UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**DIVERSIDADE GENÉTICA, FLUXO GÊNICO E SISTEMA DE CRUZAMENTO DE
ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.) BRENAN E *ANADENANTHERA PEREGRINA*
(L.) SPEG: DUAS ESPÉCIES QUE OCORREM EM ALTA DENSIDADE NO INTERIOR DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Juliana Massimino Feres

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, Área de
Concentração: Genética.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

JULIANA MASSIMINO FERES

**DIVERSIDADE GENÉTICA, FLUXO GÊNICO E SISTEMA DE CRUZAMENTO DE
ANADENANTHERA COLUBRINA (VELL.)BRENAN E *ANADENANTHERA PEREGRINA*
(L.) SPEG: DUAS ESPÉCIES QUE OCORREM EM ALTA DENSIDADE NO INTERIOR DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Genética.

ORIENTADORA: PROF^A. DR^A. ANA LILIA ALZATE MARIN

RIBEIRÃO PRETO – SP

2013

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Feres, Juliana Massimino

**Diversidade genética, fluxo gênico e sistema de cruzamento de *Anadenanthera colubrina* (VELL.)Brenan e *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg: duas espécies que ocorrem em alta densidade no interior do Estado de São Paulo, 2013.
162p.**

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: Genética.

Orientadora: Ana Lilia Alzate-Marin

1. Mimosaceae, 2. microssatélite, 3. autofecundação , 4. estrutura genética espacial, 5. angico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Programa de Pós Graduação em Genética do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, bem como todos os docentes e funcionários que o compõe, pela oportunidade da realização deste doutoramento.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de Doutorado concedidas; ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA), Pró Reitoria de Pós Graduação da Universidade de São Paulo e CAPES-PROEX pelo apoio financeiro.

A Prof^a. Dr^a. Ana Lilia Alzate Marin, pela orientação, dedicação e confiança depositados em mim no desenvolvimento desse trabalho. Agradeço pela oportunidade, pelas experiências e, acima de tudo, pela compreensão diante de alguns dos momentos difíceis que passei durante a realização desse trabalho.

Ao prof. Dr. Antônio Moacyr Mestriner pelo auxílio e dedicação na manutenção do laboratório de Genética Vegetal do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Gratidão também por sua alegria, carinho e respeito sempre presentes em todas as vezes que nos encontramos.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Martinez Y Huaman por sempre oferecer apoio e atenção ao nosso grupo de pesquisa e a Professora Dra. Zilá Luz Paulino Simões, por sempre disponibilizar a estrutura de su laboratório para nosso grupo de pesquisa.

Aos docentes Dr. Ademilson Espencer Egea Soares e Dr^a Silvana Giuliatti (coordenador e vice-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP/USP) pelo constante incentivo e apoio ao nosso grupo de pesquisa, especialmente nos momentos de maior dificuldade.

Aos pesquisadores Dra. Maria Imaculada Zucchi, Dra. Mariza Monteiro, Dra. Aluana Abreu e Dr. José Baldin Pinheiro pela grande contribuição no desenvolvimento dos marcadores microsatélites imprescindíveis para esse trabalho.

À Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldmam e sua técnica Andréa Carla Quiapim da Silva do laboratório de Biologia Molecular de Plantas pela valiosa ajuda com o sequenciamento das bibliotecas genômicas.

Aos membros da banca examinadora por participarem desta etapa tão importante da minha formação, oferecendo especiais contribuições ao trabalho.

Aos técnicos, Antônio Justino da Silva (Prefeitura da USP/RP) e Marco Aurélio Cândido dos Reis (Associação Verde Tambaú), pelo auxílio imprescindível na pesquisa de campo, pelos ensinamentos e experiências vividas. Aos colegas Rafael Campos, Matheus da Silva Mayor e Gabriel Clemente pela ajuda em campo. Sem a força, dedicação e carinho de vocês eu jamais teria conseguido material biológico para esse doutoramento.

Aos funcionários do viveiro de mudas da Prefeitura do Campus da USP/RP, Flávio e Fláusio, pela colaboração no plantio e tratamentos fornecidos às mudas, pelos bons momentos de descontração e pelo carinho e respeito que sempre me trataram.

Ao querido Dr. Leonardo Borges, cujo vasto conhecimento em taxonomia de plantas permitiu que eu conseguisse fazer as coletas para esse trabalho.

A todos os docentes, alunos e funcionários do Bloco B do Departamento de Genética pelo acolhimento, convívio agradável, além dos conselhos acadêmicos e pessoais que tornaram os dias de trabalhos mais divertidos e felizes. Com certeza sentirei muitas saudades dessa “família”. Gostaria de deixar um abraço especial para Camila, Edna, Maria, Ana Lúcia, Rosana, Edilene, Geusa, Paulo e Professora Eucléia, por todos os momentos de descontração, desabafo, acolhida, empatia e carinho por mim e minha família!

Aos colegas do Laboratório de Genética Vegetal, presentes e passados: Marcela, Ronai, Rômulo, Fernanda, Alison, Marcelo, Matheus, Klaus, Ariany, Fernando e Paulo pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional diários, companhia para as alegrias e tristezas da Pós Graduação. Juntos vencemos desafios! Obrigada de todo coração.

À minha eterna amiga Dra. Marcela Corbo Guidugli por tudo. Não tenho palavras que possam descrever o quanto sou grata por ter tido você como companheira de trabalho e de vida nesses anos todos.

Ao meu querido amigo e padrinho Dr. Alison Nazareno. Pessoa que me incentiva, acompanha (mesmo a quilômetros de distância) e ensina quase todos os dias da minha vida. Com seu carinho e paciência seguimos nossos trabalhos juntos!

A melhor e mais bonita surpresa que o último ano de doutorado me trouxe, Fernando Bonifácio, sou eternamente grata. Cuidou de mim e do meu filho antes mesmo de ele nascer. Sempre preocupado e prestativo. Você, carrego para sempre nos melhores pesamentos.

Ao meu companheiro Renato gostaria de poder registrar as lágrimas de eterna gratidão que me escapam ao tentar formular frases à altura do seu merecimento. Foram noites em claro, coletas, leituras e até géis compartilhados! Incentivo e apoio pautados no mais sincero amor. Sem você eu não conseguiria! Obrigada por você, pai do meu filho, existir na minha vida! Te amo!

Aos meus pais Carmem e Edgar, à minha irmã Mariana e às minhas avós, Leonor e Geny (quem sempre estará no meu coração), pelo amor incondicional dedicado a mim, sem o qual não teria força, coragem e perseverança suficientes para concluir essa tese. Por cuidarem de todos os detalhes para que esta etapa não comprometesse o desenvolvimento do Francisco em todos os sentidos. Tudo o que sou e tudo aquilo que eu poderei alcançar é fruto da cumplicidade e apoio da minha família, pela qual não tenho palavras para expressar a imensidão do meu amor.

Ao Francisco, meu grande amor, agradeço por me trazer de volta à vida! Por retomar valores familiares! Por me tirar da inércia do sistema e reorganizar prioridades. Por me mostrar o significado do verdadeiro sorriso e a dor da lágrima mais sentida que alguém pode ter. Agora, acima de tudo e antes de qualquer coisa, sou tua mãe!

Sumário

Resumo	12
Abstract	14
Introdução	16
Florestas, recursos genéticos e conservação.....	16
O gênero <i>Anadenanthera</i> : as espécies de angico	21
A região de Ribeirão Preto e o gênero <i>Anadenanthera</i>	29
Literatura citada	32
Objetivos	38
Organização geral da tese	39
CAPÍTULO I - Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites para <i>Anadenanthera colubrina</i> e transferibilidade para <i>Anadenanthera peregrina</i>	40
Resumo	41
1. Introdução	42
2. Material e Métodos	44
2.1. Identificação das espécies de angico	44
2.2. Locais de estudo.....	45
2.3. Extração e quantificação de DNA.....	46
2.4. Desenvolvimento de marcadores microsatélites	46
<i>Banco enriquecido em microsatélites</i>	46
<i>Extração de DNA plasmidial e sequenciamento</i>	49
<i>Análise das sequências</i>	50
<i>Desenho dos primers</i>	51
2.3. Ensaios de amplificação e polimorfismos dos marcadores microsatélites	51
2.4. Estudos de amplificação heteróloga.....	52
2.5. Revelação das bandas de DNA e determinação fenotípica.....	52
<i>Eletroforese</i>	52
<i>Coloração do gel com nitrato de prata e secagem</i>	53
<i>Determinação fenotípica</i>	54
2.6. Análises estatísticas.....	54
<i>Estimativa do desequilíbrio de ligação</i>	54
<i>Caracterização da diversidade genética</i>	55
3. Resultados e discussão.....	55
3.1. Desenvolvimento e ensaios de amplificação dos marcadores microsatélites	55
3.2. Estudo de polimorfismo dos locos SSR desenvolvidos para <i>Anadenanthera</i> <i>colubrina</i>	61
3.3. Estudos de amplificação heteróloga em <i>Anadenanthera peregrina</i>	64
4. Literatura citada	69

CAPÍTULO II –Diversidade e estrutura genética espacial de <i>Anadenanthera colubrina</i> e <i>Anadenanthera peregrina</i> em angicais na região de Ribeirão Preto (SP).....	74
Resumo	75
1. Introdução	76
2. Material e métodos	78
2.1. Locais de estudo.....	78
2.2. Extração DNA	81
2.3. Análise dos SSR	81
2.4. Análises estatísticas.....	81
<i>Análise da diversidade genética e endogamia</i>	81
<i>Divergência genética entre as populações</i>	82
<i>Aderência ao equilíbrio de mutação e deriva</i>	82
<i>Análise da distribuição espacial dos genótipos</i>	83
3. Resultados e discussão	83
3.1. Diversidade genética, endogamia e divergência genética populacional em <i>Anadenanthera colubrina</i>	83
3.2. Diversidade genética, endogamia e divergência genética populacional em <i>Anadenanthera peregrina</i>	87
3.3. Aderência ao equilíbrio de mutação e deriva	92
3.4. Análise da distribuição espacial dos genótipos	93
4. Literatura citada.....	98
CAPÍTULO III – Sistema de cruzamento e fluxo gênico de <i>Anadenanthera colubrina</i> e <i>Anadenanthera peregrina</i> em angicais na região de Ribeirão Preto (SP).....	103
Resumo	104
1. Introdução	105
2. Material e métodos	107
2.1. Local de estudo.....	107
<i>Anadenanthera colubrina</i>	107
<i>Anadenanthera peregrina</i>	109
2.2. Coleta do material biológico	110
<i>Anadenanthera colubrina</i>	110
<i>Anadenanthera peregrina</i>	110
2.3. Obtenção de sementes e produção de mudas.....	110
<i>Anadenanthera colubrina</i>	110
<i>Anadenanthera peregrina</i>	111
2.4. Extração e quantificação de dna.....	111
2.5. Marcadores microssatélites, ensaios de amplificação multiplex e eletroforese	111
2.6. Análises estatísticas.....	113
<i>Análise de desequilíbrio de ligação</i>	113
<i>Análise de diversidade genética e endogamia</i>	114
<i>Análises do sistema de reprodução, coancestria e tamanho efetivo da população</i>	114
<i>Fluxo gênico contemporâneo via pólen</i>	116

3. Resultados e discussão	117
3.1. <i>Anadenanthera colubrina</i>	117
<i>Análise de desequilíbrio de ligação</i>	117
<i>Análise de diversidade genética e endogamia</i>	118
<i>Sistema de reprodução</i>	122
<i>Correlações entre sucesso reprodutivo vs. sistema de cruzamento</i>	127
<i>Fluxo de pólen</i>	129
3.2. <i>Anadenanthera peregrina</i>	133
<i>Análise de desequilíbrio de ligação</i>	133
<i>Análise de diversidade genética e endogamia</i>	134
<i>Sistema de reprodução</i>	138
<i>Correlações entre sucesso reprodutivo vs. sistema de cruzamento em</i> <i>Anadenanthera peregrina</i>	142
<i>Fluxo gênico</i>	142
<i>Considerações finais</i>	147
4. Literatura citada	150

Lista de Figuras

- Figura 1. Ocorrência natural de *Anadenanthera colubrina* (A) e suas variedades *cebil* (B) e *colubrina* (C) no Brasil. Retirado e modificado de Morim (2013). 22
- Figura 2. Fotos de *Anadenanthera colubrina* e *peregrina* ilustrando características vegetativas e reprodutivas. Destaque para o fuste (A), frutos (B), flores (C) e súber (D) de *A. colubrina*, além do fuste (E); frutos (F), súber (G) e flores e folhas (H) de *A. peregrina*..... 25
- Figura 3. Ocorrência natural de *Anadenanthera peregrina* (A) e suas variedades *falcata* (B) e *peregrina* (C) no Brasil. Retirado e modificado de Morim (2013). 26
- Figura 4. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em SSR: digestão do DNA genômico, ligação dos adaptadores Rsa21 e Rsa25 e pré-amplificação com o primer Rsa21. (Retirado, traduzido e modificado de Zane et al., 2002) 47
- Figura 5. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em microssatélites: hibridação de sondas (biotiniladas) de microssatélites com o DNA digerido e amplificado, e seleção dos fragmentos por magnetização. (Retirado, traduzido e modificado de Zane et al., 2002)..... 48
- Figura 6. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em microssatélites: fragmentos de DNA enriquecido com microssatélites amplificados novamente usando o oligonucleotídeo Rsa21; ligação ao vetor de clonagem *pGEM-T Vector System*, Promega e seleção das colônias recombinantes. (Retirado, traduzido e modificado de Zane et al., 2002)..... 49
- Figura 7. Foto mostrando o sistema de eletroforese vertical usado durante o procedimento de genotipagem adotado no presente trabalho. 53
- Figura 8. A) Gel de agarose com amostras de DNA digerido com RsaI dando destaque (seta vermelha) para a espécie *A. colubrina*, em que houve uma ótima digestão, evidente pela presença de fragmentos entre 300 e 600 pb. B) Padrão de amplificação para 8 clones de microssatélites obtidos a partir da biblioteca construída com o DNA de *A. colubrina*..... 56
- Figura 9. Esquema mostrando as etapas no desenvolvimento de primers SSR e as taxas médias de atrito encontradas em cada uma delas. (Retirado e modificado de Squirrell et al., 2003)..... 61
- Figura 10. Indivíduos de *A. colubrina* e *A. peregrina* (A e B) genotipados com Acol 01, mostrando o monomorfismo em *A. colubrina*; Indivíduos de *A. colubrina* genotipados com Acol 17 (C) e Acol 03 (D), não amplificados em *A. peregrina*. 67
- Figura 11. Mapa do município de Ribeirão Preto mostrando a localização das 37 áreas visitadas para a escolha dos locais de coleta de angico para a realização desse trabalho..... 80
- Figura 12. Mapa mostrando a localização das áreas de coleta de *A. colubrina* e *A. peregrina* escolhidas para a realização deste trabalho. 80
- Figura 13. Estrutura genética espacial na geração adulta de *A. colubrina* localizada no angical Acol\USP (A) e no Acol\BP (B). A linha contínua refere-se à estimativa

do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se à estimativa do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade da hipótese de ausência de estrutura genética espacial ($H_0: \theta_{xy} = 0$). 94

Figura 14. Estrutura genética espacial na geração adulta de *A. peregrina* nos angicais: Aper/SP255 (A), Aperl\USP (B) e Aperl\Faz (C). A linha contínua refere-se à estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se à estimativa do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade da hipótese de ausência de estrutura genética espacial ($H_0: \theta_{xy} = 0$). 95

Figura 15. Mapa indicando a localização das árvores adultas de *A. colubrina* em Acol/BP amostradas.108

Figura 16. Mapa indicando a localização das árvores adultas de *A. peregrina* em Aper/SP-255 e Aper/Faz amostradas.109

Figura 17. Padrão de doação de pólen por árvore matriz de *Anadenanthera colubrina* analisada.130

Figura 18. Distância de dispersão de pólen para a espécie *Anadenanthera colubrina* determinada por análises de paternidade em progênies de polinização aberta....130

Figura 19. Padrão de doação de pólen por árvore reprodutiva de *Anadenanthera peregrina* analisada.146

Lista de Tabelas

Tabela 1. Efeitos genéticos esperados da degradação de habitats (Traduzida e modificada de Lowe et al., 2005).....	19
Tabela 2. Espécies florestais brasileiras cujo sistema reprodutivo foi estudado.....	20
Tabela 3. Área e porcentagem de remanescente vegetacional e reflorestamentos em Ribeirão Preto (SIFESP, 2009).....	30
Tabela 4. Relação dos locos microssatélites desenvolvidos para <i>A. colubrina</i>	59
Tabela 5. Condições de amplificação dos marcadores microssatélites desenvolvidos para <i>A. Colubrina</i>	60
Tabela 6. Desequilíbrio de ligação entre os locos microssatélites de <i>A. colubrina</i>	62
Tabela 7. Características dos 14 locos polimórficos de <i>A. colubrina</i>	64
Tabela 8. Características dos locos microssatélites transferidos para <i>A. peregrina</i>	65
Tabela 9. Diversidade genética e endogamia de 14 locos microssatélites em árvores adultas de <i>Anadenanthera colubrina</i> . N é o número de indivíduos genotipados; K é o número total de alelos; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_E e H_0 são a heterozigosidade esperada e observada, respectivamente; f é o índice de fixação.	84
Tabela 10. Diversidade genética e endogamia de 14 locos microssatélites em dois angicais de <i>Anadenanthera colubrina</i> . K é o número médio de alelos por locos; H_E é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_0 é a heterozigosidade observada; f é o índice de fixação.	85
Tabela 11. Parâmetros de diferenciação genética entre as populações de <i>A. colubrina</i> . F_{st} é a diferenciação genética entre as populações segundo Wright; G_{st}' é a diferenciação genética entre as populações segundo Hedrick.	87
Tabela 12. Diversidade genética e endogamia de 14 locos heterólogos de microssatélites em árvores adultas de <i>Anadenanthera peregrina</i> . N é o número de indivíduos genotipados; K é o número total de alelos; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_E é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_0 é a heterozigosidade observada; f é o índice de fixação.	88
Tabela 13. Diversidade genética e endogamia de 14 locos microssatélites em angicais de <i>Anadenanthera peregrina</i> . K é o número total de alelos; H_E é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_0 é a heterozigosidade observada; f é o índice de fixação.	89
Tabela 14. Parâmetros de diferenciação genética entre os angicais de <i>A. peregrina</i> na geração de adultos. F_{st} é a diferenciação genética entre as populações segundo Wright; G_{ST}' é a diferenciação genética entre as populações segundo Hedrick.....	90
Tabela 15. Parâmetros de diferenciação genética entre os angicais de <i>A. peregrina</i> na geração de adultos segundo Hedrick (G_{ST}') e distância aproximada entre os angicais em quilômetros. G_{ST}' é a diferenciação genética entre as populações.....	90

Tabela 16. Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para os angicais de <i>Anadenanthera colubrina</i> e <i>Anadenanthera peregrina</i> . N é o número esperado de locos com excesso de heterozigosidade sob o modelo.....	92
Tabela 17. Sequências dos <i>primers</i> microssatélites de <i>A. colubrina</i> e <i>A. peregrina</i> utilizados nesta pesquisa.....	112
Tabela 18. Condições das reações de PCR biplex testadas.	113
Tabela 19. Desequilíbrio de ligação entre os locos microssatélites de <i>A. colubrina</i> . Os valores na tabela são as probabilidades após 1.000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,001190.....	118
Tabela 20. Poder de exclusão e diversidade genética de sete locos microssatélites em árvores adultas e progênes de <i>A. colubrina</i> . N é o número de indivíduos analisados; K é o número total de alelos; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_o é a heterozigosidade observada; H_E é a heterozigosidade esperada; $Pr(Ex1)$ e $Pr(Ex2)$ são respectivamente as probabilidades de excluir o primeiro e o segundo parente.	119
Tabela 21. Características de sete locos microssatélites em duas gerações da espécie <i>A. colubrina</i> . Tamanho amostral (N); número total de alelos (K); número efetivo de alelos nos locos (A_e); Riqueza alélica (R); heterozigosidade observada (H_o); heterozigosidade esperada (H_E); índice de fixação (F).....	120
Tabela 22. Parâmetros de diferenciação genética entre as gerações de adultos e progênes de <i>A. colubrina</i> . G_{ST}' é a diferenciação genética entre as populações segundo Hedrick.	122
Tabela 23. Estimativa de parâmetros de sistema de reprodução e endogamia em <i>Anadenanthera colubrina</i>	123
Tabela 24. Estimativas por família dos parâmetros do sistema de reprodução durante um evento reprodutivo da espécie florestal <i>Anadenanthera colubrina</i> . n é o número de progênes analisadas por árvore matriz; t_m é a taxa de cruzamento multiloco; $r_{p(m)}$ é a correlação multiloco de paternidade; Θ_{xy} é o coeficiente de coancestria nas progênes; $N_{e(v)}$ é o tamanho efetivo de variância. EP(95%) é o erro padrão de cada estimativa que o antecede, a 95% de probabilidade.	123
Tabela 25. Proporção média de pares de irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{IA} = \hat{s}$), meios-irmãos [$\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m(1 - \hat{r}_p)$] e irmãos-completos ($\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m \hat{r}_p$) contidos nas progênes de <i>Anadenanthera colubrina</i>	126
Tabela 26. Produção média de sementes viáveis em cada família de polinização aberta analisada e suas respectivas medidas de taxa de cruzamento multiloco (t_m), cruzamento entre parentes ($tm-ts$) e correlação de paternidade ($r_{p(m)}$).....	128
Tabela 27. Perfis do fluxo de pólen para 10 matrizes de <i>Anadenanthera colubrina</i> localizadas em Ribeirão Preto (SP). n , número de progênes; s , autofecundação; A_{ep} , área de vizinhança efetiva de polinização; DP, desvio padrão.....	129

Tabela 28. Desequilíbrio de ligação entre os locos microsatélites de <i>A. peregrina</i> . Os valores na tabela são as probabilidades após 1.000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,0023.	134
Tabela 29. Poder de exclusão e diversidade genética de sete locos microsatélites em árvores adultas e progênes de <i>A. peregrina</i> . N é o número de indivíduos analisados; K é o número total de alelos; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_0 é a heterozigosidade observada; H_E é a heterozigosidade esperada; $Pr(Ex1)$ e $Pr(Ex2)$ são respectivamente as probabilidades de excluir o primeiro e o segundo parente.	135
Tabela 30. Características de sete locos microsatélites em duas gerações da espécie <i>A. peregrina</i> . Tamanho amostral (N); número total de alelos (K); número efetivo de alelos nos locos (A_e); Riqueza alélica (R); heterozigosidade observada (H_0); heterozigosidade esperada (H_E); índice de fixação (F).	136
Tabela 31. Parâmetros de diferenciação genética entre as gerações de adultos e progênes de <i>A. peregrina</i> . G_{ST}' é a diferenciação genética entre as populações segundo Hedrick.	137
Tabela 32. Estimativa de parâmetros de sistema de reprodução e endogamia em <i>Anadenanthera peregrina</i>	138
Tabela 33. Estimativas por família dos parâmetros do sistema de reprodução durante um evento reprodutivo da espécie florestal <i>Anadenanthera peregrina</i> . N é o número de progênes analisadas por árvore matriz; t_m é a taxa de cruzamento multiloco; $r_{p(m)}$ é a correlação multiloco de paternidade; Θ_{xy} é o coeficiente de coancestria nas progênes; $N_{e(v)}$ é o tamanho efetivo de variância e EP é o erro padrão, a 95% de confiança, da estimativa que o antecede.	139
Tabela 34. Proporção média de pares de irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{IA} = \hat{s}$), meios-irmãos [$\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m(1 - \hat{r}_p)$] e irmãos-completos ($\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m \hat{r}_p$) contidos nas progênes de <i>Anadenanthera peregrina</i>	141
Tabela 35. Produção de sementes viáveis em cada família de polinização aberta analisada e suas respectivas medidas de taxa de cruzamento multiloco (t_m), cruzamento entre parentes ($t_m - t_s$) e correlação de paternidade ($r_{p(m)}$).	142
Tabela 36. Perfis do fluxo de pólen para 10 matrizes de <i>Anadenanthera peregrina</i> localizadas em Ribeirão Preto (SP) em que n é o número de progênes amostradas e s é a taxa de autofecundação estimada.	144
Tabela 37. Perfis de distâncias de dispersão de pólen em <i>Anadenanthera peregrina</i>	146

RESUMO

FERES, J.M. **DIVERSIDADE GENÉTICA, FLUXO GÊNICO E SISTEMA DE CRUZAMENTO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA* (VELL.) BRENNAN E *ANADENANTHERA PEREGRINA* (L.) SPEG: DUAS ESPÉCIES QUE OCORREM EM ALTA DENSIDADE NO INTERIOR DO ESTADO DE SÃO PAULO.** 2013. 162F. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Anadenanthera é um gênero botânico pertencente à família Mimosaceae e endêmico da América Latina e Caribe. Compreende duas espécies arbóreas tropicais: *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. (angico, angico vermelho, angico branco, curupay) e *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. (angico, angico preto, angico de casca, angico do cerrado, yopo ou cohoba). As duas espécies são de ocorrência frequente na paisagem da região de Ribeirão Preto, apresentando-se em aglomerados quase monoespecíficos popularmente conhecidos como angicais. Visando contribuir para futuras medidas conservacionistas, o objetivo deste trabalho foi investigar a diversidade genética, o sistema de reprodução, a estrutura genética espacial e o fluxo gênico contemporâneo de *A. colubrina* e *A. peregrina* em angicais da Região de Ribeirão Preto – SP usando como ferramenta de análise um conjunto de marcadores moleculares microssatélites (SSR). Para isso, foram construídas duas bibliotecas enriquecidas para microssatélites usando a espécie *A. colubrina* que resultaram em 20 marcadores SSR testados para a espécie e subsequentemente transferidos para *A. peregrina*. Desses 20 marcadores, 14 foram polimórficos em cada uma das espécies. Através dessa ferramenta molecular, foi possível realizar os estudos de diversidade genética, endogamia e distribuição genética espacial em *A. colubrina* e *A. peregrina* na região de Ribeirão Preto, que acusaram de uma maneira geral, muitas semelhanças entre as duas espécies, bem como entre os angicais de uma mesma espécie. A diferença mais marcante encontrada entre elas foi com relação a estrutura genética espacial, pois todos os angicais de *A. colubrina* apresentaram forte estruturação, enquanto que os de *A. peregrina* demonstraram ter uma dispersão aleatória dos indivíduos. O sistema reprodutivo e o fluxo de pólen nas duas espécies foi acessado usando sete marcadores moleculares microssatélites. Para essas análises foram genotipados indivíduos juvenis e adultos (totalizando 352 de *A. colubrina* e 355 de *A. peregrina*) presentes nos angicais Acol/PB, Aper/SP255 e Aper/Faz. Através das análises constatou-se que ambas as espécies tem sistema de acasalamento misto, embora *A.*

colubrina tenha apresentado uma proporção maior de autofecundação (t_m Acol = 0,619; t_m Aper = 0,905). Também foram encontrados elevados índices de cruzamento entre parentes (t_m-t_s Acol = 0,159; t_m-t_s Aper = 0,216) e parentesco (coancestria), o que resultou num baixo tamanho efetivo populacional para ambas as espécies. As estimativas das taxas de cruzamentos multilocos individuais apresentaram grande variação nas duas espécies, mostrando a flexibilidade do sistema reprodutivo no gênero *Anadenanthera*. O número efetivo de doadores de pólen foi muito baixo para um mesmo fruto (1,10 em *A. colubrina* e 1,24 em *A. peregrina*) e mais alto entre frutos de uma mesma árvore (2,61 em *A. colubrina* e 3,35 em *A. peregrina*), usando a estimativa indireta de correlação de paternidade. Análises de paternidade revelaram distâncias de dispersão de pólen em duas escalas para ambas as espécies. Dessa forma, ocorreram muitos cruzamentos locais, entre árvores próximas no mesmo angical, mas também foram encontradas grandes distâncias de dispersão de pólen. A média da distância de dispersão em *A. colubrina* foi de 299,88 m e de 214,369 m em *A. peregrina*. Alto fluxo de pólen oriundo de árvores externas aos angicais de ambas as espécies foi detectado, indicando que os grupos não são isolados reprodutivamente. Por outro lado, o fluxo gênico crítico foi também muito elevado nas estimativas, provavelmente devido ao baixo poder de exclusão que os locos apresentaram dentro dos angicais de ambas as espécies.

