol foi descartado. Depois o procedimento foi repetido utilizando 500µL de etanol 95%. O precipitado (*pellet*) foi deixado secar em temperatura ambiente por 2 horas para evaporar os resíduos de etanol e dissolvido em 100µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0), acrescidos de 1µL de RNase (10 mg/mL) em cada tubo. Os tubos foram finalmente armazenados a temperatura de - 20°C no freezer.

Para a extração de DNA de amostras vegetais em estado degradado, foi utilizado o protocolo desenvolvido por Csaikl et al. (1998) com modificações, como a adição de bissulfito de sódio.

A verificação das amostras foi realizada em eletroforese com gel de agarose 1%, corado com Syber Green® e visualizado por meio de um transiluminador ultravioleta. A quantificação do DNA foi obtida pela comparação da intensidade do sinal da banda no gel com o sinal produzido com base nos padrões (DNA do bacteriófago Lambida) que correspondem a 12,5; 25; 50; 100 e 200ng (*Invitrogen*) (Figura 13).

Após a quantificação do DNA extraído, foi realizada a diluição das amostras com água ultra pura até a concentração de 1ng/µL.

Figura 13 - Perfil de gel de agarose 1% corados com Syber Green®, mostrando a quantificação de 60 amostras de *P. gonoacantha*. Padrões (DNA do bacteriófago Lambida) utilizados estão nas últimas cinco bandas e correspondem a 12,5, 25, 50, 100 e 200 ng

3.8 Microssatélites

3.8.1 Construção da biblioteca genômica enriquecida com SSR

Para a caracterização da variabilidade genética na espécie, foi construída uma biblioteca genômica para a seleção dos fragmentos contendo marcadores SSR. O protocolo utilizado para a construção da biblioteca foi descrito por Billotte et al. (1999), com modificações, e otimizado pelo pesquisador Angie-Marie Risterruci, do CIRAD/França.

Inicialmente amostrou-se, ao acaso, um dos genótipos da população da Estação Ecológica dos Caetetus. O DNA foi digerido para gerar fragmentos de tamanhos adequados. Um total de 6,5 µg de DNA foi digerido pela enzima *Afa I* (*Invitrogen*), na concentração de 0,5 U/µL, em presença de 10% (v/v) de tampão (fornecido pelo fabricante da enzima) em água ultrapura autoclavada, em banho-maria a 37°C por 15 horas. A digestão foi verificada após eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) por 1,5 h a 60 V.

O produto da digestão foi ligado aos adaptadores *Afa21* (5' CTCTTgCTTACgCgTggACTA 3') (*IDT, Integrated DNA Tchnologies, Inc.*) e *Afa25* (5' pTAgTCCACgCgTAAgCAAgAgCACA 3'), a fim de garantir que todos os fragmentos tivessem uma terminação comum e conhecida. A reação foi realizada com 20% (v/v)

do produto da digestão, 0,4µM de *Afa21*, 0,4µM de *Afa25*, 8% (v/v) de enzima T4 DNA Ligase (*Invitrogen*) e 20% (v/v) do tampão fornecido pelo fabricante da enzima, em água ultrapura autoclavada, por 20°C por 2h em termociclador (BIO-RAD My Cycler).

Após a ligação aos adaptadores, foi realizada uma etapa de pré-amplificação, visando um aumentar a quantidade de fragmentos que foram ligados aos adaptadores. A reação foi feita utilizando-se 3,0 µL de fragmentos ligados aos adaptadores, aos quais se adicionaram 47 µL de um *mix* contendo 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM de *Afa21*, 5 unidades de *Taq* DNA polimerase (*Fermentas Life Sciences*), 1,5 mM de MgCl₂ (*Fermentas Life Sciences*) e 10% (v/v) de tampão (*Fermentas Life Sciences*) contendo 750 mM de Tris-HCl (pH 8,8) e 200 mM de (NH₄)₂SO₄ em água ultrapura autoclavada.

As reações de PCR foram feitas em termociclador (BIO-RAD My Cycler), inicialmente à temperatura de 95°C durante 4 minutos, seguido de depois a 20 ciclos (94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto, e 72°C por 2 minutos) e 72°C por 8 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TBE 1X, contendo Syber Safe, utilizando uma voltagem de 110 V por 1,5 hora. Foi utilizado um marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb (*Fermentas Life Sciences*). Decorrido o tempo de eletroforese, o gel foi levado para o aparelho de fotodocumentação (Major Science UVDI) para a visualização das bandas de DNA marcado com o Syber Safe, sobre fonte de luz ultravioleta.

O produto de PCR foi purificado através do *Kit Concert Rapid PCR Purification System* (*Life Technologies*), conforme instruções do fabricante, preparando o DNA para a etapa seguinte. A purificação foi verificada em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TBE 1X, contendo Syber Safe, utilizando uma voltagem de 110 V por 1 hora.

Após a purificação, foi realizada uma etapa de seleção de fragmentos contendo microssatélites. A seleção foi obtida através de *beads* magnéticas (Promega, cat. Z5481) e de sondas biotiniladas ligadas a estreptavidina, contendo repetições em *tandem* de dinucleotídeos CT (5' biotOOOOOTCTCTCTCTCTCTCT 3' – Nome: BiotCT) e GT (biotOOOOOGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 3' – Nome: BiotGT).

A solução de 600 µL de *beads* foi lavada com 300 µL de tampão SSC 0,5 X (obtido através de diluição, em água ultrapura, de tampão SSC 20X, composto por Cloreto de Sódio 3M e Citrato de Sódio 0,3 M em água ultrapura, com pH igual a 7,0) e o procedimento foi repetido mais três vezes.

Paralelamente, o DNA foi preparado através de diluição de 40 µL em 460 µL de água ultrapura e posterior incubação em banho-maria a 95°C por 15 minutos. Após a incubação, a amostra recebeu 13 µL de SSC 20x, 3 µL do oligonucleotídeo CT e 3 µL do oligonucleotídeo GT, e foi deixada em temperatura ambiente, sendo agitada suavemente por 1 minuto, com pausa a cada 2 minutos, durante um intervalo de 20 minutos.

Posteriormente adicionou-se a mistura de DNA e oligonucleotídeos ao tubo das *beads*, incubado por 10 minutos a temperatura ambiente, sempre agitando gentilmente. O tubo foi colocado em uma *rack* magnética e o sobrenadante foi aspirado e descartado. As *beads* foram ressuspensas em SSC 0,1X e lavadas por quatro vezes. Finalmente foram ressuspensas em 250 µL de água ultrapura, e o sobrenadante após magnetização foi transferido para um novo tubo de 1,5mL.

Os fragmentos selecionados foram então amplificados via PCR, utilizando-se 20µL desses fragmentos, aos quais adicionaram-se 80 µL de um *mix* contendo 0,2 mM de dNTPs, 0,4 µM do *primer Afa21*, três unidades de *Taq* DNA polimerase (*Fermentas Life Sciences*), 1,5 mM de MgCl₂ (*Fermentas Life Sciences*) e 10% (v/v) de tampão (*Fermentas Life Sciences*) composto de 750 mM de Tris-HCl (pH 8,8) e 200 mM de (NH₄)₂SO₄ em água ultrapura autoclavada.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (BIO-RAD My Cycler), no qual foram submetidas as amostras inicialmente a 95°C por 1 minuto, e depois a 25 ciclos de amplificação. Cada ciclo submeteu as amostras a 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e finalmente a 72°C por 2 minutos. Após os 25 ciclos, as amostras foram mantidas por 5 minutos a uma temperatura de 72°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TBE 1X, contendo Syber Safe, utilizando uma voltagem de 70 V por 1,5 hora. Foi utilizado um marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb (*Fermentas Life Sciences*). Decorrido o tempo de eletroforese, o gel foi retirado da cuba e levado para o aparelho de fotodocumentação (Major Science UVDI) para revelar as bandas de DNA marcadas com o Syber Safe sobre fonte de luz ultravioleta.

Os fragmentos amplificados foram então ligados a um vetor de clonagem pGem *T-Vector* (*kit pGem-T Vector System I -Promega* cat. A3600). A reação de ligação foi realizada a 4°C por 15 horas, contendo 10 µL de tampão, 1 µL de plasmídeo, 1 µL de enzima ligase (todos componentes fornecidos pelo *kit*) e 8 µL dos fragmentos.

Células competentes da cepa DH5 α de *Escherichia coli*, preparadas através do protocolo de Cloreto de Rubídio, foram utilizadas. Cem microlitros de células competentes foram adicionadas a 4 μ L de fragmentos ligados ao vetor e deixadas sobre gelo durante 20 minutos. Assim as células sofreram choque térmico, sendo mergulhadas em banho-maria a 42°C por dois minutos, sendo retiradas e colocadas no gelo por 5 minutos. Após o choque térmico, em câmara-fluxo, adicionaram-se 450 μ L de meio LB (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl em água ultrapura, com pH igual a 7,0) autoclavado e pré-aquecido a 37°C. As células foram deixadas em estufa a 37°C por 50 minutos.

Após a incubação, o tubo contendo as células foi centrifugado por 30 segundos a 13000 rpm, e 350 μ L do sobrenadante foram descartados. O volume restante de 60 μ L, incluindo o *pellet*, foi aliqotado sobre placa de Petri contendo meio LB sólido (0,1% p/v de triptona, 0,05% p/v de extrato de levedura, 0,1 % p/v de NaCl e 0,15% p/v de *Select Agar* em água ultrapura, com pH igual a 7,0) contendo 100 μ g/mL de ampicilina. Também aliqotou-se na placa de Petri 60 μ L de 20% p/v IPTG e 60 μ L de 2% p/v X-GAL. As placas de Petri foram deixadas em estufa a 37°C por 15 horas.

Depois do tempo de crescimento das colônias, as de coloração branca foram repicadas em poços de microplaca do tipo ELISA (*Costar*, cat. 3795) contendo 140 μ L de meio 2YT-HMFM (1,6% p/v de triptona, 1% p/v de extrato de levedura, 0,5% p/v de NaCl, 0,0076% p/v de MgSO₄ (7H₂O), 0,045% p/v de Citrato de Sódio, 0,09% p/v de (NH₄)₂SO₄, 4,4% p/v de glicerol, 0,18% p/v de KH₂PO₄ e 0,47% p/v de K₂HPO₄ em água ultrapura) acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 15 horas, fechadas com adesivo selador (AB-Gene, cat. AB0558) e transferidas para freezer -20°C.

Realizou-se então uma reação de PCR para verificar se os clones transformados apresentavam os insertos. A reação foi feita com 1 μ L do conteúdo de cada poço da placa ELISA, aos quais adicionaram-se 24 μ L de um *mix* contendo 0,4 mM de dNTPs, 0,25 μ M de *Afa21*, 1 unidades de *Taq* DNA polimerase (*Fermentas Life Sciences*), 0,4 mM de MgCl₂ (*Fermentas Life Sciences*) e 10% (v/v) de tampão (*Fermentas Life Sciences*) composto de 750 mM de Tris-HCl (pH 8,8) e 200 mM de (NH₄)₂SO₄ em água ultrapura autoclavada.

A reação de PCR foi feita em termociclador (BIO-RAD My Cycler), inicialmente a 95°C por 4 minutos, seguidos de 30 ciclos de amplificação. Cada ciclo foi de 94°C

por 30 segundos, 52°C por 45 segundos e finalmente a 72°C por 1,5 minutos e ao final um ciclo de 72°C por 8 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em tampão TBE 1X, contendo Syber Safe, utilizando uma voltagem de 110 V por 1 hora. Decorrido o tempo de eletroforese, o gel foi levado para o aparelho de fotodocumentação (Major Science UVDI). Assim, pode-se identificar quais os clones que apresentaram os insertos. A presença de duas bandas no mesmo poço do gel indicou a existência de dois clones com insertos diferentes no mesmo poço da placa, essas amostras foram descartadas.

Os clones transformados foram mantidos a -80°C até o início da etapa seguinte, na qual os plasmídeos foram extraídos das células. Para esta etapa, foram utilizadas placas de 96 poços fundos (AB-GENE cat. AB0564) e adicionado a cada um dos poços, 1mL de meio *Circle Grow* (Q BIO-GENE cat. 3000-142) contendo 100 µg/mL de ampicilina. Em seguida 2 µL do conteúdo de cada poço da placa ELISA contendo as colônias foram adicionados a cada poço das placas de poços fundos, onde já estava o meio *Circle Grow*. As placas foram seladas com adesivo, que foi perfurado com uma agulha sobre cada poço da placa. As placas foram incubadas em *shaker* a 370 rpm por 22 horas.

Após o período de incubação, o adesivo das placas foi substituído por um novo, e as placas foram centrifugadas a 3000 rpm por 6 minutos, para que as células aderissem ao fundo da placa. O sobrenadante foi descartado por inversão das placas. A cada poço adicionou-se 240 µL de meio GTE (2,6% (v/v) de Tris 1M pH 7,4, 2,0% (v/v) de EDTA 0,5M pH 8,0 e 4,6% (v/v) de solução de glicose a 20%, em água ultrapura autoclavada). As placas foram novamente seladas e as células foram lavadas por agitação sobre vórtex por 2 minutos. As placas foram novamente centrifugadas a 4000 rpm por 6 minutos, e o sobrenadante foi descartado por inversão. As células sofreram outra lavagem com 80 µL de meio GTE, por agitação em vórtex por 5 minutos.

Cada poço das novas placas (do tipo ELISA) recebeu 5 µL de RNase (*Ribonuclease A*, *Sigma R6513*) a uma concentração de 10 mg/mL, preparada em solução de Tris 10 mM pH 7,5 e NaCl 15 mM em água ultrapura autoclavada. Logo após, 60 µL de suspensão de células foram aliquotados de cada poço das placas de poços fundos e transferidos para cada poço das placas ELISA. A cada poço

adicionaram-se 60 μ L de solução NaOH 0,2 M – SDS 1%. As placas foram seladas e agitadas por inversão 10 vezes e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Nesta etapa, a parede celular e a membrana das células foram rompidas.

As placas sofreram um pulso na centrífuga para limpar o adesivo selador. O adesivo foi retirado e cada poço recebeu 60 μ L de solução de KOAc 3M a 4°C. As placas novamente foram seladas e agitadas 10 vezes por inversão. Em seguida, o adesivo selador foi retirado e as placas foram incubadas a 90°C por 50 minutos. Após a incubação, as placas foram resfriadas em gelo por 10 minutos e centrifugada a 4000 rpm por 4 minutos.

Uma placa-filtro (*Millipore* cat. MAGNV 2250) foi fixada sobre uma placa ELISA, com o auxílio de elásticos, de modo que os poços das duas placas ficassem alinhados. Então todo o volume de cada poço das placas anteriores foi aliquoteado e transferido para cada poço de uma placa filtro, deixando apenas um precipitado branco nas placas, que foram descartadas.

Os conjuntos placa-filtro + placa ELISA foram centrifugados a 4000 rpm por 4 minutos, a 20°C. A placa-filtro descartada. A cada poço das placas contendo o filtrado adicionou-se 110 μ L de isopropanol gelado. As placas foram seladas e invertidas por 20 vezes e então centrifugadas a 4000 rpm por 45 minutos a 20°C.

O sobrenadante foi descartado por inversão, e 200 μ L de etanol 70 % foram adicionados. As placas foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi novamente descartado. As placas foram colocadas invertidas sobre papel absorvente, e nesta posição foram centrifugadas a 600 rpm por 1 minuto. Então foram deixadas para secar sobre a bancada por 30 minutos. Adicionou-se 60 μ L de água ultrapura autoclavada. As placas foram mantidas ao abrigo da luz, por 15 horas.

A qualidade e concentração de DNA de uma amostra aleatória dos plasmídios foram verificadas em gel de agarose 1%. Utilizou-se 3 μ L de plasmídios em comparação com um plasmídeo comercial (P-Gem 3Z, parte integrante do kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems*). As placas contendo os plasmídeos extraídos foram congeladas a -20°C.

3.8.2 Sequenciamento da região de interesse dos plasmídeos

A reação de sequenciamento foi preparada em água ultrapura autoclavada com 4 μ L de plasmídeo, 0,5 μ M de *primer* SP6, 2 μ L de *Big Dye Terminator v3.1 (Applied*

Biosystems) e 2 µL de tampão *Save Money* (preparado com 10 % (v/v) de MgCl₂ 50 mM e 20 % (v/v) de Tris HCl pH 9,0 em água ultrapura autoclavada).

A reação de sequenciamento foi feita em termociclador (BIO-RAD My Cycler), no qual submeteram-se as amostras inicialmente a 96°C por 2 minutos, e, a seguir, a 25 ciclos de amplificação. Cada ciclo submeteu as amostras a 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e finalmente a 60°C por 4 minutos.

Antes do sequenciamento foi realizada ainda uma etapa de purificação. A cada poço da placa foram adicionados 80µL de 65% (v/v) de isopropanol. A placa foi deixada em repouso, por 15 minutos ao abrigo da luz e centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e o excesso absorvido com papel toalha. Adicionou-se 200 µL de 70% (v/v) de Etanol a cada poço. A placa foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Posteriormente a placa foi deixada à temperatura ambiente, em local protegido da luz, por uma hora, para que os poços ficassem totalmente secos. As amostras foram ressuspensas em 10 µL de Formamida ultrapura (*Hi-Di™, Applied Biosystems*). Imediatamente antes do sequenciamento as amostras foram desnaturadas em termociclador (BIO-RAD My Cycler), a 90°C por três minutos, e depois imediatamente colocadas sobre gelo por cinco minutos.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador *3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems)* e as sequências obtidas foram processadas pelo *3730/3730xl Data Collection Software v3.0 (Applied Biosystems)*

3.8.3 Desenho dos oligonucleotídeos de DNA

As sequências obtidas foram transformadas em formato “FASTA” pelo programa BioEdit Sequence Alignment Editor e depois foram retirados os trechos relativos ao vetor e ao adaptador.

O programa Webtroll (disponível em <http://wsmartins.net/webtroll/troll.html>) permitiu a identificação de microssatélites nas sequências obtidas. Os parâmetros utilizados para a identificação de microssatélites foram os seguintes: microssatélites compostos por motivos dinucleotídeos devem ter no mínimo sete repetições do motivo, microssatélites compostos por motivos trinucleotídeos devem ter no mínimo cinco repetições do motivo e microssatélites compostos por motivos tetranucleotídeos (ou mais) deveriam ter no mínimo três repetições do motivo.

O programa *Primer3* (disponível em http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) foi utilizado para o desenho dos *primers* que flanqueiam os microssatélites. Os parâmetros foram configurados para obtenção de *primers* cujo produto final da amplificação esteja no intervalo de 150 a 250 pb, que é um tamanho compatível com uma eletroforese padrão; o tamanho dos *primers* deve estar entre 18 e 22 pb e a porcentagem de GC deve estar no intervalo de 40 a 60%.

O software Gene Runner v. 3.1 acusa a formação de estruturas secundárias, que são indesejáveis se ocorrerem em temperaturas próximas das temperaturas da reação de PCR. Desta maneira, foi possível avaliar a qualidade de cada par de *primer* obtido, selecionando os mais adequados para as reações de PCR.

O software Chromas 2 foi utilizado para avaliar a qualidade do sequenciamento nas regiões dos *primers* e dos microssatélites.

3.8.4 Caracterização e genotipagem dos microssatélites

A caracterização foi feita com 28 locos SSR. Na extremidade 5' do iniciador *forward* de cada loco foi adicionada uma cauda M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC), complementar às sondas contendo fluorescências IRDye700 e IRDye800. Uma mistura de 2 µL dos produtos das reações de PCR com 3 µL de azul de bromofenol (90% de formamida) foi desnaturada em banho-seco a 95°C por 5 min e mantida a 4°C. 1µL dessa mistura de cada amostra foi aplicado no genotipador automático LICOR DNA Analyser 4300s (LICOR Corporate) em gel de poliacrilamida a 6,5% pré-aquecido por 30 min. Foi aplicado também 0,25µL de marcador de peso molecular a 10mM contendo fragmentos de 50 a 350 pb marcados com as fluorescências IRDye700 e IRDye800 (LICOR Biosciences). Durante a eletroforese, imagens dos géis em formato eletrônico foram automaticamente geradas para cada um dos pares de *primers*. Estas imagens foram posteriormente utilizadas para a determinação exata do tamanho dos alelos obtidos em cada loco através dos programas SAGA Lite e SAGA MX Generation (LICOR Biosciences).

A leitura de dos géis obtidos ocorre após emissão dos sinais decorrentes da incidência do raio laser sobre os diferentes IRDyes presentes nos *primers*. Estes sinais são convertidos na forma de eletroferogramas na imagem do próprio gel (Figura 14).

Figura 14 - Perfil de gel obtido pelo sistema de eletroforese LICOR, correspondente ao loco Pgo15 na população IRA. Entre as linhas tracejadas está a região de amplificação desse loco

3.8.5 Análise estatística dos microssatélites

As frequências alélicas, o número de alelos por loco (A), a heterozigotidade observada (H_o) e esperada (H_e), de cada loco foram calculados a partir do software Microsatellite Toolkit (Park, 2001), com auxílio do Microsoft Excel®. Os intervalos de confiança a 95% das estimativas populacionais de H_e e H_o foram obtidos através de reamostragens por 1000 bootstraps pelo pacote do R PopGenKit (PAQUETTE 2012).

Nos marcadores microssatélites, o processo mutacional pode não ser compatível com o modelo de alelos infinitos. Por essa razão, foi utilizada, além do F_{ST} (Wright, 1931), uma estatística análoga, denominada de R_{ST} (Slatkin, 1995), desenvolvida especificamente para dados de microssatélites.

As estatísticas F de Wright, utilizando f e θ como estimadores de F_{IS} e F_{ST} , respectivamente (WEIR; COCKERHAM, 1984) e o R_{ST} foram determinados utilizando o programa FSTAT 2.9.3 (GOUDET et al., 1995). Os intervalos de confiança foram obtidos por meio de 1000 reamostragens *bootstrap*.

O teste exato foi feito para verificar se as populações aderem às proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e para a detecção de desequilíbrio de ligação (DL), feito com base em permutações através do programa GENEPOP v. 3.1 (RAYMOND; ROUSSET, 1995), segundo Guo e Thompson (1992), mediante o algoritmo da cadeia de Monte Carlo Markov (100 *batches*, 5000 interações). Foi aplicada a correção de Bonferroni (HOLM, 1979) ajustando-se o nível nominal de significância (5%) ao número de testes aplicados.

Os valores de riqueza alélica e riqueza alélica privada (o número exclusivo de alelos de uma determinada população) foram calculados pelo software ADZE (SZPIECH et al., 2008). Essas estatísticas consideram a diferença entre o número de genótipos analisados em cada população.

A estruturação da variabilidade foi visualizada através de dendrogramas no programa Darwin (PERRIER, 2003), construídos pela matriz de distâncias genéticas sem viés de Nei (1978) pelo software GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001), pelo critério de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (SNEATH; SOKAL, 1973). A estabilidade dos agrupamentos foi testada através de 10.000 reamostragens bootstrap utilizando o programa TFPGA (MILLER et al., 1997). O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi calculado através de um teste de Mantel com 1000 permutações no NTSYS (ROHLF et al., 1989) com o objetivo de estimar quanto da matriz original foi explicada pelo dendrograma obtido.

A estrutura genética da população foi avaliada também pelo programa STRUCTURE versão 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003) a fim de definir o número de grupos (K) mais provável nas amostras, através de métodos bayesianos, não necessitando de informações hierárquicas *a priori* para fazer um teste de atribuição dos genótipos. O programa foi configurado para admitir mistura de genomas, frequências correlacionadas, número de grupos (K) variando de 1 a 10, 500.000 *burn-in* e 10^6 interações, repetidos 20 vezes. Para determinar qual o K mais provável em relação aos 10 testados, foi utilizada a estatística descrita por Evanno et al. (2005), baseada na taxa de mudança na probabilidade das repetições dos dados entre os sucessivos valores de K . O valor de K que melhor representa a estruturação das populações pode ser identificado pelo pico no valor de ΔK .

Como cada corrida independente do software STRUCTURE gera efeitos estocásticos, é particularmente importante considerar todas as informações dos dados replicados. O programa CLUMPP (JAKOBSSON; ROSENBERG 2007) foi utilizado para recolher todos os dados gerados nas 20 repetições em uma matriz (Q-matriz) de adesão dos coeficientes individuais e de cada das quatro populações pré-definidas (CAE, COS, MSG e IRA). Para a representação gráfica dos clusters da estrutura populacional das amostras do estudo foi utilizado o programa DISTRUCT (ROSENBERG, 2003).

A estrutura em micro-escala foi analisada com base na estimativa de coeficiente de parentesco entre cada par de genótipos, utilizando o software SPAGeDi

versão 1.2 (HARDY; VEKEMANS, 2002). O estimador usado foi o de J. Nason, que não pressupõe Equilíbrio de Hardy Weinberg (LOISELLE et al., 1995). Foram definidas as classes de distância geográfica dependendo das distâncias entre os indivíduos coletados dentro de cada população. O correlograma entre o coeficiente de parentesco e as classes de distância foi construído para visualizar a estrutura genética espacial em cada subpopulação. Através da regressão entre o coeficiente de parentesco médio e as classes de distância geográfica definidas, o erro padrão foi calculado por meio de 1000 reamostragens Jackknife de locos e foi utilizado para calcular o intervalo de confiança do coeficiente de parentesco (IC95%) para cada classe de distância. As classes de distâncias foram determinadas de modo a otimizar o número de comparações em cada classe. A estruturação genética espacial foi quantificada por meio do cálculo de $S_p = \beta\text{-log}/(1-F_1)$, em que $\beta\text{-log}$ é a inclinação da reta de regressão entre o coeficiente de parentesco e o logaritmo da distância geográfica entre os pares de indivíduos; e F_1 é a média do coeficiente de parentesco entre todos os indivíduos presentes na primeira classe de distância (VEKEMANS; HARDY, 2004).

O software Bottleneck v.1.2.0 (PIRY et al., 1999) foi utilizado para testar se as populações se encontram em equilíbrio mutação - deriva genética (simulado), conforme descrito por Cornuet e Luikart (1996). Esta metodologia permite detectar se houve redução recente no tamanho populacional ou gargalo genético, que se reflete na redução do número de alelos e também da diversidade gênica (H_E). Os efeitos desse gargalo genético depende de quantas gerações que esse fenômeno se manifestou e do tamanho efetivo, antes, durante e depois do gargalo genético. O modelo mutacional e a taxa de mutação dos locos estudados são importantes para fazer a simulação do equilíbrio mutação - deriva genética (CORNUET; LUIKART, 1996). A detecção do gargalo genético ocorre quando é verificado uma redução mais acentuada do número de alelos do que da heterozigosidade (H_E), então, o valor de H_E é superior à heterozigosidade esperada sob equilíbrio mutação - deriva genética (H_{eq}), que é calculada a partir do número de alelos e do tamanho amostral (CORNUET; LUIKART 1996, PIRY et al., 1999).

Existem três opções de modelos mutacionais neste software, IAM, SMM e TPM. Os modelos SMM e TPM (12 de variação e 95% SMM) foram escolhidos utilizando o teste do sinal e o teste Wilcoxon (*two tails*) para verificar a ocorrência de redução recente no tamanho populacional. O primeiro teste faz as estimativas

baseadas na proporção dos locos que apresentam desvios em relação as heterozigosidades obtidas com as simulações de equilíbrio deriva-mutação, não levando em consideração a magnitude desses desvios; o segundo teste contrasta a hipótese nula de equilíbrio contra as hipóteses alternativas de excesso e deficiência de heterozigosidade, sendo considerado mais poderoso e robusto, quando comparado aos demais testes, além de ser mais adequado para estudos com menos de 20 locos polimórficos (PIRY et al., 1999).

O tamanho efetivo populacional (N_E) foi estimado para as amostras de cada uma das quatro populações, utilizando-se o método baseado em desequilíbrio de ligação (WAPLES, 2006) e implementado no Software LDNE, v. 1.3.1. (WAPLES; DO, 2008). O desequilíbrio de ligação entre alelos de dois locos é definido como sendo a diferença entre as frequências observadas dos gametas com os alelos dos dois locos e a frequência esperada de cada tipo de gameta obtida pela associação randômica dos alelos de acordo com suas frequências na população. Um coeficiente de correlação de Burrow pode ser obtido entre estas frequências observadas e esperadas (r^2).

A média dos quadrados dos valores de correlação das frequências alélicas entre os locos é inversamente proporcional ao N_E e S (tamanho amostral), então o tamanho efetivo populacional pode ser calculado como:

$$\hat{N}_E = \frac{2}{3(\hat{r}^2 - \frac{1}{S})}$$

Foi utilizado o valor crítico de 0,05 como critério para a exclusão de alelos raros.

3.9 Microssatélites cloroplastidiais

Para amplificar os segmentos do genoma do cloroplasto, foram realizados testes com os dez marcadores microssatélites cloroplastidiais universais desenvolvidos por Weising e Gardner (Tabela 2). Na extremidade 5' do iniciador *forward* de cada loco foi adicionada uma cauda M13 (CACGACGTTGTAAACGAC), complementar à sondas contendo fluorescências IRDye700 e IRDye800.

Tabela 2 - *Primers* cpSSR de angiospermas dicotiledôneas, número de bases, temperatura de anelamento (T) e amplitude alélica

Locos	Seq. dos <i>primers</i> (5'-3')	Nº bases	T	Ampl. alélica (pb)
ccmp1 [F]	caggtaaacttctcaacgga	20	56	122-143
ccmp1 [R]	ccgaagtcaaaagagcgatt	20		
ccmp2 [F]	gatcccgacgtaatcctg	19	-	166-234
ccmp2 [R]	atcgtaaccgagggttcgaat	20		
ccmp3 [F]	cagaccaaaaagctgacatag	20	56	89-119
ccmp3 [R]	gtttcattcggctcctttat	20		
ccmp4 [F]	aatgctgaatcgaygacctta	20	56	115-220
ccmp4 [R]	ccaaaatattbggaggactct	21		
ccmp5 [F]	tgtccaatatcttctgtcattt	24	56	77-145
ccmp5 [R]	aggtccatcggaacaattat	21		
ccmp6 [F]	cgatgcatatgtagaaagcc	20	56	93-111
ccmp6 [R]	cattacgtgcgactatctcc	20		
ccmp7 [F]	caacatataccactgtcaag	20	-	129-151
ccmp7 [R]	acatcattattgtatactcttc	23		
ccmp8 [F]	ttggctactctaaccctccc	20	48	65-77
ccmp8 [R]	ttctttctatttcgcagdga	22		
ccmp9 [F]	ggattgtacatataggaca	20	-	96-104
ccmp9 [R]	ctcaactctaagaaatacttg	21		
ccmp10 [F]	tttttttagtgaacgtgtca	22	56	91-300
ccmp10 [R]	ttcgtcgcgtagtaaatag	20		

3.9.1 Caracterização e genotipagem dos cpSSR

Para os testes de polimorfismo, a PCR foi realizada com volume final de 10 µL: 2 µL de DNA (1 ng/ µL); 1 µL de Tampão (10X); 0,8 µL de MgCl₂ (25mM); 0,8 µL de dNTP (2,5 mM); 0,67 µL de *primer forward* (2,5 µM); 0,8 µL de *primer reverse* (2,5µM); 0,75 µL de M13 (10mM); 0.2 µL de *Taq* polimerase 5 U (*Invitrogen*) e 3,655 µL de H₂O). As condições para a reação de PCR foram: 94°C por 4 minutos, 30 ciclos: 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; dez ciclos: 94° por 40 segundos; 53° por 40 segundos; 72° por 40 segundos; finalmente 72°C por 10 minutos. Para

testar o produto dessas reações de PCR, foi verificado em gel de agarose 2%, corado em Syber, com corrida eletroforética a 120V por aproximadamente 1 hora.

As amplificações foram realizadas com os *primers forward* de cada loco marcado com uma cauda M13(-21) complementar a uma sonda marcada com as fluorescências IRDye 700 e IRDYE 800.

Após a amplificação de cada loco, o tamanho dos seus alelos foi determinado em um sequenciador automático LICOR DNA Analyser 4300s (LICOR Corporate), utilizando-se IRDye ® como marcador de peso molecular para verificar o tamanho esperado dos produtos da PCR. A genotipagem dos indivíduos foi realizada através da análise dos géis virtuais.

3.9.3 Análise estatística dos marcadores cpSSR

Como os polimorfismos encontrados a partir dos marcadores cpSSR não sofrem recombinação, cada uma das combinações de alelos dos locos analisados foram definidas como um haplótipo. As estimativas do número e frequência de haplótipos, AMOVA, índices de diversidade, estimador do F_{ST} de Wright (1978) e F_{ST} par a par, foram feitas utilizando o programa ARLEQUIN 3.1 (EXCOFFIER et al., 2006).

A construção das redes de haplótipos, para obtenção das relações entre os haplótipos nas populações amostradas, foi realizada pelo programa NETWORK v. 4.5.1.0 (Fluxus Technology Ltd), utilizando uma matriz de distâncias euclidianas entre as sequências para obter uma árvore de haplótipos com menor distância total.

O software GenAIEx 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foi utilizado para exportar os dados para o POPGENE (YEH et al., 1997). O programa Fingerprint Analysis with Missing Data - FAMD (SCHLÜTER; HARRIS, 2006) foi utilizado para calcular o índice de Shannon (BOWMAN et al. 1971) e as estimativas do desvio padrão foram obtidas através de 10.000 bootstraps.

As análises de diversidade genética intrapopulacional foram calculados através do programa POPGENE (YEH et al., 1997) e a significância das estatísticas foi determinada por reamostragens de 1000 permutações. Foi realizado um teste de desequilíbrio de ligação, com base na medida composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (WEIR, 1979), considerando-se que o genoma do cloroplasto no caso de *P. gonoacantha* é herdado somente pela mãe. Foram estimados: o número de alelos

observados (n_a); o número efetivo de alelos (n_e) (KIMURA; CROW 1964); a porcentagem de locos polimórficos; índice de diversidade de Nei (h) (NEI, 1978); a heteroziosidade total (H_t); a heterozigosidade média dentro da população (H_s); a diversidade entre as populações ($D_{ST} = H_T - H_s$); o coeficiente de diferenciação populacional (G_{ST}) e a heterozigosidade esperada (H_E).

Os dendrogramas foram construídos com o software Darwin (PERRIER et al., 2003) utilizando os métodos Neighbor-Joining (NJ) e UPGMA. A confiabilidade dos nós foi avaliada por *bootstrap* (1000 replicações) utilizando o mesmo software.