ABSTRACT

FERES, J.M. **GENETIC DIVERSITY, GENE FLOW AND MATING SYSTEM OF *ANADENANTHERA COLUBRINA* (VELL.) BRENNAN AND *ANADENANTHERA PEREGRINA* (L.) SPEG: TWO SPECIES THAT OCCUR AT A HIGH DENSITY IN SÃO PAULO STATE.** 2013. 162 F. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Anadenanthera is a genus of Mimosaceae that is endemic to Latin America and the West Indies and comprises two tropical tree species: *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. (popularly known as angico, angico vermelho, angico branco or curupay) and *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. (angico, angico preto, angico de casca, angico do cerrado, yopo or cohoba). Both species are commonly found in the Ribeirão Preto region, usually as nearly monospecific agglomerates known as “angicais.” To aid future conservationist measures, this work investigated the genetic diversity, gene flow, spatial genetic structure and contemporary mating system of *A. colubrina* and *A. peregrina* in the angicais of Ribeirão Preto Region – SP by analyzing a sample of simple sequence repeat markers (SSR). Two microsatellites libraries were created from *A. colubrina*, providing 20 SSR markers that were tested for that species and later applied to *A. peregrina*. Fourteen out of the 20 markers were polymorphic between the species, allowing an examination of the genetic diversity, endogamy and spatial genetic structure in *A. colubrina* and *A. peregrina* in the Ribeirão Preto region, which revealed several similarities between the two species, as well as among the angicais of a single species. The most remarkable difference between the species was related to the spatial genetic structure, as all angicais of *A. colubrina* presented strong structuration, whereas those of *A. peregrina* exhibited an aleatory dispersion of individuals. The mating system and pollen flow in both species were analyzed through seven SSR. Adults and juveniles from the angicais Acol/PB, Aper/SP255 and Aper/Faz were genotyped for those analyses (352 specimens of *A. colubrina* and 355 of *A. peregrina*), revealing that both species undergo a mixed mating system, although *A. colubrina* presented a higher percentage of self-mating (t_m Acol = 0.619; t_m Aper = 0.905). High indices of mating among relatives (t_m-t_s Acol = 0.159; t_m-t_s Aper = 0.216) and coancestry were also found, resulting in a low effective population size for both species. A wide range in the estimate of the multilocus breeding rate was found for both species, reflecting the plasticity of the mating system in the genus

Anadenanthera. The effective number of pollen donors was very low for a single fruit (1.10 in *A. colubrina* and 1.24 in *A. peregrina*) and higher between fruits from the same tree (2.61 in *A. colubrina* and 3.35 in *A. peregrina*), using an indirect estimate of the paternity correlation. Paternity analyses revealed the distance of pollen dispersion on two different scales: many local outcrossings (between close trees from the same angical) in addition to long-distance pollen dispersion. The average dispersion distance was 299.88 m in *A. colubrina* and 214.369 m in *A. peregrina*. A high pollen flux from trees outside the angicais of both species was observed, indicating a lack of reproductive isolation. However, the gene flow was also very high, likely due to the low power of exclusion presented by loci from both species inside the angicais.

INTRODUÇÃO

FLORESTAS, RECURSOS GENÉTICOS E CONSERVAÇÃO

Os processos de desmatamento de florestas têm sido intensos nas últimas décadas. Exemplo mais marcante desse fato é a devastação de florestas tropicais no mundo, que foi estimada em 9,4 milhões de hectares por ano, dos quais 2,3 milhões correspondem às florestas tropicais úmidas no Brasil (FAO, 2001). Esse intenso desmatamento tem aumentado substancialmente a fragmentação florestal. A fragmentação é definida como o processo em que uma grande área florestal é transformada em pequenas manchas, com área total menor, isoladas por uma matriz diferente do habitat original (Fahrig, 2003). Durante essa formação de mosaicos de habitat, normalmente está associada uma série de outras intervenções na floresta, tais como extração de espécies madeireiras e outras de interesse econômico, caça, queimadas, dentre outras. Todas essas atividades têm efeitos sinérgicos com a fragmentação florestal, contribuindo para a perda acentuada de biodiversidade (Laurance et al., 2001; Tabarelli et al., 2004).

No Brasil, cerca de 1,7 milhões de hectares de florestas são perdidos anualmente (Wright, 2005). Essa situação pode ser ainda mais alarmante com a recente alteração do Código Florestal (Lei 12.651/12). Muitos estudos têm chamado a atenção das comunidades políticas nacionais e internacionais para a ameaça à biodiversidade brasileira que tais mudanças representam (Casatti et al., 2010; Metzger et al., 2010; Nazareno et al., 2011; Ferreira et al., 2012; Nazareno, 2012). Sparovek e colaboradores (2010) chegaram a estimar que 22 milhões de hectares de florestas podem ser legalmente perdidos sob a proposta desse novo código florestal.

Das florestas tropicais brasileiras, a Mata Atlântica está entre as que melhor ilustram a ação predatória das atividades antrópicas aos ambientes florestais. Em um trabalho recente, Ribeiro e colaboradores (2009) analisaram, através de ferramentas de geoprocessamento, 94% da cobertura original de Mata Atlântica no Brasil e encontraram que, dos 139.584.893 ha de mata mapeados, restam apenas 15.719.337 ha de floresta (11.26%) e 658.135 ha (0.47%) de restinga e mangue conservados. Sendo assim, 88,27% da floresta Atlântica original foram perdidos, estando o remanescente distribuído em 245.173 fragmentos florestais (o maior deles localizado na Serra do Mar), dos quais 83,4% são menores que 50 ha (fragmentos menores que 250 ha representam mais que 97% do

remanescente florestal). Para acentuar o processo degradativo, o isolamento médio de tais fragmentos gira em torno 1.441 m (com valores variando de poucos metros a dezenas de quilômetros), sendo os pequenos fragmentos de extrema importância para a diminuição desse isolamento (excluídos os fragmentos menores que 50 ha, a média de isolamento aumentou para 3.532 m) (Ribeiro et al., 2009).

Tais modificações ambientais aliadas ao desconhecimento das exigências culturais, da biologia reprodutiva, da regeneração e do padrão de distribuição genética das diferentes espécies florestais nativas, têm ocasionado uma série de consequências para o ambiente natural (Pinto et al., 2004). Para a biodiversidade, o impacto mais importante dessas atividades é a perda do habitat primário (Lira et al., 2003). Para espécies arbóreas especificamente, a degradação do habitat primário resulta principalmente da fragmentação florestal e da perturbação do ambiente devido aos processos de extração (como a extração seletiva de madeira, por exemplo) (Lowe et al., 2005). Árvores tropicais são tidas como especialmente vulneráveis aos efeitos da degradação de habitat devido às suas características demográficas e reprodutivas como baixa densidade de ocorrência, complexos sistemas de auto-incompatibilidade reprodutiva, elevadas taxas de fecundação cruzada, e interações íntimas com polinizadores e dispersores (Ewers e Didham et al., 2006; Cascante et al., 2002; Dick et al., 2003, Lowe et al., 2005; Ward et al., 2005).

A fragmentação florestal é uma ameaça presente em todos os ecossistemas florestais do planeta. A redução no número de indivíduos, o declínio nos tamanhos populacionais médios e a separação de remanescentes florestais por áreas não florestadas afetam processos genéticos fundamentais das populações (Young e Boyle, 2000). Teoricamente, as mudanças populacionais associadas à degradação do habitat conduzem à erosão da variabilidade genética e ao aumento da divergência genética interpopulacional devido ao aumento da deriva genética e endogamia, além da redução do fluxo gênico (Young et al., 1996; Lowe et al., 2005). Os três efeitos genéticos mais óbvios da fragmentação florestal são: *i*) perda de diversidade genética tanto ao nível populacional quanto de espécie; *ii*) aumento da estrutura interpopulacional, e *iii*) aumento da endogamia (Young e Boyle, 2000; Lowe et al., 2005).

O componente genético da biodiversidade é fundamental, pois é a variação genética que fornece o material básico para a evolução de todas as espécies, seja por processos neutros ou por seleção natural (Allcock et al., 1995). Em curto prazo,

a perda de variabilidade genética pode reduzir a aptidão individual da espécie, inviabilizando o remanescente populacional (Seoane et al., 2000), visto que alelos de autoincompatibilidade podem ser perdidos e alelos deletérios fixados (Huenneke et al., 1991). Em longo prazo, a redução da riqueza alélica deve limitar a capacidade das espécies responderem a mudanças que atuam como forças seletivas (Young et al., 1996). Esses efeitos genéticos da degradação de habitats e suas consequências estão resumidos na Tabela 1.

Por conseguinte, estudos que elucidem os padrões de diversidade genética, sistema reprodutivo, fluxo gênico e estruturação genética espacial irão contribuir, no futuro, para a formulação de estratégias de conservação eficazes e gestão sustentável dos recursos genéticos para espécies que habitam as cada vez mais frequentes paisagens degradadas. No Brasil, esses estudos vêm ganhando ênfase e, nos últimos dez anos, intensificaram-se. Muitas espécies nativas de interesse ecológico-econômico e com risco de extinção estão sendo estudadas e suas características genético-reprodutivas reveladas. A Tabela 2 apresenta uma lista com alguns estudos de espécies florestais brasileiras que tiveram seu sistema reprodutivo e diversidade genética estudados.

Tabela 1. Efeitos genéticos esperados da degradação de habitats (Traduzida e modificada de Lowe et al., 2005).

Efeitos genéticos esperados no habitat perturbado			Característica de Perturbação		Natureza do impacto sobre a variação genética					
Efeito	Consequências	Detecção			Escala Temporal			Escala Organizacional		
					I T	C P	L P	I	P	M
Gargalo genético	Perda alélica após gargalo demográfico	<i>Sign test</i> (teste para gargalo genético)	Redução de tamanho do fragmento		X				X	
Aumento da deriva genética	Perda de alelos raros	<i>Programa R</i>				X			X	
	Perda de alelos comuns	<i>H_E</i>					X			
Aumento da endogamia	< Heterozigosidade	F _{IS} , t _m	Isolamento espacial aumentado entre fragmentos		X	X	X	X	X	
	> depressão endogâmica	Traços de aptidão relacionados								
	Redução da carga genética	Traços de aptidão relacionados				X		X		
Redução do fluxo gênico entre remanescentes florestais	< número de migrantes efetivos	Em relação a geração: N _m					X			X
		Em relação a geração: análises de parentesco, teste de atribuição (ou teste de consignação)			X	X		X	X	
	>diferenciação genética	F _{ST} e análogos					X			X
Efeito fundador	Depressão das taxas de alogamia	Traços relacionados ao <i>fitness</i>							X	
	Perda de alelos	Programa R, <i>Sign test</i> (teste de gargalo genético)	Perda de habitat		X		X		X	

Escala temporal: IT-imediato; CP-curto prazo; LP-longo prazo

Escala de organização: I-individual; P-população; M-metapopulação.

Tabela 2. Espécies florestais brasileiras cujo sistema reprodutivo foi estudado.

Espécies	Taxa de cruzamento media	
	t_m	Autor
<i>Araucaria angustifolia</i>	0,991	Bittencourt e Sebbenn 2007
<i>Carapa guianensis</i>	0,939	Cloutier et al. 2007
<i>Caryocar brasiliense</i>	0,891	Collevatti et al. 2010
<i>Hymenaea courbaril</i>	1,002	Lacerda et al. 2008
<i>Hymenaea courbaril</i>	0,978	Feres et al. 2009
<i>Manilkara huberi</i>	0,995	Azevedo et al. 2007
<i>Swietenia macrophylla</i>	0,938	Lemes et al. 2007
<i>Symphonia globulifera</i>	0,920	Degen et al. 2004
<i>Theobroma cacao</i>	0,964	Silva et al. 2011
<i>Acronomia aculeata</i>	0,650	Abreu et al., 2012
<i>Theobroma grandiflorum</i>	1,000	Alves et al., 2003
<i>Couratari multiflora</i>	1,000	Lepsch-cunha et al., 2011
<i>Dyckia ibiramensis</i>	0,563	Hmeljevski et al., 2011
<i>Tabebuia roseo-alba</i>	0,840 e 0,963	Feres et al., 2012
<i>Tabebuia aurea</i>	0,575 e 0,800	Braga e Collevatti, 2011
<i>Copaifera langsdorffii</i>	0,984	Gonela et al., 2013
<i>Solanum lycocarpum</i>	1.000	Martins et al. 2006

Segundo Allard (1971), são consideradas espécies alógamas todas aquelas que apresentarem nível de cruzamento superior a 90 %, enquanto as autógamas correspondem às espécies que possuem até 10 % de cruzamento. Por sua vez, todas as espécies que se reproduzem utilizando os sistemas sexuais alógamo e autógamo simultaneamente são consideradas como sendo espécies mistas. Estas espécies apresentam taxas de cruzamentos que variam de 10 até 90 % dependendo das condições ambientais e da frequência de polinizadores (Allard, 1975). Goodwillie et al. (2005) sugerem que esta forma de reprodução seja comum entre angiospermas e gimnospermas, compreendendo, em média, 80 % desses grupos ou mais. O levantamento feito durante a revisão bibliográfica dessa pesquisa corrobora essa estimativa para espécies florestais, como pode ser observado na Tabela 2. Neste contexto, estratégias de conservação devem exigir conhecimentos sobre níveis das taxas de fecundação cruzada, cruzamentos correlacionados, cruzamentos entre parentes e autofecundação, pois eles afetam a diversidade genética das novas gerações e, conseqüentemente, determinam a capacidade de resposta de uma espécie à perturbação antrópica. Além disso, o sistema de acasalamento da espécie é determinante do tamanho efetivo populacional, parâmetro este de importância crítica para elaboração dos planos de conservação (Hall et al., 1996).

O GÊNERO *ANADENANTHERA*: AS ESPÉCIES DE ANGICO

De acordo com o Sistema de Classificação de Cronquist, o gênero *Anadenanthera* pertence à família Mimosaceae (Carvalho, 2003) (ou, em outros sistemas, subfamília Mimosoideae dentro de Fabaceae). As Mimosaceae são a menor família de leguminosas, com cerca de 60 gêneros e mais de 2.000 espécies distribuídas nos trópicos, subtropicais e regiões de clima temperado, sendo a América Tropical, África, Ásia e Austrália centros de grande diversidade do grupo (Elias, 1981).

Anadenanthera é um gênero endêmico da América Latina e do Caribe e compreende duas espécies e quatro variedades (Altschul, 1964):

1. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. (angico, angico vermelho, angico branco, curupay):

- variedade *colubrina*, que cresce no Nordeste da Argentina e Sudeste do Brasil;

- variedade *cebil* (Griseb.) Altschul (cebil ou Vilca), que ocorre no Norte da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Peru.

2. *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. (angico, angico preto, angico de casca, angico do cerrado, yopo ou cohoba):

- variedade *peregrina*, que ocorre no Noroeste do Brasil, Guiana, Colômbia, Venezuela e nas Antilhas;

- variedade *falcata* (Benth.) Altschul, que é encontrada no Sul do Brasil e Paraguai.

O gênero foi revisado por Altschul em 1964, o qual sinonimizou *A. macrocarpa* (Benth.) Brenan com *A. colubrina* (Vellozo) Brenan e *A. falcata* (Benth.) Spegazzini como *A. peregrina* (Lineau) Spegazzini (Lorenzi, 2002; Carvalho, 2003). Nos herbários e nas atividades de campo, essas espécies, bem como suas variedades, são frequentemente confundidas, já que os padrões de crescimento, folhas, flores, frutos e caules são muito semelhantes. Segundo Altschul (1964), para diferenciar com precisão as espécies *A. colubrina* e *A. peregrina* é necessário o exame de flores com botões, pois a identificação precisa é obtida através da observação de glândulas nas anteras de *A. colubrina*, as quais estão ausentes em *A. peregrina*. Os frutos, embora variem na forma e em seus caracteres, não garantem a identificação segura das espécies em alguns casos. Nas duas espécies o fruto é um folículo (vagem com uma única fenda longitudinal)

achatado e deiscente, contendo sementes circulares, achatadas, sem asas, brilhantes e de coloração escura (marrom escura a preta) (Lorenzi, 2002).

Etimologicamente, os nomes atribuídos às espécies têm os seguintes significados: *colubrina* vem do latim *coluber*, em alusão à cobra; *peregrina* quer dizer viajante, ou seja, com distribuição ampla; *cebil* é uma palavra de origem espanhola, comum às leguminosas; e em *falcata* o fruto é recurvado do meio para o ápice, como uma foice (Carvalho, 2003).

Do ponto de vista ecológico, as espécies de angico do gênero *Anadenanthera* foram enquadradas no grupo das espécies secundárias (transição de secundária inicial para tardia), para fins de revegetação com espécies nativas no Estado de São Paulo (Ferretti et al., 1995).

Anadenanthera colubrina possui a maior abrangência geográfica do gênero, ocorrendo desde o sul da Bolívia até o norte da Argentina (Morim, 2013). No Brasil (Figura 1A), esta espécie está presente nos domínios fitogeográficos Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, ocorrendo naturalmente no Nordeste (Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina). Segundo Morim (2013), a distribuição de suas duas variedades é:

- Var. *cebil* – Figura 1B: Regiões Nordeste (Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais) e Sul (Paraná, Santa Catarina);
- Var. *colubrina* – Figura 1C- Regiões Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná).

Figura 1. Ocorrência natural de *Anadenanthera colubrina* (A) e suas variedades *cebil* (B) e *colubrina* (C) no Brasil. Retirado e modificado de Morim (2013).

Anadenanthera colubrina é hermafrodita com flores brancas a amareladas, pequenas, perfumadas, reunidas em inflorescências terminais (Figura 3A, B, C e D); o fruto é deiscente por meio de uma fenda única, marrom-escuro, estreito, com 11 a 30 cm de comprimento e 10 a 15 mm de largura, com cinco a quinze sementes (Lima, 1985; Lorenzi, 2002). Os vetores de polinização são principalmente as abelhas e diversos insetos pequenos, que visitam os indivíduos no período de floração (de setembro a outubro, no Rio de Janeiro; de outubro a dezembro, em São Paulo e de novembro a fevereiro, no Paraná); os frutos amadurecem de junho a novembro e permanecem na árvore até a próxima floração. A dispersão de frutos e sementes é autocórica, principalmente barocórica (Lorenzi, 2002). Outra importante característica de *A. colubrina* é a possível existência de efeitos alelopáticos, uma vez que aglomerados de indivíduos dessa espécie são encontrados, não raramente, em talhões de mata praticamente monoespecíficos. A alelopatia tem sido reconhecida como um importante mecanismo ecológico, podendo determinar a dominância vegetal, a sucessão, a formação de comunidades e de vegetação clímax (Melkania, 1992). Nesse sentido, Silva e colaboradores (2010) verificaram a capacidade alelopática do extrato etanólico das folhas e frutos de *A. colubrina* pela capacidade de interferir diretamente na germinabilidade (velocidade média e no tempo de germinação). Nesse estudo, os maiores atrasos na germinação foram observados no extrato etanólico de frutos de angico. Estudos fitoquímicos realizados por Monteiro et al. (2005) demonstraram que indivíduos de *A. colubrina* produzem grupos fenólicos com importante ação de defesa para o vegetal, sendo que os taninos apresentaram a maior diversidade. Na região de Ribeirão Preto (SP), área do presente estudo, a variedade *colubrina* ocorre naturalmente. *A. colubrina* var. *colubrina* é uma árvore perenifólia a semicaducifólia, com 10 a 35 m de altura e 30 a 120 cm de diâmetro a altura do peito (DAP); tronco geralmente reto e mais ou menos cilíndrico, fuste com até 12 m de comprimento; a ramificação é cimosa, dicotômica, tortuosa e irregular, com copa umbeliforme, bastante ramificada e esgalhamento grosso (Figura 3; casca com espessura de até 20 mm, sendo externamente lisa (branca-acinzentada a cinza-escura, áspera, provida de fendas finas longitudinais) e internamente avermelhada. As folhas são compostas bipinadas, paripinadas e com raque apresentando de 15 a 20 cm de comprimento; folíolo linear, assimétrico na base, obtuso; há presença de glândulas: uma glândula cônica sésil próxima ao pulvínulo (na base do pecíolo) e uma a quatro glândulas verde-avermelhadas nos últimos pares de folíolos (Cândido e Gomes, 1992; Lorenzi, 2002). É comum na vegetação

secundária formando, às vezes, capões puros (Nogueira, 1977), característica marcante na região de estudo e conhecida como “angical”.

Figura 2. Fotos de *Anadenanthera colubrina* e *peregrina* ilustrando características vegetativas e reprodutivas. Destaque para o fuste (A), frutos (B), flores (C) e súber (D) de *A. colubrina*, além do fuste (E); frutos (F), súber (G) e flores e folhas (H) de *A. peregrina*.

No Brasil, *Anadenanthera peregrina* está presente nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, ocorrendo naturalmente no Norte (Roraima, Pará, Amazonas e Acre), Nordeste (Paraíba e Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná) (Morim, 2013; Figura 2A). Ainda segundo Morim (2013), a distribuição de suas duas variedades é:

- Var. *falcata* - Figura 2B - presente nas Regiões Nordeste (Paraíba, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná);

- Var. *peregrina* - Figura 2C- ocorrendo nas Regiões Norte (Roraima, Pará, Amazonas), Centro-Oeste (Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul) e Sudeste (Minas Gerais).

Portanto, muito provavelmente na região de Ribeirão Preto (SP) a var. *falcata* é a que ocorre naturalmente.

Figura 3. Ocorrência natural de *Anadenanthera peregrina* (A) e suas variedades *falcata* (B) e *peregrina* (C) no Brasil. Retirado e modificado de Morim (2013).

No cerrado, *A. peregrina* (Figura 3 E, F, G e H) é uma árvore de menor porte (até 16 m de altura), mas na floresta estacional semidecidual pode atingir 25m de altura (Durigan et al., 1997). Seu tronco é geralmente tortuoso, com fuste normalmente curto (no máximo 8 m de comprimento) e com uma copa ampla, aberta, com folhagem esparsa. A casca (Figura 3G), característica marcante da espécie, é grossa, com espessura de até 40 mm, de coloração preta ou marrom-escuro, dura, profundamente gretada e fissurada (Lorenzi, 2002). As folhas de *A. peregrina* são compostas, com folíolos coriáceos, nítidos, frequentemente falcados, uninervados e glabros (Morim, 2013). As flores, assim como em *A. colubrina*, são pequenas, reunidas em inflorescências em capítulo. O fruto é também um folículo deiscente, coriáceo, escamante ou verruculoso, opaco, glabro, reticulado, ápice

agudo, margem levemente constricta entre as sementes, de coloração marrom, com 10 a 25 cm de comprimento e 17 a 25 mm de largura, com dez a quinze sementes (Lorenzi, 2002). Comparados com os de *A. colubrina*, os frutos de *A. peregrina* são mais coriáceos e opacos, característica que pode ser usada na diferenciação da espécie. A semente é muito semelhante à de *A. colubrina*, de formato orbicular, coloração marrom, leve, achatada, sem ala, com até 12 mm de comprimento.

A. peregrina é uma espécie colonizadora, sendo comum na vegetação secundária, principalmente na fase de capoeirão; contudo, ocorre também em formações primárias (Durigan et al., 1997; Carvalho, 2003) e assim como *A. colubrina* é, muitas vezes, encontrada em altíssimas densidades, formando os “angicais”. No Estado de São Paulo, *A. peregrina* floresce de agosto a outubro e os frutos amadurecem de agosto a setembro do ano seguinte (Durigan et al., 1997). A planta é hermafrodita e a espécie é preferencialmente alógama devido ao fato de a polinização cruzada ser favorecida pelo alto grau de auto-incompatibilidade genética, enfatizada pela defasagem no tempo de receptividade dos grãos de pólen. A polinização é realizada principalmente por abelhas e insetos pequenos (Costa et al., 1992).

Como as duas espécies do gênero são muito semelhantes com relação às características vegetativas e são frequentemente confundidas popularmente, a importância cultural e o uso dos angicos normalmente são sobrepostos. Assim, existem diversos usos domésticos, comerciais, ecológicos, culturais e tradicionais relatados com as diferentes porções dos angicos (*A. colubrina* ou *A. peregrina*). Em primeiro lugar, ambas as espécies têm potencial para uso em paisagismo, principalmente na arborização de avenidas, rodovias, parques e praças. Produzem madeira apropriada para a construção civil, como vigas, caibro, tábua e taco para assoalho, bem como para usos rurais e em obras externas, além de fornecerem lenha de excelente qualidade. A casca e o lenho possuem tanino (usado em curtume) e um corante, que pode ser extraído da casca (utilizado em tinturaria) (Durigan et al., 1997; Lorenzi, 2002; Carvalho, 2003). A madeira serrada e roliça é indicada para tabuado, tacos, marcenaria, desdobro, obras internas, ripas, implementos, embalagens, construção civil e naval. Isso porque a madeira dos angicos é densa (0,80 a 1,10 g/cm³, a 15% de umidade), com alburno e cerne castanhos (com reflexos dourados e com manchas largas quase pretas), superfície lisa ao tato e lustrosa, de grande durabilidade quando exposta e com belos efeitos decorativos. Porém, racha com facilidade e demora muito para secar, chegando a brotar durante o processo (Mainieri, 1973; Ferretti et al., 1995).

Outros usos reportados para o gênero *Anadenanthera* compreendem o apícola, já que *A. colubrina* e *A. peregrina* são plantas melíferas, que fornecem pólen e néctar (Pirani e Cortopassi-Laurino, 1993); o medicinal, já que ambas são usadas na medicina popular em infusões, maceração e tinturas, como antidiarréico e expectorante, sendo recomendado nas afecções pulmonares e das vias respiratórias, bronquites, tosse, faringites e asma (Balbach, 1992). Além disso, ambas fazem parte da lista de espécies utilizadas para reflorestamento heterogêneo de áreas degradadas no Estado de São Paulo (Barbosa, 2001) sendo também amplamente recomendadas para recuperação de terrenos depauperados e erodidos, para reposição de mata ciliar em terrenos com inundação e em solos pobres e rasos (Durigan e Nogueira, 1990).

Sementes das espécies de *Anadenanthera* são utilizadas como alucinógenos por vários grupos étnicos (Altschul, 1972). Para essa finalidade, as sementes podem ser ceifadas, bebidas e misturadas com “chicha”, além de inaladas (“paricá”, que significa inspirar, fungar, é outra designação comum para as espécies do gênero) (Schultes, 1967). O rapé feito de sementes de *Anadenanthera* é tomado como um estimulante ou um alucinógeno durante rituais de magia ou cerimônias religiosas, além de diagnósticos de doenças por meio de adivinhação (Cooper, 1963; Schultes e Raffauf, 1990). Povos nativos do Noroeste da Argentina são conhecidos por terem transmitido para as populações do leste e planícies o conhecimento sobre a utilização do angico no contexto religioso, formando um circuito que Pérez Gullán e Gordillo (1993) denominaram “a rota do cebil” (Pochettino et al., 1999). Ainda para ilustrar o vasto uso das espécies do gênero *Anadenanthera* como alucinógeno, Rodd (2002) descreveu a utilização de sementes de *Anadenanthera peregrina* para preparar o “yopo”, um inalante alucinógeno usado pelos curandeiros da tribo que habita Piaroa, sudeste da Venezuela. Evidências arqueológicas também ressaltam a importância cultural dessas espécies (Baéz et al., 2000).

À luz de seu amplo uso, os “angicos” foram indicados como de alta prioridade para a conservação *in situ* na primeira reunião técnica para “Estratégias para a Conservação e Gestão dos Recursos Genéticos dos Medicamentos e Plantas Aromáticas do Brasil” (Vieira et al., 2002). Porém, mesmo diante de tamanha importância cultural, ecológica e financeira, até o momento não foram relatados estudos referentes à conservação de recursos genéticos dessas valiosas espécies.

A REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO (SP) E O GÊNERO *ANADENANTHERA*

O interior do Estado de São Paulo, anteriormente ocupado por matas semidecíduas e cerrados, está praticamente tomado por diferentes culturas ou pastagens, restando apenas algumas pequenas áreas com vegetação de Cerrado e Mata Atlântica. De acordo com um levantamento do Instituto Florestal de São Paulo, restam apenas 13,9 % da cobertura vegetal natural paulista, o equivalente a 3,46 milhões de hectares (Zorzetto et al., 2003). Geraque (2005) ressaltou que a área original de cerrado no Estado de São Paulo era de 14% e que em 1992, essa cobertura original já havia sido reduzida para apenas 1,14%. Estima-se que o bioma tenha perdido 38,8% da vegetação nativa, sendo o Estado de São Paulo o mais castigado (Romero, 2007).

A situação é ainda mais crítica quando a região de Ribeirão Preto, no interior de São Paulo, é destacada nesse cenário. Estima-se que nesse importante pólo de desenvolvimento sucroalcooleiro exista apenas cerca de 3% de remanescente florestal original (Kotchetkoff-Henriques, 2003). De acordo com o IBGE (1993), a Região de Ribeirão Preto situa-se em uma área de transição entre Floresta Estacional Semidecidual e Cerrado, sendo essa transição na forma de encraves. A formação savânica corresponde ao Cerradão e ocorre em aproximadamente um quarto da área do Município, predominantemente na Região Nordeste. A Floresta Estacional Semidecidual, ou Floresta Mesófila predomina no restante do Município. Entretanto, em decorrência do processo de ocupação populacional, atualmente a vegetação natural encontra-se extremamente fragmentada e cada vez mais exposta às ações antrópicas, que incluem desde a abertura de trilhas, caça e captura de aves, deposição de lixos e entulhos, corte seletivo de árvores e, inclusive, aumento na incidência de fogo (Kotchetkoff-Henriques, 2003). A supressão da vegetação natural no Município de Ribeirão Preto ocorreu associada a ciclos econômicos. O desmatamento foi insignificante até 1870, quando o plantio de café começou a substituir a vegetação nativa, principalmente florestas. Entre 1962 e 1984, o aumento da área cultivada com cana-de-açúcar, devido ao programa governamental de incentivo à produção do álcool, provocou diminuição drástica na área de cerrado (Kotchetkoff-Henriques, 2003). Atualmente o município está entre os maiores produtores de cana-de-açúcar do Brasil e a vegetação nativa sofre grande impacto da expansão dessa monocultura.