Utilizando o programa STRUCTURE 3.3 (PRITCHARD et al., 2000), foram testadas 10 possibilidades de agrupamento, de um até 10 clusters (K), com 20 corridas para cada valor de K , admitindo um modelo com mistura, frequências alélicas correlacionadas, 500.000 *burnins* e 10^6 simulações de Monte Carlo de cadeias de Markov (MCMC). A seleção do número K mais provável foi realizada através dos valores de ΔK , de acordo com o método proposto por EVANNO et al. (2005). O programa CLUMPP (JAKOBSSON; ROSENBERG 2007) foi utilizado para recolher todos os dados gerados nas 20 repetições em uma matriz (Q-matriz) de adesão dos coeficientes individuais e de cada uma das quatro populações pré-definidas (CAE, COS, MSG e IRA). Para a representação gráfica dos clusters da estrutura populacional das amostras do estudo foi utilizado o programa DISTRUCT (ROSENBERG, 2003).

3.10 Marcadores AFLP

Para o desenvolvimento da técnica AFLP foi utilizado o protocolo de Vos et al. (1995), com algumas modificações.

Aproximadamente 300 ng do DNA obtido foram duplamente digeridos com quatro unidades das enzimas *EcoRI* (Invitrogen) e *MseI* (Nebiolabs) em tampão 10X One-Phor-All buffer PLUS (OPA -Amersham GE) contendo 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM β -Mercaptoethanol (β -ME) e 100 μ g de *bovine serum albumin* (BSA), por 3 horas a 37°C e 15 minutos a 70°C. O produto obtido foi visualizado em gel de agarose 0,8% corado com SYBR® Safe (*Invitrogen*).

Adaptadores específicos (oligonucleotídeos) foram ligados aos fragmentos digeridos pelas enzimas *EcoRI* e *MseI* em solução contendo enzima de ligação para obter o molde de amplificação. Imediatamente antes do uso, as sequências de

oligonuclotídeos *EcoRI* 5'-CTCGTAGACTGCGTACC e 5'-AATTGGTACGCAGTC e *MseI* 5'-GACGATGAGTCCTGAG e 5'-TACTCAGGACTCAT, diluídas nas concentrações de 5pMol/μL e 50pMol/μL, respectivamente, foram aquecidas a 94°C por 2 minutos. Em seguida, foram misturadas em reação contendo 0,5X Tampão da enzima T4 (10mM TrisHCl pH 7.5, 50mM KCl, 1mM DTT e 50% v/v glicerol), 0,25 mM de ATP, 50pMol/μL de adaptadores *MseI*, 5pMol/μL de adaptadores *EcoRI* e 1U da enzima T4 DNA Ligase (*Invitrogen*). A ligação foi realizada em temperatura de 37°C por 2 horas e 16°C por 16 horas.

O produto obtido foi amplificado em termociclador MJ96+, marca Biocycler, programado para realizar 29 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. A reação de volume total de 15μL continha 2μL do produto de digestão e ligação diluído 6X, 1X tampão de PCR (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl, pH 8,9), 2,5 mM de cada dNTP, 2,0mM de MgCl₂, 3,33μM do iniciador *EcoRI*+0 (5'-AGACTGCGTACCAATTC), 3,33 μM do iniciador *MseI*+0 (5'-GATGAGTCCTGAGTAA) e 1 unidade da enzima *Taq* DNA Polimerase (*Fermentas*).

Para a amplificação seletiva foram sintetizados primers *EcoRI* (5'-AGACTGCGTACCAATTC) e *MseI* (5'-GATGAGTCCTGAGTAA), com adição de três nucleotídeos específicos na extremidade 3'.

Os primers *EcoRI* foram modificados com fluoróforos, de modo a ser possível a realização de leitura no 4300s DNA Analyser da LICOR (*LICOR Corporate*). A reação foi realizada em volume total de 10μL contendo 2 μL do produto da pré-amplificação diluído 10X, 1X tampão de PCR, 2,5 mM de cada dNTP, 2,0mM de MgCl₂, 0,05μM do iniciador *EcoRI*+3 modificado com IRDye700 ou IRDye 800, 0,25μM do iniciador *MseI*+3 e duas unidades de *Taq* DNA Polimerase. O termociclador foi programado para realizar 1 ciclo de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 12 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C (decréscimo de -0,7°C/ciclo) por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidos por 23 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto.

Na etapa de amplificação seletiva, dois primers trinucleotídeos da *EcoRI* foram marcados com o fluoróforo IRDye700, os quais foram combinados com 7 primers da *MseI*. Um conjunto de 14 combinações de primers foi testado para a otimização das condições de reação utilizando 2 genótipos de cada população para determinar as combinações que apresentam os melhores padrões das bandas (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequências das 14 combinações de primers da *EcoRI* e *MseI*

	<i>ECORI</i>	<i>MSEI</i>
1	ACA	CAC
2	ACA	CTG
3	ACA	CAA
4	ACA	CTC
5	ACA	CAG
6	ACA	CTT
7	ACA	CTA
8	ACC	CAC
9	ACC	CTG
10	ACC	CAA
11	ACC	CTC
12	ACC	CAG
13	ACC	CTT
14	ACC	CTA

3.10.1 Caracterização e genotipagem dos marcadores AFLP

Os produtos de amplificação foram separados pelo LICOR DNA Analyzer 4300s com géis de poliacrilamida 6,5% e pente com espaço para 64 amostras em sistema de eletroforese contendo tampão TBE 1X. Amostras de duas combinações AFLP representadas pelos dois tipos de IRDyes (700 e 800) foram preparadas em uma solução contendo 1,0 µL de cada produto de PCR, 3,0 µL de Blue Stop Solution (LICOR Corporate), 7µL de água ultra pura e dois marcadores de peso molecular conhecido (50-700 bp IRDye700 e IRDye800, LICOR Corporate). Imediatamente antes do uso, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 minutos em banho-seco sendo aplicadas cerca de 1,0uL de cada amostra no gel.

Por meio dos programas *SAGA Lite* e *SAGA MX Generation*, ambos da LICOR Corporate, os alelos dos marcadores AFLP foram genotipados para a realização de análises. De acordo com o equipamento, a leitura de bandas ocorreu após os sinais emitidos pela incidência do raio laser sobre os diferentes IRDyes presentes nos *primers* serem captados e convertidos em sinais na forma de eletroferograma e na imagem do próprio gel.

3.10.2 Análise estatística dos marcadores AFLP

A genotipagem foi feita como marcador dominante, a partir da construção de uma matriz binária, na qual a presença da banda é representada por (1) enquanto a ausência é marcada com (0).

Para a obtenção dos dados do número efetivo de alelos (HARTL; CLARK 1989) e proporção de locos polimórficos foi utilizado o programa POPGENE v. 1.32 (YEH et al., 1999), utilizando-se parâmetros para dados diplóides dominantes. A heterozigosidade esperada ou diversidade gênica de Nei foi calculada pelo programa AFLP-SURV (VEKEMANS, 2002), que utiliza a metodologia Bayesiana com uma distribuição não-uniforme que utiliza o valor de F_{IS} obtido através dos marcadores SSR para calcular as frequências alélicas.

O índice de Shannon (BOWMAN et al. 1971) foi calculado através do software FAMD (SCHLÜTER; HARRIS, 2006) e as estimativas do desvio padrão foram obtidas através de 10.000 *bootstraps*.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) baseada nas distâncias quadráticas, através do software ARLEQUIN v. 3.1 (EXCOFFIER et al., 2006) permitiu-se entender como a variação genética de *P. gonoacantha* está particionada dentro e entre as áreas deste estudo. Como a AMOVA necessita da definição a priori dos níveis hierárquicos (grupos), realizou uma AMOVA considerando os quatro grupos representativos de cada uma das populações.

O dendrograma representando a similaridade genética entre cada par de genótipos, foi calculado por meio do coeficiente de Jaccard utilizando-se o programa Darwin versão 5.0 (PERRIER et al., 2003) pelo método de agrupamento Neighbor-Joining.

A estrutura genética da população foi avaliada também pelo programa STRUCTURE versão 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003) a fim de definir o número de grupos (K) mais provável nas amostras, através de métodos bayesianos, não necessitando de informações hierárquicas a priori para fazer um teste de atribuição dos genótipos. O programa foi configurado para organismos haplóides, admitindo mistura de genomas, frequências correlacionadas, número de grupos (K) variando de 1 a 10, 500.000 *burn-in* e 10^6 interações, repetidos 20 vezes. Para determinar qual o K mais provável em relação aos 10 testados, foi utilizada a estatística descrita por Evanno et al. (2005), baseada na taxa de mudança na probabilidade das repetições dos dados entre os sucessivos valores de K. O valor de K que melhor representa a estruturação das populações pode ser identificado pelo pico no valor de ΔK .

Como cada corrida independente do software STRUCTURE gera efeitos estocásticos, é particularmente importante simplificar a avaliação de dados replicados

através do cálculo de medianas. O programa CLUMPP (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) foi utilizado para recolher todos os dados gerados nas 20 repetições em uma matriz (Q-matriz) de adesão dos coeficientes individuais e de cada das quatro populações pré-definidas (CAE, COS, MSG e IRA). Para a representação gráfica dos clusters da estrutura populacional das amostras do estudo foi utilizado o programa DISTRUCT (ROSENBERG, 2003).

A identificação de locos outliers dentro do contexto da genética da conservação separa os locos de efeito específico (sob seleção) dos locos neutros e assim permite realizar análises populacionais para estimar os parâmetros considerando os diferentes cenários evolutivos (DAVEY et al., 2011).

A interpretação dos agrupamentos quando os locos *outliers* estão presentes tem papel importante na genômica da conservação: As “Unidades com Significado Evolutivo” (do inglês “*Evolutionary Significant Units* – ESUs”) são identificadas por métodos de agrupamento quando todos os locos são utilizados; as Unidades de Manejo (“*Management Units* – MUs”) são consideradas quando apenas os locos neutros são analisados; já a diferenciação adaptativa é observada quando apenas os locos outliers são analisados (FUNK et al., 2012).

A busca de locos *outliers*, ou seja, locos que possuem valores da razão F_{ST}/H_E maiores (seleção direcional ou disruptiva) e menores (seleção balanceadora) que a média sobre neutralidade foi feita utilizando o software MCHEZA (ANTAO; BEAUMON, 2011). As análises foram feitas para o conjunto das quatro populações e para populações pareadas.

Primeiro os locos *outliers* foram identificados em relação ao F_{ST} médio das quatro populações, com a finalidade de identificar os padrões genéticos adaptativos em um contexto mais geral. Depois, as populações foram analisadas par a par, identificando os locos *outliers* associados aos processos adaptativos mais específicos. Desta maneira foi possível reconhecer os locos AFLP que podem estar sofrendo seleção, tanto balanceadora, quanto direcional ou disruptiva.

É importante salientar que outros processos além da adaptação local também podem levar a locos *outliers*, como seleção contra alelos deletérios, zonas híbridas crípticas e efeitos estocásticos em populações em processo de expansão. No entanto, os *outliers* com base no método F_{ST} são os únicos locos candidatos para adaptação local, e precisa-se de estudos aprofundados para determinar quais locos são verdadeiramente envolvidos na adaptação local (SAVOLAINEN et al.; 2013).

Quando existe evidência de adaptação local nas plantas, a base genética dessa adaptação local geralmente é pouco compreendida, especialmente quando são caracteres quantitativos de herança poligênica, no entanto, alguns processos adaptativos com mecanismos simples de herança podem ser caracterizados (SAVOLAINEN et al.; 2013).

4 RESULTADOS

4.1 Extração e quantificação do DNA

Para extração do DNA foi utilizado o protocolo de CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990). No entanto, o material vegetal de algumas plantas estava mais oxidado, e o DNA ficou degradado.

Nessas plantas foi utilizado o protocolo ácido desenvolvido por Csaikl et al. (1998) no qual foi incluído bissulfeto de sódio para evitar a oxidação da folhas do pau jacaré. Esse protocolo melhorou a qualidade das extrações de DNA desses indivíduos. Todas as amostras foram quantificadas e diluídas em água ultrapura para a concentração de 1ng/μL.

4.2 Microssatélites

A partir da biblioteca genômica construída foram obtidas sequencias de boa qualidade a partir de 84 colônias, sendo que, em 37 delas não foram encontrados microssatélites, o que representa um índice de enriquecimento das colônias de 55,95%. No total foram identificados 54 microssatélites, sendo todos dinucleotídeos.

A partir da biblioteca genômica gerada, sintetizou-se 28 pares de oligonucleotídeos que flanqueam os motivos SSR. Os marcadores SSR sintetizados apresentam porcentagem média de GC igual a 49,8%, amplificando produtos com tamanho médio de 224,78 pb, em temperatura de anelamento média de 59,18°C, desenhados a partir de sequências com tamanho médio de 788,46 nucleotídeos. Dos 28 SSR sintetizados, 23 (82,14%) são classificados como simples e apenas cinco (17,86%) são compostos.

Quinze marcadores SSR sintetizados apresentaram amplificação específica e três foram monomórficos nos genótipos utilizados no estudo. Doze marcadores SSR polimórficos (Tabela 4) foram utilizados para a caracterização genética das quatro áreas do estudo.

Tabela 4 - Marcadores SSR sintetizados, com os respectivos motivos, amplitude alélica (SR), porcentagem de CG e classificação do motivo

Locos	Sequência	Motivo	SR	Produto	%CG	Classificação
Pgo01	F: CACCGAGGAGGTTTCATCTCTG R: ACCCCCAAATAAGGAGGAAG	(TA) ₈	224-240	208	52,5	Simple
Pgo02	F: CTGGATCGAAACAAATGGAAG R: TGGTTGATCTTTCCAAGATGG	(GT) ₈	106-140	118	40,5	Simple
Pgo03	F: CTTGTGTCCCCTGCTATCTG R: TGAAAAGACTGCATGGTGC	(TC) ₁₃	238-266	241	54,05	Simple
Pgo04	F: CGGAGGATGAGGATCGACG R: GAACCACACAAGACGTTAGG	(GT) ₅	206-238	195	54,55	Simple
Pgo05	F: CTCCCCTTCAACAACCTCATT R: GGTCTTCGTGACATGGTC	(AC) ₉	252-318	273	59,4	Simple
Pgo06	F: CTCTTAACCCACCTCCATTT R: CGGCATTAACCTAACATCA	(GT) ₁₃	236-290	227	50,4	Simple
Pgo07	F: CTGCTGGTGCAGAAGAAGAGA R: CCAACAACAAGCAAGAGCTG	(GT) ₉ (GA) ₆	178-196	162	56,6	Composto
Pgo08	F: CAGGGGAAGGATGAAGATACA R: GCTACGAAATGAACAAGCAG	(AT) ₇ (CG) ₅	224-266	230	52,65	Composto
Pgo09	F: CGCAGCATCAACAAGAAAACA R: GGATTTTGAGTTTCCACAGG	(GT) ₈ (TC) ₈	245-293	255	53	Composto
Pgo10	F: CGGTTACACACTCCACAGGA R: AACCTGCCATAAGCGTGAGT	(AC) ₈	236-286	245	52,5	Simple
Pgo11	F: CGACCGATCAACAGGGATTGA R: AACAAATAAGGCCATCCGTTT	(GT) ₁₁	180-238	197	47,5	Simple
Pgo12	F: CCCAATCCCGTTGTTGTCTTT R: CGGGAACAGTAATTCCTCA	(TC) ₁₀	209-237	215	45	Simple

Os marcadores SSR sintetizados para o presente estudo foram inicialmente testados em diferentes temperaturas de anelamento e diferentes concentrações de DNA, utilizando seis genótipos representantes das quatro populações, para obter a melhor condição de amplificação dos fragmentos desejados. Os ciclos de amplificação foram feitos no termociclador BIO-RAD (MyCycler) e foram realizadas num volume total de 10µL contendo: 2,5 µL de DNA a 1 ng; 0,2 µL de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (75 mM Tris-HCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄ pH 8,8; 0,01% (v/v) Tween 20) (*Fermentas*); 2,0 µL de MgCl₂ (25mM da *Fermentas*); 0,5 µL de BSA (2,5 mM); 1,6 µL de *Taq* DNA polimerase 5 U (*Fermentas*); 1,0 µL de dNTP (2,5 mM); 0,35 µL de cada iniciador (*Forward* + *Reverse* a 10 mM); 0,2 µL (10 mM) de cauda marcada com o fluoróforo IRDye 700 ou IRDye 800 (LICOR Biosciences) e água ultrapura autoclavada até completar o volume.

Os locos foram amplificados através da programação *touchdown*, nas seguintes condições: um ciclo inicial a 94°C por 5 min; seguido de 10 ciclos *touchdown* a 94°C por 40s para desnaturação, temperatura de anelamento de 50° por 40s (-1°C por ciclo), 72°C por 1 min para extensão dos fragmentos pela *Taq* polimerase; seguido de 30 ciclos a 94°C por 40s, 40°C por 40s, 72°C por 1min; um ciclo de extensão final

de 72°C por 10 min. A Figura 17 apresenta um teste feito com as condições descritas para 16 marcadores SSR, dos quais 9 amplificaram nos seis genótipos.

Dentre os 12 SSR que foram polimórficos, destacam-se Pgo07, Pgo08 e Pgo09 que apresentaram motivos compostos. Pgo02 foi polimórfico apenas em MSG. Pgo04 foi monomórfico em CAE. Pgo05 e Pgo05 foram monomórficos em IRA. Pgo05 foi o marcador que apresentou o maior número total de alelos (22) e a maior amplitude alélica.

A distribuição das frequências alélicas para os 12 locos SSR comparando os genótipos amostrados nas 4 populações de *P. gonoacantha* analisadas nesta pesquisa encontra-se na Figura 15.

As oscilações nas frequências alélicas, perdas e fixação de alelos, podem surgir devido à ação da deriva genética ou da seleção. No caso de marcadores moleculares neutros como SSR, essas oscilações se desenvolvem através de processos aleatórios. Dessa maneira, a análise das frequências alélicas é de grande importância, pois pode refletir melhor os efeitos aleatórios do que a maioria dos parâmetros utilizados no estudo de genética de populações, uma vez que tais parâmetros não refletem diretamente frequências alélicas eventualmente muito baixas (OLIVEIRA et al., 2002)

As análises realizadas com os 12 locos SSR nas quatro populações de *P. gonoacantha* indicaram um polimorfismo moderado, foi observado um total de 126 alelos.

Foram encontrados 84 alelos (66,67%) com frequência inferior a 5 %, sendo considerados alelos raros. A riqueza alélica média foi de 7,745.

Figura 15 - Histograma das frequências alélicas dos 12 locos de SSR, estimados para cada uma das quatro populações utilizadas no estudo. O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X indica o tamanho do alelo (continuação)

Figura 18 - Histograma das frequências alélicas dos 12 locos de SSR, estimados para cada uma das quatro populações utilizadas no estudo. O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X indica o tamanho do alelo (conclusão)

De acordo com a Tabela 5, os indivíduos coletados em MSG apresentam a maior média do número de alelos (6,75), seguidos de CAE (5,5), COS (5,25) e finalmente IRA (4,25). Não foi observada diferença significativa entre as médias do número de alelos de CAE em relação a COS. O valor médio de alelos por loco, considerando cada população foi de 5,43.

Tabela 5 - Número de alelos por loco e por população

Locos	CAE	MSG	COS	IRA	Média
Pgo01	6	8	5	4	5,75
Pgo02	1	5	1	1	2,00
Pgo03	4	8	4	7	5,75
Pgo04	1	3	3	4	2,75
Pgo05	15	15	8	4	10,5
Pgo06	7	7	9	5	7,00
Pgo07	6	3	3	7	4,75
Pgo08	6	6	8	4	6,00
Pgo09	4	6	4	5	4,75
Pgo10	6	7	11	6	7,50
Pgo11	7	8	5	3	5,75
Pgo12	3	5	2	1	2,75
Média	5,50	6,75	5,25	4,25	5,43

A Tabela 6 mostra a riqueza alélica das populações, que leva em conta o tamanho amostral de cada uma delas, o mesmo ranqueamento observado em relação ao número de alelos fica ainda mais evidenciado. MSG apresentou a maior riqueza alélica média (6,485), pois sua riqueza alélica é superior na maioria dos locos (Pgo01=8; Pgo02=4,317; Pgo03=7,508; Pgo05=14,707; Pgo09=5,961; Pgo11=7,543; Pgo12=5). CAE apresentou a segunda maior riqueza alélica média (5,114), principalmente devido aos locos Pgo01 (5,982), Pgo05 (10,5), Pgo07 (5,74), Pgo08 (6,088), Pgo11 (5,632) e Pgo 12 (2,453). A riqueza alélica média em COS foi de 4,842, as amostras dessa população tiveram a maior riqueza alélica nos locos Pgo06 (8,613), Pgo08 (6,088), Pgo10 (10,263). A menor riqueza alélica média foi encontrada em IRA (3,851), apesar dos genótipos dessa população apresentarem a maior riqueza alélica nos locos Pgo04 (3,966) e Pgo07 (6,778).

Tabela 6 - Riqueza alélica (R) por loco e por população

Locos	CAE	MSG	COS	IRA	Média
Pgo01	5,98	8,00	5,00	3,35	6,72
Pgo02	1,00	4,31	1,00	1,00	2,98
Pgo03	3,99	7,51	3,94	6,13	8,58
Pgo04	1,00	3,00	2,99	3,96	4,29
Pgo05	13,68	14,70	7,59	3,96	15,39
Pgo06	6,51	6,78	8,61	4,45	8,59
Pgo07	5,74	2,99	2,94	6,39	6,51
Pgo08	5,99	5,11	6,09	4,00	10,33
Pgo09	3,64	5,96	3,44	4,07	5,47
Pgo10	5,73	6,9	10,26	5,49	13,23
Pgo11	5,63	7,54	4,225	2,38	6,84
Pgo12	2,45	5,00	2,00	1,00	3,97
Média	5,11	6,48	4,84	3,85	7,74

A riqueza média de alelos privados (Tabela 7) foi significativamente maior em MSG (0,6).

Tabela 7 - Riqueza de alelos privados por loco e por população. Entre parênteses é apresentado o desvio padrão nos valores médios por população

Locos	CAE	MSG	COS	IRA
Pgo01	0,26	0,55	0,92	0,05
Pgo02	0,00	0,44	0,00	0,00
Pgo03	0,36	0,90	0,89	0,76
Pgo04	0,00	0,25	0,26	0,23
Pgo05	1,51	1,04	0,64	0,32
Pgo06	0,53	0,40	0,43	1,28
Pgo07	0,74	0,18	0,28	0,45
Pgo08	0,76	1,21	0,50	1,26
Pgo09	0,06	0,78	0,07	0,11
Pgo10	1,06	0,54	0,51	1,67
Pgo11	0,12	0,39	0,17	0,03
Pgo12	0,03	0,48	0,10	0,00
Média	0,45 (0,04)	0,60 (0,07)	0,40 (0,07)	0,51 (0,06)

Os marcadores SSR desenvolvidos para o presente estudo apresentam, em média, diversidade gênica intermediária. O loco Pgo02 apresentou a menor diversidade (0,11) enquanto o loco Pgo10 foi o mais polimórfico, com um valor de H_e igual a 0,76 (Tabela 8).

A população MSG apresentou maior diversidade gênica H_E (0,49), seguida de CAE (0,40). As áreas reflorestadas COS e IRA tiveram estimativas de diversidade gênica muito semelhantes (0,35 e 0,34 respectivamente).

Tabela 8 - Heterozigozidade esperada por loco e por população. Em parênteses está indicado o intervalo de confiança a 95% das médias populacionais

Locos	CAE	MSG	COS	IRA	Média
Pgo01	0,44	0,75	0,67	0,08	0,60
Pgo02	0,00	0,39	0,00	0,00	0,11
Pgo03	0,45	0,76	0,49	0,72	0,77
Pgo04	0,00	0,25	0,27	0,25	0,20
Pgo05	0,83	0,85	0,66	0,33	0,76
Pgo06	0,57	0,44	0,61	0,57	0,73
Pgo07	0,77	0,30	0,52	0,65	0,64
Pgo08	0,75	0,22	0,19	0,70	0,80
Pgo09	0,08	0,58	0,08	0,11	0,24
Pgo10	0,71	0,51	0,49	0,67	0,80
Pgo11	0,12	0,36	0,17	0,03	0,17
Pgo12	0,03	0,42	0,11	0,00	0,12
Média	0,40 (0,37 a 0,41)	0,49 (0,45 a 0,50)	0,35 (0,32 a 0,37)	0,34 (0,31 a 0,36)	0,49

A frequência de heterozigotos vou superior nos remanescentes florestais, sobretudo em MSG ($H_o=0,37$), mas também em CAE ($H_o=0,28$) e nas áreas em processo de restauração não foi observado diferença estatisticamente significativa entre elas (sobreposição do intervalo de confiança a 95%), como pode ser observado na tabela 9.

A heterozigosidade média esperada em Equilíbrio de Hardy Weiberg H_E (0,494) (Tabela 8) foi muito maior do que a heterozigosidade observada H_o (0,251) (Tabela 9), em todas as populações, indicando taxa relativamente alta de endogamia nas 4 populações estudadas, confirmadas através do alto valor médio de F_{IS} (0,342). A população de IRA apresentou o maior F_{IS} (0,478), seguida da população de COS (0,388), CAE (0,301) e finalmente MSG (0,233) (Tabela 10).

Tabela 9 - Heterozigotidade observada por loco e por população. Em parênteses está indicado o intervalo de confiança a 95% das médias populacionais

Locos	CAE	MSG	COS	IRA	Média
Pgo01	0,39	0,50	0,33	0,08	0,30
Pgo02	0,00	0,43	0,00	0,00	0,10
Pgo03	0,42	0,77	0,33	0,56	0,52
Pgo04	0,00	0,28	0,28	0,20	0,19
Pgo05	0,36	0,42	0,25	0,15	0,28
Pgo06	0,42	0,31	0,28	0,46	0,37
Pgo07	0,62	0,29	0,52	0,31	0,43
Pgo08	0,37	0,23	0,04	0,26	0,21
Pgo09	0,08	0,19	0,03	0,02	0,07
Pgo10	0,56	0,32	0,35	0,07	0,31
Pgo11	0,07	0,39	0,11	0,03	0,14
Pgo12	0,03	0,36	0,09	0,00	0,09
Média	0,28 (0,25 a 0,30)	0,37 (0,34 a 0,41)	0,22 (0,19 a 0,24)	0,18 (0,16 a 0,20)	0,25

Tabela 10 - Coeficiente de endogamia (F_{IS}) por loco e por população

Locos	CAE	MSG	COS	IRA
Pgo01	0,12	0,33	0,51	-0,03
Pgo02	NA	-0,10	NA	NA
Pgo03	0,07	-0,01	0,33	0,22
Pgo04	NA	-0,12	-0,06	0,20
Pgo05	0,57	0,51	0,62	0,55
Pgo06	0,26	0,29	0,55	0,19
Pgo07	0,20	0,04	-0,01	0,53
Pgo08	0,51	-0,03	0,81	0,63
Pgo09	-0,02	0,68	0,56	0,81
Pgo10	0,21	0,38	0,30	0,89
Pgo11	0,38	-0,07	0,34	-0,01
Pgo12	-0,01	0,14	0,16	NA
Média	0,30	0,23	0,39	0,48

O valor da estimativa do F_{ST} (0,283) e R_{ST} (0,194) indicam que existem fortes indícios de estruturação na amostra total.

A Tabela 11 mostra que as estimativas das estatísticas F de Wright e do R_{ST} obtidas foram significativamente diferente de zero.

Tabela 11 - Estimativa das estatísticas F de Wright, de R_{ST} nas quatro populações de *P. gonoacantha*. Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade

	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}	R_{ST}
Estimativa	0,528	0,342	0,283	0,194
Limite inferior (IC 95%)	0,409	0,229	0,203	0,279
Limite superior (IC 95%)	0,624	0,442	0,363	0,455

CAE apresenta os menores valores de F_{ST} par a par em relação às demais populações, enquanto em IRA podemos observar os maiores valores de F_{ST} par a par (Tabela 12). Em função do alto valor de F_{ST} detectado no estudo e da grande distância geográfica, provavelmente não existe fluxo gênico significativo entre as populações.

Tabela 12 - Matriz de F_{ST} par a par entre as quatro populações analisadas

	CAE	MSG	COS
MSG	0,2218		
COS	0,2414	0,2528	
IRA	0,2533	0,3167	0,3504

No teste exato de Fisher para aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg apresentado na Tabela 13, os únicos locos em que, em média, aderem as frequências alélicas esperadas em Equilíbrio de Hardy-Weinberg são Pgo02 e Pgo04. Os outros locos estão com frequências compatíveis com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg somente em algumas populações, por exemplo: CAE (Pgo03, Pgo06, Pgo09 e Pgo12); COS (Pgo07 e Pgo12); MSG (Pgo07, Pgo08 e Pgo11) e IRA (Pgo01, Pgo06 e Pgo11). Esse resultado era esperado uma vez que o Equilíbrio de Hardy-Weinberg só é atingido em populações panmíticas e foi detectado um coeficiente de endogamia (F_{IS}) significativo em *P. gonoacantha*.

Tabela 13 - P-valor do Teste Exato de Fisher para aderência ao EHW por loco e por população. $\alpha = 0.001$ (correção de Bonferroni). Marcados com asterisco estão os locos que aderem às proporções esperadas. NA indica que os respectivos locos são monomórficos

	CAE	MSG	COS	IRA	Média
Pgo01	0,001	0,000	0,000	1,000*	0,000
Pgo02	NA	0,699*	NA	NA	0,699*
Pgo03	0,065*	0,000	0,000	0,000	0,000
Pgo04	NA	1,000*	1,000*	0,092*	0,573*
Pgo05	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Pgo06	0,056*	0,000	0,000	0,004*	0,000
Pgo07	0,000	0,782*	0,621*	0,000	0,000
Pgo08	0,000	0,120*	0,000	0,000	0,000
Pgo09	1,000*	0,000	0,000	0,000	0,000
Pgo10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Pgo11	0,000	0,397*	0,000	1,000*	0,000
Pgo12	1,000*	0,000	0,235*	NA	0,001
Média	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Segundo Mota (2003), o teste aplicado é bastante conservador, em decorrência da correção de Bonferroni para testes múltiplos, que consiste em dividir o nível nominal de probabilidade do teste (5%) pelo número de testes (n° populações amostradas x n° locos). Assim, o nível nominal ajustado probabilidade assume valores muito baixos para a rejeição da hipótese de nulidade. De qualquer modo, os resultados do teste exato mostram-se mais confiáveis que testes baseados em X^2 ou razão de verossimilhança, quando a análise envolve amostras pequenas e locos multialélicos, onde é muito comum a ocorrência de classes genóticas de baixa frequência.

Não foi encontrado desequilíbrio de ligação (DL) para nenhum par dos locos analisados.

A estruturação genética das amostras detectada pela análise de atribuição bayesiana foi definida claramente de acordo com as delimitações geográficas das quatro populações (Figura 16 e Figura 17), provavelmente cada população é constituída de um *pool* gênico próprio e existe pouco fluxo gênico entre as populações analisadas.

Figura 16 - Estimativa do número de clusters (K) mais adequado para o conjunto de amostras analisado. Metodologia proposta por Evanno et al. (2005)

O cluster vermelho de CAE está significativamente representado apenas em aproximadamente 50% no genoma de 3 indivíduos coletados em COS e em duas amostras coletadas em MSG. O agrupamento verde de COS está significativamente representado apenas em aproximadamente 50% no genoma de três indivíduos coletados em CAE. O agrupamento amarelo da MSG está representado apenas em aproximadamente 50% no genoma de apenas um indivíduo da população de CAE.

Figura 17 - Teste de atribuição feito pela análise bayesiana, baseado nos 12 locos microssatélites em *P. gonoacantha*. Cada uma das 4 cores indica um cluster baseado em semelhanças genotípicas. O eixo das ordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada cluster (Q)

A análise de agrupamento (Figura 18) também mostra uma sutil semelhança entre as frequências alélicas de CAE e COS e que IRA é a população mais diferenciada das demais.

Figura 18 - Padrão de divergência genética entre 4 populações *P. gonoacantha*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base na distância genética de Nei (1978). Correlação cofenética igual a 0,84

O resultado das análises que testam recentes reduções no tamanho efetivo populacional (*bottleneck*) encontra-se na Tabela 14 e Tabela 15.

Tabela 14 - P-valor da análise de gargalo genético das populações usando o modelo SMM e TPM, através dos testes de sinal e Wilcoxon. Em asterisco estão as populações que apresentam evidências de gargalo genético recente

		CAE	MSG	COS	IRA
Sinal	SMM	0,06046	0,00002*	0,00091*	0,00181*
	TPM	0,18391	0,00002*	0,00833*	0,00197*
Wilcoxon	SMM	0,08398	0,00024*	0,00146*	0,00488*
	TPM	0,10547	0,00024*	0,00244*	0,00684*

Aplicaram-se dois testes para verificar se uma população exibe número significativo de locos com excesso ou déficit de heterozigosidade. Quando a hipótese nula é rejeitada, existem evidências de gargalo genético recente. A única população em que não foi detectada uma redução recente no tamanho efetivo populacional foi CAE, nas outras três populações os dois testes indicam gargalo genético recente.

Tabela 15 - P-valor da análise de gargalo genético por loco para as populações nos modelos SMM e TPM. Em asterisco estão os locos que apresentam excesso ou *déficit* de heterozigosidade em relação ao equilíbrio deriva-mutação. NA indica que os respectivos locos são monomórficos

Locos	SMM				TPM			
	CAE	MSG	COS	IRA	CAE	MSG	COS	IRA
Pgo01	0,004*	0,117	0,373	0	0,011*	0,183	0,439	0,000*
Pgo02	NA	0,013*	NA	NA	NA	0,025*	NA	NA
Pgo03	0,076	0,174	0,154	0,172	0,142	0,247	0,186	0,223
Pgo04	NA	0,115	0,117	0,008*	NA	0,141	0,162	0,028*
Pgo05	0,007*	0,017*	0,020*	0,029*	0,018*	0,052	0,027*	0,046*
Pgo06	0,003*	0,000*	0,002*	0,091	0,010*	0,002*	0,002*	0,149
Pgo07	0,323	0,121	0,397	0,042*	0,264	0,19	0,379	0,06
Pgo08	0,457	0,000*	0,000*	0,11	0,367	0,000*	0,000*	0,077
Pgo09	0,000*	0,047*	0,000*	0,000*	0,000*	0,071	0,000*	0,000*
Pgo10	0,296	0,000*	0,000*	0,177	0,405	0,008*	0,000*	0,262
Pgo11	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,002*	0,000*
Pgo12	0,000*	0,030*	0,351	0,000*	0,000*	0,031*	0,366	NA

Todas as quatro populações apresentaram autocorrelação espacial. Em CAE foi feita a amostragem bem mais dispersa e a autocorrelação espacial chegou até 500 metros, devido às boas condições de conservação do local e pela grande extensão coletada (Figura 19 e Figura 20).