O resultado de 37.104 ha municipais plantados com cana-de-açúcar (IBGE, 2010) somado a outras pressões antrópicas sobre os ecossistemas naturais, é a

perda drástica do patrimônio genético regional, estimada principalmente pela pequena quantidade de remanescentes florestais naturais que somam 2.103,6 ha (3,28%) da área do município (Tabela 3) (SIFESP, 2009).

Tabela 3. Área e porcentagem de remanescente vegetacional e reflorestamentos em Ribeirão Preto (SIFESP, 2009).

<i>Cobertura vegetal</i>	<i>Área (ha)</i>	<i>% *</i>
Mata	719,45	1,12
Capoeira	939,20	1,46
Cerrado	131,00	0,20
Cerradão	115,71	0,18
Vegetação de várzea	178,21	0,28
Vegetação não-classificada	19,49	0,03
Total	2.103,06	3,28
Reflorestamento	206,44	0,32

* Em relação à área do Município (64.200 ha)

Embora exista uma dificuldade em estabelecer um padrão único para caracterizar os efeitos da fragmentação florestal, uma série de mudanças nas comunidades vegetais que sofrem esse processo tem sido levantada, dentre elas o aumento de pioneiras, trepadeiras e de espécies não-zoocóricas ou que ocupam o dossel e invasão de espécies alóctones.

A principal consequência dessas perturbações antrópicas é o processo de formação de mosaicos de habitats, incluindo fragmentos de diferentes tamanhos. Os remanescentes florestais ficam isolados, separados por matrizes pouco permeáveis e sujeitos às consequências relatadas anteriormente (por exemplo, Tabela 1).

Buscando avaliar essas consequências, Kotchetkoff-Henriques (2003) mapeou e quantificou o remanescente florestal ribeirão-pretano. Nesse mapeamento, foi encontrado que o remanescente florestal de Ribeirão Preto está distribuído em 102 fragmentos (que variam de 1,5 – 247 ha), dos quais 54% são menores que 10 ha. Dos fragmentos florestais restantes em Ribeirão Preto, 37 áreas apresentaram elevada densidade/domínio (mais que 20 indivíduos/ha) de angicos. Além disso, a paisagem regional é marcada por grandes concentrações de

Anadenanthera, espalhadas nas beiras de rodovias e parques municipais, destacando a importância do estudo do gênero.

Portanto, a convicção da importância de estudos genético-populacionais de espécies arbóreas das florestas tropicais somados à realidade paisagística da região de Ribeirão Preto e a importância econômico-ecológica dos angicos são os grandes motivadores desse trabalho.

LITERATURA CITADA

- ALTSCHUL, SIRI VON REIS. 1964. "A Taxonomic Study of the Genus *Anadenanthera*. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**, 193: 1-65.
- ALTSCHUL S VON R. 1972. The genus *Anadenanthera* in Amerindian cultures. Cambridge: Mass., Botanical Museum Harvard University 96p.
- ALVES, R. M.; ARTERO, A. S.; SEBBENN, A. M.; FIGUEIRA, A. 2003. Mating system in natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Shumm., by microsatellite markers **Genetics and Molecular Biology** 26: 373-379.
- ALZATE-MARIN, A. L.; GUIDUGLI, M. C.; SORIANI, H. H.; MARTINEZ, C. A. H.; MESTRINER, M. A. 2009. A DNA miniprep procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 52: 1217-1224.
- BÁEZ, H.; CASTRO, M.M.; BENAVENTE, A.M.; KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; CAMARGO, C.; THOMAS, C. 2000. Drugs in prehistory: chemical analysis of ancient human hair. **Forensic Science International**. 108:173-179.
- BILLOTTE, N; LAGODA, PJL; RISTERUCCI, AM; BAURENS, FC. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits** 54:277-288.
- BORÉM, A. **Biotecnologia Florestal**. 2007. Viçosa:UFV, 387p.
- BRAGA, A.C.; COLLEVATTI, R.G. 2011. Temporal variation in pollen dispersal and breeding structure in a bee-pollinated Neotropical tree. **Heredity** 106: 911-919.
- BRAGA, A. C.; REIS, A. M. M.; LEOI, L. T.; PEREIRA, R. W.; COLLEVATTI, R. G. 2007. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes** 7: 53-56.
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**. 97: 816-827.
- BRONDANI, R. P. V.; GAIOTTO, F. A.; MISSIAGGIA, A. A.; GRIBEL, R.; GRATTAPAGLIA, D. 2003. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**. 3: 177-179.

- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S. 2003. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Circular Técnica** 20: 1–11.
- CENIS, J. L. 2000. Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas. **Revista Terralia** 12: 40–43.
- CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany** 83: 51–57.
- CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C. R.; GAIOTTO, F. A.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources** 8: 1074–1077.
- CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W.G.; MARRAZZO, M.T.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics** 99: 65–72.
- COLLEVATTI, R.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. 1999. Development and characterisation of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity** 83: 748–756.
- DECROOCQ, V.; FAVÉ, M.G.; HAGEN, L.; BORDENAVE, L.; DECROOCQ, S. 2003. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. **Theoretical and Applied Genetics** 106: 912–922.
- EISEN, J. A 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: GOLDSTEIN, D. B et al. (Ed.) **Microsatellites – evolution and applications**. Oxford: Oxford University Press. p. 34 - 48.
- EWERS, R. M., Didham, R. K. 2006. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biol Rev** 81: 117–142.
- DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology** 8: 1585–1592.
- FERES, J.M.; MARTINEZ, M.L.L.; MARTINEZ, C.A.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. 2009. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. **Molecular Ecology Resources** 9: 434–437.

- FERES, J. M. ; SEBBENN, A. M. ; GUIDUGLI, M. C. ; MESTRINER, M. A. ; MORAES, M. L. T. ; Alzate-Marin, A. L. 2012. Mating system parameters at hierarchical levels of fruits, individuals and populations in the Brazilian insect-pollinated tropical tree, *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniaceae). **Conservation Genetics**, 13 (2): 393-415.
- FERREIRA, M. E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 1995. 220p.
- FERREIRA-RAMOS, R.; LABORDA, P. R.; SANTOS M. O.; MAYOR M. S.; MESTRINER M. A.; SOUZA A. P.; ALZATE-MARIN A. L. 2007. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics** 9: 1281–1285.
- GOUDET, J. 2002. **FSTAT version 2.9.3**. Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- GUIDUGLI, M. C.; ACCORONI, K. A.; MESTRINER, M. A.; CONTEL, E. P. B.; MARTINEZ, C. A.; ALZATE-MARIN, A. L. 2010. Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). **Genetics and Molecular Biology**. 33:131–134.
- GUIDUGLI, M. C.; CAMPOS T.; SOUSA A. C. B.; FERES J. M.; SEBBENN A. M.; MESTRINER M. A.; CONTEL E. P. B.; ALZATE-MARIN A. L. 2009. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics** 10: 1001–1004.
- GUPTA, P. K.; BALYAN, H. S.; SHARMA, P. C.; RAMESH, B. 1996. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Sei** 70: 45–54.
- HAMILTON, M. B. 2002. Isolation and characterization of nuclear microsatellite loci in the tropical tree *Corythophora alta* (Lecythidaceae). **Molecular Ecology Notes** 2: 363-365.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 1993. **Recursos Naturais e Meio Ambiente: uma visão do Brasil**. Departamento de Recursos naturais e Estudos Ambientais. Rio de Janeiro.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. **Produção Agrícola Municipal 2009**. Rio de Janeiro.
- JONES, T. A. 2003. The restoration gene pool concept: Beyond the native versus non native debate. **Restoration Ecology** 11: 281-290.

- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology** 16: 1099–1106.
- KOTCHETKOFF-HENRIQUES, O. **Caracterização da vegetação natural em Ribeirão Preto, SP: Bases para a conservação**. 2003. 270 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de 117 Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.
- KIM, K.-S.; MIN, M.-S.; AN, J.H.; LEE, H. 2004. Cross-species amplification of Bovidae microsatellites and low diversity of the endangered Korean Goral. **Journal of Heredity** 95: 521-525.
- KOBLÍZKOVÁ, A.; DOLEZEL, J.; MACAS, J. 1998. Subtraction with 3' modified oligonucleotides eliminates amplification artifacts in DNA libraries enriched for microsatellites. **Biotechniques** 25: 32–38.
- LEPSCH-CUNHA, N.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSKY, R.; NASCIMENTO, H. E. M. 2011. Outcrossing rate of *Couratari multiflora* (J.Smith) Eyma (Lecythidaceae), a low-density tropical tree species from a central Amazonian rainforest. **Acta Amazonica**, 41: 153 –162.
- LIAN, C.; MIWA, M.; HOTETSU, T. 2001. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. **Heredity** 87: 88-98.
- MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; BUSO, G. S. C.; KAGEYAMA, P. Y. 2006. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics** 7: 957–969.
- MORIM, M.P. *Anadenanthera* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB18073>
- NAZARENO, A.G.; PEREIRA, R.A.S.; FERES, J.M.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. 2009. Transferability and characterization of microsatellite markers in two Neotropical *Ficus* species. **Genetics and Molecular Biology** 32(3): 568-571.
- NAZARENO, A. G.; FERES, J. M. ; CARVALHO, D.; SEBBENN, A. M.; LOVEJOY, T. E.; LAURANCE, W. F. 2012. Serious New Threat to Brazilian Forests. **Conservation Biology**, 26: 5-6.
- NOVICK, R. R.; DICK, C. W.; LEMES, M. R.; NAVARRO, C.; CACCONE, A.; BERMINGHAM, E. 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of

- Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology** 12: 2885–2893.
- PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. 1998. Cross-Species Amplification of Soybean (*Glycine max*) Simple Sequence Repeats (SSRs) Within the Genus and Other Legume Genera: Implications for the Transferability of SSRs in Plants. **Molecular Biology and Evolution** 15(10): 1275–1287.
- POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science** 1: 209-245.
- ROA, A. C.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; DUQUE, M. C.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; IGLESIAS, C.; THOME, J. 2000. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany** 87: 1647-1655.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Humana Press, Totowa, 365–386. Disponível em: http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.
- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSH, E. F. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Sprig Harbor Laboratory.
- SANGUINETTI, C. J.; DIAS, E. N.; SIMPSON, A. J. G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechnology** 17: 914 -921.
- SANTOS, K.L.; WELTER, L.J.; DANTAS, A.C.M.; GUERRA, M.P.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O. 2007. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genetics and Molecular Biology** 30:73-79.
- SQUIRRELL, J; HOLLINGSWORTH, PM; WOODHEAD,M; RUSSELL, J; LOWE, AJ; GIBBY, M; POWELL, W. 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants. **Molecular Ecology** 12: 1339–1348.
- TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. 1994. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics & Development** 4: 832–837.
- TEMNYKH, S.; DECLERCK, G.; LUKASHOVA, A.; LIPOVICH, L.; CARTINHO, S.; MCCOUCH, S. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation,

- transposon associations, and genetic marker potential. **Genome Research** 11: 1441-1452.
- WANG Z.; WEBER J. L.; ZHONG G.; TANKSLEY, S. D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics** 88: 1-6.
- WEIR, B. S. 1996. **Genetics data analysis II – Methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- WHITE, G.M.; BOSHIER, D.H.; POWELL, W. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology** 8: 1899–1909.
- WUNSCH, A.; HORMAZA, J.I. 2007. Characterization variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple **Scientiae Horticulturae** 113: 37–43.
- YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SAWAMURA, Y.; KOTOBUKI, K.; BAN, Y.; HAYASHI, T.; MATSTUTA, N. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. **Theoretical and Applied Genetics** 102: 865–870.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATERNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology** 11: 1-16.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x/pdf>
- ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO J.B.; CHAVES L.J.; COELHO A.S.G.; VENCOSKY, R. 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology** 26: 449-457.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi investigar a diversidade genética, a distribuição espacial de genótipos, o sistema de reprodução e o fluxo de pólen de *Anadenanthera colubrina* e *Anadenanthera peregrina* presentes na Região de Ribeirão Preto, interior de São Paulo, com auxílio de marcadores moleculares microssatélites.

Para isso, foram endereçados especificamente os seguintes pontos:

- a) Desenvolver e padronizar marcadores microssatélites para a espécie florestal *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan e transferir e caracterizar os SSR desenvolvidos para *Anadenanthera peregrina*;
- b) Quantificar os níveis de endogamia, diversidade e estrutura genética espacial usando locos microssatélites em adultos de *A. colubrina* e *A. peregrina* em angicais de ambas as espécies na Região de Ribeirão Preto;
- c) Estimar parâmetros do sistema de reprodução, como taxas de cruzamento, autofecundação e cruzamentos correlacionados, em áreas de ocorrência natural de *A. colubrina* e *A. peregrina*, além de determinar distâncias de dispersão de pólen e taxa de fluxo gênico via pólen externo aos fragmentos de *A. colubrina* e *A. peregrina*, usando análise de paternidade.

ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE

Para tornar a leitura e estudo mais organizados, a tese encontra-se dividida em três capítulos. No **Capítulo I** são apresentados os estudos de desenvolvimento e caracterização de marcadores moleculares microssatélites (SSR) para a espécie *Anadenanthera colubrina*, bem como os esforços de transferência e caracterização desses marcadores para *A. peregrina*. A investigação dos níveis de diversidade genética, estruturação genética espacial e endogamia em angicais de *Anadenanthera colubrina* e *A. peregrina* em Ribeirão Preto está relatado no **Capítulo II**. Os padrões de cruzamentos e o fluxo gênico contemporâneo via pólen de *Anadenanthera colubrina* e *A. peregrina* estão especificados no **Capítulo III**. Ao final da tese são apresentadas as **Considerações finais**.

CAPÍTULO I

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA
ANADENANTHERA COLUBRINA E TRANSFERIBILIDADE
PARA *ANADENANTHERA PEREGRINA****

***Artigo publicado – ANEXO I**

FERES, JM; MONTEIRO, M.; ZUCCHI, MI; PINHEIRO, JBP; MESTRINER, MA; ALZATE-MARIN, AL. 2012. Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* (Leguminosae), a neotropical tree species. American Journal of Botany. vol. 99 no. 4 p.154-156. DOI: 10.3732/ajb.1100446. **ISI: 2,586**

RESUMO

A partir de uma biblioteca genômica enriquecida para repetições GA/CA, 20 marcadores microssatélites (SSR) foram desenvolvidos para *Anadenanthera colubrina*, uma espécie arbórea tropical. Os locos microssatélites foram caracterizados utilizando-se amostras de DNA provenientes de 30 árvores adultas encontradas na Região de Ribeirão Preto - Estado de São Paulo, Brasil. Para este conjunto amostral, um total de 82 alelos foi detectado usando 14 SSR polimórficos, com uma média de 5,85 alelos por loco. A heterozigosidade esperada variou de 0,063 a 0,825 e estes locos apresentaram alta probabilidade de exclusão de paternidade. Adicionalmente, 17 locos foram efetivamente transferidos e caracterizados para *Anadenanthera peregrina*, sendo seu polimorfismo avaliado em 30 indivíduos adultos coletados na região de Ribeirão Preto-SP. Dos 17 locos heterólogos, 14 foram polimórficos. A riqueza alélica em cada loco variou de dois a nove com uma média de 5,71 alelos por loco, e a heterozigosidade esperada variou de 0,1 a 0,803. Em suma, as características do conjunto de locos microssatélites desenvolvidos para a espécie florestal *A. colubrina* e transferidos para *A. peregrina* indicam que esses marcadores são ferramentas aplicáveis em estudos de genética populacional e, conseqüentemente, na conservação de ambas as espécies.

1. INTRODUÇÃO

Os marcadores moleculares referem-se a diferenças entre indivíduos nas suas sequências de nucleotídeos ao longo da fita de DNA e podem ser classificados em função de sua herança, como dominantes e codominantes. Em indivíduos diploides, marcadores codominantes permitem a distinção de ambos os alelos homólogos de um loco. Já os marcadores dominantes são menos informativos, pois não permitem distinguir o fenótipo heterozigoto do homozigoto (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para verificar a variabilidade genética diretamente no DNA, destacando-se: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e STS (Sequence- Tagged Site), em que se destacam os SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), os ISSRs (Inter-simple Sequence Repeats) e os microssatélites. Estes marcadores podem diferir com respeito a características importantes como abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro (Buso et al., 2003).

Entre os marcadores moleculares mais adequados para o estudo da estrutura genética, reprodução e fluxo gênico de populações arbóreas, encontram-se os marcadores microssatélites (ou Sequências Simples Repetidas – SSR), os quais se tornaram uma ferramenta útil na construção de mapas genéticos, análise de paternidade e fluxo gênico (Chase et al., 1996). As frequências dos microssatélites variam significativamente entre os diferentes organismos, sendo que o genoma de plantas contém, em média, dez vezes menos microssatélites do que o genoma humano (Gupta et al., 1996).

Os microssatélites formam uma classe de DNA caracterizada por sequências de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas em *tandem*, que apresentam uma alta taxa de mutação, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração (Eisen, 1999). As mutações são causadas 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 (Eisen, 1999). Dois modelos podem explicar estas alterações: o *crossing-over* desigual entre as moléculas de DNA, resultado da recombinação entre cromossomos homólogos que não foram alinhados corretamente; e o mecanismo do *slippage* da DNA polimerase. Este último modelo

é o mais aceito e ocorre durante a replicação do DNA e conduz ao aumento ou à diminuição do número de repetições (Tautz e Schlotterer, 1994).

As unidades de repetição dos microssatélites são, geralmente, mono-, di-, tri- ou tetranucleotídeos. Segundo Oliveira et al. (2006), microssatélites são classificados de acordo com o tipo de sequência repetida, podendo ser perfeitos (a sequência repetida não é interrompida por nenhuma base), imperfeitos (há um par de bases dentro do *motif* de repetição), interrompidos (há uma pequena sequência de bases dentro da sequência repetida do microssatélite) e compostos (em que há duas sequências repetidas distintas adjacentes).

Devido à distribuição preferencial nas regiões não codificadoras, os microssatélites podem não sofrer ação da seleção natural, o que os torna seletivamente neutros e muito úteis para estudos da genética das populações naturais (Eisen, 1999). O potencial dos SSRs como marcadores úteis foi reconhecido por possuírem uma série de características desejáveis como distribuição ao acaso e ocorrência em grande quantidade em genomas de eucariotos e procariotos, codominância dos alelos, facilidade de detecção via PCR, e alta diversidade alélica (Chase et al., 1996; Borém, 2007). Além disso, são suficientemente estáveis para serem utilizados em análises genéticas e de evolução de populações naturais, especialmente em espécies arbóreas altamente diversas, como já vem sendo demonstrado para espécies tropicais (ver Tabela 2 com exemplos de espécies florestais brasileiras).

Outra característica muito interessante dos SSRs é sua fácil repetitibilidade, dado que é possível obter os mesmos resultados em qualquer laboratório do mundo (Cenis, 2000). Assim, os marcadores microssatélites são ideais para gerar informações para análises de diversidade genética, sistemas de reprodução e fluxo gênico em populações de plantas, pois essas ferramentas permitem estimar frequências alélicas, possuem alto poder de exclusão de paternidade, com segregação mendeliana e alto polimorfismo (Lian et al., 2001).

O desenvolvimento de marcadores microssatélites tem se tornado mais acessível nos últimos anos, devido às novas estratégias de enriquecimento de bibliotecas genômicas e à rapidez no sequenciamento automático baseado na fluorescência (Zane et al., 2002). Ainda que o desenvolvimento de marcadores SSR demande tecnologias moleculares refinadas, esse se torna compensador pela quantidade de informações genéticas que podem ser geradas.

A maior desvantagem desses marcadores é o grande volume de trabalho necessário para desenvolvimento de *primers* específicos para os locos de

microssatélites de cada espécie, já que os SSR são usualmente encontrados em regiões não codificadoras, onde a taxa de substituição dos nucleotídeos é maior do que em regiões codificadoras. Esse fato inviabiliza o uso de “*primers* universais” correspondentes a sequências conservadas, estratégia muito efetiva para DNA mitocondrial (Zane et al., 2002). Uma alternativa para eliminar tempo e despesas envolvidas no isolamento de marcadores microssatélites para a espécie de interesse é a utilização de *primers* heterólogos. Esse potencial tem sido observado em diferentes estudos (Cipriani et al., 1999; Collevatti et al., 1999; Roa et al., 2000; Yamamoto et al., 2001; Alves et al., 2003; Zucchi et al., 2003; Decroocq et al., 2003; Braga et al., 2007; Santos et al. 2007; Ciampi et al., 2008; Nazareno et al., 2009; Feres et al., 2009; Guidugli et al., 2010) e é possível graças à conservação de regiões flaqueadoras para alguns locos microssatélites entre espécies relacionadas. Tal constatação permite o aproveitamento de *primers* espécie-específicos em outras espécies proximamente aparentadas.

Até o momento, não havia disponibilidade de marcadores microssatélites específicos para o gênero *Anadenanthera*. Sendo assim, o objetivo principal desta etapa da pesquisa foi obter um conjunto de *primers* que amplificassem locos independentes de microssatélites polimórficos do genoma de *Anadenanthera colubrina*. Em seguida, foi investigada a transferência e caracterização destes locos em *A. peregrina* com o intuito de completar os estudos genéticos deste importante gênero.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ANGICO

Denominam-se “angicos” várias espécies de leguminosas-mimosoídeas de folhas miúdas, frutos alongados do tipo vagem ou legume, com sementes redondas e achatadas. Normalmente são árvores de médio a grande porte, comuns em capoeiras ou na colonização de áreas abertas, no inverno perdendo totalmente as folhas. Dentre muitas espécies podem ser citadas o angico-rajado (*Parapiptadenia rigida*), o angico-branco (*Anadenanthera colubrina*), o angico-do-cerrado/de casca/preto (*Anadenanthera peregrina*), dentre muitas outras. A diferenciação entre indivíduos pertencentes a gêneros diferentes não é difícil, desde que características morfológicas como estrutura e cor do caule, textura do fruto, disposição dos folíolos e flores, auxiliam e permitem que pesquisadores e trabalhadores do campo possam diferenciar os grupos e coletar as espécies desejadas. Porém, angicos do gênero *Anadenanthera*, como exposto na

“Introdução” desta tese, necessitam de uma avaliação mais cautelosa para uma separação e identificação seguras. Muitas das características, como pode ser visto em Altschul (1964), são sobrepostas, o que dificulta a delimitação de caracteres espécie-específicos.

A distribuição geográfica natural de *A. colubrina* e *A. peregrina*, embora ajude na delimitação, é também sobreposta, especialmente em áreas como Ribeirão Preto, onde mais de um tipo de formação florestal está presente (Mata Atlântica e Cerrado, especificamente). Nesta região, as duas espécies de angico ocorrem naturalmente e características como o porte da árvore, o tamanho dos folíolos e a estrutura do súber do tronco (as características da casca) são muito variáveis. Por esses motivos, no início do desenvolvimento desta pesquisa, as árvores foram confundidas e a atribuição da espécie foi trabalhosa. Com o objetivo de minimizar esses erros e garantir o bom desenvolvimento desse trabalho, foi solicitada a colaboração de um especialista em mimosoídeas. Assim, o Mestre em taxonomia de plantas, Leonardo Borges, do Instituto de Biociências – USP, acompanhou saídas à campo para a confirmação da identificação dos indivíduos coletados.

Portanto, foram coletadas amostras na forma de exsicata e a identificação das espécies, baseada em características vegetativas e reprodutivas (frutos e sementes), foi confirmada em laboratório. Para os indivíduos de angico da Região de Ribeirão Preto, foram consideradas características diagnósticas em campo de *Anadenanthera colubrina* o tamanho dos folíolos menores e a presença de frutos com superfície mais lisa que de sua espécie correlacionada *A. peregrina*.

Com base nessas características e com o auxílio do especialista, foram delimitados os agrupamentos monoespecíficos de *A. colubrina* e *A. peregrina* na região de Ribeirão Preto que foram usadas nessa pesquisa.

2.2. LOCAIS DE ESTUDO

Para os estudos de caracterização e transferibilidade dos marcadores microsatélites, foram amostrados tecidos foliares de 30 indivíduos de *Anadenanthera colubrina* e 30 indivíduos de *A. peregrina* provenientes de áreas localizadas na região de Ribeirão Preto-SP. Para ambas as espécies, as árvores adultas amostradas estão presentes dentro de propriedades privadas, em meio a plantações (principalmente cana-de-açúcar) e beiras de rodovia, sendo isoladas por aglomerados urbanos.

2.3. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

As condições da extração de DNA das amostras foliares foram efetuadas com base na metodologia de Alzate-Marin et al. (2009).

A quantificação do DNA foi realizada em Nanodrop, medindo-se a absorbância em contraste com uma amostra de TE, nos comprimentos de onda 260 e 280nm.

2.4. DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Para a realização desta etapa extraiu-se o DNA das folhas de um único indivíduo de *A. colubrina*, coletado no campus da USP/Ribeirão Preto, cujo voucher está depositado no herbário da Universidade de São Paulo (SPF) e assinalado por J. Feres 1.

Nos tópicos seguintes, serão descritas, sucintamente, as etapas necessárias para construção da biblioteca enriquecida em SSR. As etapas iniciais do procedimento, baseado na metodologia descrita por Billotte et al. (1999), foram realizadas no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento – USP/ESALQ, contando com a colaboração do Prof. Dr. José Baldin Pinheiro, da Dra. Maria Imaculada Zucchi e da Dra. Mariza Monteiro.

BANCO ENRIQUECIDO EM MICROSSATÉLITES

Inicialmente, o DNA de um único indivíduo de *A. colubrina* foi extraído a partir de amostras foliares frescas e quantificado no Laboratório de Genética Vegetal – USP/RP (~5 µg), sendo posteriormente transportado ao Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento – USP/ESALQ e congelado a -20°C. Subsequentemente, foi realizada a digestão do DNA com enzima de restrição de corte frequente (*Rsa*I, Invitrogen), de forma que foram obtidos fragmentos entre 300 e 600 pb. Em seguida, adaptadores com sequências conhecidas de 21 e 25 pb (*Rsa*21-5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3' e *Rsa*25-5'TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA3') foram ligados aos fragmentos obtidos.

Com a finalidade de aumentar a quantidade de fragmentos que se ligaram aos adaptadores, uma pré-amplificação usando como *primer* o oligonucleotídeo *Rsa*21 foi realizada. Esse procedimento simplificado pode ser melhor visualizado na Figura 4.

Figura 4. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em SSR: digestão do DNA genômico, ligação dos adaptadores Rsa21 e Rsa25 e pré-amplificação com o primer Rsa21. (Retirado, traduzido e modificado de Zane et al., 2002)

O produto de amplificação foi purificado (*Qiaquick PCR Purification Kit*, Qiagen) e submetido ao passo de enriquecimento da biblioteca para fragmentos contendo microssatélites. Isso foi feito por meio da hibridação com os oligonucleotídeos biotinilados $(GT)_8$ e $(CT)_8$, de maneira que fragmentos contendo sequências repetitivas $(AC)_n$ e $(AG)_n$ fossem preferencialmente selecionados. Em seguida, esses fragmentos foram recuperados pela ligação entre as moléculas de biotina e as moléculas de streptavidina associadas a partículas magnéticas (*Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles*, Promega) (Figura 5).

Figura 5. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em microssatélites: hibridação de sondas (biotiniladas) de microssatélites com o DNA digerido e amplificado, e seleção dos fragmentos por magnetização. (Retirado, traduzido e modificado de Zane et al., 2002)

Os fragmentos selecionados foram amplificados novamente usando o oligonucleotídeo Rsa21, e posteriormente ligados a um vetor de clonagem (*pGEM-T Vector System*, Promega). Essa construção foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue. As colônias recombinantes foram selecionadas para resistência ao antibiótico ampicilina e pelo sistema branco-azul, transferidas para placa ELISA contendo meio 2YT-HMFM, incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas e estocadas a -80°C. Essa etapa está simplificada representada na Figura 6.

Figura 6. Etapas do desenvolvimento da biblioteca enriquecida em microssatélites: fragmentos de DNA enriquecido com microssatélites amplificados novamente usando o oligonucleotídeo Rsa21; ligação ao vetor de clonagem *pGEM-T Vector System*, Promega e seleção das colônias recombinantes. (Retirado, traduzido e modificado de Zane et al., 2002)

EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL E SEQUENCIAMENTO

Após a construção do banco com fragmentos enriquecidos em microssatélites, foi realizada a etapa de sequenciamento dos clones. Para dar início a essa etapa, o DNA plasmidial de clones selecionados foi extraído por meio da metodologia de lise alcalina utilizando o kit de extração Qiagen.

Em seguida, as amostras foram preparadas com o kit de reação ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems). Os plasmídeos (200 - 500 ng), contendo os insertos de interesse, foram submetidos a reações de PCR utilizando o *primer* T7 (5'TAATACGACTCACTATAGGG3'), de acordo com as instruções dadas pelo fabricante. Para cada reação de sequenciamento foram utilizados: 200-500ng de DNA; 2µl na concentração de 5µmoles do *primer* T7; 2µl de tampão (tampão para a reação de PCR corresponde a 200mM Tris-HCl, pH9,0 e 50mM MgCl₂); 2µl de mistura de reação *terminator ready* e uma quantidade adequada de água mili-Q para completar um volume final de 10µl. A microplaca foi então selada, levada ao vortex por 1 minuto e centrifugada rapidamente a 1.000

rpm (Centrífuga Eppendorf 5810R). O programa de PCR utilizado foi desnaturação 96°C por 2 minutos (passo inicial); desnaturação 96°C por 45 segundos; pareamento 50°C por 30 segundos; extensão 60°C por 4 minutos; número total de ciclos 35 e manutenção 4°C por tempo indeterminado.