Figura 19 - Representação da média do coeficiente de parentesco na população de CAE em função das classes de distância (indicadas pela distância máxima). Barras indicam o desvio padrão do coeficiente de parentesco. Linhas pontilhadas e tracejadas indicam os valores críticos (superior e inferior, respectivamente) de rejeição (VC95%) da hipótese nula de ausência de estruturação genética espacial

Figura 20 - Número de pares de indivíduos em cada classe de distância

Figura 21 - Representação da média do coeficiente de parentesco na população de MSG em função das classes de distância (indicadas pela distância máxima). Barras indicam o desvio padrão do coeficiente de parentesco. Linhas pontilhadas e tracejadas indicam os valores críticos (superior e inferior, respectivamente) de rejeição (VC95%) da hipótese nula de ausência de estruturação genética espacial

Figura 22 - Número de pares de indivíduos em cada classe de distância

MSG é um local que sofre constantemente com o efeito de borda (SOUZA; MARTINS, 2005), mesmo com o manejo periódico de borda (corte de Lianas), o remanescente florestal recebe frequentemente muitos regenerantes, principalmente nas clareiras, formando muitos pequenos agrupamentos de indivíduos com grande coeficiente de parentesco entre si. A autocorrelação espacial ocorreu até 50 metros (Figura 21 e Figura 22), mas também pode ser observado uma grande variação no coeficiente de parentesco ao longo das classes de distância.

Em COS foi detectado autocorrelação espacial até 75 metros (Figura 23 e Figura 24). Nesse local existem algumas árvores mais antigas (provavelmente replantadas no período da restauração) que sobreviveram e se destacaram por atingir porte maior que as demais, gerando muitos regenerantes no entorno.

Em IRA foi detectado autocorrelação espacial até 125 metros (Figura 25 e Figura 26). Nessa área os grupos de indivíduos com alto coeficiente de parentesco entre si estão mais dispersos.

A análise de estrutura intrapopulacional permitiu identificar estruturação genética espacial significativa nas quatro populações analisadas, (Tabela 16). Os valores encontrados para quantificação da estrutura genética espacial (S_p) foram superiores nas populações de CAE (0,034) e IRA (0,033) e inferiores em MSG (0,014) e COS (0,010).

Tabela 16 - Estimativas de estrutura em micro-escala das populações

Pop	β -log	$F_{\text{intra-ind}}$	F_1	F_2	S_p
CAE	-0,023	-0,002	0,320	0,134	0,034
MSG	-0,013	-0,002	0,105	0,038	0,014
COS	-0,009	-0,003	0,062	0,020	0,010
IRA	-0,030	-0,004	0,101	0,097	0,033

Nota: β -log é a inclinação da reta de regressão entre o coeficiente de parentesco e o logaritmo da distância geográfica entre os pares de indivíduos; $F_{\text{intra-ind}}$ é a média do coeficiente de parentesco entre todos os indivíduos da população; F_1 é a média do coeficiente de parentesco entre os indivíduos presentes na primeira classe de distância; F_2 é a média do coeficiente de parentesco entre todos os indivíduos presentes na segunda classe de distância e S_p é o coeficiente de intensidade da estrutura genética espacial.

O tamanho efetivo populacional (N_e) estimado foi maior em MSG (274,9), seguido por CAE (78,7), COS (57,6) e IRA (47,4).

Figura 23 - Representação da média do coeficiente de parentesco na população de COS em função das classes de distância (indicadas pela distância máxima). Barras indicam o desvio padrão do coeficiente de parentesco. Linhas pontilhadas e tracejadas indicam os valores críticos (superior e inferior, respectivamente) de rejeição (VC95%) da hipótese nula de ausência de estruturação genética espacial

Figura 24 - Número de pares de indivíduos em cada classe de distância

Figura 25 - Representação da média do coeficiente de parentesco na população de IRA em função das classes de distância (indicadas pela distância máxima). Barras indicam o desvio padrão do coeficiente de parentesco. Linhas pontilhadas e tracejadas indicam os valores críticos (superior e inferior, respectivamente) de rejeição (VC95%) da hipótese nula de ausência de estruturação genética espacial

Figura 26 - Número de pares de indivíduos em cada classe de distância

4.3 Microssatélites cloroplastidiais

Foram feitos testes para caracterizar os 10 locos cpSSR, 3 indivíduos de IRA e 2 indivíduos de CAE, no genotipador automático LICOR (4300s DNA Analyser). Como resultado do teste foi obtido a amplificação de sete dos 10 locos cpSSR.

O único loco em que foi utilizada temperatura de anelamento distinta dos demais (48°C) foi amplificado pelo *primer* ccmp02, sendo este o único loco monomórfico dos sete testados.

O padrão de polimorfismo, com variação de poucos pares de base (pb) entre os indivíduos, observado nos géis genotipados nas quatro populações pode ser visualizado na Figura 28.

Figura 27 - Padrão de polimorfismo encontrado na genotipagem dos géis do LICOR. A: *primer* ccmp01 em MSG com polimorfismo de 2pb. B: *primer* ccmp06 em IRA com polimorfismo de 1pb (indicado pelas setas azuis são os alelos de menor peso molecular e vermelhas são os alelos com maior peso molecular)

O resultado da AMOVA mostrou que 83,35% da variação genética ocorre entre as populações, enquanto somente 16,65% ocorreu dentro das populações, com F_{ST} médio de 0,83 (Tabela 17). Em função do alto valor da estimativa de F_{ST} detectado por esses marcadores no estudo, foi encontrado um fluxo gênico muito baixo entre as populações.

Tabela 17 - AMOVA entre os 367 indivíduos distribuídas nas quatro populações, indicando Fonte de variação (FV), Graus de liberdade (GL), Componentes de Variação (CV) e Porcentagem de Variação (PV)

FV	GL	SQ	CV	PV
Entre Populações	3	418584	1,50289 Va	83,35
Dentro das Populações	366	110219	0,30032 Vb	16,65
Total	366	528803	180322	

Caetetus apresenta os menores valores de F_{ST} em relação às demais populações, enquanto em Cosmópolis e Iracemápolis podemos observar os maiores valores de F_{ST} par a par (Tabela 18).

Tabela 18 - Matriz de F_{ST} par a par entre as quatro populações analisadas

	CAE	MSG	COS
MSG	0,77882		
COS	0,75828	0,86551	
IRA	0,84480	0,76414	0,93398

Os índices de diversidade: número efetivo de alelos de Kimura & Crow (1964); diversidade genética de Nei (1973) e índice de Shannon (BOWMAN et al. 1971), descritos na tabela 19, apresentaram CAE como a população que contém a maior diversidade, seguido pela MSG, IRA e COS. O desvio padrão dos índices de diversidade genética (h) foi relativamente menor em comparação com o desvio padrão do índice de Shannon (I) e do número efetivo de alelos (ne). A amplitude da variação do polimorfismo dos locos pode explicar a magnitude do desvio padrão dessas estimativas.

Tabela 19 - Estimativas do número efetivo de alelos (ne) e índice de diversidade de Nei (h) e de Shannon (I) nas quatro populações. Entre parênteses está indicado o desvio padrão dos parâmetros analisados

Populações	ne	h	I
CAE	1,708 (0,145)	0,165 (0,021)	0,094 (0,164)
MSG	1,378 (0,082)	0,140 (0,029)	0,061 (0,117)
COS	1,126 (0,023)	0,090 (0,030)	0,030 (0,050)
IRA	1,194 (0,042)	0,104 (0,029)	0,039 (0,075)
Média	1,263 (0,355)	0,158 (0,190)	0,251 (0,263)

Através da tabela 20, podemos destacar que o loco ccmp05 apresentou o maior número de alelos (6) e o loco ccmp06 apresentou a maior diversidade ($I = 1,69$). Os locos ccmp05 e ccmp06 também foram os mais importantes para diferenciar as quatro populações ($G_{ST} = 0,63$ e $0,65$ respectivamente).

Tabela 20 - Estimativas do número efetivo de alelos (ne), índice de diversidade de Nei (h) e de Shannon (I), diversidade intrapopulacional (H_S), diversidade total (H_T) e diferenciação genética entre populações (G_{ST}) por loco cpSSR

Loco	Alelos	ne	h	I	H_T	H_S	G_{ST}
ccmp01	3	0,059	0,021	1,022	0,021	0,021	0,022
ccmp03	2	0,019	0,005	1,005	0,006	0,006	0,008
ccmp04	2	0,134	0,058	1,061	0,056	0,051	0,089
ccmp05	6	0,379	0,250	1,399	0,251	0,016	0,631
ccmp06	3	0,524	0,362	1,691	0,364	0,058	0,651
ccmp10	2	0,094	0,037	1,038	0,036	0,035	0,037

A combinação dos 18 alelos observados nos seis locos cloroplastidiais resultou na detecção de 16 haplótipos, descritos na Tabela 21. Apenas dois haplótipos (H1 e H6) são compartilhados por duas populações. Os demais haplótipos são exclusivos de uma população, esse resultado evidencia o alto grau de diferenciação das populações estudadas.

Tabela 21 - Descrição dos 16 haplótipos, suas frequências em cada população e em qual população o haplótipo é observado

Haplótipos	Descrição	CAE	MSG	COS	IRA	Freq	Pop
H1	100101000010010001	0,023	-	-	0,010	0,008	CAE/IRA
H2	100101000100010001	0,730	-	-	-	0,175	CAE
H3	100101000100001001	0,180	-	-	-	0,043	CAE
H4	100101000100001010	0,011	-	-	-	0,003	CAE
H5	100101000000110001	0,056	-	-	-	0,013	CAE
H6	100101001000010001	-	0,040	0,942	-	0,229	COS/MSG
H7	001101001000010001	-	-	0,035	-	0,008	COS
H8	100101010000010001	-	-	0,012	-	0,003	COS
H9	100011001000010001	-	-	0,012	-	0,003	COS
H10	100101000000100101	-	0,810	-	-	0,218	MSG
H11	100100100000100101	-	0,110	-	-	0,030	MSG
H12	100101000000101001	-	0,010	-	-	0,003	MSG
H13	010101000000100101	-	0,030	-	-	0,008	MSG
H14	100101000010000101	-	-	-	0,917	0,237	IRA
H15	100101000001000101	-	-	-	0,010	0,003	IRA
H16	100101000010000110	-	-	-	0,063	0,016	IRA

O teste do desequilíbrio genotípico entre pares de locos, realizado pelo software POPGENE, utilizando-se as frequências genotípicas encontradas nas populações, mostrou associação significativa 100% entre alelos de diferentes locos para todas as recombinações possíveis. Este resultado se torna consistente uma vez que o genoma do cloroplasto é haplóide e herdado maternalmente, ou seja, sem recombinação.

Assim como os resultados obtidos com marcadores SSR, a estruturação genética detectada pela análise de atribuição bayesiana a partir das amostras analisadas com cpSSR, coincidem exatamente com a divisão geográfica das quatro populações (Figura 29 e Figura 30).

CAE apresenta maior contribuição dos outros *clusters*, oito amostras contendo cores provenientes das outras populações. COS e MSG tem apenas um indivíduo cujo genótipo é muito diferente do restante da sua população. IRA tem 2 indivíduos que apresentam porções do genoma características das outras populações (Figura 30).

Figura 28 - Estimativas do número de clusters (K) mais adequado para o conjunto de amostras analisado. Metodologia de Pritchard et al. (2000) em (A) e metodologia proposta por Evanno et al. (2005) em (B)

Figura 29 - Teste de atribuição feito pela análise bayesiana, baseado nos seis locos microsatélites cloroplastidiais em *P. gonoacantha*. Cada uma das 4 cores indica um cluster baseado em semelhanças genotípicas. O eixo das ordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada cluster (Q)

Na tabela de frequência dos haplótipos, no dendrograma feito pelo método de agrupamento UPGMA (Figura 31) e na rede de haplótipos (Figura 32) e podemos observar que existe um haplótipo principal representativo de cada população. Em CAE e a MSG foram identificados três haplótipos com frequência razoável (encontrados em pelo menos três indivíduos coletados), enquanto em COS e IRA foram encontrados dois haplótipos com essa frequência.

A análise de agrupamento feita pelo método de agrupamento *Neighbor Joining* (Figura 33) e a rede de haplótipos indicam que as populações de CAE e COS são geneticamente um pouco mais similares que as demais, assim como MSG e IRA. Podemos observar também que o haplótipo H04 (representado por apenas um indivíduo) é o mais diferenciado, se posicionando longe dos outros haplótipos de CAE.

Alguns haplótipos (H4, H8, H9 e H15) foram encontrados em somente um indivíduo. Esses cinco indivíduos são muito importantes e devem ser preservados pois apresentam características genéticas singulares, o que não necessariamente implica que essa diferenciação haplotípica é relacionada a adaptação local. Esses indivíduos se encontram em estado de desenvolvimento juvenil e não tiveram oportunidade de se reproduzir.

Figura 30 - Análise de agrupamento UPGMA, utilizando a dissimilaridade de Jaccard para indicar a variabilidade e frequência dos genótipos avaliados em cada população

Figura 31 - Rede de haplótipos. Os traços na figura entre os haplótipos representam os passos mutacionais

Figura 32 - Análise de agrupamento *Neighbor Joining*, utilizando a dissimilaridade de Jaccard para indicar a variabilidade dos genótipos avaliados. *Bootstraps* representados como porcentagens em seus respectivos nós

4.4 Marcadores AFLP

As análises foram realizadas nos 32 indivíduos que apresentaram melhor qualidade do DNA, representantes das quatro populações.

A partir das 14 combinações de *primers* que foram testados (Tabela 3), oito combinações (Tabela 22) foram escolhidas por amplificarem um padrão de bandas específicas e de qualidade. As outras combinações foram descartadas.

Tabela 22 - Combinações de *primers* *EcoRI* e *MseI* utilizadas para caracterização das populações de *P. gonoacantha*

Combinações		Marcas polimórficas				Total
<i>EcoRI</i> + 3	<i>MseI</i> + 3	CAE	MSG	COS	IRA	
ACC	CTC	72	65	57	50	85
ACC	CAG	34	35	21	35	43
ACA	CTC	33	37	29	21	48
ACA	CAG	35	33	34	38	47
ACC	CTG	11	9	8	9	16
ACC	CTA	8	10	12	10	15
ACA	CTG	19	21	23	24	30
ACA	CTA	15	13	17	13	19
Total		227	223	201	200	303

Houve ampla variação de marcas polimórficas por combinação de *primers* AFLP obtidos, conforme pode ser observado na Tabela 22. O número de bandas variou de 15 a 85, média de 38,125 bandas por combinação *primer*-enzima, num total de 303 marcas polimórficas para os genótipos analisados das 4 populações.

Os indivíduos que representaram cada uma das quatro populações foram selecionados pois não sofreram problemas na digestão do DNA extraído e geraram um padrão de bandas específicas e de qualidade (Tabela 22). 6 em CAE, 12 em COS, 5 em MSG e 9 em IRA.

O Índice de Shannon global para todas as amostras foi de 7,914. Esse índice de diversidade molecular foi calculado também em cada população e por combinação de primer AFLP. Considerando as combinações para as 4 populações, esse índice variou de 3,576 até 6,140. Os remanescentes de floresta nativa CAE e MSG apresentaram os maiores valores (7,685 e 7,647, respectivamente) que não diferem estatisticamente entre si, devido ao desvio padrão (0,049 e 0,063, respectivamente). As áreas reflorestadas COS e IRA apresentaram valores inferiores em relação aos remanescentes (7,361 e 7,391), que também não diferem estatisticamente entre si, devido ao desvio padrão (0,063) (Tabela 23).

Tabela 23 - Combinações de *primers* *EcoRI* e *MseI* utilizadas para caracterização do Índice de Shannon (LogBase = 2) das populações de *P. gonoacantha*. Entre parênteses está indicado o desvio padrão da estimativa, obtido através de 10.000 *bootstraps*

Combinações		Índice de Shannon				
<i>EcoRI</i> + 3	<i>MseI</i> + 3	CAE	MSG	COS	IRA	Total
ACC	CTC	6,013 (0,070)	5,887 (0,089)	5,607 (0,115)	5,418 (0,135)	6,140 (0,033)
ACC	CAG	4,965 (0,118)	5,050 (0,109)	4,218 (0,232)	5,053 (0,109)	5,237 (0,032)
ACA	CTC	4,871 (0,153)	5,030 (0,124)	4,495 (0,187)	4,077 (0,253)	5,214 (0,063)
ACA	CAG	4,985 (0,128)	4,875 (0,142)	4,848 (0,137)	5,016 (0,110)	5,331 (0,032)
ACC	CTG	3,388 (0,258)	2,982 (0,345)	2,625 (0,391)	2,983 (0,346)	3,723 (0,054)
ACC	CTA	2,915 (0,376)	3,183 (0,275)	3,407 (0,208)	3,039 (0,297)	3,576 (0,090)
ACA	CTG	4,159 (0,208)	4,248 (0,181)	4,207 (0,163)	3,312 (0,145)	4,633 (0,059)
ACA	CTA	3,715 (0,182)	3,533 (0,240)	3,822 (0,145)	3,313 (0,247)	3,893 (0,079)
Total		7,685 (0,049)	7,647 (0,051)	7,361 (0,063)	7,391 (0,063)	7,914 (0,019)

As análises de diversidade genética com os marcadores AFLP (Tabela 24) mostraram que o número efetivo de alelos não foi estatisticamente diferente entre as populações. No entanto as estimativas de diversidade gênica de Nei (H_j) e porcentagem de locos polimórficos (PL%) foram superiores nas duas áreas de remanescentes naturais, em relação às duas áreas restauradas.

Tabela 24 - Estimativas de número efetivo de alelos (n_e), diversidade gênica (H_j), porcentagem de locos polimórficos (PL%). Desvio padrão entre parênteses

	CAE	MSG	COS	IRA	Média
n_e	1,393 (0,373)	1,455 (0,374)	1,318 (0,371)	1,314 (0,371)	1,558 (0,371)
H_j	0,310 (0,011)	0,359 (0,011)	0,253 (0,011)	0,278 (0,010)	0,300 (0,023)
%PL	74,92	73,59	66,33	66,00	

O resultado da AMOVA mostrou que 82,28% da variação genética ocorre dentro das populações, enquanto somente 17,72% ocorreu entre as populações, com F_{ST} médio de 0,177 (Tabela 25).

Tabela 25 - Análise de Variância Molecular de populações de *P. gonoacantha*, graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), componentes de variância (CV) e porcentagem da variação total (%VT)

Fonte de variação	GL	SQ	CV	%VT
Entre as populações	3	362,674	9,802 Va	17,72
Dentro das populações	28	1274,889	45,531 Vb	82,28
Total	31	1637,562	55,334	

A tabela de F_{ST} par a par (Tabela 26) com os marcadores AFLP mostra uma maior diferença entre as populações CAE e IRA, e que a MSG possui menor F_{ST} par a par em relação às demais.

Tabela 26 - Matriz de F_{ST} par a par entre as quatro populações analisadas

	CAE	MSG	COS
MSG	0,095		
COS	0,152	0,091	
IRA	0,194	0,097	0,149

A estruturação genética das amostras analisadas está representada na Figura 38 e Figura 39. A análise bayesiana de agrupamento do programa STRUCTURE detectou o número de clusters mais provável igual a 2, no entanto $k=5$ apresenta mais sentido biológico, pois além das 4 cores que caracterizam cada população, pode ser visualizado um novo cluster, representado pela cor cinza que corresponde a aproximadamente 50% do genoma de 3 genótipos em MSG e 5 genótipos em IRA,

em COS o *cluster* cinza corresponde mais de 90% do genoma de 7 indivíduos e em CAE esse *cluster* é menos representativo (Figura 34 e Figura 35).

Figura 33 - Estimativas do número de clusters (K) mais adequado para o conjunto de amostras analisado. Metodologia proposta por Evanno et al. (2005)

Figura 34 - Teste de atribuição feito pela análise bayesiana, baseado nas oito combinações de *primers* AFLP em *P. gonoacantha*. Cada uma das 5 cores indica um cluster baseado em semelhanças genotípicas. O eixo das ordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada cluster (Q)

A similaridade genética de cada genótipo foi representada pelo agrupamento um dendrograma obtido pelo método *Neighbor Joining* (Figura 36) através do índice de Jaccard. A confiabilidade dos nós obtidos está representada pelos valores obtidos a partir de *bootstrap* com 10.000 reamostragens. Os valores de *bootstrap* foram mais consistentes, nos nós que envolvem genótipos dentro das populações. Devido ao

grande número de marcas acessadas, foi feita uma ampla cobertura do genoma, fornecendo resultados mais seguros e robustos, típicos dos marcadores AFLP.

Figura 35 - Dendrograma obtido pelo método *Neighbor Joining* através do coeficiente de similaridade de Jaccard para as amostras das quatro populações de *P. gonoacantha*

Identificou-se um total de dez locos candidatos sobre seleção direcional ou disruptiva (F_{ST} médio = 0,513) e 21 locos candidatos sobre seleção balanceadora (Figura 37). A combinação *Eco*-ACA/*Mse*-CTC apresentou três locos candidatos sobre seleção direcional ou disruptiva e seis locos sobre seleção balanceadora. As combinações *Eco*-ACC/*Mse*-CAG e *Eco*-ACA/*Mse*-CTA foram as únicas a não manifestar candidatos associados a seleção direcional ou disruptiva, mas apresentaram um loco candidato sobre seleção balanceadora, cada combinação (Tabela 27).

Figura 36 - Cenário apresentado para os 10 locos candidatos que estão sofrendo seleção direcional ou disruptiva (região em vermelho), dos locos neutros (região em cinza) e para locos que estão sofrendo seleção balanceadora, considerando as quatro populações de *P. gonoacantha*

Tabela 27 – Locos AFLP *outliers* por combinação

Combinações		Seleção direcional ou disruptiva	Seleção balanceadora
<i>EcoRI</i> + 3	<i>MseI</i> + 3		
ACC	CTC	1	5
ACC	CAG	0	1
ACA	CTC	3	6
ACA	CAG	1	4
ACC	CTG	2	1
ACC	CTA	2	1
ACA	CTG	1	2
ACA	CTA	0	1
Total		10	21

A similaridade genética das amostras utilizando apenas os locos *outliers* candidatos foi representada pelo agrupamento no dendrograma obtido pelo método Neighbor Joining (Figura 38) através do índice de Jaccard. A confiabilidade dos nós está representada pelos valores obtidos a partir de *bootstrap* com 10.000 reamostragens, um dos genótipos provenientes de COS se agrupou com os genótipos de IRA.

Figura 37 - Dendrograma obtido pelo método *Neighbor Joining* através do coeficiente de similaridade de Jaccard para as quatro populações de *P. gonoacantha*, utilizando somente os 10 locos candidatos sobre seleção direcional ou disruptiva

A estrutura genética, sem hierarquização *a priori*, das quatro populações utilizando os 10 locos candidatos sobre seleção direcional ou disruptiva foi determinada através de um teste bayesiano de atribuição dos indivíduos no programa STRUCTURE (Figura 39 e Figura 40).

Figura 38 - Estimativa do número de clusters (K) mais adequado para o conjunto de amostras analisado. Metodologia proposta por Evanno et al. (2005)

Figura 39 - Teste de atribuição feito pela análise bayesiana, baseado nos 10 AFLP locos outliers em *P. gonoacantha*. Cada uma das 3 cores indica um cluster baseado em semelhanças genotípicas. O eixo das ordenadas mostra o coeficiente de participação do indivíduo em cada cluster (Q)

Cada valor estrutural de K é representado por uma cor. O valor do K mais provável ($\Delta K = 3$) foi determinado pelo método de Evanno et al. (2005). Alguns desses locos *outliers* associam aos indivíduos da população de CAE aos indivíduos coletados em COS. Assim como a análise do dendrograma, IRA foi o local mais diferenciado pela análise, indicando que os locos podem estar associados a seleção sofrida nesse ambiente.

Quando cada par entre as quatro populações é analisado (Tabela 28), MSG foi a população que apresentou maior número de locos candidatos sobre seleção

direcional ou disruptiva. A maioria dos locos outliers AFLP encontrados nos pares que envolvem a MSG não foram detectados através da análise com as quatro populações juntas.

Tabela 28 - Quantidade de locos candidatos sobre seleção direcional ou disruptiva, considerando os pares entre as quatro populações analisadas

	CAE	MSG	COS
MSG	20		
COS	2	26	
IRA	6	33	4

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com o único trabalho publicado até então envolvendo genética de *P. gonoacantha*, esse estudo caracterizou nove populações utilizando o marcador dominante RAPD (TAMBARUSSI et al., 2008), ao longo de dois municípios de SP. A heterozigosidade esperada média em Equilíbrio de Hardy Weinberg encontrada pelos autores foi de 0,292, semelhante à estimativa de H_E encontrada nas quatro populações analisadas no presente estudo (0,336). Elevados valores de distância genética entre as populações também foram encontrados por esses autores.

Costa et al. (2012) estudou 45 indivíduos de uma espécie filogeneticamente próxima à *P. gonoacantha*, em três populações de *Parapiptadenia rigida* utilizando nove microssatélites que apresentaram média de 3,9 alelos por loco. A média de alelos por loco encontrada nos marcadores SSR da biblioteca genômica desenvolvida para *P. gonoacantha* (5,43) foi superior a *P. rígida*. Em *P. gonoacantha* a endogamia é maior, o contraste entre as heterozigosidades observada e esperada (0,251 e 0,494, respectivamente) é maior do que em *P. rígida* (0,318 e 0,44 respectivamente).

Alelos nulos podem causar os desvios de heterozigosidade observada de acordo com o Equilíbrio de Hardy Weinberg. A ocorrência de alelos nulos leva ao aumento da homozigose aparente e redução da heterozigose aparente, visto que indivíduos heterozigotos poderão ser interpretados como homozigotos.

Entretanto, presença de alelos nulos não deve ser a explicação mais provável para o alto valor de endogamia encontrado para a espécie. Valores altos de F_{IS} observados na maioria dos locos favorecem a interpretação de que os genótipos analisados estão submetidos a forte endogamia, provavelmente devido ao próprio processo evolutivo da espécie ao longo das gerações. No entanto os valores maiores das estimativas de F_{IS} nas áreas reflorestadas sugerem que o processo de restauração florestal pode limitar os cruzamentos que ocorrem nessas áreas e aumentar o coeficiente de parentesco de espécies como a *P. gonoacantha*, que não recebem pólen ou sementes provenientes de grandes distâncias.

O padrão de distribuição da *P. gonoacantha* em agrupamentos pode explicar a endogamia (F_{IS} médio = 0,342) encontrada no perfil genético desta espécie.

Os padrões de autocorrelação espacial encontrados nas populações através dos marcadores SSR foram semelhantes aos encontrados para espécies arbóreas tropicais, com a polinização realizada por animais (VEKEMANS; HARDY, 2004). Em CAE a autocorrelação espacial foi muito superior às demais populações, provavelmente devido ao melhor estado de conservação dessa área, que apresenta poucas clareiras onde sementes migrantes poderiam colonizar.

Segundo Wright (1978), para valores de F_{ST} iguais ou acima de 0,25, considera-se que existe uma diferenciação muito grande; valores na faixa de 0,15 a 0,25 indicam uma diferenciação moderadamente grande. As estimativas da diferenciação genética entre as quatro populações obtidas com marcadores SSR ($F_{ST} = 0,283$ e $R_{ST} = 0,194$); marcadores cpSSR ($F_{ST} = 0,83$) e marcadores AFLP ($F_{ST} = 0,177$) variaram de acordo com cada marcador utilizado. No entanto, existe muita diversidade genética entre populações, dessa maneira, as coletas de sementes para os viveiros que atendem projetos de restauração devem ser feitas com o objetivo de coletar os materiais genéticos presentes no maior número de populações diferentes possível.

Estimativas de F_{ST} encontradas com marcadores como cpSSR são maiores do que de outros tipos de marcadores porque cpSSR são marcadores mais conservados e seu polimorfismo ocorre ao longo de muitas gerações. Provavelmente as populações analisadas são descendentes de *pools* gênicos que já se diferenciaram há muitas gerações. Valores altos de F_{ST} são observados em *Populus cathayana* (PENG; CHEN, 2011). A comparação das frequências haplotípicas possibilita determinar se as populações apresentam ou não histórias evolutivas similares (HARTL, 2008).

Estudos foram feitos com marcadores cpSSR e AFLP (DZIALUK et al., 2009; PETIT et al., 2005; RIBEIRO et al., 2002) também encontraram alta diferenciação genética e diversidade genética menor com marcadores cpSSR, enquanto em dados AFLP, a diferenciação é mediana e a diversidade genética é maior.

As distâncias entre as populações analisadas de *P. gonoacantha* são grandes e não foi observado fluxo gênico entre elas. A matriz da paisagem sob forte efeitos de alterações antrópicas, em que os fragmentos estão inseridos, repercute em uma quebra de conectividade da paisagem, comprometendo a troca de material genético entre indivíduos de populações ou subpopulações vizinhas.

Os resultados das análises de agrupamento também demonstraram que cada fragmento apresenta um perfil genético característico. Os locos candidatos sobre seleção direcional ou disruptiva mostraram a maior diferenciação de IRA em relação às demais populações (essa mesma característica também foi sugerida pelos resultados dos marcadores cpSSR e SSR). Quando os pares das populações foram analisados, MSG apresentou grande quantidade desses locos.

A estrutura genética observada e alta divergência entre as duas populações naturais sugerem efeito da deriva genética. O teste feito para detecção de gargalo populacional e a grande diversidade genética encontrada em MSG mostraram que existe fortes evidências de que existiu uma expansão populacional recente nessa área.

A expansão populacional em MSG pode ser explicada pelo histórico de intervenções antrópicas e alterações ambientais. MSG sofreu um processo de fragmentação muito intenso durante o cultivo de café enquanto em CAE esse processo foi muito mais brando. Esses fatores explicam a abertura de clareiras na MSG, que favorecem a colonização por espécies secundárias iniciais como *P. gonoacantha*. A matriz isolada em que a MSG está inserida, cujo entorno é preenchido por plantações e bairros residências, favorecem a manutenção das clareiras. Em contraponto, CAE possui conectividade com outros fragmentos florestais vizinhos.

Há um relevante número de trabalhos a respeito do remanescente MSG (LEITÃO-FILHO; MORELLATO, 1995; PIZZO, 1997; FONSECA et al., 2004, GUARATINI, 2008), abrangendo as mais diversas áreas da biologia. Porém poucas informações estavam disponíveis sobre o perfil genético desta área, para que possam servir de comparação com o perfil de áreas reflorestadas.

Em relação às áreas em processo de restauração, as duas áreas apresentaram índices de diversidade estatisticamente semelhantes. IRA apresentou o padrão genético mais diferenciado das quatro populações com os três tipos de marcadores, isso significa que viveiro do Parque do Tietê (selecionado para o reflorestamento dessa área) realizou suas coletas de sementes de *P. gonoacantha* em regiões que possuem material genético muito diferente do encontrado em CAE e MSG.

Ambas as áreas em processo de restauração, apresentam grande quantidade de espécies exóticas e se não houver variabilidade genética, a espécie pode ficar em

desvantagem em relação a competição com as espécies invasoras que ocupam o mesmo nicho na ausência de predadores naturais, doenças ou pragas.

A menor diversidade encontrada nas duas áreas em processo de restauração em relação as áreas de remanescentes que foram usadas como referência, pode oferecer um risco para a sobrevivência das populações de *P. gonoacantha* a médio e longo prazos. Essas populações reflorestadas ficam mais sujeitas a estocasticidade genética, o que implica em uma maior estruturação genética e modificações nos padrões genéticos em comparação com populações naturais.

Conforme Chambers e Macavoy (2000), a variabilidade herdável de características adaptativas, confere aos organismos uma flexibilidade fenotípica que seria a capacidade de adaptação às novas mudanças ambientais, como a introdução de um predador, uma repentina proliferação de patógenos ou poluentes, entre outros.

Apesar da menor diversidade apresentada pelas áreas restauradas em comparação às áreas de remanescentes florestais, os valores do tamanho efetivo populacional (N_e) estimados dessas áreas (57,6 para COS e 47,4 para IRA) foram próximos ao número de referência para conter os efeitos da endogamia nas populações, considerando 10 gerações (FRANKEL; SOULÉ, 1981). Outros valores de referência do tamanho efetivo populacional foram sugeridos por NUNNEY e CAMPBELL (1993), estando entre 100, no mínimo, até o ideal de 150. Além destes autores, Sebbenn (2003) também critica o número de referência de tamanho efetivo igual a 50. Assim, sob condições mais restritas para conservação, somente a população da MSG apresenta um tamanho efetivo populacional ($N_e = 274,9$) que poderia efetivamente conter os efeitos da endogamia no local. Portanto, há necessidade de aumentar a diversidade genética de *P. gonoacantha* nas áreas restauradas, a fim de assegurar a manutenção da espécie ao longo das gerações.

A diversidade genética das áreas que já foram restauradas pode ser ampliada através do plantio de mudas que apresentam genótipos que não estão presentes nessa área (enriquecimento genético), esse procedimento pode auxiliar as áreas que foram reflorestadas com baixa diversidade genética, aumentando sua capacidade de responder as mudanças ambientais (RODRIGUES et al., 2009). No entanto, a seleção natural pode eliminar as plantas transplantadas que não são adaptadas ao local (HUFFORD; MAZER, 2003).

Com o presente estudo, podemos indicar a escolha de indivíduos representantes dos haplótipos H1, H2, H3 e H5 em Caetetus para a coleta de

sementes para viveiros. Na Mata Santa Genebra os indivíduos representantes dos haplótipos H10, H11 e H13 são indicados para a coleta de sementes para viveiros. As sementes provenientes dessas plantas podem aumentar a diversidade genética do estoque de sementes de *P. gonoacantha* dos viveiros e aumentar o potencial de sucesso dos futuros programas de reflorestamento envolvendo essa espécie.

A obtenção de sementes com qualidade genética e fisiológica para as diversas espécies nativas para a restauração ainda é um desafio, mas é um fator muito importante para o sucesso dos projetos de restauração (FAO, 2004). A qualidade das mudas é importante por estar relacionada diretamente com a sobrevivência e o crescimento das plantas em campo (DIAS et al., 2006).

Os projetos de restauração ecológica precisam, além da variedade de espécies, de diversidade genética entre mudas de uma mesma espécie (ANDEL, 1998). Segundo Piña-Rodrigues et al. (2007), as espécies florestais necessitam de diversidade genética para continuidade da evolução, devido à constante mudança do ambiente biótico e a contínua adaptação das espécies frente ao regime de seleção dos seus predadores, hospedeiros, simbioses e competidores.

A qualidade e manutenção dos plantios de restauração ecológica podem ficar comprometidos pela grande dificuldade de se acessar a diversidade genética das espécies. A busca por alternativas para melhorar a variabilidade das sementes disponíveis para a produção de mudas é um fator que deve ser priorizado (BARBOSA, 2006).

A adição de sementes provenientes de matrizes que já estão estabelecidas nos locais em que os projetos de restauração são implantados é uma maneira de incentivar a formação de híbridos com os ecótipos presentes na região. Esse procedimento garante diversidade genética e vigor adaptativo para as espécies implantadas, frente às mudanças climáticas (BURTON; BURTON, 2002).

O rastreamento das matrizes que forneceram as sementes para o desenvolvimento das mudas é muito importante para a organização da produção em larga escala de mudas com diversidade genética suficiente para atender as demandas dos projetos de restauração ecológica (RODRIGUES et al., 2009).