O produto das reações de PCR foi precipitado com 80µl de isopropanol 75% e, após leve agitação no vórtex, foi incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 35 minutos a 4.000rpm o sobrenadante foi descartado e, em seguida, o precipitado foi seco novamente a temperatura ambiente. Este precipitado foi lavado com 200µl de etanol 70% e a seguir centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos. O etanol foi removido completamente por centrifugação com a placa invertida e apoiada em papel absorvente. O precipitado foi incubado a temperatura ambiente por 1 hora e ressuspensionado em 10µl de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems). Posteriormente, o DNA foi desnaturado a 95°C por 5 minutos antes de ser submetido ao sequenciamento utilizando o sequenciador automático modelo ABI 3100 Applied Biosystems.

As reações de sequenciamento foram feitas em colaboração com o laboratório de Biologia Molecular de Plantas, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP - USP) sob-responsabilidade da Professora Dra. Maria Helena Goldman e com o apoio da técnica Dra. Andrea Carla Quiapim.

ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Para identificação das regiões microssatélites dentro das sequências obtidas foi utilizada a ferramenta de busca “SSRIT - *The Simple Sequence Repeat Identification Tool*” (Temnykh et al., 2001) disponível na página <http://www.gramene.org>. Somente foram consideradas para o desenvolvimento de marcadores microssatélites as repetições simples e/ou compostas que possuíam número igual ou superior a 5 unidades repetidas para dinucleotídeos, 4 para os tri e 3 para os tetra, penta e hexanucleotídeos. O programa *Microsat* foi utilizado para encontrar os adaptadores e os possíveis sítios de enzima *RsaI*. Uma vez editadas, as sequências foram alinhadas para remoção de redundâncias através do programa SeqMan do pacote computacional LaserGene (DNASTar Inc.). Locos de microssatélites encontrados em mais de uma sequência foram descartados e apenas os marcadores não ambíguos foram avaliados.

DESENHO DOS PRIMERS

Os oligonucleotídeos (*primers*) complementares às sequências flanqueadoras dos microssatélites foram desenhados com o auxílio do programa PRIMER3 (Rozen e Skaletsky, 2000). Para esse desenho foram adotados os seguintes critérios: não conter bases redundantes; estar a uma distância adequada dos SSR (entre 20 a 60 pb); ser constituídos por 17 a 23 nucleotídeos sem sequências repetitivas; conter uma porcentagem de bases G e C entre 50 a 55%; começar em 5' e terminar em 3' com bases G, ou C, ou G e C, se possível; obter produtos de PCR com comprimento entre 150 e 250 pb; e ter temperatura de anelamento entre 45 e 63°C, com diferença máxima de 2°C entre as temperaturas dos *primers* direto e reverso, de modo que possam ser usados na mesma reação e não hibridizem um com o outro, ou sofram auto-hibridização.

2.3. ENSAIOS DE AMPLIFICAÇÃO E POLIMORFISMOS DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES

DNA de 10 indivíduos adultos de *A. colubrina* foi utilizado para testar e padronizar as condições de amplificação dos locos microssatélites. O equipamento utilizado para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi o termociclador Mastercycler® Eppendorf. Foram realizados ensaios de temperaturas de anelamento entre 45°C e 57°C para avaliar a melhor temperatura de amplificação de cada loco. A sequência geral das condições de amplificação foi a seguinte: 1 ciclo: 96°C por 5 minutos, 25-30 ciclos: 94°C por 30 segundos, 45-57°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, 1 ciclo: 72°C por 7 minutos, 22°C indefinidamente.

Para cada reação de PCR com volume final de 10 µL, foram usados 2,5 ng de DNA genômico, 1,5 mM de tampão MgCl₂[75 mM Tris-HCl pH 9.0; 50 mM KCl; 20 mM (NH₄)₂SO₄], 250 µM de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,3 µM de cada *primer* microssatélite (direto e reverso) e 1 U de *Taq* DNA polimerase. Para cada reação foi mantido um poço contendo água Milli-Q como controle negativo.

Para a avaliação do polimorfismo dos marcadores SSR desenvolvidos neste trabalho, realizou-se a genotipagem de um grupo de 30 indivíduos adultos de *A. colubrina*, distribuídos na região de Ribeirão Preto, interior de SP.

2.4. ESTUDOS DE AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA

Uma vez padronizadas as condições de amplificação dos marcadores SSR desenvolvidos para *A. colubrina*, estudos de transferibilidade e caracterização para *Anadenanthera peregrina* foram realizados. Para esses experimentos, utilizaram-se amostras de DNA de 30 indivíduos dessa espécie coletados na região de Ribeirão Preto-SP.

As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler® Eppendorf com temperaturas variando de 46 a 58°C para cada marcador, até que se obtivesse a temperatura ótima de anelamento dos *primers*. As reações de amplificação do DNA de *A. peregrina* foram realizadas em um volume final de 10 µl, similares às utilizadas para *A. colubrina*. Com exceção do DNA, todos os reagentes (tampão, dNTP, primers – solução de trabalho, MgCl₂ e a Taq - DNA polimerase) foram misturados em quantidades específicas para cada loco em um único tubo para garantir a homogeneidade das reações.

2.5. REVELAÇÃO DAS BANDAS DE DNA E DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA

ELETROFORESE

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese vertical em géis de poliacrilamida 10 % sob condições desnaturantes. Cada gel fora montado entre dois vidros com 3mm de espessura, garantindo a formação de poços para aplicação das amostras (Figura 7).

Cada solução de gel continha um volume total de 30 mL, da qual eram misturados 14,4 g de uréia, 10,0 mL solução de acrilamida/bis-acrilamida (29:1), 3,0 mL de TBE (10X), 22,5 µL de TEMED, 450 µL de solução de persulfato de potássio e água destilada. Os géis polimerizados foram montados nas cubas de eletroforese vertical contendo tampão TBE (1X – 100 mL Tampão TBE (10X); 900 mL H₂O) em ambos os pólos (porção superior e inferior) como pode ser visto na Figura 7.

Figura 7. Foto mostrando o sistema de eletroforese vertical usado durante o procedimento de genotipagem adotado no presente trabalho.

Antes da eletroforese, as amostras foram submetidas a tratamento desnaturante com formamida. Para isso, foram adicionados 14 μL de tampão de amostra (900 μL de bromofenol, 900 μL xilenocianol, 900 μL TBE (10X), 4,5 mL de Ficol 30% diluído em água destilada, 1,8 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, 3,6 g de sacarose; na proporção de 3:1 com formamida) em cada produto amplificado (10 μL). As amostras foram então aquecidas a 94°C por 7 minutos e, subsequentemente, colocadas em banho de gelo, seguindo-se à aplicação no gel. Posteriormente, a cuba de eletroforese foi conectada a uma fonte de voltagem, Amersham Pharmacia Biotech (EPS 1001), ajustada à corrente elétrica de 25 mA constante durante 4h para cada gel submetido à corrida.

COLORAÇÃO DO GEL COM NITRATO DE PRATA E SECAGEM

Com o término da corrida eletroforética, os géis de poliacrilamida 10% desnaturantes e não desnaturantes foram retirados cuidadosamente das placas de vidro e corados com nitrato de prata de acordo com o protocolo adaptado de Sanguinetti et al. (1994) descrito a seguir para cada gel.

Após a retirada das placas de vidros e dos espaçadores, o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 200 mL de solução fixadora (160 mL de etanol (PA), 7,0 mL de ácido acético glacial (PA) e 833 mL de água destilada). Em seguida, adicionou-se 3,0 mL de solução de nitrato de prata 20% (2 g de nitrato de prata, 10 mL de água destilada) e agitou-se por 5 minutos. A solução foi então descartada adequadamente e o gel lavado em água pré-aquecida (40°C) por cerca de 10 segundos. Posteriormente, 200 mL de solução reveladora (22 g de NaOH, 1 litro de água destilada) foram despejadas cuidadosamente no recipiente contendo o gel juntamente com 1,5 mL de formaldeído, sendo submetido a agitação por alguns minutos até que as bandas fossem reveladas. A solução reveladora foi pré-aquecida em forno de micro-ondas por 3 minutos em potência máxima para facilitar a reação de coloração. Finalmente, após o gel ter sido revelado, a solução reveladora foi descartada e a reação foi bloqueada com a lavagem direta do gel em 200 mL de solução fixadora. Terminado o processo de revelação dos fragmentos amplificados, o gel é seco em papel celofane para análise e posterior armazenagem.

DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA

Os alelos de todos os locos SSR foram identificados por ordem crescente de tamanho, definida pela migração eletroforética, ou seja, em um gel de eletroforese os fragmentos de DNA com menor peso molecular (tamanho) migram mais rápido que os de maior tamanho. A quantificação do tamanho dos alelos, em pares de bases, foi realizada utilizando um marcador de peso molecular de 10 pares de bases (Invitrogen).

2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a caracterização dos locos microssatélites em indivíduos de *Anadenanthera colubrina* e *A. peregrina*, foram realizadas estimativas do desequilíbrio de ligação e caracterização da diversidade genética, conforme descrição a seguir.

ESTIMATIVA DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

O teste de desequilíbrio de ligação foi realizado com o programa FSTAT (Goudet, 2002), aplicando a correção de Bonferroni. Esse teste permite determinar quais locos são adequados para as análises genéticas populacionais.

CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA

A diversidade genética da geração adulta das duas espécies de *Anadenanthera* foi caracterizada pelos índices: número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_0), heterozigosidade esperada segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) e número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e = 1/(1 - H_E)$). Estes índices de diversidade foram calculados utilizando o programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002) e comparados entre si usando o método jackknife sobre os locos.

Também foi estimado o índice de fixação (F), conforme Weir (1996) - $\hat{F} = 1 - H_0 / H_E$ - e sua significância (determinada por 10.000 permutações sobre os locos) usando o programa SPAGeDi (Hardy e Vekemans, 2002).

Probabilidades de exclusão do primeiro [$\Pr(Ex_1)$] e segundo parentes [$\Pr(Ex_2)$] e Frequência de Alelos Nulos (FAN) foram estimadas com auxílio do programa CERVUS version 3.0 (Kalinowski et al., 2007). A significância estatística dos valores médios entre locos do índice de fixação F foi calculada por reamostragem *bootstrap* com 10.000 repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. DESENVOLVIMENTO E ENSAIOS DE AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES

A extração do DNA através do protocolo adotado possibilitou o isolamento de grande quantidade de material de boa qualidade (evidenciado pela facilidade de clivagem na etapa de digestão), requisito necessário para as etapas iniciais da construção do banco (Figura 8).

As demais etapas do desenvolvimento da biblioteca foram também satisfatórias, de maneira que o desenvolvimento de marcadores microssatélites para a espécie *Anadenanthera colubrina* foi iniciado contando com 192 clones distribuídos em duas microplacas de manutenção.

Na primeira etapa, amostras de 8 clones (escolhidos ao acaso nas duas microplacas obtidas) foram analisadas por PCR utilizando-se o *primer* Rsa21 para: 1) confirmar a presença do adaptador nos insertos clonados no vetor pGEM-T e 2) verificar a faixa de tamanho dos insertos simples clonados. As amplificações

mostraram que houve sucesso na ligação dos insertos aos vetores de clonagem (Figura 8), os quais apresentaram variações entre 300 e 1.600 pares de base.

Figura 8. A) Gel de agarose com amostras de DNA digerido com *RsaI* dando destaque (seta vermelha) para a espécie *A. colubrina*, em que houve uma ótima digestão, evidente pela presença de fragmentos entre 300 e 600 pb. **B)** Padrão de amplificação para 8 clones de microssatélites obtidos a partir da biblioteca construída com o DNA de *A. colubrina*.

Dentre os 192 clones constituintes da biblioteca enriquecida, 96 foram sequenciados utilizando-se o *primer* T7 (um lado da fita de DNA). Porém, dos 96 clones sequenciados, onze (11,46%) deles apresentaram SSR e apenas oito tiveram repetições *in tandem* adequadas e foram selecionados para o desenho de *primers*, demonstrando que houve um baixíssimo enriquecimento da biblioteca. Esse baixo enriquecimento foi observado em todas as bibliotecas que estavam sendo desenvolvidas conjuntamente com a de *A. colubrina*, não sendo, portanto, atribuído a características da espécie. Uma análise do procedimento adotado sugeriu que o problema enfrentado na realização dessa biblioteca foi durante o processo de hibridação dos oligonucleotídeos biotinizados (GT)₈ e (CT)₈ ao DNA das espécies. Como consequência desse baixo aproveitamento observado e atribuído a falhas no procedimento, uma segunda biblioteca foi construída. Dela, resultaram 288 clones distribuídos em três microplacas. Dessas placas, foram selecionados, ao acaso, 78 clones, que após extração do DNA plasmidial, foram submetidos ao sequenciamento. Dos clones sequenciados, 27 (34,6%) apresentaram SSR e 12 foram selecionados para o desenho e síntese de *primers*, totalizando 20 marcadores (das duas bibliotecas).

Em artigo de revisão elaborado por Squirrell e colaboradores (2003), os autores demonstraram que no caso de bibliotecas enriquecidas, a porcentagem de

sequências não contendo SSR é, em média, 36%. Ainda segundo esse trabalho, durante o isolamento dos microssatélites de plantas, aproximadamente 1/3 dos clones sequenciados são perdidos devido à ausência de sequências SSR. Assim, foi percebido que o enriquecimento da segunda biblioteca está de acordo com o comumente encontrado no desenvolvimento de *primers* microssatélites para plantas.

Como critério para a seleção dos microssatélites a serem desenvolvidos, foi utilizado um número mínimo de 5 repetições para dinucleotídeos (com exceção feita para a primeira biblioteca), 4 para os tri e 3 para os tetra, penta e hexanucleotídeos. O número de repetições variou de 4 em di (da primeira biblioteca) e 4 em tetranucleotídeos a 38 em dinucleotídeos compostos. Como esperado, a classe de microssatélites mais frequente foi a de dinucleotídeos (~ 92%), enquanto a classe de tetra foi a menos frequente (~3%), não foi observada ocorrência de pentanucleotídeos e houve uma única ocorrência de hexanucleotídeo em um SSR composto. Resultados com valores percentuais próximos a estes também foram encontrados no desenvolvimento de marcadores SSR para *Eucalyptus* spp. (Brondani et al., 1998, 2003), *Cariniana estrellensis* (Guidugli et al., 2010), e *Butia eriospata* (Nazareno et al., 2011).

A frequência de cada classe de SSR é altamente variável entre as espécies vegetais (Wang et al., 1994). Neste trabalho foi observada uma predominância da combinação CA/TG entre os dinucleotídeos, a qual foi encontrada 17 vezes. Tal resultado é esperado, pois os *motifs* escolhidos para o enriquecimento da biblioteca foram CT e GT.

Vinte pares de *primers* foram desenhados para *A. colubrina*, sendo oito da primeira biblioteca e doze da segunda (Tabela 4), sendo a maioria deles simples e perfeitos (sete, 35%), de acordo com a classificação de Oliveira et al. (2006).

Os *primers* foram sintetizados e utilizados na amplificação do DNA de 30 indivíduos adultos de *A. colubrina* visando a padronização das condições de PCR (Tabelas 4 e 5) e corrida eletroforética. Como resultado destes ensaios preliminares, foi observado que todos os *primers* amplificaram o DNA de *A. colubrina*, sendo que 14 foram polimórficos e 6 (Acol 1, Acol 3, Acol 4, Acol 6, Acol 7 e Acol 8), monomórficos (Tabela 4).

Os benefícios dos SSR são bem documentados (Powell et al., 1996), mas em muitos casos as dificuldades para o isolamento desses marcadores agem de maneira determinante na escolha de uma classe em detrimento de outras (RAPD, RFLP, ISSR, etc) (Squirrell et al., 2003). O desenvolvimento da biblioteca para o

isolamento dos SSR é somente o primeiro estágio no processo de obtenção de um conjunto de *primers* microssatélites para o trabalho pretendido. Em cada estágio desse processo existe um potencial para a perda de locos. Assim, os *primers* SSR que constituirão o conjunto de locos de trabalho serão apenas uma fração do número original de clones sequenciados. Esse potencial de perda é chamado de *taxa de atrito* e é fonte de considerável esforço despendido no trabalho laboratorial (Squirrell et al, 2003).

Conforme descrito, não foi possível o desenho de *primers* para um grande número de sequências contendo microssatélites pelos seguintes motivos: regiões SSR na extremidade inicial ou final da sequência, onde a confiabilidade do sequenciamento era muito baixa; sequência microssatélite muito próxima da região terminal/inicial do sequenciamento, de maneira que o número de bases ou a sua constituição não permitiu o desenho de iniciadores satisfatórios na região flangeadora; ou as sequências foram do tipo *quimera*. Com relação a essa última situação, sabemos que não é incomum encontrar sequências quiméricas, nas quais uma das regiões flangeadoras (mas não a outra) vem de outro clone. Essas sequências podem ser formadas como parte dos procedimentos do desenvolvimento da biblioteca e são inadequadas para o desenvolvimento de pares de *primers* (Koblízková et al., 1998). Portanto, todos esses “entraves” podem ser considerados “atritos” encontrados no desenvolvimento desse trabalho. Além disso, como visto na Tabela 4, seis dos vinte marcadores desenvolvidos foram “perdidos” por apresentarem produtos monomórficos (todos da primeira biblioteca). Com relação à esse tema, Squirrell et al. (2003) concluíram que em 25 estudos de caso analisados, uma média de 19,5% dos locos desenvolvidos falharam para produzir produtos de PCR e 17,7% deles foram monomórficos.

Tabela 4. Relação dos locos microssatélites desenvolvidos para *A. colubrina*.

	<i>Loco</i>	<i>Motivo Repetitivo</i>	<i>Tamanho esperado fragmento (pb)</i>	<i>Sequência do primer 5'→3'</i>
1	Acol 01*	(AT) ₆	181	F GGTGAGATAGCTGAAGTTCG R GAATTTCAACTCCCCATG
2	Acol 02	(CTT) ₅	181	F TGGCTATCACTCTCGGACTTC R CATAATGCAAACCGATGACC
3	Acol 03*	(AATT) ₄	150	F TTAAGACCCCGCACAAAC R CTATTCAAGTTCCTGCAAATTA
4	Acol 04*	(AT) ₃ G(AT) ₂ T(AT) ₂	246	F GATGGTGGGCAAAGTGAG R GAAGCCGCATGTATAAGAGT
5	Acol 05	(GA) ₂ A(GA) ₇	234	F TGGACTTTTGCCTGGACAC R CCCACCCACCTAGAACTGTC
6	Acol 06*	(AT) ₄ AG(AT) ₂	166	F TGGGAATGTGCATGAGAAAG R CTCGTGAATTTTCGGGTGT
7	Acol 07*	(CA) ₄	166	F GCTTGCCATTATTATCACACCA R GGGGAAACTTGGTAACATGG
8	Acol 08*	(CA) ₄	222	F ATGTTAGTGTGATGGCC R CTGACTGAAAGGCTTAA
9	Acol 09	(CT) ₁₀ (AT) ₇	160	F CCAGGTCCTCTCAGATTG R ATGCTCCTCTCAACACACC
10	Acol 10	(TG) ₃ C(GT) ₁₅ (GA) ₂₀	190	F CGTATGTAGGTGGACTTAATATGC RGCATGAAAGAAAGCTAATCACTC
11	Acol 11	(CA) ₉	200	F GGAAATGCAAGATCAGAGGCTC R GTTTGGTTGATTGAGGATGTCTT
12	Acol 12	(TA) ₉	118	F CCCCACATTTAGAACAGGAG R CCACCTTGGATGATGTTTC
13	Acol 13	(AG) ₁₅	139	F CTTATTGCCTACTCCCTAACCC R GCATGGGGTCTTGATCC
14	Acol 14	(GA) ₁₁	183	F GCGATAACCCCTTGATG R GGCGAATGACCATCTTATC
15	Acol 15	(GA) ₁₀	124	F CATATGTCCAATCAGGTTAGAC R CTCATTTGGTGACTGTAAAGC
16	Acol 16	(TC) ₁₁ (CA) ₅ AA(CA) ₅	220	F AAGGTCCAAGGGTTATGC R GGACGTTCTCTTGTCATGC
17	Acol 17	(AG) ₉	182	F ACTCTCGACAACAAGTAATTCAAC R CAACAGCCAATGACAATGATG
18	Acol 18	(TG) ₁₀	160	F GTCAGGTATTCAATCTTCTACGT R CACCATACCTCCACCTCATC
19	Acol 19	(CT) ₅ (CCCTCT) ₄ (CT) ₁₆ (AC) ₇	163	F GACTGAAACCATTCTTTTATC R TGTTGCGTATGTGGGTG
20	Acol 20	(GT) ₄ GGG(TG) ₆	136	F CAACCGCCACCATCAAACR AGTATACCAGTAGATCACAAGGATG

(*) Marcadores monomórficos em *A. colubrina*.

Tabela 5. Condições de amplificação dos marcadores microssatélites desenvolvidos para *A. Colubrina*.

<i>Locos</i>	Temperatura de Anelamento (°C)
Acol 01, Acol 03, Acol 04	50
Acol 18, Acol 19	52
Acol 08	53
Acol 10, Acol 14	54
Acol 20	56
Acol 02, Acol 07	57
Acol 05, Acol 06, Acol 09, Acol 12, Acol 13, Acol 15,	58
Acol 16, Acol 17	58
Acol 11	60

Assim, se considerarmos apenas o rendimento da segunda biblioteca (pois à primeira foram atribuídos erros não recorrentes da técnica) e contabilizarmos as perdas (a taxa de atrito) no desenvolvimento do conjunto de microssatélites resultantes dela, notaremos que houve uma eficiência no processo de cerca de 15,5% (12 SSR polimórficos para 78 clones sequenciados). Ou seja, tivemos uma taxa de atrito em torno de 84,5%, semelhante à de 83% encontrada por Squirrell et al. (2003). A Figura 9 resume essa problemática, apontando as perdas médias encontradas em cada etapa do desenvolvimento de um conjunto de marcadores microssatélites para a realização do trabalho pretendido.

Figura 9. Esquema mostrando as etapas no desenvolvimento de primers SSR e as taxas médias de atrito encontradas em cada uma delas. (Retirado e modificado de Squirrell et al., 2003).

3.2. ESTUDO DE POLIMORFISMO DOS LOCOS SSR DESENVOLVIDOS PARA *ANADENANTHERA COLUBRINA*

O equilíbrio de ligação em locos marcadores é um dos pressupostos básicos para sua utilização em análise de diversidade e estrutura genética, sistema de reprodução e análise de paternidade. Dos 91 testes realizados entre os pares de locos avaliados nas árvores de *A. colubrina* genotipadas com os 14 locos SSR polimórficos (Tabela 6), nenhum par sugeriu desequilíbrio gamético, após a correção de Bonferroni ($\alpha=0,05$). Os valores na tabela correspondem às probabilidades após 1.000 permutações, cujo valor limite de significância é 0,00055. Portanto, pode-se afirmar que os alelos de diferentes locos não estão associados e segregam independentemente. Certamente estes locos podem ser usados em estudos da estrutura e diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico contemporâneo, visto que não vão gerar vícios nessas estimativas.

Tabela 6. Desequilíbrio de ligação entre os locos microssatélites de *A. colubrina*.

Pares de locos		Pares de locos	
Acol 02 X Acol 05	0,0584	Acol 10 X Acol 20	0,2476
Acol 02 X Acol 09	0,4002	Acol 11 X Acol 12	0,3517
Acol 02 X Acol 10	0,6304	Acol 11 X Acol 13	0,0464
Acol 02 X Acol 11	0,3456	Acol 11 X Acol 14	0,2711
Acol 02 X Acol 12	0,2112	Acol 11 X Acol 15	0,0021
Acol 02 X Acol 13	0,1026	Acol 11 X Acol 16	0,0485
Acol 02 X Acol 14	0,2759	Acol 11 X Acol 17	0,0791
Acol 02 X Acol 15	0,6245	Acol 11 X Acol 18	0,0154
Acol 02 X Acol 16	0,3823	Acol 11 X Acol 19	0,9450
Acol 02 X Acol 17	0,7240	Acol 11 X Acol 20	0,4195
Acol 02 X Acol 18	0,6456	Acol 12 X Acol 13	0,0458
Acol 02 X Acol 19	0,3884	Acol 12 X Acol 14	0,4773
Acol 02 X Acol 20	0,9362	Acol 12 X Acol 15	0,1788
Acol 05 X Acol 09	0,3871	Acol 12 X Acol 16	0,0919
Acol 05 X Acol 10	0,5737	Acol 12 X Acol 17	0,0050
Acol 05 X Acol 11	0,0859	Acol 12 X Acol 18	0,8319
Acol 05 X Acol 12	0,0044	Acol 12 X Acol 19	0,8878
Acol 05 X Acol 13	0,3335	Acol 12 X Acol 20	0,0847
Acol 05 X Acol 14	0,7612	Acol 13 X Acol 14	0,7188
Acol 05 X Acol 15	0,4942	Acol 13 X Acol 15	0,7410
Acol 05 X Acol 16	0,2124	Acol 13 X Acol 16	0,1273
Acol 05 X Acol 17	0,0135	Acol 13 X Acol 17	0,1514
Acol 05 X Acol 18	0,4347	Acol 13 X Acol 18	0,4259
Acol 05 X Acol 19	0,6231	Acol 13 X Acol 19	0,0930
Acol 05 X Acol 20	0,6124	Acol 13 X Acol 20	0,0040
Acol 09 X Acol 10	0,9112	Acol 14 X Acol 15	0,6063
Acol 09 X Acol 11	0,5021	Acol 14 X Acol 16	0,5967
Acol 09 X Acol 12	0,6398	Acol 14 X Acol 17	0,5699
Acol 09 X Acol 13	0,3234	Acol 14 X Acol 18	0,0778
Acol 09 X Acol 14	0,8057	Acol 14 X Acol 19	0,8377
Acol 09 X Acol 15	0,0203	Acol 14 X Acol 20	0,6828
Acol 09 X Acol 16	0,8042	Acol 15 X Acol 16	0,1214
Acol 09 X Acol 17	0,7551	Acol 15 X Acol 17	0,4550
Acol 09 X Acol 18	0,9226	Acol 15 X Acol 18	0,3692
Acol 09 X Acol 19	0,1866	Acol 15 X Acol 19	0,8914
Acol 09 X Acol 20	0,0342	Acol 15 X Acol 20	0,0003
Acol 10 X Acol 11	0,2529	Acol 16 X Acol 17	0,0013
Acol 10 X Acol 12	0,8909	Acol 16 X Acol 18	0,7645
Acol 10 X Acol 13	0,3960	Acol 16 X Acol 19	0,2312
Acol 10 X Acol 14	0,0850	Acol 16 X Acol 20	0,0226
Acol 10 X Acol 15	0,1892	Acol 17 X Acol 18	0,2160
Acol 10 X Acol 16	0,4189	Acol 17 X Acol 19	0,2197
Acol 10 X Acol 17	0,8322	Acol 17 X Acol 20	0,6725
Acol 10 X Acol 18	0,1154	Acol 18 X Acol 19	0,7321
Acol 10 X Acol 19	0,7802	Acol 18 X Acol 20	0,3011
		Acol 19 X Acol 20	0,5162

Um total de 82 alelos foi identificado, sendo que o número de alelos por loco variou de dois (Acol 05) a 11 (Acol 15), com uma média de 5,857 (Tabela 7). Esse valor é menor que o número médio de alelos por loco observado em outras espécies arbóreas tropicais como *Caryocar brasilienses* (16; Collevatti et al., 1999), *Corythophora alta* (10,7; Hamilton, 2002), *Ceiba pentandra* (14; Brondani et al., 2003), *Jacaranda copaia* (13,3; Jones et al., 2003), *Tabebuia aurea* (18,8; Braga et al., 2007), *Eugenia uniflora* (14,4; Ferreira-Ramos et al., 2007), *Hymenaea courbaril* (10,7; Ciampi et al., 2008) e *Cariniana estrellensis* (8,5; Guidugli et al., 2009).

Conforme pode ser visto na Tabela 7, o valor da heterozigosidade observada variou de 0,064 (Acol 05) a 0,793 (Acol 12) com uma média de 0,417, enquanto que a estimativa da heterozigosidade esperada foi mais elevada (média de 0,572) variando 0,063 (Acol 05) a 0,812 (Acol 15).

Contudo, o índice de diversidade genética em *A. colubrina* ($H_E = 0,572$) foi compatível aos relatados em outras espécies florestais da América do Sul como *Carapa guianensis* ($H_E = 0,61$; Dayanandan et al., 1999), *Swietenia humilis* ($H_E = 0,53$; White et al., 1999), *Swietenia macrophylla* ($H_E = 0,66$; Novick et al., 2003), *Solanum lycocarpum* ($H_E = 0,33$; Martins et al., 2006), *Eugenia uniflora* ($H_E = 0,83$; Ferreira-Ramos et al., 2007) e *Cariniana legalis* ($H_E = 0,560$; Guidugli et al., 2009).

Uma deficiência de heterozigotos foi observada para a maioria dos locos, provavelmente devido à estratégia de amostragem dos indivíduos utilizados para sua caracterização (Efeito Wahlund) ou à presença de alelos nulos (*FAN*)(Tabela 7).

Além do elevado polimorfismo, este conjunto de marcadores apresentou alta probabilidade de exclusão de paternidade (Tabela 7). Assim, concluiu-se que para a espécie *A. colubrina* este conjunto de 14 marcadores é suficientemente informativo e poderá ser empregado como ferramenta adequada para a realização dos estudos genéticos propostos nesse trabalho.

Tabela 7. Características dos 14 locos polimórficos de *A. colubrina*.

Primer	Nº Acesso	Ta (°C)	A	H ₀	H _E	f	Pr(Ex1)	Pr(Ex2)	FAN
Acol 01	JN098377	57	1	-	-	-	-	-	-
Acol 02	JN098378		3	0,096	0,234	0,591	0,9513	0,8354	0,396
Acol 03	JN098379	50	1	-	-	-	-	-	-
Acol 04	JN098380		1	-	-	-	-	-	-
Acol 05	JN098381	53	2	0,064	0,063	-0,016	0,9838	0,9116	0,061
Acol 06	JN098382		1	-	-	-	-	-	-
Acol 07	JN098383	51	1	-	-	-	-	-	-
Acol 08	JN098384		1	-	-	-	-	-	-
Acol 09	JN098385	51	5	0,366	0,448	0,184	0,8695	0,7060	0,571
Acol 10	JN098386		9	0,304	0,809	0,629	0,5821	0,4014	0,043
Acol 11	JN098387	48	3	0,419	0,386	-0,086	0,9401	0,8434	0,060
Acol 12	JN098388		4	0,793	0,686	-0,158	0,6546	0,4782	0,120
Acol 13	JN098389	49	6	0,590	0,728	0,192	0,6239	0,4447	0,173
Acol 14	JN098390		3	0,225	0,288	0,219	0,9835	0,9072	0,052
Acol 15	JN098391	46	11	0,709	0,812	0,128	0,5131	0,3414	0,155
Acol 16	JN098392		8	0,612	0,825	0,260	0,7988	0,5238	0,139
Acol 17	JN098393	47	7	0,354	0,521	0,323	0,7144	0,5249	0,304
Acol 18	JN098394		6	0,433	0,739	0,418	0,7368	0,5611	0,125
Acol 19	JN098395	51	9	0,655	0,729	0,103	0,5885	0,4091	0,587
Acol 20	JN098396		6	0,222	0,734	0,701	0,7642	0,5920	0,571
Média	-	-	5,857	0,417	0,572	0,272*	-	-	-
Total	-	-	82	-	-	-	0,9886	0,9997	-

Número de alelos (A); Heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H₀); Índice de fixação (f); Probabilidade de exclusão do primeiro Pr(Ex1) e segundo Pr(Ex2) parental e Frequência de alelos nulos (FAN).

* $P < 0,05$

3.3. ESTUDOS DE AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA EM *ANADENANTHERA PEREGRINA*

Os 20 pares de *primers* desenvolvidos para *A. colubrina* foram testados para amplificar o DNA genômico de 30 indivíduos de *Anadenanthera peregrina*, espécie popularmente conhecida como angico preto ou angico de casca. Destes, 17 pares de *primers* (85%) amplificaram regiões SSR com sucesso. Dos 17 SSR transferidos, 14 mostraram-se polimórficos e três (17,64%) foram monomórficos. Interessantemente, dois dos marcadores polimórficos em *A. peregrina* (Acol 01 e

Acol 08) foram monomórficos em *A. colubrina*. As condições de amplificação utilizadas e as características de diversidade e poder de exclusão estão apresentadas na Tabela 8.

Um total de 80 alelos foi identificado nos 30 indivíduos de *A. peregrina*, usando os 14 locos SSR polimórficos. O número de alelos variou de dois (Acol 05) a nove (Acol 19), com uma média de 5,7 (Tabela 8). Esse valor foi semelhante ao encontrado em *A. colubrina* (5,85). Os padrões observados neste estudo estão em desacordo com estudos anteriores que relataram uma diminuição do polimorfismo na espécie analisada com *primers* heterólogos (Ciampi et al., 2008; Feres et al., 2009).

Tabela 8. Características dos locos microsatélites transferidos para *A. peregrina*.

Primer	Ta °C	A	H ₀	H _E	f	Pr(Ex1)	Pr(Ex2)	FAN
Acol 01 [€]	50	7	0,080	0,751	0,895	0,5865	0,4082	0,698
Acol 02	57	3	0,000	0,138	1,000	0,9865	0,9171	0,647
Acol 04 [£]	50	1	-	-	-	-	-	-
Acol 05	58	2	0,034	0,100	0,659	0,9942	0,9464	0,509
Acol 06 [£]	58	1	-	-	-	-	-	-
Acol 07 [£]	57	1	-	-	-	-	-	-
Acol 08 [€]	52	3	0,120	0,316	0,625	0,8947	0,7578	0,482
Acol 09	58	6	0,448	0,391	-0,150	0,8776	0,7157	-0,065
Acol 11	60	8	0,600	0,750	0,204	0,6225	0,4444	0,094
Acol 12	58	6	0,793	0,656	-0,214	0,6616	0,4774	-0,083
Acol 13	58	4	0,655	0,625	-0,049	0,7689	0,6139	0,005
Acol 14	54	8	0,571	0,777	0,268	0,6550	0,4804	0,115
Acol 15	58	6	0,607	0,669	0,094	0,7292	0,5465	0,080
Acol 16	57	3	0,087	0,518	0,835	0,8629	0,7695	0,433
Acol 18	51	7	0,048	0,803	0,942	0,4625	0,2981	0,728
Acol 19	53	9	0,586	0,730	0,199	0,5518	0,3721	0,174
Acol 20	56	8	0,571	0,754	0,245	0,6880	0,5134	0,225
Média		5,714	0,371	0,569	0,351*	-	-	-
Total		80	-	-	-	0,9897	0,9997	-

Número de alelos (A); Heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H₀); Índice de fixação (f); Probabilidade de exclusão do primeiro Pr(Ex1) e segundo Pr(Ex2) parental e Frequência de alelos nulos (FAN).

*P < 0,05

£ Monomórficos/ € SSR monomórficos em *A. colubrina* e polimórficos em *A. peregrina*.

De acordo com Peakall et al. (1998), fragmentos microssatélites relacionados que sejam amplificados em diferentes espécies podem possuir mutações, rearranjos e duplicações na região flanqueadora, ocasionando mudanças no número de repetições, as quais poderiam causar a redução do polimorfismo. Sendo assim, esperávamos encontrar uma diminuição nos valores de parâmetros de diversidade. Ao invés disso, foram encontrados valores muito semelhantes. Resultado parecido foi reportado por Nazareno et al. (2009) em estudo de transferibilidade entre espécies de *Ficus*. Por outro lado, se comparado com a média de alelos por locos encontrado em espécies analisadas com *primers* heterólogos, o valor é semelhante, como por exemplo, para *Eugenia dysenterica* ($H_E = 0,44$; Zucchi et al., 2003), *Acca sellowiana* ($H_E = 4,9$; Santos et al., 2007) e *Pyrus communis* L ($H_E = 6,6$; Wunsch e Hormaza, 2007).

O valor médio da heterozigosidade observada foi 0,371, variando de 0,00 (Acol 02) a 0,793 (Acol 12) (Tabela 8). O índice de diversidade genética em *A. peregrina* (0,569) também foi semelhante ao valor encontrado em *A. colubrina* (0,572). Uma deficiência de heterozigotos foi observada para a maioria dos locos, provavelmente devido à estratégia de amostragem dos indivíduos utilizados para sua caracterização (Efeito Wahlund) ou à presença de alelos nulos. Isso refletiu em um elevado e significativo índice de fixação (0,351). De fato, o teste para alelo nulo revelou que a maioria dos locos mostrou evidência de alelos nulos, com maiores indícios nos locos Acol 01, Acol 02, Acol 05 e Acol 18. Isso mostra que se deve ter cautela ao usar esses quatro marcadores nas análises genéticas e de sistemas de cruzamento, já que podem viciar as estimativas e dificultar a identificação dos parentais no estudo de fluxo gênico. Segundo Kim et al. (2004), a probabilidade de ocorrência de alelos nulos é maior nas espécies que foram analisadas com marcadores microssatélites heterólogos do que nas espécies em que os marcadores foram desenvolvidos.

Assim como em *A. colubrina*, em *A. peregrina* nenhum dos locos mostrou indício de desequilíbrio de ligação significativa após correção de Bonferroni, indicando que estes marcadores são apropriados para estudos genéticos populacionais. Os valores de probabilidade de exclusão de paternidade sobre os 14 locos polimórficos foram altos (Tabela 8), demonstrando que os marcadores microssatélites transferidos poderão ser usados em estudos de parentesco em populações naturais de *A. peregrina*.

A análise dos 20 locos microssatélites desenvolvidos para *Anadenanthera colubrina* e transferidos para *Anadenanthera peregrina* permitiu um melhor

entendimento dos padrões de diversidade genética e endogamia destas importantes espécies colonizadoras de ambientes na Região de Ribeirão Preto. Porém, mais do que entender essas questões, essas marcas podem nos ajudar na identificação das duas espécies desse gênero. Como abordado no item 2.1 do Material e Métodos do presente capítulo, a separação das duas espécies de *Anadenanthera* é difícil e exige um conhecimento especializado de morfologia vegetal, além de bastante critério na observação em campo. Na tentativa de facilitar essa identificação, durante o procedimento de transferibilidade dos marcadores para *A. peregrina*, houve um esforço para tentar reconhecer possíveis *primers* ou alelos marcadores (espécie-específicos). Porém, os testes de amplificação mostraram padrões muito semelhantes para as duas espécies, com regiões microssatélites sendo amplificadas em tamanhos sobrepostos nos indivíduos impossibilitando separá-las pela presença ou ausência de bandas de um mesmo loco.

Contudo, embora o sucesso de transferibilidade tenha sido muito grande, o que mostra bastante similaridade genética entre as duas espécies, houve quatro locos que mereceram destaque:

- Acol 01 e Acol 08: por apresentarem-se monomórficos na espécie em que foram desenvolvidos (*A. colubrina*) e polimórficos em *A. peregrina* (Figura 10 A e B);
- Acol 03 e Acol 17: por não terem sido transferidos para *A. peregrina*, sendo o Acol 17 polimórfico em *A. colubrina* (Figura 10 C e D).

Figura 10. Indivíduos de *A. colubrina* e *A. peregrina* (A e B) genotipados com Acol 01, mostrando o monomorfismo em *A. colubrina*; Indivíduos de *A. colubrina* genotipados com Acol 17 (C) e Acol 03 (D), não amplificados em *A. peregrina*.

Para que esses marcadores possam efetivamente serem qualificados como espécie-específicos é necessário um maior esforço amostral, aumentando o número de indivíduos coletados precedentes de diferentes regiões de ocorrência natural de ambas espécies. Isso seria importante em estudos ecológicos, de

interesse econômico e até mesmo em Antropologia, em que muitos resquícios de *Anadenanthera* têm sido encontrados em humanos mumificados e não confirmados (ver em Báez et al., 2000).

4. LITERATURA CITADA

- ALTSCHUL, SIRI VON REIS. 1964. A Taxonomic Study of the Genus *Anadenanthera*. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**, 193: 1-65.
- ALVES, R. M.; ARTERO, A. S.; SEBBENN, A. M.; FIGUEIRA, A. 2003. Mating system in natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Shumm., by microsatellite markers **Genetics and Molecular Biology** 26: 373-379.
- ALZATE-MARIN, A. L.; GUIDUGLI, M. C.; SORIANI, H. H.; MARTINEZ, C. A. H.; MESTRINER, M. A. 2009. A DNA miniprep procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 52: 1217-1224.
- BÁEZ, H.; CASTRO, M.M.; BENAVENTE, A.M.; KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; CAMARGO, C.; THOMAS, C. 2000. Drugs in prehistory: chemical analysis of ancient human hair. **Forensic Science International**. 108:173-179.
- BILLOTTE, N; LAGODA, P.J.L; RISTERUCCI, AM; BAURENS, FC. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits** 54:277-288.
- BORÉM, A. 2007. **Biotecnologia Florestal**. Viçosa:UFV, 387p.
- BRAGA, A. C.; REIS, A. M. M.; LEOI, L. T.; PEREIRA, R. W.; COLLEVATTI, R. G. 2007. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). **Molecular Ecology Notes** 7: 53-56.
- BRONDANI, R. P. V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, 97: 816-827.
- BRONDANI, R. P. V.; GAIOTTO, F. A.; MISSIAGGIA, A. A.; GRIBEL, R.; GRATTAPAGLIA, D. 2003. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, 3: 177-179.
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y.; MORETZSOHN, M. C.; AMARAL, Z. P. S. 2003. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microsatélites. **Circular Técnica**, v. 20, p. 1-11.
- CENIS, J. L. 2000. Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas. **Revista Terralia**, v. 12, p. 40-43.

- CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, v. 83, p. 51-57.
- CIAMPI, A. Y.; AZEVEDO, V. C. R.; GAIOTTO, F. A.; RAMOS, A. C. S.; LOVATO, M. B. 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 1074-1077.
- CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W.G.; MARRAZZO, M.T.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, 99: 65-72.
- COLLEVATTI, R.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. 1999. Development and characterisation of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v. 83, p. 748-756.
- DECROOCQ, V.; FAVÉ, M.G.; HAGEN, L.; BORDENAVE, L.; DECROOCQ, S. 2003. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. **Theoretical and Applied Genetics**, 106:912-922.
- EISEN, J. A Mechanistic basis for microsatellite instability. 1999. In: GOLDSTEIN, D. B et al. (Ed.) **Microsatellites – evolution and applications**. Oxford: Oxford University Press, p. 34 - 48.
- DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, 8: 1585-1592.
- FERES, J.M.; MARTINEZ, M.L.L.; MARTINEZ, C.A.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. 2009. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. **Molecular Ecology Resources** 9:434-437.
- FERREIRA, M. E.; GATTAPAGLIA, D. 1995. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p.
- FERREIRA-RAMOS, R.; LABORDA, P. R.; SANTOS M. O.; MAYOR M. S.; MESTRINER M. A.; SOUZA A. P.; ALZATE-MARIN A. L. 2007. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics**, 9: 1281-1285.
- GOUDET, J. 2002. FSTAT version 2.9.3 Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.

- GUIDUGLI, M. C.; ACCORONI, K. A.; MESTRINER, M. A.; CONTEL, E. P. B.; MARTINEZ, C. A.; ALZATE-MARIN, A. L. 2010. Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). **Genetics and Molecular Biology**, 33:131-134.
- GUIDUGLI, M. C.; CAMPOS T.; SOUSA A. C. B.; FERES J. M.; SEBBENN A. M.; MESTRINER M. A.; CONTEL E. P. B.; ALZATE-MARIN A. L. 2009. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics**, 10: 1001-1004.
- GUPTA, P. K.; BALYAN, H. S.; SHARMA, P. C.; RAMESH, B. 1996. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Sei**, 70: 45-54.
- HAMILTON, M. B. 2002. Isolation and characterization of nuclear microsatellite loci in the tropical tree *Corythophora alta* (Lecythidaceae). **Molecular Ecology Notes**, 2: 363-365.
- HARDY, O.; VEKEMANS, X. 2002. SPAGeDi 1. 2: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, 2: 618-620. Disponível em: <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/software.html>
- JONES, T. A. 2003. The restoration gene pool concept: Beyond the native versus non native debate. **Restoration Ecology**, v11: 281-290.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER. M. L.; MARSHALL, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, 16: 1099-1106.
- KIM, K.-S.; MIN, M.-S; AN, J.H.; LEE, H. 2004. Cross-species amplification of Bovidae microsatellites and low diversity of the endangered Korean Goral. **Journal of Heredity** 95: 521-525.
- KOBLÍZKOVÁ, A; DOLEZEL, J; MACAS, J. 1998. Subtraction with 3' modified oligonucleotides eliminates amplification artifacts in DNA libraries enriched for microsatellites. **Biotechniques**, 25: 32-38.
- LIAN, C.; MIWA, M.; HOTETSU, T. 2001. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. **Heredity**, 87: 88-98.
- MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; BUSO, G. S. C.; KAGEYAMA, P. Y. 2006. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, 7: 957-969.

- NAZARENO, A.G.; PEREIRA, R.A.S.; FERES, J.M.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. 2009. Transferability and characterization of microsatellite markers in two Neotropical *Ficus* species. **Genetics and Molecular Biology** 32(3): 568-571.
- NAZARENO, A. G. ; ZUCCHI, M. I. ; REIS, M. S. 2011. Microsatellite markers for *Butia eriospatha* (Arecaceae), a vulnerable palm species from the Atlantic Rainforest of Brazil . **American Journal of Botany**, 98:198-200.
- NOVICK, R. R.; DICK, C. W.; LEMES, M. R.; NAVARRO, C.; CACCONI, A.; BERMINGHAM, E. 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, 12: 2885–2893.
- OLIVEIRA, A. F; PÁDUA, J. G; ZUCCHI, M. I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29: 294-307.
- PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. 1998. Cross-Species Amplification of Soybean (*Glycine max*) Simple Sequence Repeats (SSRs) Within the Genus and Other Legume Genera: Implications for the Transferability of SSRs in Plants. **Molecular Biology and Evolution** 15(10): 1275–1287.
- POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Science**, 1: 209-245.
- ROA, A. C.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; DUQUE, M. C.; MAYA, M. M.; BONIERBALE, M. W.; IGLESIAS, C.; THOME, J. 2000. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany** 87: 1647-1655.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. **Humana Press**, Totowa, 365–386, 2000. Disponível em: http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi.
- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSH, E. F. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory**.
- SANGUINETTI, C. J.; DIAS, E. N.; SIMPSON, A. J. G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotech.**, 17: 914 -921.

- SANTOS, K.L.; WELTER, L.J.; DANTAS, A.C.M.; GUERRA, M.P.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O. 2007. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Acca sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genetics and Molecular Biology**, 30:73-79.
- SQUIRRELL, J; HOLLINGSWORTH, PM; WOODHEAD,M; RUSSELL, J; LOWE, AJ; GIBBY; M; POWELL, W. 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants. **Molecular Ecology** 12:1339–1348.
- TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. 1994. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics and Development**, 4: 832 – 837.
- TEMNYKH, S.; DECLERCK, G.; LUKASHOVA, A.; LIPOVICH, L.; CARTINHO, S.; MCCOUCH, S. 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. **Genome Research**, 11: 1441-1452.
- WANG Z.; WEBER J. L.; ZHONG G.; TANKSLEY, S. D. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, 88: 1-6.
- WEIR, B. S. 1996. Genetics data analysis II – Methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, **Inc. Publishers**.
- WHITE, G.M.; BOSCHER, D.H.; POWELL, W. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology** 8: 1899–1909.
- WUNSCH, A.; HORMAZA, J.I. 2007. Characterization variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. **Sci.Horticult**, 113: 37–43.
- YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SAWAMURA, Y.; KOTOBUKI, K.; BAN, Y.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. **Theoretical and Applied Genetics**, 102: 865–870.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATERNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology** 11: 1-16.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x/pdf>.
- ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO J.B.; CHAVES L.J.; COELHO A.S.G.; VENCOSKY, R. 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, 26: 449-457.

CAPÍTULO II

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL DE *ANADENANTHERA COLUBRINA* E *ANADENANTHERA PEREGRINA* EM ANGICAIS NA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO (SP)

RESUMO

A diversidade e a estruturação genética de duas amostras populacionais de *Anadenanthera colubrina* e *Anadenanthera peregrina* (angico) foram acessadas utilizando 14 locos microssatélites. Foram genotipadas 60 árvores de *A. colubrina* e 71 árvores de *A. peregrina*, distribuídas em “angicais” da região de Ribeirão Preto, no interior de São Paulo. A riqueza alélica variou de três a 14 alelos (média de 7 alelos por loco) em *A. colubrina* e de três a 11 alelos (média de 7,7 alelos por loco) em *A. peregrina*. A diversidade genética encontrada também teve pouca variação entre as duas espécies, tendo um valor médio de 0,592 em *A. colubrina* e 0,624 em *A. peregrina*. A heterozigosidade média observada foi sempre menor que a esperada para as duas espécies nos quatro angicais estudados, resultando em índices de fixação positivos e significantes: em média 0,310 e 0,312 em *A. colubrina* e *A. peregrina*, respectivamente. Essa estimativa aponta para a existência de endogamia nessas espécies em Ribeirão Preto, o que pode ser reflexo dos padrões de cruzamento e da distribuição genética espacial. A divergência genética foi acessada para as populações de cada uma das espécies e acusou uma elevada diferenciação, sugerindo aproximadamente 20% de estruturação entre os agrupamentos de *A. colubrina* e 33% entre os de *A. peregrina*, o que pode ser resultado da fragmentação e isolamento dos angicais em Ribeirão Preto, bem como do efeito fundador. A análise de distribuição espacial dos genótipos apontou estruturação genética para as amostras de *A. colubrina* e distribuição aleatória dos indivíduos de *A. peregrina*. Nos angicais de *A. colubrina*, a estruturação foi mais forte (com parentesco entre as árvores no grau de primos) até os primeiros 150 metros ($\Theta_{xy}=0,136$) em Acol\USP e até os 300 metros ($\Theta_{xy}=0,147$) em Acol\BP. Continuou havendo estruturação genética até próximo aos 200 metros em Acol\USP e 800 metros em Acol\BP, porém com um parentesco mais fraco. Em uma escala espacial fina a possível explicação para esse arranjo espacial dos genótipos de *A. colubrina* em estruturação de famílias seria a dispersão limitada de genes. Tais contastações podem ser explicadas por efeito fundador desses aglomerados de angico, que se tornaram mais frequentes na paisagem em Ribeirão Preto após a drástica perda da biodiversidade local.

1. INTRODUÇÃO

Florestas tropicais sazonalmente secas ocorrem em solos férteis, com um moderado a alto pH e bom estado nutricional, além de baixos níveis de alumínio. Tais características tornam esses solos favoráveis para a agricultura, o que resultou em enorme destruição dessas florestas em muitas áreas (Pennington et al., 2000). Embora exista uma dificuldade em estabelecer um padrão único para caracterizar os efeitos da fragmentação florestal, uma série de mudanças nas comunidades que sofrem esse processo tem sido levantada: aumento de espécies pioneiras, trepadeiras e de não-zoocóricas ou daquelas que ocupam o dossel; invasão de espécies alóctones; extensão do efeito de borda; redução nas taxas de migração; aumento nas taxas de mortalidade e recrutamento; e diminuição da biodiversidade com perda de espécies raras e ameaçadas de extinção levando à simplificação e homogeneização biótica dentro e entre fragmentos florestais (Tabarelli et al., 1999; Fahrig, 2003). Na região de Ribeirão Preto (SP), a drástica perda de áreas florestadas deixa evidente muitos desses putativos efeitos e, atualmente, o que tem chamado a atenção na paisagem é a elevada taxa de ocupação por espécies do gênero *Anadenanthera*. Estima-se (dados ainda não publicados) que mais da metade das áreas verdes remanescentes dessa região estejam densamente ocupadas por *A. colubrina* e *A. peregrina* (às vezes em associação). Embora essas espécies ocupem naturalmente os biomas regionais, acredita-se que essa vasta ocorrência possa ter relação com a perda de biodiversidade que, por sua vez, pode favorecer espécies mais tolerantes e de fácil ocupação, tais como as do gênero *Anadenanthera*.

A biodiversidade é definida como a diversidade de espécies, ecossistemas e diversidade genética presentes na natureza (Mcneely et al., 1990). A proteção da diversidade genética em geral é uma prioridade inerente aos planos da conservação, sendo o objetivo de longo prazo manter a viabilidade evolutiva das espécies. A diversidade genética é fundamental para a sustentabilidade das espécies, pois fornece matéria-prima para a adaptação, evolução e sobrevivência de populações (Rajora e Pluhar, 2003).

Nas últimas décadas, o foco das pesquisas tem sido direcionado para a conservação da biodiversidade em seus mais diversos componentes, pois atualmente as ferramentas científicas permitem quantificar a diversidade genética, os padrões de cruzamento e realizar estudos de fluxo gênico. Tais informações são importantes teoricamente e podem ser aplicadas com o objetivo de responder

questões práticas em ecologia (Freeland, 2005). Nesse sentido, as pesquisas sobre recuperação das áreas degradadas no Brasil, considerando, sobretudo, a conservação e/ou restauração da biodiversidade, associadas aos processos de licenciamento ambiental e o estímulo aos programas de reflorestamento, constitui-se hoje em um dos desafios estabelecidos nos principais programas de políticas públicas das Secretarias de Estado do Meio Ambiente (Barbosa, 2002).

A distribuição da variação genética em espécies de plantas pode ser influenciada pelo tamanho da população, distribuição geográfica da espécie, modo primário de reprodução (assexual, sexual, ambos), sistema de reprodução (autofecundação, cruzamento, sistema misto), mecanismos de dispersão das sementes e pólen (fluxo gênico) e tipo de comunidade em que a espécie comumente ocorre. Espécies que apresentam ampla distribuição geográfica, gerações longas, sistema de reprodução por cruzamentos e que sejam auto-incompatíveis, possuam longo tempo de fecundidade e que ocorram em estágios finais de sucessão, tendem a manter maiores níveis de variabilidade genética do que espécies com outras combinações destes fatores (Hamrick, 1983; Loveless e Hamrick, 1984).

O tamanho da população, o *fitness* e a variação genética podem depender de características diferentes das plantas, especialmente do tempo de vida, do sistema de acasalamento e raridade (Leimu et al. 2006). Espécies endêmicas, raras e densamente organizadas, tendem a apresentar uma redução da variabilidade genética (Cole, 2003; Hmeljevski et al., 2011), o que é atribuído principalmente à influência de forças evolutivas como deriva genética e seleção, além de eventos como gargalos genéticos e efeito fundador.

A estrutura genética de uma população refere-se à forma como a variabilidade genética é distribuída entre e dentro dos níveis hierárquicos de subdivisão de uma espécie (Brown, 1978). Esta estrutura pode ser manifestada entre distintas populações geográficas, dentro de um grupo local de espécies ou mesmo em grupos de progênes (Loveless e Hamrick, 1984) e pode ser definida como a distribuição não aleatória de alelos e genótipos (Hamrick e Loveless, 1986). O desenvolvimento e a manutenção da estrutura genética das populações ocorrem devido às interações de um conjunto complexo de fatores evolutivos como: variação no conjunto gênico; organização desta variação dentro dos genótipos; distribuição espacial dos genótipos; sistema de reprodução; fluxo gênico; seleção; deriva; mutação; e processos de crescimento, mortalidade e reposição dos indivíduos que darão origem às populações futuras (Hamrick, 1986). De

importância primária para a formação da estrutura é a seleção e o fluxo gênico (Hamrick, 1986). Em geral, espécies com intenso fluxo gênico têm menor diferenciação do que espécies em que ele é restrito.

A estrutura genética de qualquer espécie pode ser demográfica ou temporal (Brown, 1978; Loveless e Hamrick, 1984). A estrutura genética demográfica refere-se à distribuição espacial dos indivíduos, sendo característica de cada espécie e determinada principalmente pelo sistema de reprodução e pelos padrões de dispersão. No caso de espécies de plantas, é o fluxo de sementes, pólen e propágulos que determina o padrão da estrutura genética demográfica. De acordo com esses padrões, juntamente com seu histórico de vida (eventos de colonização, migração e extinção), uma espécie pode desenvolver uma estrutura espacial agrupada de indivíduos dentro das populações, dando origem às subpopulações ou demes. Tais agrupamentos intrapopulacionais são caracterizados por um maior grau de parentesco e homogeneidade gênica entre os indivíduos que os compõem. Já a estrutura genética temporal refere-se à subdivisão da diversidade genética entre gerações (por exemplo, diferentes fases ontogênicas: plântulas, jovens e adultos) (Loveless e Hamrick, 1984). A compreensão de como a variação genética é distribuída e quais são as características do ambiente ou da espécie que influenciam esta distribuição é fundamental para o manejo racional dos recursos genéticos de uma espécie em programas de melhoramento e conservação (Hamrick, 1983).

Com tais pressupostos e visando investigar o comportamento das espécies que comumente ocorrem em populações de elevada densidade, os objetivos endereçados no presente capítulo foram: quantificar os padrões de diversidade genética de *A. colubrina* e *A. peregrina* em angicais na Região de Ribeirão Preto, além de estudar a estrutura genética espacial desses indivíduos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. LOCAIS DE ESTUDO

A amostragem do material biológico para o desenvolvimento desta etapa da pesquisa foi realizada em três áreas localizadas na Região de Ribeirão Preto (SP). A escolha dessas áreas, foi feito com base no levantamento dos 102 remanescentes florestais realizado por Kotchekoff-Henriques (2003). Inicialmente foram identificadas 37 áreas (Figura 11) contendo indivíduos do gênero *Anadenanthera* para visita e inspeção. À partir disso, foram selecionadas

três regiões de coleta: uma contendo *Anadenanthera colubrina* e *Anadenanthera peregrina* e outras duas onde ocorre apenas uma das duas espécies.