A realização de intercâmbio entre os viveiros próximos, com o objetivo de aumentar o número de matrizes que fornecem as sementes de cada espécie, pode ser uma solução para aumentar a variedade de espécies e de diversidade genética

entre mudas de uma mesma espécie, sem elevar os custos de coleta (BRANCALION et al., 2012).

Estudos mostram que o sucesso a longo prazo dos projetos de restauração está profundamente ligado à incorporação de alta diversidade genética nas mudas e com a utilização de técnicas que mantêm essa diversidade (REYNOLDS et al., 2012; LEIMU et al., 2006)

Um novo paradigma da restauração ecológica deve ser proposto pensando no estabelecimento de ecossistemas capazes de se auto sustentar para o futuro, tendo o foco na reabilitação de funções do ecossistema e não somente na recomposição de espécies (CHOI, 2007).

6 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos foram utilizados para uma maior compreensão da necessidade de implantação de diversidade genética junto às práticas de reflorestamento. A viabilidade de uma população em processo de restauração depende tanto das influências de condições ecológicas adequadas quanto da diversidade genética implementada. A baixa variabilidade de progênies plantadas em recomposições florestais não pode ser compensada por diversidade florística, sendo necessária a implementação de sementes oriundas de várias matrizes para a composição de uma ação de reflorestamento consciente e bem sucedida.

Mesmo quando as áreas em processo de restauração estão aparentemente bem estabelecidas (exibindo mata alta e relativamente fechada), a baixa diversidade genética encontrada em espécies secundárias iniciais como o pau-jacaré pode resultar em uma homogeneização das populações. Consequentemente aumentando a vulnerabilidade dessas populações às alterações climáticas e ambientais.

A grande diferenciação nas frequências alélicas encontradas nas quatro populações de *P. gonoacantha* aponta a necessidade de conservação dos remanescentes florestais para preservar essa diversidade genética e necessidade de um enriquecimento genético nas áreas em processo de restauração para aumentar as probabilidades de sobrevivência a longo prazo dessas populações.

O levantamento e a manutenção da variabilidade genética desses recursos genéticos são fundamentais para a sobrevivência de espécies importantes para projetos de reflorestamento, como *P. gonoacantha*.

A hipótese inicial levantada pelo projeto de que “populações vegetais implantadas por ações de restauração florestal apresentam baixa diversidade genética e estão passando por um processo de erosão genética”, foi confirmada pela análise de diversidade e estrutura genética de *P. gonoacantha* através dos marcadores moleculares SSR, cpSSR e AFLP.

Esse trabalho foi feito avaliando a diversidade genética em duas áreas em processo de restauração que foram implementadas de uma forma eficiente, que são modelos para o reflorestamento no estado de São Paulo, mas cuja diversidade genética pode ser incrementada com base neste estudo. Outros estudos devem ser feitos em outras áreas restauradas para chegar em um panorama mais geral sobre o tema.

Para alcançar a auto sustentabilidade das áreas em processo de restauração é necessário unir os vários conceitos ecológicos, como de função e estrutura da comunidade, à diversidade genética das espécies. Os resultados aqui presentes poderão delinear procedimentos adequados de restauração e manutenção da diversidade em áreas degradadas.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 27, p. 617–631, 2008.
- AIDAR, M.P.M.; GODOY, J.R.L.; JOLY, C.A. Atlantic forest succession over calcareous soil -PETAR, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 455-469, 2001.
- ALLENDORF F.W.; HOHENLOHE P.A.; LUIKART G. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature Genetics**, London, v.11, p. 697–709, 2010.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the Genetics of Populations**. Blackwell Publishing, 2007. 642p.
- ALVES, R. M.; SEBBERN, A.M.; ARTERO, A.S.; FIGUEIRA, A. Microsatellite locos transferability from *Theobroma cacao* to *Theobroma grandiflorum*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, US, v.6, n.2, p.1219-1221, 2006.
- ALZATE-MARIN, A.L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Marker assisted selection in the development of disease resistant plants, with emphasis on common bean and soybean. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v.30, n. 4, p. 333-342, 2005.
- ANA. Atlas Brasil: abastecimento urbano de água. Brasília: Engecorps/Cobrapi, 2011. 77 p.
- ANDEL, J. VAN. Intraspecific variability in the context of ecological restoration projects. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, London, v. 2, p. 221–237, 1998.
- ANTAO, T.; BEAUMONT, M. A. Mcheza: A workbench to detect selection using dominant markers. **Bioinformatics**, Oxford, UK , doi:10.1093/bioinformatics/btr253, 2011.
- AUREA, C.; ROSS, A. Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite locos in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.8, n.1, p.135-138, 2008.

BAGGIO, A.J.; CARVALHO, P.E.R. Algumas técnicas agroflorestais recomendadas para o litoral do Paraná. In: IPARDES. Fundação Edison Vieira. **Macrozoneamento da APA de Guaraqueçaba**. Curitiba: Fundação Edson Vieira (IBAMA / IPARDES), 1990. cap.1, p. 241-248.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 11, p. 155-165, 2002.

BARBOSA, L.M. Manual para recuperação de áreas degradadas do estado de São Paulo: matas ciliares do interior paulista. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. 128 p.

BARRET, S.C.H.; KOHN, J.R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: FALK, D. A.; OLSINGER, K. E. **Genetic and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 3-30.

BLACK W.C.; BAER C.F.; ANTOLIN M.F.; DUTEAU N.M. Population genomics: genome-wide sampling of insect populations. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 46, p. 441–469, 2001.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, Les Ulis, v.54, p.277-288, 1999.

BOWMAN, K.O.; HUTCHENSON, K.; ODUM, E.P.; SHENTON, L.R. **Comment on the distribution of indices of diversity, in Statistical Ecology**. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1971. p. 315-319.

BRADSHAW, C. J.; GIAM, A.X; SODHI, N.S. Evaluating the relative environmental impact of countries. **PlosOne**, San Francisco, v. 5, p. 1-16. 2010.

BRANCALION, P.H.S.; CARDOZO, I.V.; CAMATTA, A.; ARONSON, J.; RODRIGUES R.R. Cultural Ecosystem Services and Popular Perceptions of the Benefits of an Ecological Restoration Project in the Brazilian Atlantic Forest. **Restoration Ecology**, San Diego, v. 22, n. 1, p. 65–71, 2004.

BRANCALION, P.H.S.; VIANI, R.A.G.; ARONSON, J.; RODRIGUES, R.R.; NAVE, A.G. Improving Planting Stocks for the Brazilian Atlantic Forest Restoration through Community-Based Seed Harvesting Strategies. **Restoration Ecology**, San Diego, v. 20, p. 704-711, 2012.

BURTON, P.J.; BURTON, C.M. Promoting Genetic Diversity in the Production of Large Quantities of Native Plant Seed. **Ecological Restoration**, San Diego, v. 20, n. 2, p. 117-123, 2002.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N.J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, p. 1040-1050, 2006.

CANALE, G.R.; PERES, C.A.; GUIDORIZZI, C.E.; GATTO, C.A.F.; KIERULFF, M.C.M. Pervasive Defaunation of Forest Remnants in a Tropical Biodiversity Hotspot. **PlosOne**, San Francisco, v. 7, p. 1-8, 2012.

CAPOBIANCO, J.P.R. **Dossiê Mata Atlântica**: Projeto Monitoramento Participativo da Mata Atlântica. São Paulo: Instituto Socioambiental. 2001. 372 p. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/44826805/MONITORAMENTO-PARTICIPATIVO-DA-MATA-ATLANTICA>>. Acesso em: 13 maio 2013.

CARVALHO, P.E.R. **Pau-jacaré - *Piptadenia gonoacantha***. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 12p. (Circular técnica, 91).

CASCANTE, A.; QUESADA, M.; LOBO, J.J.; FUCHS, E.A. Effects of dry tropical Forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. **Conservation Biology**, Washington, DC, v., n. 16, p. 137-147. 2002.

CAVALHEIRO, K.O.; AMEIXEIRO, C.A.C. **Biologia floral de espécies arbóreas**. Piracicaba: IPEF, 1992. p. 11-13. (Série Técnica IPEF)

CHOI, Y.D. Restoration Ecology to the Future: A Call for New Paradigm. **Restoration Ecology**, Washington, v. 15, n. 2, p. 351-353, 2007.

COLE, T.C. Genetic Variation in rare and common plants. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 34, p. 213-237, 2003.

CORNUET, J.; LUIKART G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Austin, v. 144, p. 2001-2014, 1996.

CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. 1984. v. 4, 765 p.

COSTA, B. F.; RODRIGUES, L. A.; RUAS, E. A.; SOUZA, L. B.; RUAS, C. F.; VIEIRA, B. G.; CONSON, A. R. O.; RUAS, P. M. Characterization of nine microsatellite locos for the tree species *Parapiptadenia rigida* **Genetics and molecular research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 3, p. 2338-2342, 2012.

CSAIKL U.M.; BASTIAN H.; BRETTSCHEIDER, R. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogentic studies. **Plant Molecular Biology Reporter**, San Francisco, v. 16, p. 69-86, 1998.

DEVEY, M.E.; BELL, J.C.; SMITH, D.N.; NEALE, D.B.; MORAN, G.F. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.92, p.673-679, 1996.

DAVEY J.W.; HOHENLOHE P.A.; ETTER P.D.; BOONE J.Q.; CATCHEN J.M.; BLAXTER M.L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature**, London, v. 12, p. 499-510, 2011.

DEAN, W. **A Ferro e Fogo**: a História da devastação da Mata Atlântica. São Paulo: Companhia das Letras, 1996. 484 p.

DIAS, E.S.; KALIFE, C.; MENEGUCCI, Z. R. H.; SOUZA, P.R. **Produção de mudas de espécies florestais nativas**. Campo Grande: Editora UFMS. 2006. 57 p.

DIRZO, R.; RAVEN, P.H. Global state of biodiversity and loss. **Annual Review of Environment and Resources**, Palo Alto, v. 28, p. 137-167, 2003.

DI RIENZO, A.; PETERSON, A.C.; GARZA, J.C.; VALDE´S, A.M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B.. Mutational processes of simple-sequence repeat locos in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 91, p. 3166–3170, 1994.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 27, p. 13-15, 1990.

DURIGAN, G.; FRANCO, G.A.D.C.; SAITO, M.; BAITELLO, J.B. Estrutura e diversidade do componente arbóreo da floresta na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 23, p. 369-381, 2000.

DZIALUK, A.; MUCHEWICZ, E.; BORATYŃSKI, A.; MONTSERRAT, J.M. BORATYŃSKA, K.; BURCZYK, J. Genetic variation of *Pinus uncinata* (Pinaceae) in the Pyrenees determined with cpSSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, Heidelberg, v. 277, n. 3-4, p. 197-205, 2009.

EBERT, D.; PEAKALL, R. Chloroplast simple sequence repeats (cpSSR): technical resources and recommendations for expanding cpSSR discovery and applications to a wide array of plant species. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, US, v. 9, p. 673–690, 2009.

EGAN S.P.; NOSIL P.; FUNK D.J. Selection and genomic differentiation during ecological speciation: isolating the contribution of host association via comparative genome scan of *Neochlamisus bebbianea* leaf beetles. **Evolution**, Hoboken, v. 62, p. 1162-1181, 2008.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, p. 435-445, 2004.

EPPERSON, B.K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer, 1990. p. 229-253

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin**: an integrated software package for population genetics data analysis. Bern: Zoological Institute. 2006.

EXCOFFIER, L.; SMOUES, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v.131, p. 479-491, 1992.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, US, v. 7, n. 4, p. 574-578, 2007.

FAO; IPGRI. Forest genetic resources conservation and management. Overview, concepts and some systematic approaches. Rome, Italy: International Plant Genetic Resources Institute, v. 1, 2004. 115 p.

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

FINKELDEY, R.; HATTEMER, H. H. **Tropical Forest Genetics**. Berlin: Ed. Springer, 2007. 315p.

FLUXUS TECHNOLOGY LTD. **NETWORK**. 2008. Disponível em: < <http://www.fluxus-engineering.com> >. Acesso em: 20 maio 2013.

FONSECA, M.G.; MARTINI, A.M.Z.; SANTOS, F.A.M. Spatial structure of *Aspidosperma polyneuron* in two semideciduous forest in southeast Brazil. **Journal of Vegetation Science**, Hoboken, v. 15, p. 41-48, 2004.

FRANKEL, O.H.; SOULÉ, M.S. **Conservation and evolution**. Cambridge: Cambridge University, 1981. 327 p.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Conservation Genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 617 p.

FUNDAÇÃO JOSÉ PEDRO DE OLIVEIRA - FJPO. **Plano de Manejo da Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra**. Campinas: Prefeitura Municipal de Campinas, 2010. 162 p.

FUNK, W.C.; MCKAY, J.K.; HOHENLOHE, P.A.; ALLENDORF, F.W. Harnessing genomics for delineating conservation units. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 27, p. 489-496, 2012.

FUTUYMA, D. **Evolution**. Sunderland: Sinauer, 2003. 603 p.

GASCON, C.; WILLIAMSON, B.; FONSECA, G.A.B. Receding forest edges and vanishing reserves. **Science**, Washington, DC, v. 288, p. 1356-1358, 2000.

GONÇALVES, C.A.; LELIS, R.C.C. Avaliação do teor de tanino condensáveis de cinco de leguminosas arbóreas. In: CONGRESSO E EXPOSIÇÃO INTERNACIONAL SOBRE FLORESTAS, 6., 2000, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Forest, 2000, p. 393-394.

GOLDSTEIN D.B.; SCHLÖTTERER C. **Microsatellites**: evolution and applications. New York: Oxford University Press, 1999. p. 34-41.

GOUDET, J. **Fstat version 2.9.3.2**. 2002. Institute of Ecology, Lausann. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

GUARATINI, M.T.G.G.; GOMES, E.P.C.; TAMASHIRO, J.Y.; RODRIGUES, R.R. Composição Florística da Reserva Municipal de Santa Genebra, Campinas, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, p. 323-337, 2008.

GUIRAO, A.C.; FILHO, J.T. Preservação de um fragmento florestal urbano – Estudo de caso: A ARIE Mata de Santa Genebra, Campinas-SP. **GEUSP: Espaço e Tempo**, São Paulo, n. 29, p. 147-158, 2011.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiples allele. **Biometrics**, Arlington, v. 48, p.361-372, 1992.

HAMRICK, J.L.; NASON, J.D. Gene flow in forest trees. In: Young, A.; Boshier, D.; Boyle, T. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Collingwood: CSIRO, 2000. p.81-89.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Alloenzyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L. (Ed). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. p.145-162.

HAMRICK, J.L. Responses of forest trees to global environmental changes. **Forest ecology and management**, Fort Collins, v. 197, p. 323-335, 2004.

HANSON, T.R.; BRUNSFELD, S.J.; FINEGAN, B.; WAITS, L.P. Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 17, p. 2060-2073, 2008.

HARDY, O.J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 2, p. 618–620, 2002.

HARTL, D.L. **Princípios de genética de população**. Editora, FUNPEC, Ribeirão Preto: FUNPEC,. 2008. 217 p.

HAYDEN, M.J.; SHARP, P.J. Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers. **Nucleic Acids Research**, London, V. 29, n. 8, p. 1-6, 2001.

HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**, Gothenburg, v. 6, p. 65-67, 1979.

HUFFORD, K.M.; MAZER, S.J. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v.18, n. 3, p. 147-155, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N.A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, Oxford, UK, v. 23, p. 1801-1806, 2007.

JOBES, D.V.; HURLEY, D.L.; THIEN, L.B. Plant dna isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides and rna. **Taxon**, Mainz, v. 44, p. 379-386, 1995.

KAGEYAMA, P.; GANDARA, F.B. Recuperação de áreas ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILHO, H. F. (Eds.) **Matas ciliares: conservação e recuperação**. Sao Paulo: USP, 2004. v. 2, p. 249-269.

KARP A., SEBERG O., BUIATTI, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany**, Oxford, UK, v. 78, p. 143-149, 1996.

KASHYAP, V.K., GUHA, S.; SITALAXIMI, T.; BINDU, G.H.; HASNAIN, S.E; TRIVED, R. Genetic structure of indian populations based on fifteen autosomal microsatellite locos. **BMC Genetics**, Austin, v.7, p. 1- 28, 2006.

KIMURA, M.; CROW, J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, Austin, v. 49, p. 725-738, 1964.

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 75, n. 6, p. 2868-2872, 1978.

KINOSHITA, L.S.; TORRES, R.B.; FORNI-MARTINS, E.R.; SPINELLI, Y.J.A.; CONSTÂNCIO, S.S. Composição florística e síndromes de polinização e de dispersão da mata do Sítio São Francisco, Campinas, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, p. 213-237, 2006.

LAURENCE, W.F.; COCHRANE, M.A. Synergistic effects in fragmented landscapes. **Conservation Biology**, Washington, DC, v. 15, p. 1488-1535, 2001.

LEBERG, P.L. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.2445-2449, 2002.

LEIMU, R.; MUTIKAINEN, P.; KORICHEVA, J.; FISCHER, M. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? **Journal of Ecology**, London, v. 94, p. 942–952, 2006.

LEITÃO-FILHO, H. de F.; MORELLATO, P.C. **Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana**: Reserva de Santa Genebra. Campinas: Unicamp, 1995. 136 p.

LEITE, I.T. DE A.; TAKAKI, M. Análise da germinação de sementes de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. (Leguminosae - Mimosoideae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 37, p. 587-595. 1994.

LELLES, J.G. DE.; REIS, M.S.; VALENTE, O.F.; SOUZA, A.P. de. Durabilidade de moirões preservados em condições de campo. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 2, p. 27-33, 1978.