A primeira área de coleta compreende uma porção urbana, localizada no *campus* da Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto – USP/RP. Esse *campus* possui duas grandes áreas de reflorestamento, totalizando 45ha de mata, além de várias porções de remanescente florestal preservado. Sendo assim, na área verde da USP/RP, foram encontradas as duas espécies de angico, ocorrendo em maciços quase monoespecíficos e em porções distintas. Desses maciços, dois foram escolhidos, cada um contendo *A. colubrina* e *A. peregrina*, separadamente (Figura 12, representada por Acol/USP e Aper/USP). Da espécie *A. colubrina*, foram coletados 30 indivíduos próximos a área de reflorestamento (23K 202632.00 E; 765730.00 S), presentes em um maciço constituído por aproximadamente 200 indivíduos adultos dessa espécie. Essa área de coleta será representada por Acol/USP. Da espécie *A. peregrina* foram amostrados todos os 16 indivíduos isolados presentes no angical representado por Aper/USP (23K 204414.16 E; 7657264.96 S).

Um segundo angical da espécie *A. colubrina* foi identificado em uma área de recente desmatamento (23K 207595.00 E, 7644684.00 S), próxima ao distrito de Bonfim Paulista, zona rural de Ribeirão Preto, o qual foi denominado de Acol/BP (Figura 12). Neste angical foi realizado o censo populacional, coletando-se amostras foliares de 30 árvores e sementes de dez delas para realização dos estudos genéticos da espécie.

A segunda área de coleta de *A. peregrina* (23K 205405.00 E; 7635040.00 S) é composta por um fragmento florestal de aproximadamente 15 hectares (Representado por Aper/Faz na Figura 12), que possui alta diversidade de espécies arbóreas e se encontra em bom estado de conservação. Aqui, 17 indivíduos adultos de *A. peregrina* agrupados encontram-se em um angical na borda da mata. Por último, na mesma estrada, foi identificado outro angical monoespecífico de *A. peregrina* com 38 indivíduos. Essa população também aparenta ser constituída por indivíduos remanescentes do processo de fragmentação florestal e encontra-se na beira da rodovia Antonio Machado Sant'Anna (SP-255) (23K 204806.00 E; 7635215.00 S). Todos os indivíduos de *A. peregrina* dessa região foram amostrados e serão referidos como Aper/Faz e Aper/SP-255, respectivamente (Figura 12).

Figura 11. Mapa do município de Ribeirão Preto mostrando a localização das 37 áreas visitadas para a escolha dos locais de coleta de angico para a realização desse trabalho.

Figura 12. Mapa mostrando a localização das áreas de coleta de *A. colubrina* e *A. peregrina* escolhidas para a realização deste trabalho.

Portanto, a amostragem para as duas espécies ficou da seguinte maneira:

- *A. colubrina*: 60 indivíduos amostrados, sendo 30 pertencentes à área Acol/USP e 30 pertencentes à área Acol/BP;

- *A. peregrina*: 71 indivíduos amostrados, sendo 16 pertencentes à área Aper/USP, 17 pertencentes à Aper/Faz e 38 pertencentes à beira da estrada que dá acesso ao angical da mata (Aper/SP-255).

As folhas dos indivíduos adultos foram coletadas e armazenadas em freezer -20°C até a extração do DNA.

2.2. EXTRAÇÃO DNA

A metodologia de extração e quantificação do DNA foi similar à descrita no Capítulo I, item 2.3.

2.3. ANÁLISE DOS SSR

A amplificação do DNA das espécies *A. colubrina* e *A. peregrina* foi realizada com os 14 pares de locos microsatélites de acordo com as especificações apresentadas em Feres et al. (2012) e também na Tabela 5. Para as análises genéticas de *A. colubrina* foram utilizados os seguintes marcadores SSR: Acol 02, Acol 05, Acol 09, Acol 10, Acol 11, Acol 12, Acol 13, Acol 14, Acol 15, Acol 16, Acol 17, Acol 18, Acol 19 e Acol 20. Para as análises genéticas de *A. peregrina*, os marcadores SSR utilizados foram: Acol 01, Acol 02, Acol 05, Acol 08, Acol 09, Acol 11, Acol 12, Acol 13, Acol 14, Acol 15, Acol 16, Acol 18, Acol 19 e Acol 20.

Os padrões eletroforéticos, a coloração, a revelação das bandas, secagem e leitura dos géis, também seguiram a metodologia descrita anteriormente (item 2.7 do Capítulo I).

2.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E ENDOGAMIA

A diversidade genética da geração adulta das duas espécies de *Anadenanthera* foi caracterizada pelos índices: número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) e número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e = 1/(1 - H_E)$). Estes índices de diversidade foram calculados utilizando o programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002) e comparados entre si usando o método jackknife sobre os locos.

Também foi estimado o índice de fixação (F), conforme Weir (1996) - $\hat{F} = 1 - H_0 / H_E$ - e sua significância (determinada por 10.000 permutações sobre os locos) usando o programa SPAGeDi (Hardy e Vekemans, 2002).

DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES

As diferenças genéticas presentes entre os angicais de *A. colubrina* e *A. peregrina* foram acessadas através de dois métodos: estatística F_{ST} clássica de Wright (Nei, 1977) e estatística G_{ST}' de Hedrick (Hedrick, 2005) utilizando o programa GDA_NT (Degen, 2006).

ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE MUTAÇÃO E DERIVA

Cornuet e Luikart (1996) desenvolveram um teste para detectar recentes gargalos ou expansões populacionais, usando dados genéticos. O teste é baseado na diferença entre a heterozigosidade esperada (diversidade genética - H_E) e a heterozigosidade calculada a partir do número de alelos esperado numa população com acasalamento aleatório, tamanho constante e em equilíbrio de mutação e deriva (H_{eq}). Para verificar se as populações de *A. colubrina* e *A. peregrina* encontram-se em equilíbrio entre mutação e deriva genética (ou seja, $H_E = H_{eq}$), análises foram feitas com todos os locos polimórficos empregados para cada espécie.

A hipótese nula foi testada pelo teste do sinal de Wilcoxon, por ser o mais robusto quando utilizado para menos de 20 locos (Piry et al., 1999), baseando-se em 5.000 replicações através do programa Bottleneck 1.2.02 (Cornuet e Luikart, 1996). Estes testes baseiam-se no princípio de que populações que experimentaram uma redução recente de seu tamanho efetivo populacional exibem uma redução mais rápida do número de alelos do que da heterozigosidade esperada (H_E) pelas proporções de EHW nos locos polimórficos. Assim, segundo Luikart et al. (1998), populações que passaram por um processo recente de gargalo genético apresentam um excesso temporário de heterozigosidade. Isso faz com que H_E se torne maior que a heterozigosidade esperada sob equilíbrio entre mutação e deriva (H_{eq}), pois esta é calculada a partir do número de alelos (Cornuet e Luikart, 1996; Piry et al., 1999). Consequentemente, em uma população que sofreu um recente processo de gargalo genético, espera-se que $H_E > H_{eq}$.

ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS GENÓTIPOS

A distribuição espacial dos genótipos foi analisada para árvores adultas amostradas em todos os angicais estudados, de ambas as espécies. Estas análises foram realizadas utilizando-se a estimativa do coeficiente de coancestria (θ_{xy}) proposto por Loiselle et al., (1995), entre pares de árvores dentro de dez classes de distância. O coeficiente θ_{xy} mede a extensão da similaridade entre os indivíduos X e Y, relativo à similaridade genética média entre dois indivíduos aleatórios da amostra (Hardy e Vekemans, 2002).

Para visualizar a estrutura genética espacial, os valores de θ_{xy} foram calculados para a média de pares de indivíduos dentro das classes de distância determinadas. O tamanho das classes foi determinado em função do número igual de pares de árvores comparadas dentro de cada classe. Esta metodologia gera classes de distâncias de diferentes tamanhos, mas permite obter maior precisão nas comparações das estimativas de coancestrias entre diferentes classes, pois os valores médios comparados entre classes são estimados com a mesma precisão (mesmo número de pares). Para testar se os valores médios eram significativamente diferentes de zero e a existência de estrutura genética espacial, o intervalo de confiança a 95% de probabilidade foi calculado para cada valor observado em cada classe de distância, usando permutação de indivíduos (1.000). As estimativas médias de coancestrias e os intervalos de confiança foram usados para a obtenção de um correlograma. As análises foram conduzidas utilizando o programa SPAGeDi versão 1.2 (Hardy e Vekemans, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. DIVERSIDADE GENÉTICA, ENDOGAMIA E DIVERGÊNCIA GENÉTICA POPULACIONAL EM *ANADENANTHERA COLUBRINA*

O resumo dos resultados das análises da diversidade genética para todos os indivíduos das populações de *Anadenanthera colubrina* amostrados na região de Ribeirão Preto estão apresentados na Tabela 9.

Nas análises realizadas com os 14 locos, foram identificados 96 alelos em *A. colubrina*. O número de alelos por loco variou de três (Acol 05, Acol 11 e Acol 14) a 14 (Acol 15) com uma média de 7 alelos/loco. O número efetivo de alelos por loco foi menor do que o número de alelos por loco, variando de 1,22 (Acol 05) a 5,867 (Acol 15 e Aco 16) alelos, com média de 3,312 alelos/loco. Isso indica que muitos

alelos são raros (frequências menores ou iguais a 5 %). De fato, poucos alelos nos quatorze locos tiveram frequência superior a 25% e, em geral, um a cinco alelos tinham frequência maior do que 10% e os demais eram raros.

Tabela 9. Diversidade genética e endogamia de 14 locos microssatélites em árvores adultas de *Anadenanthera colubrina*. *N* é o número de indivíduos genotipados; *K* é o número total de alelos; *A_e* é o número efetivo de alelos nos locos; *H_E* e *H_O* são a heterozigosidade esperada e observada, respectivamente; *f* é o índice de fixação.

Locus	N	K	<i>A_e</i>	<i>H_E</i>	<i>H_O</i>	<i>f</i>
Acol 02	60	4	1,452	0,3114	0,1373	0,5617
Acol 05	60	3	1,222	0,1817	0,1569	0,1379
Acol 09	59	6	1,959	0,4895	0,3600	0,2665
Acol 10	51	9	4,744	0,7892	0,2195	0,7243
Acol 11	60	3	1,537	0,3494	0,3137	0,1031
Acol 12	59	6	4,144	0,7587	0,8367	-0,1041
Acol 13	47	6	4,578	0,7816	0,5946	0,2417
Acol 14	60	3	1,225	0,1835	0,1373	0,2537
Acol 15	60	14	5,867	0,8295	0,7255	0,1265
Acol 16	60	8	5,867	0,8295	0,6078	0,2692
Acol 17	60	8	3,094	0,6768	0,5098	0,2486
Acol 18	59	7	3,111	0,6785	0,3673	0,4612
Acol 19	58	10	4,735	0,7888	0,6042	0,2360
Acol 20	51	9	2,841	0,6480	0,1707	0,7389
Média	57	7	3,312	0,5926	0,4101	0,3101*

* $P < 0,05$

O índice de fixação foi alto e significativo em todos os conjuntos amostrais, sugerindo excesso de homozigotos e que algum processo está causando à endogamia nessas populações, tais como cruzamento entre parentes, deriva genética (efeito Wahlund) ou segregação de alelos nulos. As análises de sistema de cruzamento e fluxo gênico poderão auxiliar na interpretação desses resultados.

Quando analisamos os angicais de *A. colubrina* separadamente encontramos que os valores de heterozigosidade observada, diversidade genética e índice de fixação são muito semelhantes e não diferiram estatisticamente entre si para as duas áreas de coleta, como pode ser visualizado na Tabela 10.

Tabela 10. Diversidade genética e endogamia de 14 locos microsatélites em dois angicais de *Anadenanthera colubrina*. K é o número médio de alelos por locos; H_E é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_o é a heterozigosidade observada; f é o índice de fixação.

População	K	H_E	H_o	f
Acol/USP	5,71 (0,216)	0,568 (0,012)	0,407 (0,123)	0,288*
Acol/BP	5,01 (0,227)	0,556 (0,021)	0,414 (0,145)	0,260*

() Erro padrão

* $P < 0,05$

O índice de fixação continuou sendo alto e significativo nos dois conjuntos amostrais, mostrando que provavelmente esse déficit de heterozigotos provenha de características reprodutivas da espécie ou efeitos de fragmentação, já que isolando as populações o efeito Wahlund tende a desaparecer. Uma hipótese alternativa para o excesso de homozigotos inclui a ocorrência de alelos nulos (Nybom, 2004) como sugerido no Capítulo I desse relatório.

Porém, de uma forma geral, observa-se que ambas os agrupamentos apresentam níveis de diversidade genética mais baixos que os encontrados para outras espécies florestais como, por exemplo, em *Carapa guianensis* ($H_E = 0,61$, Dayanandan et al., 1999), *Swietenia macrophylla* ($H_E = 0,66$, Novick et al., 2003), *Eugenia uniflora* ($H_E = 0,83$, Ferreira-Ramos et al., 2007) e *Cariniana estrellensis* ($H_E = 0,730$, Guidugli et al., 2009). Isso pode refletir características do sistema reprodutivo das espécies, como descrito no próximo capítulo. Como ressaltado anteriormente, as espécies do gênero *Anadenanthera* tendem a formar agrupamentos fortemente adensados. Uma hipótese para explicar esses agrupamentos de angicais é a perda da biodiversidade local, que acarreta condições biológicas para o estabelecimento e expansão dessas espécies na região de Ribeirão Preto. Sendo assim, tais angicais podem ter sido originados à partir de poucos indivíduos remanescentes do processo de fragmentação, que mediante condições favoráveis e elevada capacidade adaptativa da espécie, conseguiram dominar a paisagem florestal. Considerando essa hipótese, esses demes de *Anadenanthera* podem estar sujeitos ao “efeito fundador”.

As populações naturais de plantas e animais podem passar por pontos de estrangulamento onde os números são muito reduzidos. Muitas vezes, este fato pode constituir um evento fundador, especialmente quando alguns indivíduos colonizam um novo território, seguido de um aumento muito rápido/explosivo [repentino] populacional, com aumento de forma acentuada nos números novamente, até que a capacidade limite do novo ambiente seja atingida. Durante evento fundador, existe potencial para que a base genética da nova população

mude drasticamente, tanto pelo próprio resultado do efeito de amostragem no gargalo, como em gerações subsequentes, através de deriva genética e relaxamento possível de pressões de seleção (Tagartt et al., 1990). Evidência de diferenciação genética, incluindo uma redução na heterozigosidade, vem sendo reportada em populações naturais que possivelmente sofreram esse efeito.

Além disso, pequenas populações são mais propensas a estocasticidade demográfica, ambiental e genética (Oostermeijer et al., 2003; Hmeljevski et al., 2011) do que grandes populações, devido à perda de variação genética através de deriva genética, aumento da autofecundação, acasalamento entre indivíduos aparentados e endogamia (Hmeljevski et al., 2011). Nesse sentido, estudos recentes têm apontado que o tamanho da população tem um efeito altamente significativo sobre a diversidade genética, sugerindo que populações pequenas consistentemente contêm variação genética significativamente menor do que grandes populações (Aguilar et al 2008; Leimu et al 2006; Hmeljevski et al., 2011.).

Portanto, a baixa variabilidade genética encontrada nos angicais da Região de Ribeirão Preto pode ser entendida pela soma de fatores: efeito fundador (o que delimitou a base genética do agrupamento) e adensamento populacional (o que promove o cruzamento entre indivíduos próximos e possivelmente aparentados e torna mais drásticos os efeitos da deriva genética).

A divergência genética entre as duas populações de *A. colubrina* estudadas foi examinada através das estatísticas F de Wright (F_{st}) e de Hedrick (G_{ST}') (Tabela 11). Os resultados mostraram diferenças entre os métodos aplicados. A estimativa de Wright (F_{st}) sugeriu uma baixa, porém positiva e significativa, variação entre os grupos (9,1 %). Em contraste, as estimativas de Hedrick (G_{ST}') mostraram diferenças maiores e significativas entre os agrupamentos (20,4%).

A estimativa obtida pelo método de Nei foi muito inferior à obtida pelo método de Hedrick. Isso porque o primeiro método (F_{ST}) é indicado apenas para genes com alelos com alta frequência. Como, no presente trabalho, o marcador utilizado (microsatélite) produz um grande número de alelos, muito deles em baixa frequência, tal estimativa pode apresentar valores não representativos da realidade (Hedrick, 2005).

Tabela 11. Parâmetros de diferenciação genética entre as populações de *A. colubrina*. F_{st} é a diferenciação genética entre as populações segundo Wright; G_{st}' é a diferenciação genética entre as populações segundo Hedrick.

Loco	F_{st}	G_{st}'
Acol 02	0,0717	0,067
Acol 05	0,1286	0,088
Acol 09	0,0378	0,057
Acol 10	0,0393	0,161
Acol 11	0,1635	0,177
Acol 12	0,1487	0,455
Acol 13	0,0524	0,201
Acol 14	0,0058	0,004
Acol 15	0,0634	0,292
Acol 16	0,1285	0,547
Acol 17	0,0617	0,157
Acol 18	0,0470	0,119
Acol 19	-0,0135	-0,061
Acol 20	0,3091	0,587
Média	0,0916 (+/- 0,0067)*	0,204 (+/- 0,0077)*

* $P < 0,05$

A estatística de Nei mede a variação entre os grupos em relação à variação total da população, mas sem especificar a identidade dos alelos envolvidos. Em contraste, a estatística de Hedrick (2005) mede a diferenciação entre as populações levando em consideração a frequência e o tipo de alelo. Portanto, a medida de Hedrick (2005) pode ser considerada mais específica para microssatélites e será considerada como a estimativa medida mais plausível para a divergência genética entre as gerações estudadas.

Dessa forma, essa elevada diferenciação genética entre os angicais numa região próxima como a de coleta (aproximadamente 14 km), reforça a ideia de um possível efeito fundador ocorrendo nos agrupamentos de *A. colubrina* em Ribeirão Preto.

3.2. DIVERSIDADE GENÉTICA, ENDOGAMIA E DIVERGÊNCIA GENÉTICA POPULACIONAL EM *ANADENANTHERA PEREGRINA*

Através das análises realizadas com os 14 locos microssatélites transferidos para *A. peregrina* foram identificados 108 alelos. O número de alelos por loco variou de três (Acol 02, Acol 05 e Acol 08) a 11 (Acol 14 e Acol 19) com uma média de 7,7 alelos/loco. O número efetivo de alelos por loco foi menor do que o número de alelos por loco, variando de 1,121 (Acol 05) a 7,113 (Acol 18) alelos, com média

de 2,657 alelos/loco (Tabela 12). Isso indica, assim como em *A. colubrina*, que muitos alelos são raros (frequências menores ou iguais a 5 %). Para essa espécie o índice de fixação foi também positivo e significativo em todos os conjuntos amostrais (Tabela 12), sugerindo excesso de homozigotos e que processos como deriva genética, cruzamento entre parênteses e isolamento reprodutivo estejam levando à endogamia nessas populações.

Tabela 12. Diversidade genética e endogamia de 14 locos heterólogos de microssatélites em árvores adultas de *Anadenanthera peregrina*. N é o número de indivíduos genotipados; K é o número total de alelos; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_E é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_o é a heterozigosidade observada; f é o índice de fixação.

Locus	N	K	A_e	H_E	H_o	f
Acol 01	64	10	4,706	0,788	0,141	0,823
Acol 02	68	3	1,198	0,166	0,029	0,823
Acol 05	71	3	1,121	0,108	0,028	0,741
Acol 08	61	3	1,862	0,463	0,164	0,648
Acol 09	70	9	3,673	0,728	1,000	-0,378
Acol 11	64	9	4,415	0,773	0,641	0,173
Acol 12	70	10	3,666	0,727	0,829	-0,140
Acol 13	70	7	2,874	0,652	0,643	0,014
Acol 14	65	11	4,064	0,754	0,600	0,205
Acol 15	70	10	3,032	0,670	0,586	0,127
Acol 16	53	4	2,114	0,527	0,208	0,608
Acol 18	52	10	7,113	0,859	0,135	0,845
Acol 19	68	11	4,946	0,798	0,559	0,301
Acol 20	68	8	3,557	0,719	0,456	0,368
Média	65,238	7,714	2,657	0,624	0,430	0,312*

* $P < 0,05$

Quando estudamos os angicais de *A. peregrina* separadamente, verificamos que os valores de heterozigosidade observada, diversidade genética e índice de fixação são muito semelhantes para as três áreas de coleta, como pode ser visualizado na Tabela 13. O agrupamento que apresentou menor diversidade genética foi o angular presente na USP/RP.

O índice de fixação, assim como em *A. colubrina*, foi alto e significativo em todos os conjuntos amostrais, mostrando que provavelmente esse déficit de heterozigotos provenha de características reprodutivas da espécie ou efeitos de fragmentação, como discutido anteriormente em *A. colubrina*. Uma hipótese alternativa para o excesso de homozigotos inclui a ocorrência de alelos nulos (Nybohm, 2004). Aqui essa característica merece um maior destaque por se

trataram de marcadores heterólogos (i.e., marcadores transferidos de *A. colubrina*).

Tabela 13. Diversidade genética e endogamia de 14 locos microssatélites em angicais de *Anadenanthera peregrina*. K é o número total de alelos; H_E é a heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_o é a heterozigosidade observada; f é o índice de fixação.

Angical	K	H_E	H_o	f
Aper/USP	4,142 (0,198)	0,483 (0,013)	0,432 (0,142)	0,106*
Aper/Faz	4,357 (0,201)	0,562 (0,023)	0,436 (0,225)	0,229*
Aper/Br255	6,928 (0,277)	0,621 (0,022)	0,425 (0,179)	0,318*

() Erro padrão

* $P < 0,05$

Se compararmos a diversidade genética com espécies florestais em que marcadores heterólogos foram usados, como por exemplo, em *Acca sellowiana* ($H_E = 0,64$, Santos et al., 2007) e *E. dysenterica* ($H_E = 0,44$, Zucchi et al., 2003), o valor aproxima-se do estimado nesse trabalho. Isso pode refletir efeitos da fragmentação florestal e/ou as características do sistema reprodutivo, assim como para *A. colubrina*. Como ressaltado anteriormente, os estudos subsequentes ajudarão a responder tais questionamentos.

A Tabela 14 apresenta os valores de divergência genética entre as três populações de *A. peregrina* para as estatísticas F de Wright (F_{st}) e de Hedrick (G_{ST}). Os resultados para divergência genética mostraram diferenças, assim como em *A. colubrina*, entre as estatísticas aplicadas. O F_{ST} sugeriu uma significativa variação interpopulacional (12 %). Em contraste, as estimativas de Hedrick (G_{ST}) mostraram elevadas diferenças entre as três populações 33,5%. A diferenciação genética segundo Hedrick considerando as três populações separadamente está resumida na Tabela 15. Quando analisamos os angicais separadamente notamos que a diferenciação aumenta com a distância (Aper/USP é o angical geneticamente mais distante dos demais), como é esperado (Tabela 15). Porém, mesmo os angicais bem próximos (Aper/Faz X Aper/Br255) possuem diferenças significativas (~8%), o que também reforça a ideia de efeito fundador nessa espécie.

Tabela 14. Parâmetros de diferenciação genética entre os angicais de *A. peregrina* na geração de adultos. F_{st} é a diferenciação genética entre as populações segundo Wright; G_{ST}' é a diferenciação genética entre as populações segundo Hedrick.

Loco	F_{st}	G_{ST}'
Acol 02	0,275	0,888
Acol 05	0,005	0,009
Acol 09	0,022	0,025
Acol 10	0,222	0,328
Acol 11	0,008	0,003
Acol 12	0,185	0,691
Acol 13	0,029	0,112
Acol 14	0,015	0,063
Acol 15	0,156	0,536
Acol 16	0,207	0,675
Acol 17	0,258	0,508
Acol 18	0,024	0,200
Acol 19	0,021	0,160
Acol 20	0,124	0,492
Médial	0,121* (+/- 0,022)	0,335* (+/- 0,0114)

* $P < 0,05$

Tabela 15. Parâmetros de diferenciação genética entre os angicais de *A. peregrina* na geração de adultos segundo Hedrick (G_{ST}') e distância aproximada entre os angicais em quilômetros. G_{ST}' é a diferenciação genética entre as populações.

Angicais comparados	G_{ST}'	Distâncias (Km)
Aper/USP X Aper/Faz	0,262* (+/- 0,0234)	22,2
Aper/USP X Aper/Br255	0,326* (+/- 0,0122)	22
Aper/Faz X Aper/Br255	0,084* (+/- 0,0032)	0,6

* $P < 0,05$

Em comparação com as populações de *A. colubrina*, as de *A. peregrina* apresentaram uma diferenciação populacional maior. Isso pode ser reflexo das características reprodutivas da espécie ou o grau de isolamento que os indivíduos estão sujeitos.

Para *A. peregrina* também vale a possível explicação sobre a formação desses densos e numerosos angicais na região de Ribeirão Preto discutida para *A. colubrina*. Assim, a variação na baixa diversidade genética encontrada e a considerável diferenciação genética entre os grupos de angico estudados, pode refletir uma dinâmica de colonização, fortemente influenciada pelo efeito fundador. Quando novas populações são estabelecidas por um pequeno número de fundadores originais, a heterozigosidade pode diminuir devido à deriva aleatória. Esses agrupamentos podem ser compostos por indivíduos de elevado parentesco,

o que pode estar associado com altos níveis de homozigose (Templeton e Levin, 1979), explicando, também, o alto índice de fixação encontrado.

Uma outra explicação para esse possível efeito fundador é a fragmentação florestal. Como discutido na Introdução da tese, Ribeirão Preto e região tem pouquíssimos remanescentes florestais, graças à sucessivas expansões urbanas e do agronegócio. No processo de supressão da paisagem natural, algumas áreas são poupadas, especialmente as de solo raso, pedregoso e pobre, onde as culturas comerciais não conseguem se estabelecer. O gênero *Anadenanthera*, dentre muitas característica ecológicas importantes, tem a capacidade de se estabelecer nesses locais, podendo ser favorecido diante do processo de fragmentação do habitat. Porém, a base genética das espécies de angico, embora mais favorecido que as demais espécies arbóreas da região, sofre perda de diversidade. O resultado desse processo é o estabelecimento de angicais à partir de poucos indivíduos, que aumentam graças às características reprodutivas das espécies, facilidade de germinação das sementes e estabelecimento das plântulas, além da alelopatia presente no gênero.

Como podemos notar ao longo desse tópico, os parâmetros genéticos encontrados para as três populações de *A. peregrina* não são apenas semelhantes entre si. Os valores e conclusões tirados desse trabalho mostram que as duas espécies de *Anadenanthera* são muito semelhantes.

A própria facilidade na transferibilidade dos marcadores dá evidências de que há bastante correspondência genética entre as duas, o que pode refletir em características ecológicas também semelhantes. Em termos gerais, a chance de sucesso na transferibilidade (amplificação heteróloga) de sequências de DNA por PCR é inversamente relacionada à distância evolutiva entre as duas espécies (Zucchi et al., 2003). Pesquisas de FitzSimmons et al. (1995) constataram que pode-se conseguir uma eficiência superior a 50% em espécies que apresentam um tempo de divergência entre 15-25 milhões de anos, comparada a 6,2 % em um tempo de divergência entre 80-100. Porém, a eficiência na utilização está mais fortemente relacionada à taxa de evolução molecular do que ao tempo de divergência. Portanto, a porcentagem obtida nesse trabalho foi possível, principalmente, por se tratar de uma amplificação heteróloga entre espécies do mesmo gênero, muito aparentadas evolutivamente.

3.3. ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE MUTAÇÃO E DERIVA

Por meio dos testes de adequação ao modelo de mutação sequencial (Cornuet e Luikart, 1996; Luikart et al., 1998; Piry et al., 1999), todos os agrupamentos de *A. colubrina* e dois de *A. peregrina*, nos respectivos angicais estudados, mostraram-se em equilíbrio de mutação e deriva (Tabela 16) pelo excesso de homozigose. O único angical que apontou equilíbrio de mutação-deriva foi o de *A. peregrina* Aper/USP.

De acordo com o modelo de mutação e deriva, um gargalo no passado ocasiona uma perda de alelos raros, enquanto a heterozigosidade esperada é menos afetada (Nei et al., 1975; Dutech et al., 2005). Por isso, pressupõe-se que eventos recentes de gargalo genético (como fragmentação florestal, corte seletivo de árvores) produzem um aumento temporário da heterozigosidade. Para as espécies de *Anadenanthera* estudadas foram detectados déficits significativos de heterozigotos, o que, segundo esse modelo, descarta a ocorrência de gargalos.

Por outro lado, o excesso de homozigose sugere uma possível expansão populacional. Uma característica presente nas espécies de *Anadenanthera* que pode contribuir para essa expansão populacional é a alelopatia. Em áreas de regeneração natural ou quando da introdução de espécies numa dada área, a alelopatia pode influenciar a constituição dos ecossistemas, ficando a sucessão vegetacional restrita às plantas pré-existentes e aos aleloquímicos liberados para o meio (Oliveira et al., 2000).

Tabela 16. Testes de equilíbrio entre mutação e deriva genética para os angicais de *Anadenanthera colubrina* e *Anadenanthera peregrina*. N é o número esperado de locos com excesso de heterozigosidade sob o modelo.

<i>Anadenanthera colubrina</i>					
Angical	N	Déficit de heterozigosidade	Excesso de heterozigosidade	Teste Wilcoxon para deficiência de heterozigosidade	Probabilidade
Acol/USP	8,16	12	2	0,0010	0,0009
Acol/BP	8,25	11	3	0,0145	0,0049
<i>Anadenanthera peregrina</i>					
Angical	N	Déficit de heterozigosidade	Excesso de heterozigosidade	Teste Wilcoxon para deficiência de heterozigosidade	Probabilidade
Aper/SP255	8,27	12	2	0,0007	0,0007
Aper/USP	6,63	9	5	8,5844	0,4592
Aper/Faz	7,60	11	3	0,0008	0,0018

Esses resultados são importantes, pois ajudam a esclarecer o padrão de ocupação dos angicais em Ribeirão Preto. Há a dúvida se esse elevado número de indivíduos espalhados pelas áreas remanescentes na região seja resultado da expansão das espécies após os eventos de fragmentação, ou se *A. colubrina* e *A. peregrina* tinham naturalmente esse tipo de ocupação. Através de nossas análises podemos supor que os angicais de *A. colubrina* e *A. peregrina* (exceto Aper/USP) provavelmente tenham encontrado condições de expansão após os eventos de remoção da paisagem natural.

3.4. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS GENÓTIPOS

De acordo com Sato et al. (2006), a estrutura genética espacial em populações naturais de plantas é definida como a distribuição não aleatória da variação genética entre indivíduos. Esta distribuição não aleatória pode ser determinada pela interação de vários fatores, tais como fluxo gênico, deriva genética e seleção natural (Loiselle et al., 1995).

No presente trabalho, a análise da distribuição espacial dos genótipos das regiões de amostragem estudadas (dois de *A. colubrina* (Acol) e três de *A. peregrina* (Aper)) revelou a existência de estruturação genética ou seja, distribuição não aleatória dos genótipos, somente em *Anadenanthera colubrina* (Figuras 13 e 14). Em *A. colubrina*, a estruturação observada foi mais forte até os primeiros 150 metros ($\Theta_{xy}=0,136$) em Acol\USP e até os 300 metros ($\Theta_{xy}=0,147$) em Acol\BP, tendo sido os indivíduos aparentados no grau de primos. Continuou havendo estruturação genética até próximo aos 200 metros em Acol\USP e 800 metros em Acol\BP, porém com um parentesco mais fraco. Essas diferenças quanto às distâncias nos dois angicais no estudo de estruturação genética espacial são, provavelmente, decorrentes da diferença de adensamento das árvores nessas áreas, já que no agrupamento amostrado na USP existem muito mais árvores num espaço menor que o encontrado em Bonfim Paulista.

A Figura 14 é o demonstrativo gráfico dos coeficientes de coancestria por classes de distância para indivíduos adultos de *Anadenanthera peregrina*. Observa-se que a análise da distribuição espacial dos genótipos de todos os angicais amostrados revelou ausência de correlação entre a posição geográfica e a distância genética dos indivíduos. Em outros termos, foi observada uma distribuição aleatória dos genótipos de *A. peregrina* dentro dos fragmentos estudados.

Figura 13. Estrutura genética espacial na geração adulta de *A. colubrina* localizada no angical Acol\USP (A) e no Acol\BP (B). A linha contínua refere-se à estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se à estimativa do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade da hipótese de ausência de estrutura genética espacial ($H_0: \theta_{xy} = 0$).

Figura 14. Estrutura genética espacial na geração adulta de *A. peregrina* nos angicais: Aper/SP255 (A), Aperl\USP (B) e Aperl\Faz (C). A linha contínua refere-se à estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se à estimativa do intervalo de confiança do erro a 95% de probabilidade da hipótese de ausência de estrutura genética espacial ($H_0: \theta_{xy} = 0$).

Como descrito anteriormente, os diferentes padrões de distribuição da estrutura genética espacial encontrada nas espécies em suas regiões de ocorrência podem ser causados pela interação de fatores como fluxo gênico, deriva genética e seleção natural (Loiselle et al., 1995). Em uma população na qual existam limitações físicas que não permitam o cruzamento aleatório, deve haver maior probabilidade de cruzamentos entre indivíduos mais próximos, estruturando a população (Futuyma, 1992). Em uma escala espacial local, entretanto, a causa mais prevalente para o arranjo espacial dos genótipos em estruturação de famílias seria a dispersão limitada de genes (Vekemans e Hardy, 2004), o que pode ser decorrente da elevada densidade e/ou características do sistema reprodutivo da espécie (Epperson e Alvarez-Buylla, 1997). Como os angicais são compostos por indivíduos de várias gerações, já que as espécies de *Anadenanthera* apresentam crescimento moderado a rápido, com maturação por volta dos dez anos de idade (Carvalho, 1994), a distribuição espacial dos genótipos no angical reflete o fluxo de genes relativamente recente. Sendo assim, os diferentes resultados para estruturação genética espacial dos genótipos de *A. colubrina* e *A. peregrina*, em seus respectivos angicais, pode ser um indicativo de que os eventos de dispersão do pólen e sementes, dentro das referidas áreas, tenham ocorrido de maneira dissimilar para as duas espécies. Ou seja, fluxo gênico parece ocorrer de forma restrita às vizinhanças da matriz durante a constituição dos maciços de angicos da espécie *A. colubrina*, mas não em *A. peregrina*.

Aqui devemos ressaltar uma outra questão referente às análises. Não podemos considerar os resultados das análises de distribuição dos genótipos de *A. peregrina* nos angicais Aper/USP e Aper/Faz robustos. Isso porque recomenda-se que haja pelo menos 30 pares de combinações entre genótipos em cada classe de distância (Legendre e Fortin, 1989) e em ambos os angicais esse número não foi atingido. Porém, para os indivíduos de *A. peregrina* presentes em Aper/SP255 a análise é robusta e confiável.

A dispersão de sementes, processo pelo qual as sementes são removidas das imediações da planta-mãe para distâncias “seguras”, onde a predação e competição são mais baixas (Howe e Miriti, 2004), é considerada a principal causa da estrutura genética espacial em espécies arbóreas (Bittencourt e Sebbenn, 2007; Carneiro et al., 2007; Lacerda et al., 2008). Dessa maneira, hipotetizava-se que a estruturação genética espacial para as duas espécies ocorressem de forma semelhante, já que ambas possuem a mesma forma de dispersão de sementes.

A distância máxima de dispersão de sementes depende do agente dispersor, quer seja ele gravidade, vento, água ou animal (Guariguata e Pinard, 1998). Via de regra, espécies arbóreas tropicais que possuem síndrome de dispersão de sementes predominantemente anemocórica, como é o caso de *A. colubrina* e *A. peregrina*, têm maior probabilidade de se regenerarem a consideráveis distâncias (>100 m) dos progenitores (Silva et al., 2004) e, portanto, menor possibilidade de apresentarem uma estruturação genética espacial. Contudo, em espécies agregadas e que ocorrem em elevada densidade em áreas com pouca vegetação remanescente como os angicos, essa dispersão pode ser limitada, favorecendo a estruturação.

Também o padrão de cruzamento e fluxo de pólen podem favorecer a estruturação genética espacial (Epperson e Alvarez-Buylla, 1997). De fato, Loveless e Hamrick (1984) relataram que a dispersão do pólen por animais é mais suscetível à densidade populacional, ou seja, em populações com alta densidade, o fluxo do pólen é restrito, o que aumenta a subdivisão. Vale ressaltar que para o melhor entendimento da estruturação genética espacial dessas espécies, torna-se desejável uma amostragem mais abrangente, o que permitiria que um número maior de indivíduos, submetidos a diferentes condições de conservação e densidade das espécies, fosse avaliado no estudo da distribuição espacial dos genótipos.

Finalmente, destacamos que os diferentes padrões de estruturação genética nas áreas de coleta de *A. colubrina* e *A. peregrina*, aliada às outras características biológicas das espécies (tais como modo de reprodução e padrões de dispersão), devem ser levados em consideração no momento de se delinear estratégias de coleta de material genético para fins de conservação da variabilidade genética nesta região.

4. LITERATURA CITADA

- AGUILAR R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOBO, J. 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology** 17: 5177–5188.
- ALTSCHUL, S.V.R. 1964. A Taxonomic Study of the Genus *Anadenanthera*. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University** 193: 1-65.
- BÁEZ, H.; CASTRO, M.M.; BENAVENTE, A.M.; KINTZ, P.; CIRIMELE, V.; CAMARGO, C.; THOMAS, C. 2000. Drugs in prehistory: chemical analysis of ancient human hair. **Forensic Science International**. 108:173-179.
- BARBOSA, L.M. 2002. **Diretrizes da secretaria de estado do meio ambiente de São Paulo para reflorestamento heterogêneo de áreas degradadas. CINP-SMA.** São Paulo. Disponível em : <http://www.rc.unesp.br/xivsbsp/Mesa03MLMB.PDF>>
- BITTENCOURT, J. M.; SEBBENN, A. M. 2007. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity** 99: 580-591.
- BROWN, A.H.D. 1978. Isozymes plant populations genetics structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics** 52: 145-157.
- CARVALHO, P.E.R. 1994. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: EMBRAPA – CNPF. 640p.
- CARNEIRO, F. S.; SEBBENN, A. M.; KANASHIRO, B.; DEGEN, B. 2007. Low Interannual Variation of Mating System and Gene Flow of *Symphonia globulifera* in the Brazilian Amazon. **Biotropica** 39: 628-636.
- COLE, C. T. 2003. Genetic variation in rare and common plants. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics** 34: 213–237.
- CORNUET, J.M.; LUIKART, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics** 144: 2001-2014.
- DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology** 8: 1585-1592.

- DEGEN, B. 2006. **Genetic data analysis and numerical test. GDA-NT. Beta version 1.0.**
- DUTECH, C.; SORK, V.L.; IRWIN, A.J.; SMOUSE, P.E.; DAVIS, F.W. 2005. Gee flow ad fine-scale genetic structure in a wind-pollinated tree species *Quercus lobata* (Fabaceae). **American Journal of Botany** 92:252-261.
- EPPERSON, B.K.; ALVAREZ-BUYLLA, E.R. 1997. Limited seed dispersal and genetic structure in life stages of *Cecropia obtusifolia*. **Evolution** 51: 275–282.
- FAHRIG, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Reviews of Ecology and Systematics** 34: 487-515.
- FERES, J.M.; MONTEIRO, M.; ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B.P.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. 2012. Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* (Leguminosae), a neotropical tree species. **American Journal of Botany** 99(4):154-156.
- FERREIRA-RAMOS, R.; LABORDA, P. R.; SANTOS M. O.; MAYOR M. S.; MESTRINER M. A.; SOUZA A. P.; ALZATE-MARIN A. L. 2007. Genetic analysis of forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics** 9: 1281-1285.
- FITZSIMMONS, N.N.; MORITZ, C.; MOORE, S.S. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular Biology and Evolution** 12: 432-440.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992. 631 p.
- FREELAND, J.R. 2005. **Molecular ecology**. Sussex, Wiley.
- GOUDET, J. 2002. **FSTAT version 2.9.3** Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- GUARIGUATA, M.R.; PINARD, M.A. 1998. Ecological knowledge of regeneration from seed in neotropical Forest trees: Implication for natural Forest management. **Forest Ecology Management** 112: 87-99.
- GUIDUGLI, M.C.; CAMPOS, T.; SOUZA, A.C.B.; FERES, J.M.; SEBBENN, A.M.; MESTRINER, M.A.; CONTEL, E.P.B.; ALZATE-MARIN, A.L. 2009. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics** 10(4): 1001–1004.
- HAMRICK, J. L. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M. et al. (Ed.) **Genetics**

- and Conservation.** California: Benjamin Cummings Publishing Company, p. 335 – 348.
- HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. 1986. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: ESTRADA, A.; FLEMING, T. H. (eds) **Fugivores and Seed Dispersal**. Junk Publishers, 392 pp.
- HARDY, O.; VEKEMANS, X. 2002. SPAGeDi 1. 2: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes** 2: 618-620. Disponível em: <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/software.html>
- HEDRICK, P. W. 2005. A Standardized Genetic Differentiation Measure. **Evolution** 59: 1633–1638.
- HMELJEVSKI, K.V.; REIS, A; MONTAGNA, T; REIS, M.S. 2011. Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. **Conservation Genetics** 12: 761- 769.
- HOWE, H.F.; MIRITI, M.N. 2004. When Seed Dispersal Matters. **BioScience** 54: 651-660.
- KOTCHETKOFF-HENRIQUES, O. 2003. **Caracterização da vegetação natural em Ribeirão Preto, SP: Bases para a conservação**. 270 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- LACERDA, A.B.; SEBBENN, A.M.; KANASHIRO, M. 2008. Long-pollen movement and deviation of random mating in a lowdensity continuous population of *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. **Biotropica** 40: 462–470.
- LEGENDRE, P.; FORTIN, M.J. 1989. Spatial pattern and ecological analysis. **Vegetatio** 80: 107–138.
- LEIMU, R.; MUTIKAINEN, P.; KORICHEVA, J.; FISCHER, M. 2006. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? **Journal of Ecology** 94: 942–952.
- LOISELLE, B. A.; SORK, V. L.; NASON, J.; GRAHAM, C. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany** 82: 1420-1425.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics** 15: 65-95.

- LUIKART, G.; ALLENDORF, F.W.; CORNUET, J.M.; SHERWIN, W.B. 1998. Distortion of allele frequency distribution provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity** 89: 238 – 247.
- MARTINS, K.; CHAVES, L. J.; BUSO, G. S. C.; KAGEYAMA, P. Y. 2006. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics** 7: 957–969.
- MCNEELY, J.A.; MILLER, K.R.; REID, W.V.; NITTERMEIER, R.A.; WERNER, T.B. 1990. **Conserving the world's biological diversity**. International Union for the conservation of nature, Gland.
- NEI, M.F.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution** 29: 1-10.
- NEI, M. F. 1977. Statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics** 41: 225-233.
- NOVICK, R. R.; DICK, C. W.; LEMES, M. R.; NAVARRO, C.; CACCONI, A.; BERMINGHAM, E. 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology** 12: 2885–2893.
- NYBOM, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology** 13(5): 1143–1155.
- OOSTERMEIJER, J.G.B.; LUIJTEN, S.H.; NIJS J.C.M. 2003. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. **Biological Conservation** 113:389–398.
- PENNINGTON, R. T.; DARIÉN, E. P.; COLIN, A. P. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. **Journal of Biogeography** 27: 261-273.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J.M. 199. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity** 90: 502-503.
- RAJORA, O.P.; PLUHAR, S.A. 2003. Genetic diversity impacts of forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce (*Picea mariana*). **Theoretical and Applied Genetics** 106: 1203–1212.
- SANTOS, K.L.; WELTER, L.J.; DANTAS, A.C.M.; GUERRA, M.P.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O. 2007. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Acacia sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. **Genetics and Molecular Biology** 30:73-79.

- SATO, T.; ISAGI, Y.; SAKIO, H.; OSUMI, K.; GOTO, S. 2006. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. **Heredity** 96: 79–84.
- SILVA, J.A.; LEITE, E.J.; SILVEIRA, M.; NASSIF, A.A.; REZENDE, S.J.M. 2004. Phytosociological and Floristic Characterization and Natural Regeneration of the undergrowth at Tamandua Forest Genetic Reserve, Brazil. **Ciência Florestal** 14: 121-132.
- TAGGART, J B, AND FERGUSON, A. 1990. Minisatellite DNA fingerprints of salmonid fishes. **Animal Genetics** 21: 377–389.
- TABARELLI, M.; MANTOVANI, W.; PERES, C.A. 1999. Effects of habitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biological Conservation** 91: 119-127.
- TEMPLETON, A.R.; LEVIN, D.A. 1979. Evolutionary consequences of seedbanks. **American Naturalist** 114: 232-249.
- VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology** 13: 921-935.
- WEIR, B. S. 1996. **Genetics data analysis II – Methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- WHITE G.M.; BOSHIER, D.H.; POWELL, W. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology** 8: 1899–1909.
- ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO J.B.; CHAVES L.J.; COELHO A.S.G.; VENCOSKY, R. 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology** 26: 449-457.

CAPÍTULO III

SISTEMA DE CRUZAMENTO E FLUXO GÊNICO DE *ANADENANTHERA COLUBRINA* E *ANADENANTHERA PEREGRINA* EM ANGICAIS NA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO (SP)

RESUMO

Neste trabalho foram investigados os padrões da variabilidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em angicais de *Anadenanthera colubrina* (Acol/BP) e *Anadenanthera peregrina* (Aper/SP225 e Aper/Faz) em Ribeirão Preto (SP) usando sete pares de primers microssatélites. Os *primers* utilizados foram submetidos a análises para comprovar a eficácia para análises do sistema reprodutivo e não foram detectados indícios de ligação física entre esses locos nas gerações estudadas. Foram mapeadas e amostradas todas as 30 árvores de *A. colubrina* adultas presentes em Acol/BP e mais 55 indivíduos de *A. peregrina* presentes em Aper/SP225 e Aper/Faz. Além disso, coletaram-se sementes de polinização aberta que levaram a obtenção de 322 indivíduos juvenis de *A. colubrina* e 300 de *A. peregrina* para as análises genéticas. Através das análises genéticas constatou-se que os agrupamentos destas espécies estudados em Ribeirão Preto apresentam um sistema misto de reprodução (t_m Acol = 0,619; t_m Aper = 0,905). Significantes desvios do cruzamento aleatório foram observados através do cruzamento entre parentes ($t_m - t_s$ Acol = 0,159; $t_m - t_s$ Aper = 0,216) e cruzamentos correlacionados entre frutos ($r_{p(m)d}$ Acol = 0,393; $r_{p(m)d}$ Aper = 0,298) e dentro de frutos ($r_{p(s)}$ Acol = 0,905; $r_{p(s)}$ Aper = 0,805), indicando endogamia nas populações. Endogamia foi também detectada em todas as gerações de ambas as espécies, evidenciando o sistema misto de acasalamento da espécie e o seu padrão agrupado de distribuição. O número efetivo de doadores de pólen foi muito baixo para um mesmo fruto (1,10 em *A. colubrina* e 1,24 para *A. peregrina*) e mais alto entre frutos de uma mesma árvore (2,61 em *A. colubrina* e 3,35 para *A. peregrina*) usando a estimativa indireta de correlação de paternidade. Análises de paternidade revelaram distâncias de dispersão de pólen relativamente longas (média de 299,88 m em *A. colubrina* e 214,37 em *A. peregrina*) nas áreas de estudo. Alto fluxo de pólen imigrante aos angicais das espécies foi detectado, indicando que os fragmentos não estão isolados reprodutivamente. Por outro lado, o fluxo gênico crítico foi também muito elevado, para ambas as espécies, provavelmente devido ao baixo poder de exclusão que os locos apresentaram dentro dos aglomerados de angico.

1. INTRODUÇÃO

O sistema de reprodução refere-se à forma como um indivíduo, população ou espécie transfere suas informações genéticas de uma geração para outra, podendo ser assexuado ou sexuado (Wright, 1921). A reprodução de vegetais superiores geralmente envolve o processo sexual, onde dois indivíduos produzem gametas de tipos complementares, que se fundem e formam um zigoto, originando uma descendência com diferentes genótipos (Finkeldey, 1998). Segundo Fryxell (1957), os sistemas de reprodução sexuada nos vegetais podem ser divididos em três classes principais quanto à forma de cruzamento: alógamas, autógamas e mistas. O processo conhecido como alogamia pode envolver o cruzamento entre diferentes indivíduos, bem como a transferência de pólen entre diferentes flores de uma mesma planta (geitonogamia). Na autogamia verifica-se a fusão dos gametas masculinos e femininos de uma mesma flor (autofecundação). Já no sistema misto, os dois processos anteriores ocorrem, com predominância de um deles (Wendt, 2005).

O modo de reprodução (sexual ou assexual) e o sistema de cruzamento (autogamia, alogamia ou misto) que cada espécie apresenta têm um efeito marcante na composição genética de suas populações (Finkeldey, 1998). Isso porque ambos exercem controle na distribuição das frequências genotípicas e afetam o potencial de recombinação das populações, podendo diminuir ou aumentar a taxa em que novas combinações gênicas são produzidas (Zanettini e Cavalli, 2003). Dessa forma, a determinação da forma preferencial de acasalamento nas plantas é importante para o correto delineamento dos métodos de melhoramento e conservação genética a serem adotados (Allard, 1999).

Segundo Hamrick e Loveless (1986), o sistema de reprodução, junto com o mecanismo de dispersão de pólen e sementes, determina parte da estrutura genética das populações. De modo geral, espécies que apresentam ampla distribuição geográfica, gerações longas, polinização pelo vento, reprodução alogâmica, longo tempo de fecundidade e ocorrem em estágios finais de sucessão, tendem a manter maiores níveis de variabilidade genética do que espécies com outras combinações destes fatores (Hamrick e Loveless, 1986).

A estrutura genética de uma população também é determinada pelo fluxo gênico existente. O fluxo gênico é definido como o movimento de alelos entre populações, o qual pode ser realizado por gametas, propágulos e indivíduos que efetivamente trocam alelos na distribuição espacial (Neigel, 1997). É o sistema de

acasalamento entre populações locais que determina a quantidade de fluxo gênico existente entre elas. Por exemplo, o endocruzamento pode diminuir drasticamente o fluxo gênico, mesmo entre indivíduos próximos, tanto espacial como temporalmente. Da mesma forma, o acasalamento preferencial positivo (fenótipos ou genótipos similares que cruzam mais frequentemente entre si que com fenótipos distintos) pode também reduzir enormemente esse fluxo.

A conectividade genética em populações de plantas, por sua vez, é determinada pelo fluxo gênico entre elas. Nesses organismos a transferência de genes pode ocorrer tanto pelo movimento de estruturas individuais (sementes, rizomas, estolões), como pelo movimento de gametas (pólen) (Zucchi, 2002). Plantas são organismos sésseis e, portanto, dependentes de agentes polinizadores e dispersores de sementes para seu sucesso reprodutivo. Muitas espécies arbóreas possuem meios efetivos de dispersão de genes e com isso mantêm altos níveis de variação genética, mesmo em populações com pouca diferenciação genética (Hamrick, 1983). Populações naturais normalmente têm níveis altos de variação genética, que é introduzida continuamente nelas por mutação ou migração de indivíduos de outras populações. O fluxo de pólen é um dos fatores mais importantes na estruturação genética de espécies arbóreas. Extensivo fluxo gênico via pólen promove altos níveis de diversidade genética dentro de populações e baixa diferenciação entre populações e é o maior mecanismo mantendo a coesão genética de uma espécie (Dick et al., 2003). Além disso, muito da endogamia observada dentro de populações naturais de espécies florestais é determinada pela distância e taxa com que os genes migram dentro e entre populações (Coles e Fowler, 1976).

A intensidade do fluxo gênico entre as populações pode ser considerada como o elemento-chave para prever os efeitos da fragmentação. Com altas taxas de fluxo gênico, pouca variabilidade genética será perdida nos fragmentos em níveis individuais e na espécie como um todo. Por outro lado, se as taxas de fluxo gênico são reduzidas abaixo dos níveis anteriores à fragmentação, então a estrutura genética entre fragmentos aumentará e a variabilidade genética dentro deles diminuirá (Hamrick, 2004).

O fluxo gênico pode ser quantificado através de medidas diretas e indiretas. Os métodos indiretos baseiam-se nas análises da estrutura genética de populações (estimativas de F_{ST} , alelos privados e auto-correlação espacial) e referem-se ao fluxo gênico histórico (passado). Os métodos diretos referem-se ao fluxo gênico contemporâneo (atual) e são inferidos através da utilização de marcadores

morfológicos e análise de paternidade utilizando isoenzimas ou marcadores moleculares (Zucchi, 2002). A análise de paternidade consiste na utilização de locos gênicos para identificar o mais provável pai de um conjunto de candidatos. A resolução deste procedimento é dependente do número de locos polimórficos, número de alelos por loco, frequência alélica e número de pais potenciais. Uma vez que o pai do indivíduo é identificado, o padrão do movimento de pólen dentro da área estudada pode ser determinado (Zucchi, 2002). Esse método de estimação do fluxo gênico é extremamente atrativo, pois permite identificar os prováveis pais envolvidos nos cruzamentos, conhecer sobre o sucesso reprodutivo dos indivíduos, detectar contaminação de pólen externo (migração) e inferir sobre os padrões de dispersão do pólen (Lian et al., 2001).

A análise de paternidade, como esclarecido acima, é um método direto para estudar a dispersão de pólen, por meio do qual é possível reconhecer a árvore doadora de pólen que originou as progênes e estabelecer a distribuição espacial de polinização. Para esse tipo de análise é necessário fazer um mapeamento completo das árvores reprodutivas em uma área demarcada (Smouse e Sork, 2004).

Nesse panorama, é importante entender a dinâmica reprodutiva nos maciços praticamente monoespecíficos compostos por indivíduos das espécies de *Anadenanthera* para que, futuramente, medidas mais adequadas norteiem o manejo de populações florestais remanescentes.

Refletindo sobre tais pontos, os seguintes objetivos foram estabelecidos nesse capítulo: a) estimar parâmetros do sistema de reprodução como taxas de cruzamento, autofecundação e cruzamentos correlacionados em área de ocorrência natural de *A. colubrina* e *A. peregrina*; b) determinar a distância de dispersão de pólen dentro dos fragmentos amostrados, bem como a taxa de fluxo gênico via pólen externo à população, usando análise de paternidade; c) fornecer dados genéticos que contribuam para o mapeamento e conservação da diversidade genética *in situ* e *ex situ* das espécies arbóreas tropicais do gênero *Anadenanthera*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. LOCAL DE ESTUDO

ANADENANTHERA COLUBRINA

Dentre as regiões de coleta de *Anadenanthera colubrina* (Figura 12) usadas para o estudo da diversidade genética dessa espécie (mostrado no Capítulo II), a

área Acol\BP foi selecionada para conduzir as análises do seu sistema reprodutivo e fluxo gênico via pólen.

Acol/BP pertence a uma área composta por pequenas manchas de floresta estacional semidecidual e fica nas imediações periféricas de Bonfim Paulista, um distrito de Ribeirão Preto, SP. Esta área está sobre forte impacto da expansão imobiliária do município sofrendo um processo recente de fragmentação florestal. Entre essas manchas de floresta encontram-se os angicais, onde *A. colubrina* e *A. peregrina* ocorrem quase que sem associação com outras espécies (manchas monoespecíficas). O angical escolhido para o estudo (Figura 15), conta com 30 indivíduos da espécie *A. colubrina* e margeia a rodovia Antônio Machado, sendo todos amostrados para a realização destas análises.

Figura 15. Mapa indicando a localização das árvores adultas de *A. colubrina* em Acol/BP amostradas.

ANADENANTHERA PEREGRINA

Dentre as regiões de coleta de *Anadenanthera peregrina* (Figura 12) usadas para o estudo da diversidade genética dessa espécie (mostrado no Capítulo II), as áreas Aper/SP-255 e Aper/Faz foram selecionadas para conduzir as análises do seu sistema reprodutivo e fluxo gênico (Figura 16). Como as duas áreas são muito próximas geograficamente (média de 629 m) e apresentaram baixíssima diferenciação genética ($G_{st}' = 0,084 \pm 0,0032$ – Capítulo II), foram consideradas como uma única população nas análises de fluxo gênico e sistema reprodutivo. Assim, para este estudo foram selecionados todos os 55 indivíduos adultos reprodutivos de *A. peregrina* que compõem ambos angicais. Esses angicais também aparentam ser compostos por indivíduos remanescentes do processo de fragmentação florestal e encontram-se próximos à matas e a rodovia Antonio Machado Sant'Anna (SP-255).

Figura 16. Mapa indicando a localização das árvores adultas de *A. peregrina* em Aper/SP-255 e Aper/Faz amostradas.

Como demonstrado claramente na Figura 16, esses angicais estão isolados por malha viária (SP 255) e plantações de cana-de-açúcar. Certamente são árvores remanescentes do processo de fragmentação florestal que a região sofreu para as implantações da rodovia e das monoculturas. São compostas por árvores de diferentes tamanhos e perímetros à altura do peito, sugerindo que há várias gerações no local e que o agrupamento foi estabelecido à partir de alguns indivíduos que se reproduziram e dominaram o ambiente.

2.2. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

ANADENANTHERA COLUBRINA

A amostragem do material biológico de *Anadenanthera colubrina* foi realizada de em 2011, no período em que se verificou a maturação dos frutos dessa espécie na região de Ribeirão Preto-SP. Trinta árvores adultas reprodutivas foram georreferenciadas (GPS) (Figura 15), identificadas com uma numeração específica gravada em placa e tiveram tecidos foliares amostrados. Além disso, frutos foram colhidos aleatoriamente em dez dessas árvores matrizes.

ANADENANTHERA PEREGRINA

A amostragem do material biológico de *Anadenanthera peregrina* foi realizada em duas etapas. Em maio de 2011 foram coletadas folhas dos 55 indivíduos adultos georreferenciados para o estudo de diversidade genética. Em setembro de 2012, período em que se verificou a maturação dos frutos dessa espécie na região de Ribeirão Preto-SP, frutos foram colhidos aleatoriamente em dez dessas árvores matrizes.

2.3. OBTENÇÃO DE SEMENTES E PRODUÇÃO DE MUDAS

ANADENANTHERA COLUBRINA

Após a identificação das matrizes de *A. colubrina* que haviam frutificado dentro da área Acol\BP, os frutos foram colhidos diretamente de cada árvore (dez árvores matrizes no total) com o auxílio de técnicas de escaladas e tesoura de poda. Em média, de cada árvore foram coletados 10 frutos aleatórios, os quais foram acondicionados em sacos de papel, separados e identificados (um fruto por saco) para garantir a correspondência entre fruto, semente e genitor. A identificação das sementes por fruto permitiu determinar a correlação de paternidade entre e dentro de frutos. Logo em seguida, as sementes foram extraídas e plantadas em condições de viveiro de mudas da Coordenadoria do Campus da USP/RP, sendo colocadas para germinar sem nenhum tratamento, em recipientes de plástico individuais (tubetes) contendo substrato e adubo adequados. Durante o procedimento de retirada das sementes, foram contabilizadas as quantidades de sementes abortadas e/ou predadas, de forma que foi possível mensurar a média de sementes sadias geradas por frutos (Tabela 26).