LEME, M.C.J.; DURIGAN, M.E.; RAMOS, A. Avaliação do potencial forrageiro de espécies florestais. In: Seminário Sobre Sistemas Agroflorestais Na Região Sul Do Brasil, 1. Colombo. SEMINÁRIO SOBRE SISTEMAS AGROFLORESTAIS NA REGIÃO SUL DO BRASIL. 1994, Colombo **Anais...**Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1994. p.147-155.

LEY, A.C.; HARDY, O.J. Improving AFLP analysis of large-scale patterns of genetic variation – a case study with the Central African lianas *Haumania* spp (Marantaceae) showing interspecific gene flow. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 22, p. 1984–1997, 2013.

LEWIS, P.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data (software) 2000. Version 1.1. Disponível em: <<http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>>. Acesso em: 25 nov. 2013.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 82, p. 1420-1425. 1995.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum. 1992. 352p.

LORENZI, H.; MATOS, A.J.F. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum: 2002.120 p.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Reviews of Ecology and Systematics**, New York, v. 15, p. 65-95, 1984.

LUIKART, G.; BIJU-DUVAL, M-P.; ERTUGRUL, O. ; ZAGDSUREN, Y. ; MAUDET, C.; TABERLET, P. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). **Animal Genetics**. Oxford, UK, v. 30, p. 431-438, 1999.

MADER, H.J. Animal habitat isolation by roads and agriculture fields. **Biological Conservation**, Boston, v. 29, p. 81-96, 1994.

MANEL S.; CONORD C.; DESPRÉS L. Genome scan to assess the respective role of host-plant and environmental constraints on the adaptation of a widespread insect. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 288. p. 1-10, 2009.

MARSHALL, T.C.; SUNNUCKS, P.; SPALTON, J.A.; GRETH, A.; PEMBERTON, J.M. Use of genetic data for conservation management: the case of the Arabian oryx. **Animal Conservation**, London, v. 2, pp. 269-278. 1999.

MARTINELLI, B.M. **Marcadores moleculares e o melhoramento genético de espécies florestais**. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/bioano01/div39.htm>. Acessado em: 27 nov. 2013.

MARTINS, K.; CHAVES, L.J.; BUSO, G.S.C.; KAGEYAMA, P.Y. Mating system and fine-scale spatial structure of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 7, p. 957-969, 2006.

MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; VENCovsky, R.; KAGEYAMA, P.Y. Genetic structure based on nuclear and chloroplast microsatellite locos of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. (Solanaceae) in Central Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, p. 665-677, 2011.

MATTHIES, D.; BRAUER, I.; MAIBOM, W.; TSCHARNTKE, T. Population size and the risk of local extinction: empirical evidence from rare plants. **Oikos**, Lund, v. 105, p. 481-488, 2004.

MCCOUCH S.R.; CHEN X.; PANAUD O.; TEMNYKH S.; XU Y.; CHO Y. G.; HUANG N.; ISHII T.; BLAIR M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p. 89–99, 1997.

MILLER, M. **Tools for population genetic analyses (TFPGA) version 1.3**: a windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data, 1997. Disponível em: <<http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>>. Acesso em: 25 nov. 2013.

MOILANEN, A.; HANSKI, I. On the use of connectivity measures in spatial ecology. **Oikos**, Lund, v. 95, n. 1, p. 147-151, 2001.

MORELLATO, L.P.C.; LEITÃO FILHO, H.F. Reproductive phenology of climbers in a Southeastern Brazilian Forest. **Biotropica**, Hoboken, v. 28, p.180-191, 1996.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWEL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genome. **Nature Genetic**, London, v.30, p. 194-200, 2002.

MORIN, P.A.; WALLIS, J.; MOORE, J.J.; WOODRUFF, D.S. Paternity exclusion in a community of wild chimpanzees using hypervariable simple sequence repeats. **Molecular Ecology**. Oxford, US, v. 3, p. 469-477, 1994.

MUELLER U.G.; WOLFENBARGER L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v. 14, n.10, p. 389-394, 1999.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; da FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, 2000.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, **Genetics**, Pittsburgh, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NOGUEIRA, J.C.B. **Reflorestamento heterogêneo com essências indígenas**. São Paulo: Instituto Florestal, 1977. 71p. (IF. Boletim Técnico, 24).

NOGUEIRA, J. C. B. **Reflorestamento misto com essências nativas**: a mata ciliar. São Paulo: Instituto Florestal, 2010. 148 p.

NUNNEY, L.; CAMPBELL, K.A. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. **Trends in Ecology & Evolution**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 234-239, 1993.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 294-307, 2006.

PARK, S.D.E. **Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection**. 2001. Thesis (PhD) – University of Dublin, Dublin, 2001.

PEAKALL R., SMOUSE P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, US, v. 6, p. 288-295, 2006.

PAETKAU, D.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 3, p.489-495, 1994.

Paquette, S.R. **PopGenKit: Useful functions for (batch) file conversion and data resampling in microsatellite datasets**. R package version 1.0. <<http://cran.r-project.org/package=PopGenKit>. 2012.

PENG, Y.; CHEN, K. Phylogeographic Pattern of *Populus cathayana* in the Southeast of Qinghai-Tibetan Plateau of China Revealed by cpSSR Markers. **Silva Fennica**, Vantaa, v. 45, n. 4, p. 583-594, 2011.

PERRIER, X.; FLORI, A.; BONNOT, F. Data analysis methods. In: HAMON, P., SEGUIN, M., PERRIER, X, GLASZMANN, J. C. Ed., **Genetic diversity of cultivated tropical plants**. Montpellier: Enfield, Science Publishers, 2003. p. 43-76.

PETIT, R.J.; DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G.G. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant population. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 14, p. 689-701, 2005.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FREIRE, J.M.; SILVA, L.D. Parâmetros genéticos para colheita de sementes de espécies florestais. In: PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FREIRE, J.M.; LELES, P.S.S.; BREIER, T.B. **Parâmetros técnicos para a produção de sementes florestais**. Seropédica: EDUR/UFRRJ. 2007. p. 51-104.

PIRANI, J.R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: EDUSP/FAPESP. 1993. 192 p.

PIRY, S.; LUIKART G.; CORNUET, J.M. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, Newport, v. 90, n. 4, p. 502-503, 1999.

PIZZO, M.A. Seed dispersal and predation in twopopulation of *Cabralea canjerana* (Meliaceae) in the Atlantic forest of southeastern Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, Winchelsea, v. 13, p. 559-577, 1997.

PROVAN, J.; BISS, P.M.; MCMEEL, D.; MATHEWS, S. Universal primer for the amplification of chloroplast microsatellites in grasses (Poaceae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, US, v. 4, p. 262-264, 2004.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; MCDEVITT, R.; VENDRAMIN, G.G.; RAFASLKI, J. A. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to population genetics of pines. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v.92, 1995, p.7759-7763.

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. *Biologia da conservação*. Londrina: E. Rodrigues, 2001. 327 p.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Washington v. 155, n.2, p. 945-959, 2000.

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical crops: Dicotyledons**. London: Longman, Green, 1968. 346 p.

PUTZ, S., GROENEVELD, J., ALVES, L., METZGER, J., HUTH, A. Fragmentation drives tropical forest fragments to early successional states: A modelling study for Brazilian Atlantic forests. **Ecological Modelling**, Towson, v. 222, n. 12, p.1986-1997, 2011

RAFALSKY, J.A.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; VOGEL, J.M.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. (Ed.). **Analysis of non mammalian genomes - a practical guide.**, New York: Academic Press, 1996. p. 75-134.

RAJORA, O.P.; RAHMAN, M.H.; BIUCHERT, G.P.; DANCİK, B.P. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v.9, p.339-348, 2000.

RAFALSKI, J.A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: Birren, B.; Lai, E. **Nonmammalian genome analysis: a practical guide.** San Diego: Academic Press, 1996. p.75-134.

RAMOS, D.F.; LEITÃO, G.G.; COSTA, F.N.; ABREU L.; VILLARREAL, J.V.; LEITÃO, S.G.; FERNANDEZ, L.S.L.; SILVA, P.E.A. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 4, n. 44, 2008.

RAUBESON, L.A.; PEERY, R.; CHUMLEY, T.W.; DZIUBEK, C.; FOURCADE, H.M.; BOORE, J.L.; JANSEN, R.K. Comparative chloroplast genomics: analyses including new sequences from the angiosperms *Nuphar advena* and *Ranunculus macranthus*. **BMC Genomics**, London, v. 8, p. 174, 2007.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, Newport, v. 86, p. 248-249, 1995.

REED, D.H. Relationship between population size and fitness. **Conservation Biology**, Washington, DC, v. 19, p. 563-568, 2005.

REIS, A.; FANTINI, A.C.; REIS, M.S. DOS; GUERRA, M.P.; DOEBELI, G. Aspectos sobre a conservação da biodiversidade e o manejo da floresta tropical Atlântica. **Revista do Instituto Florestal**. São Paulo, v.4, n. 1, p.169-173, 1992.

REIS, A.; ESPÍNDOLA, M.B.; VIEIRA, N.K. Restauração de áreas degradadas: a nucleação como base para os processos sucessionais. **Natureza & Conservação**, Goiânia, p. 28-36, 2003.

REYNOLDS, L.; KAREN, K.; MCGLATHERY, J.; WAYCOTT, M. Genetic diversity enhances restoration success by augmenting ecosystem services. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, p. 38-39, 2012.

RIBEIRO, J.F.; FERREIRA, J.N. Germinação de sementes de *Piptadenia gonoacantha* Mart. Sob inundaço. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTNICA, 51., 2000, Braslia. **Resumos...** Braslia: Sociedade Botnica do Brasil, 2000. 143 p.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, Boston, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.

RING, I. **Public and Private in Natural Resource Governance: A False Dichotomy?** Earthscan, London: Ch. Biodiversity governance: Adjusting local costs and global benefits, 2008. p. 107-126.

RODRIGUES, R.R.; LEITO FILHO, H.F.; CRESTANA, M.S.M. Regenerao do entorno da represa de abastecimento de gua do municpio de Iracempolis/ SP, In: SIMPSIO NACIONAL DE RECUPERAO DE REAS DEGRADADAS, 1992, Curitiba. **Anais...** Curitiba: FUPAF, 1992. p. 406-414.

RODRIGUES, P.J.F.P.; NASCIMENTO, M.T. Fragmentao Florestal: Breves Consideraes Tericas sobre Efeitos de Borda. **Rodrigusia**, Rio de Janeiro, v. 57, p. 63-74, 2006.

RODRIGUES, R.R.; BRANCALION, P.H.S.; ISERNEIAGEN, I. **Pacto pela restaurao da Mata Atlntica Referencial dos conceitos e aes de restaurao florestal** So Paulo: LERF/ESALQ. 2009. 260 p.

RODRIGUES, R.R.; LIMA, R.A.F.; GANDOLFI, S.; NAVE, A.G. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, Boston, v. 142, p. 1242–1251, 2009.

RODRIGUES, R.R., GANDOLFI, S., NAVE, A.G., ARONSON, J., BARRETO, T.E., VIDAL, C.Y., BRANCALION, P.H.S. Large-scale ecological restoration of high diversity tropical forests in SE Brazil. **Forest Ecology and Management**, Fort Collins, v. 261, p. 1605–1613. 2011.

RODRIGUES, R.R.; GANDOLFI, S. Recomposição de florestas nativas: princípios gerais e subsídios para uma definição metodológica. **Revista Brasileira de Horticultra Ornamental**, Campinas, v. 2, p. 4-15, 1996.

ROHLF, F.J. **NTSYS-Pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Publisher, 1989. 210p.

ROSENBERG, N. A. **Distruct**: a program for the graphical display of population structure. Los Angeles: University of Southern California. 2003. Disponível em: <<http://www.cmb.usc.edu/~noahr/distruct.html>>. Acesso em: 27 nov. 2013.

SALVADOR, J.L.G.; OLIVEIRA, S.B. **Reflorestamento ciliar de açudes**. São Paulo: CESP. 1989. 14p. (CESP. Série Divulgação e Informação, 123).

SAVOLAINEN, O.; LASCOUX, M.; MERILÄ J. Ecological genomics of local adaptation. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 14, p. 807-820, 2013.

SCHLÜTER P.M.; HARRIS S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, US, v. 6, p. 569-572, 2006.

SCHLÖTTERER C.; TAUTZ D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 20, p. 211–215, 1992.

SEBBENN, A.M. Número de populações para a conservação genética in situ de espécies arbóreas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 45-51, 2003.

SER – SOCIETY FOR ECOLOGICAL RESTORATION. 2004. Science & Policy Working Group. The SER international primer on ecological restoration. Disponível em: <<http://www.ser.org/>>. Acessado em: 20 jan 2014.

SERRÃO, S.M. **Para Além dos Limites da Mata**: uma discussão sobre o processo de preservação da reserva da Mata de Santa Genebra. 2002. 251 p. Tese (Doutorado.) Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2002.

SEZEN, U.U.; CHAZDON, R.L.; HOLSINGER, K.E. Genetic consequences of tropical second-growth forest regeneration. **Science**, Washington, DC, v. 307, p. 1-891. 2005.

SIQUEIRA, L.P. **Monitoramento de áreas restauradas no interior do Estado de São Paulo**. 2002. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Austin, v. 139, p. 457-462, 1995.

SMITH-RAMÍREZ, C.; ROVERE, A.E.; NÚÑEZ-ÁVILA, M.C.; ARMESTO, J.J. Habitat fragmentation and reproductive ecology of *Embothrium cocineum*, *Eucryphia cordifolia* and *Aextoxicon punctatum* in Southern Temperate Rainforests. In: NEWTON, A.C. **Biodiversity loss and conservation in fragmented forest landscapes**. Wallingford: CABI, 2007. 416p.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973. 12p.

SORK, V.L., SMOUSE, P.E. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. **Landscape ecology**, Tempe, v. 21, p. 821-826, 2006.

SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (Inpe), 2014. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período de 2010 a 2011**. Disponível em: <<http://www.sosmatatlantica.org.br>>. Acessado em: 20 jan 2014.

SOUZA, A.F.; MARTINS, F.R. Spatial variation and dynamics of flooding, canopy openness, and structure in a Neotropical swamp forest. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 180, p.161-173, 2005.

STAPLEY J, REGER J, FEULNER PGD, SMADJA C, GALINDO J, EKBLOM R, BENNISON C, BALL AD, BECKERMAN AP, SLATE J Adaptation Genomics: the next generation. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 25, p. 705-712, 2010.

SZPIECH, Z.A.; JAKOBSSON, M. Y.; ROSENBERG N. A. ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. **Bioinformatics**, Oxford, UK, v. 24, p. 2498-2504, 2008.

TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C.; GASCON, C. Forest fragmentation synergisms and the impoverishment of neotropical forests. **Biodiversity and Conservation**, Madrid 13:1419-1425. 2004.

TARAZI, R.; MANTOVANI, A.; REIS, M.S. Fine-scale spatial genetic structure and allozymic diversity in natural populations of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 11, p. 965-976, 2009.

TAMBARUSSI, E.V.; MORI, E.S.; ZIMBACK, L. Estrutura genética de populações de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. por meio de marcadores moleculares RADP. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, Garça, v. 12, p.1–15, 2008.

TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. **Isoenzimas**: variabilidade genética em plantas. Ribeirão Preto: SBG, 1995, 186p.

VEKEMANS X.; BEAUWENS, T.; LEMAIRE, M.; ROLDAN-RUIZ, I. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 11, p. 139-151, 2002.

VEKEMANS, X.; HARDY, O.J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 13, p. 921–935, 2004.

VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. **A classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE. 1991.123 p.

VENDRAMIN, G.G.; LELLI, L.; ROSSI, P.; MORGANTE, M. A set of primer for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 5, p. 595-598, 1996.

VEKEMANS, X.; HARDY, O.J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, US, v. 13, p. 921–935, 2004.

VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. *Revista brasileira de genética*, v.15, n.1, 1992. p.53-60.

VIDAL, M.M.; PIVELLO, V.R.; MEIRELLES, S.T.; METZGER, J.P. Produção de serapilheira em floresta Atlântica secundária numa paisagem fragmentada (Ibiúna, SP): importância da borda e tamanho dos fragmentos. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, p. 521-532, 2007.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN, DE LEE T.; HORNES, M.; FRIJTERS A.; POT J.; PELEMAN J.; KUIPER M.; ZABEAU M. AFLP: a new technique for DNA fringerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WAPLES, R. S. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene locos. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 7, p. 167–184, 2006.

WAPLES, R.S.; DO, C. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, US, v. 8, p. 753–756, 2008.

WEIR, B.S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics**, Lawrence, 35: 235-354. 1979.

WEISING, K.; GARDNER, R.C. A set of consented per primer for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, Ottawa, v. 42, p. 9-19, 1999.

WHITMORE, T.C. **An introduction to tropical rain forests**. Oxford: Clarendon Press. 1998. 282 p.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, Austin, v. 16, p. 97-159, 1931.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**: variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 573 p.

YEH, F.C., YANG, R.C.; BOYLE T.B.J.; YE, Z.H; MAO, J.X. **POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis**. Alberta: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta. 1997.

YEEH, Y.; KANG, S.S.; CHUNG, M.G. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Shangai, v.37, n.1, p.141-146, 1996.

YOUNG, A.G.; BOYLE, T.J. Forest fragmentation. In: Young, A.G.; Boshier, D.; Boyle, T.J (eds.) **Forest conservation genetics: principles and practice**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. p. 123–134.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trands in Ecology and Evolution**, London, v. 11, p. 413-418, 1996.