Após o plantio das sementes procedentes das dez famílias, os tubetes foram então identificados e colocados em bandejas com capacidade para 154 mudas. O desenvolvimento das primeiras folhas ocorreu cerca de sete dias após o plantio.

Passados 30 dias, folhas de 322 progênies foram obtidas (oito famílias com 33 progênies cada; uma família com 28 progênies e uma família com 30 delas) para realização dos testes genéticos. As amostras coletadas foram acondicionadas em papel-alumínio, identificadas e armazenadas em *freezer* -20°C para posterior extração do DNA.

ANADENANTHERA PEREGRINA

Após a identificação das matrizes de *A. peregrina* que haviam frutificado dentro das áreas Aper/SP-255 e Aper/Faz, os frutos foram colhidos diretamente de cada árvore (dez árvores matrizes no total) também com o auxílio de técnicas de escadas e tesoura de poda. Em média, de cada árvore foram coletados 15 frutos aleatórios, os quais foram acondicionados em sacos de papel, separados e identificados (um fruto por saco) para garantir a correspondência entre fruto, semente e árvore-matriz. Infelizmente, para os frutos de *A. peregrina* não foram feitas as observações referentes a quantidade de sementes sadias x sementes inviáveis para todas as matrizes (apenas quatro de dez – Tabela 29).

As sementes foram plantadas em condições de viveiro também no viveiro da USP/RP, exatamente como descrito para *A. colubrina*. A partir do plantio das sementes de *A. peregrina*, foram obtidas 10 famílias de polinização aberta compostas por 30 progênies cada. Dessa forma, folhas de 300 juvenis foram obtidas para as análises do sistema reprodutivo da espécie. As amostras coletadas foram igualmente acondicionadas em papel de alumínio, identificadas e armazenadas em *freezer* -20°C para posterior extração do DNA.

2.4. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A metodologia de extração e quantificação do DNA foi a mesma descrita no Capítulo I dessa tese, item 2.3.

2.5. MARCADORES MICROSSATÉLITES, ENSAIOS DE AMPLIFICAÇÃO MULTIPLEX E ELETROFORESE

Dos 14 pares de *primers* microsatélites polimórficos desenvolvidos para a espécie *A. colubrina* descritos nos subítens 2.4 e 2.5 do Capítulo I desse trabalho (Feres et al., 2012a), sete marcadores (Tabela 17) foram usados para a realização das amplificação do DNA de *Anadenanthera colubrina* e sete do material genético de *A. peregrina*. A escolha dos marcadores foi feita através da qualidade e facilidade de amplificação via PCR das regiões.

Com a finalidade de aperfeiçoar a genotipagem dos indivíduos analisados nesta pesquisa, dois sistemas de PCR bplex (Acol 02/Acol 05 e Acol 15/Acol 16) e três sistemas de eletroforese *multiload* (Acol 09/Acol 17, Acol 11/Acol 14 e Acol 18/Acol 20) foram testados para amplificar o material genético de *A. colubrina*. Os ensaios de PCR bplex foram feitos em um volume final de 10 µL de reação de PCR, misturando todos os reagentes (tampão, dNTP, *primers*, MgCl₂ e a *Taq* DNA polimerase), com exceção do DNA, em um único tubo para garantir a homogeneidade das reações. As quantidades exatas de cada reagente para cada um dos testes de PCR bplex estudados estão resumidas na Tabela 18. Todas as amplificações bplex foram realizadas a uma temperatura de anelamento de 48°C, utilizando o termociclador Mastercycler® Eppendorf.

Tabela 17. Sequências dos *primers* microssatélites de *A. colubrina* e *A. peregrina* utilizados nesta pesquisa.

Loco	Motivo Repetitivo	Tamanho esperado fragmento (pb)
<i>A. colubrina</i>		
Acol 02	(CTT) ₅	181
Acol 05	(GA) ₂ A(GA) ₇	234
Acol 15	(GA) ₁₀	124
Acol 16	(TC) ₁₁ (CA) ₅ AA(CA) ₅	220
Acol 17	(AG) ₉	182
Acol 18	(TG) ₁₀	160
Acol 20	(GT) ₄ GGG(TG) ₆	136
<i>A. peregrina</i>		
Acol 09	(CT) ₁₀ (AT) ₇	160
Acol 11	(CA) ₉	200
Acol 12	(TA) ₉	118
Acol 13	(AG) ₁₅	139
Acol 14	(GA) ₁₁	183
Acol 15	(GA) ₁₀	124
Acol 20	(GT) ₄ GGG(TG) ₆	136

Para a amplificação do material de *A. peregrina* foram padronizadas duas reações de PCR bplex (Acol 12/Acol 14 e Acol 11/Acol 20). Essas reações foram preparadas seguindo os mesmos procedimentos que os realizados para *A. colubrina* (Tabela 18).

Os produtos amplificados de ambas as espécies foram separados por eletroforese sob condições desnaturantes em géis de poliacrilamida 10%. Os protocolos de eletroforese, coloração e secagem dos géis são idênticos aos descritos nos subitens 2.7 do Capítulo I.

Os sistemas *multiload* de eletroforese vertical, para os pares de SSR citados, seguiram também esse protocolo padrão. A vantagem é que são combinadas duas corridas em um mesmo sistema eletroforético, economizando tempo e material. Dessa forma, os PCRs de dois pares de locos são submetidos à etapa de desnaturação e aplicados no gel de poliacrilamida 10% ao mesmo tempo. A diferença na região de amplificação faz com que a capacidade de migração das porções SSR amplificadas sejam diferentes e ambas sejam reveladas no gel.

Tabela 18. Condições das reações de PCR biplex testadas.

Reagentes	Locos	
	Acol 02/Acol 05 Acol12/Acol14 Acol11/Acol20	Acol 15/Acol 16
DNA (10 ng/μL)	2,5 μL	2,5 μL
dNTP (2,5 mM)	1,0 μL	1,0 μL
Tampão	1,0 μL	1,0 μL
MgCl ₂ (50 mM)	0,3 μL	0,25 μL
Primers (2,5 μM)	1,2 μL (Acol 02)	1,2 μL (Acol 15)
	1,2 μL (Acol 05)	1,2 μL (Acol 16)
Taq (1U/μL)	0,3 μL	0,2 μL
Água	2,5 μL	2,65 μL
DNA (10 ng/μL)	10 μL	10 μL
dNTP (2,5 mM)	2,5 μL	2,5 μL
Volume final	10 μL	10 μL

2.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

ANÁLISE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

O desequilíbrio de ligação é um procedimento estatístico que analisa a recombinação das frequências entre pares de locos para determinar se dois locos não segregam independentemente. Caso isso ocorra, significa que o número de marcadores microssatélites utilizados no trabalho não é como o assumido, mas sim um número menor (de acordo com o número de ligações). Como a ligação entre locos pode variar entre gerações e também populações de uma mesma espécie, foram feitos novos testes (além dos apresentados no Capítulo 1) para a continuidade das análises do sistema reprodutivo de ambas as espécies.

Dessa forma, o teste de desequilíbrio de ligação foi realizado entre todos os pares de locos com base em uma estatística *G* de razões de logaritmos de máxima-verossimilhança. As probabilidades de significância do teste foram obtidas por

10.000 permutação e aplicando uma correção sequencial de Bonferroni para múltiplas comparações (95%, $\alpha = 0,05$). Tais análises foram calculadas com o programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002).

ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA E ENDOGAMIA

A diversidade genética da geração adulta das duas espécies de *Anadenanthera* foi caracterizada pelos índices: número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_0), heterozigosidade esperada segundo expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_E) e número efetivo de alelos por loco ($\hat{A}_e = 1/(1 - H_E)$). Estes índices de diversidade foram calculados utilizando o programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002) e comparados entre si usando o método jackknife sobre os locos.

Também foi estimado o índice de fixação (F), conforme Weir (1996) - $\hat{F} = 1 - H_0 / H_E$ - e sua significância (determinada por 10.000 permutações sobre os locos) usando o programa SPAGeDi (Hardy e Vekemans, 2002).

A estrutura genética entre as populações de adultos e progênies das espécies de *Anadenanthera* foi acessada através da estatística G_{ST}' de Hedrick (Hedrick, 2005) utilizando o programa GDA_NT (Degen et al., 2006).

Finalmente, calculou-se a probabilidade de exclusão do primeiro [$\Pr(Ex_1)$] e segundo parentes [$\Pr(Ex_2)$] utilizando o programa CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007).

ANÁLISES DO SISTEMA DE REPRODUÇÃO, COANCESTRIA E TAMANHO EFETIVO DA POPULAÇÃO

O sistema de reprodução foi caracterizado pelos modelos misto de reprodução (Ritland e Jain, 1981) e cruzamentos correlacionados (Ritland, 1989), utilizando o programa MLTR (Ritland, 2004). Os parâmetros estimados foram: a) taxa de cruzamento multiloco (t_m); b) taxa de cruzamento uniloco (t_s); c) taxa de cruzamento entre aparentados ($t_m - t_s$); d) a correlação de autofecundação (r_s); e) a correlação multiloco de paternidade ($r_{p(m)}$) e; f) correlação uniloco de paternidade ($r_{p(s)}$). O intervalo de confiança dos parâmetros foi obtido por meio de 1.000 reamostragens *bootstraps*.

Os parâmetros do sistema de reprodução foram utilizados para estimar outros parâmetros demográficos e genéticos. O número efetivo de pais

polinizadores ou tamanho da vizinhança reprodutiva foi calculado da correlação de paternidade por:

$$\hat{N}_{ep} = 1/\hat{r}_p$$

Dos parâmetros do sistema de reprodução foram ainda estimados a proporção média de pares de irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{IA} = \hat{s}$), irmãos-completos ($\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m \hat{r}_p$) e meios-irmãos [$\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m (1 - \hat{r}_p)$] ontidos nas progênes.

O Coeficiente de Coancestria (Θ_{xy}) é uma medida do parentesco dos indivíduos

dentro das populações. Esse coeficiente pode variar de -1,0 (sem genes em comum) até 1,0 (gêmeos idênticos ou clones). No presente trabalho, a fim de conhecer a estrutura genética das progênes, estimou-se o coeficiente médio de coancestria (Θ_{xy}) entre plantas dentro de cada progênie através da seguinte expressão:

$$\begin{aligned} \Theta = & 0.125(1 + F_p)[4s(s + t_s) + t_s^2(1 + r_p)] + \\ & + 0.25(t_m - t_s)[2(1 + F_p + 2\Theta_p)(s + t_s) + t_s(1 + F_p + 6\Theta_p)(1 - r_p)] + \\ & + 0.125(t_m - t_s)^2[(1 + F_p + 6\Theta_p)(1 - r_p) + (1 + F_p + 2\Theta_p)2r_p], \text{ em que } F_p \text{ é o} \end{aligned}$$

índice de fixação na geração parental, s é a taxa de autofecundação, t_s é a taxa de cruzamento uniloco, r_p é a correlação de paternidade, t_m é a taxa de cruzamento multiloco e Θ_p é a coancestria na geração parental (Sebbenn, 2006).

Tal cálculo é feito para espécies bissexuais com níveis variáveis de endogamia ($F_p > 0$), coancestria ($\Theta_p > 0$) e reproduzindo-se por misturas de autofecundação e alogamia, cruzamentos correlacionados ($r_p > 0$) e cruzamento entre parentes ($t_m - t_s > 0$) com variação individual na taxa de cruzamento ($r_s > 0$), como é o caso das espécies de *Anadenanthera* estudadas.

Para conhecer a representatividade genética das progênes foi estimado o tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$) médio das progênes conforme propôs Cockerham (1969):

$$N_{e(v)} = 0,5 / \theta_{xy} [(n-1)/n] + (1+F_o)/2n$$

O número de árvores matrizes (m) para a coleta de sementes foi calculado assumindo que infinitas sementes serão coletadas de cada árvore ($n = \infty$) e que o objetivo é reter na amostra total o tamanho efetivo de referência de 100,

$$\hat{m} = N_{e(referência)} / \hat{N}_{e(v)} \text{ (Sebbenn, 2003).}$$

A correlação entre as características reprodutivas obtidas durante a coleta dos frutos e plantio das sementes e os dados do sistema reprodutivo das duas espécies obtidos através da análise genética foi feita através do coeficiente de correlação de Spearman (Sokal e Rohlf, 1981). A análise foi performada de acordo com Zar (1996) e realizada no software R.

FLUXO GÊNICO CONTEMPORÂNEO VIA PÓLEN

As estimativas do fluxo gênico contemporâneo a partir do pólen (adultos e progênies) foram realizadas utilizando análise de paternidade através do programa CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007). As análises de paternidade das progênies de *Anadenanthera colubrina* e *peregrina* foram realizadas utilizando-se o método de máxima verossimilhança (Meagher, 1986; Meagher e Thompson, 1987), comparando o genótipo das árvores adultas dos angicais e as sementes das árvores maternas conhecidas. A paternidade de cada semente foi determinada pela estatística Δ , que é a diferença entre o LOD do candidato a pai mais provável, menos o segundo mais provável candidato a pai. Para encontrar o valor crítico de Δ foram conduzidas simulações, usando 50.000 repetições, 0,01 como a proporção de erro de genotipagem, com 90% de árvores adultas reprodutivas como candidatos a parental paterno amostrados, incluindo auto fecundação e a endogamia parental. Foram utilizados os níveis de confiabilidade de 95% como restrito e de 80% como relaxado, conforme sugestão de Marshall et al. (1998). Quando o valor de Δ de um candidato a pai de determinada semente foi maior que o seu valor crítico (calculado nas simulações), a paternidade foi atribuída a esse candidato. Além disso, como as análises do sistema reprodutivo sugeriram a possibilidade de autofecundação para a espécie, a opção para essa característica foi também assinalada na análise de paternidade. Dessa forma, quando a árvore materna foi indicada como o provável parental paterno, a progênie estudada foi considerada como advinda de autofecundação. Assim, a estimativa da taxa de autofecundação (s) foi calculada como o número de progênies autofecundadas, dividido pelo número total de progênies amostradas.

A taxa de imigração de pólen no angical (m) foi calculada como a proporção de indivíduos que não tiveram um candidato a pai determinado dentro da população ($n_{\text{imigrante}}$) em relação ao número total de indivíduos amostrados (n_{total}), $m = n_{\text{imigrante}}/n_{\text{total}}$ (Burczyk et al., 1996, Burczyk et al., 2004, Smouse e Sork, 2004). O fluxo gênico crítico (erro tipo I) ou, em outros termos, a probabilidade de determinar erroneamente um pai de um indivíduo dentro da população, quando o

verdadeiro parental encontra-se fora da população (falso-positivo), foi calculada como descrito em Dow e Ashley (1996): $F_{GC}=1-(1-P)^n$, onde P corresponde à probabilidade de não exclusão do segundo parental e n ao número de árvores parentais encontradas no interior da população.

Usando a variância da distância do fluxo de pólen (σ_p^2), a área de vizinhança efetiva de polinização foi estimada usando a seguinte equação $A_{ep} = 2\pi\sigma_p^2$. A taxa de imigração de pólen (m) foi calculada como a proporção de sementes que não tiveram um candidato a pai determinado dentro da população ($n_{imigrante}$) em relação ao total de sementes genotipadas (n_{total}) dentro da população, $m = n_{imigrante}/n_{total}$ (Burczyk et al., 1996, Burczyk et al., 2004, Smouse e Sork, 2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *ANADENANTHERA COLUBRINA*

ANÁLISE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

O equilíbrio de ligação em locos marcadores é uma das pressuposições básicas para sua utilização em análise de diversidade, estrutura genética, sistema de reprodução e análise de paternidade. Dos 21 testes realizados entre os pares de locos avaliados na geração adulta, nenhum deles apontou desequilíbrio gamético (Tabela 19), após a correção de Bonferroni ($\alpha=0,05$). Foram detectados indícios significativos de desequilíbrio gamético apenas entre os pares de locos na geração de progênies (em nove deles). Como este desequilíbrio foi encontrado apenas nas progênies, é indicativo de que deriva genética possa estar ocorrendo e não ligação física entre locos, caso contrário, o mesmo resultado deveria ter sido observado na geração de adultos.

Consequentemente, pode-se afirmar que os alelos de diferentes locos não estão associados e segregam independentemente em ambas as gerações de *A. colubrina*. Assim, os sete locos SSR testados em todas as amostras de *A. colubrina* foram considerados adequados para as análises genéticas propostas nesse trabalho. Desse modo, esses locos foram considerados bons candidatos para estudos de sistema de reprodução e fluxo gênico contemporâneo, pois não viciarão essas estimativas.

Tabela 19. Desequilíbrio de ligação entre os locos microsatélites de *A. colubrina*. Os valores na tabela são as probabilidades após 1.000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,0023.

Pares de locos	Matrizes	Progênies
Acol 02 X Acol 05	0,30595	0,00119
Acol 02 X Acol 15	0,21786	0,00119
Acol 02 X Acol 16	0,01905	0,00119
Acol 02 X Acol 17	0,25000	0,00119
Acol 02 X Acol 18	0,43690	0,18333
Acol 02 X Acol 20	0,21071	0,00119
Acol 05 X Acol 15	0,05833	0,36190
Acol 05 X Acol 16	0,96905	0,90952
Acol 05 X Acol 17	0,30238	0,00238
Acol 05 X Acol 18	0,88095	0,79524
Acol 05 X Acol 20	0,42381	0,45476
Acol 15 X Acol 16	0,41429	0,00119
Acol 15 X Acol 17	0,32143	0,00119
Acol 15 X Acol 18	0,35595	0,06310
Acol 15 X Acol 20	0,12381	0,00238
Acol 16 X Acol 17	0,00476	0,00119
Acol 16 X Acol 18	0,76071	0,13452
Acol 16 X Acol 20	0,05238	0,00952
Acol 17 X Acol 18	0,43333	0,04643
Acol 17 X Acol 20	0,03214	0,10119
Acol 18 X Acol 20	0,27738	0,99762

ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA E ENDOGAMIA

Nas análises realizadas com os sete locos microsatélites em todos os indivíduos de *A. colubrina* (30 árvores adultas + 322 progênies), foram identificados 51 alelos. O número de alelos por loco variou de 4 (Acol 04 e Acol 20) a 12 (Acol 15) com uma média de 7,28 alelos/loco (Tabela 20). O número efetivo de alelos por loco foi menor do que o número médio de alelos por loco, variando de 1,195 (Acol 20) a 4,209 (Acol 17), com média de 1,897 alelos/loco. Isso indica que muitos alelos são raros (frequências menores ou iguais a 5 %). De fato, poucos alelos nos sete locos tiveram frequência superior a 25% e, em geral, um a cinco alelos tinham frequência maior do que 10% e os demais eram raros. Esse baixo número efetivo de alelos por loco teve efeito significativo no poder de exclusão desses marcadores.

Tabela 20. Poder de exclusão e diversidade genética de sete locos microssatélites em árvores adultas e progênes de *A. colubrina*. N é o número de indivíduos analisados; K é o número total de alelos; A_e é o número efetivo de alelos nos locos; H_o é a heterozigosidade observada; H_E é a heterozigosidade esperada; $Pr(Ex1)$ e $Pr(Ex2)$ são respectivamente as probabilidades de excluir o primeiro e o segundo parente. EP é o erro padrão da estimativa a 95% de confiança.

Locos	N	K	A_e	H_o	H_E	$Pr(Ex1)$	$Pr(Ex2)$
Acol 02	361	5	1,895	0,202	0,472	0,882	0,726
Acol 05	345	4	1,351	0,162	0,260	0,974	0,898
Acol 15	349	12	3,733	0,639	0,732	0,659	0,476
Acol 16	330	9	2,564	0,256	0,610	0,827	0,664
Acol 17	346	9	4,209	0,580	0,762	0,633	0,454
Acol 18	312	8	1,448	0,099	0,309	0,991	0,932
Acol 20	353	4	1,195	0,097	0,163	0,990	0,931
Média	340,	7,285	1,897	0,291	0,473	---	---
+/- EP	43	+/- 0,291	+/- 0,142	+/- 0,026	+/- 0,03		
Total	352	51				0,7091	0,9187

() = Erro Padrão; * $P < 0,05$

O poder de exclusão total para identificação de um candidato a pai em uma progênie arbitrária, quando nenhum dos pais é conhecido ($Pr(Ex1)$), foi estimado em 0,709125. Quando é conhecido o genótipo de um dos pais, a probabilidade de exclusão ($Pr(Ex2)$) do conjunto de locos é de 0,918794 (Tabela 20).

Os resultados da variação genética nas gerações de adultos e progênes, separadamente, estão apresentados na Tabela 21. Os adultos apresentaram um número menor de alelos (36) do que os observados na geração de progênes (49). Com relação à presença de alelos exclusivos, foi constatado um total de 12, sendo cinco pertencentes à geração de adultos e sete às progênes. Visto que todas as árvores adultas desta área de coleta foram amostradas, a presença de alelos exclusivos na geração de progênes sugere fluxo gênico proveniente de indivíduos de outras localidades. Por outro lado, a presença de alelos exclusivos na geração parental sugere que nem todos os indivíduos aptos a deixarem descendentes estão se reproduzindo.

Tabela 21. Características de sete locos microssatélites em duas gerações da espécie *A. colubrina*. Tamanho amostral (*N*); número total de alelos (*K*); número efetivo de alelos nos locos (*A_e*); Riqueza alélica (*R*); heterozigosidade observada (*H_O*); heterozigosidade esperada (*H_E*); índice de fixação (*F*).

População de matrizes (<i>N</i> = 30)							
Locos	<i>N</i>	<i>K</i>	<i>A_e</i>	<i>R</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F</i>
Acol 02	30	4	1,775	3,999	0,300	0,439	0,317
Acol 05	29	2	1,409	2,000	0,345	0,289	-0,191
Acol 15	30	9	3,43	8,782	0,667	0,709	0,060
Acol 16	29	6	2,76	5,858	0,448	0,641	0,301
Acol 17	29	7	4,456	7,000	0,690	0,777	0,113
Acol 18	27	5	1,554	5,000	0,185	0,360	0,485
Acol 20	30	3	1,508	2,992	0,200	0,380	0,474
Média	29,14	5,142 (+/-0,275)	2,413 (+/-0,134)	5,090 (+/-0,266)	0,400 (+/-0,021)	0,513 (+/-0,020)	
Total	30	36	-	-	-	-	0,212
População de progênies (<i>N</i> = 322)							
Locos	<i>N</i>	<i>K</i>	<i>A_e</i>	<i>R</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>F</i>
Acol 02	321	4	1,905	3,990	0,475	0,47	0,596
Acol 05	316	3	1,342	2,085	0,255	0,224	0,309
Acol 15	319	11	3,771	8,341	0,735	0,729	0,123
Acol 16	301	8	2,501	5,890	0,6	0,545	0,531
Acol 17	317	8	4,161	6,417	0,76	0,755	0,231
Acol 18	285	5	1,414	2,549	0,293	0,111	0,079
Acol 20	320	3	1,155	2,319	0,135	0,121	0,251
Média	311,3	6,000 (+/-0,349)	2,321 (+/-0,149)	4,513 (+/-0,298)	0,464 (+/-0,028)	0,422 (+/-0,031)	
Total	322	42	-	-	-	-	0,319

() = Erro Padrão; *P<0,05

Conforme pode ser visto na Tabela 21, a riqueza alélica do conjunto amostral, feita por rarefação com base em 30 indivíduos, variou de 2,000 (geração de adultos) a 8,782 (também geração de adultos). Em ambas as gerações o número efetivo de alelos por loco (*A_e*) foi menor do que o número de alelos encontrado por loco (*K*), indicando a existência de alelos em baixa frequência. O menor valor da heterozigosidade média esperada (*H_E*) foi atribuído à geração de progênies (0,282) enquanto a geração de adultos apresentou o maior valor desta estimativa (0,502).

Esses resultados demonstram que a geração de árvores adultas tem maior diversidade genética do que a geração seguinte (progênies provenientes do plantio de sementes). É interessante notar também que, ao comparar as duas gerações, a riqueza alélica variou de forma estatisticamente significativa, apesar de valores absolutos próximos (média de 5,09 para adultos e 4,51 para progênies).

Em relação à dinâmica da endogamia entre gerações, observou-se que os valores médios do índice de fixação diferiram estatisticamente de zero ($P < 0,05$) em todas as gerações analisadas, indicando endogamia na espécie (Tabela 21). Esse resultado foi esperado, tendo em vista a área pequena e com alta densidade de indivíduos: devido ao sistema misto de reprodução de *A. colubrina* (maiores detalhes a frente), a espécie não possui estratégias naturais que impeçam a autofecundação e o acasalamento entre parentes.

Pelo índice de fixação também podemos notar que na geração seguinte houve um aumento significativo da endogamia. Isso pode ser reflexo do processo de fragmentação das áreas verdes do entorno, situação que reduz a quantidade de polinizadores e dispersores e favorece o endocruzamento. Lowe et al. (2005) revisaram estudos de várias espécies arbóreas neotropicais e para a maioria delas não encontraram efeito sobre a diversidade após fragmentação, mas observaram que a endogamia na geração de progênies e a aptidão foram impactadas.

A divergência genética entre as gerações de adultos e progênies de angico foi examinada através do G'_{ST} (Hedrick, 2005). Apesar de a estimativa sugerir baixa diferenciação genética entre as gerações ($G'_{ST} = 0,0221$, Tabela 22), esse valor ainda foi estatisticamente diferente de zero, indicando alterações na estrutura genética entre as gerações. Como a estatística de Hedrick (2005) mede a diferenciação entre as populações levando em consideração a frequência e o tipo de alelo, podemos considerar o valor sugerido como confiável. Segundo Seoane et al. (2005), essas alterações podem ser causadas por seleção natural, deriva genética e migração. Contudo, descarta-se a seleção, uma vez que essas diferenças foram observadas a partir de marcadores neutros como os microsatélites. Assim, as divergências genéticas observadas entre as gerações, podem ser uma consequência da deriva genética no processo de reprodução, combinado com o fluxo gênico oriundo de outras populações localizadas em fragmentos florestais vizinhos.

Tabela 22. Parâmetros de diferenciação genética entre as gerações de adultos e progêies de *A. colubrina*. G_{ST}' é a diferenciação genética entre as populações segundo Hedrick.

Loco	G_{ST}'
Acol 02	0,0000
Acol 05	-0,0017
Acol 15	-0,0184
Acol 16	0,0665
Acol 17	0,0000
Acol 18	0,0514
Acol 20	0,0699
Média	0,0221*
* $P < 0,05$	

SISTEMA DE REPRODUÇÃO

As estimativas das taxas de cruzamento multilocos ($t_m=0,619$) e unilocos ($t_s=0,460$) a nível populacional diferiram estatisticamente da unidade, indicando que *Anadenanthera colubrina* é uma espécie de sistema misto de reprodução ($t < 0,95$) com predominância de cruzamento (Tabela 23). A taxa de cruzamento multilocos estimada em *A. colubrina* é comparável à encontrada em outras espécies arbóreas tropicais com sistema misto de reprodução (Cascante et al., 2002; Fuchs et al., 2003; Lobo et al., 2005; Gusson et al., 2006; Feres et al., 2012b).

As estimativas das taxas de cruzamentos multilocos individuais apresentaram variação entre as árvores adultas amostradas, sendo também encontrados valores altos e baixos para as dez famílias de polinização aberta analisadas durante o evento reprodutivo (Tabela 24). A ocorrência de autofecundação ($\hat{s} = 0,38$) em nove das dez famílias estudadas sugere ausência de mecanismos de autoincompatibilidade na espécie.

A diferença entre a taxa de cruzamentos multiloco e uniloco ($t_m - t_s$) tem sido utilizada para quantificar a ocorrência de cruzamentos endogâmicos ou, em outros termos, entre indivíduos aparentados. A diferença da taxa de cruzamento multiloco e uniloco foi positiva e significativa na população estudada, mostrando a ocorrência de 15,9% de cruzamentos entre indivíduos parentes nas árvores de *A. colubrina* amostradas na região de Ribeirão Preto (Tabela 23). O cruzamento entre parentes é uma das formas de produzir endogamia nas populações de espécies arbóreas, embora seus efeitos sejam mais brandos do que os da autofecundação em si.

Tabela 23. Estimativa de parâmetros de sistema de reprodução e endogamia em *Anadenanthera colubrina*.

Parâmetros	
Número de árvores matrizes doadoras de sementes: n_m	10
Número total de progênies analisadas: n_p	322
Taxa de cruzamento multiloco: t_m	0,619 (0,064)
Taxa de cruzamento uniloco: t_s	0,460 (0,068)
Taxa de cruzamento entre parentes: $t_m - t_s$	0,159 (0,055)
Correlação multiloco de paternidade: $r_{p(m)}$	0,465 (0,082)
Correlação uniloco de paternidade: $r_{p(s)}$	-0,999 (0,383)
Presença de parentesco entre doadores de pólen: $r_{p(s)} - r_{p(m)}$	-1,464 (0,413)
Correlação multiloco de paternidade dentro de frutos: $r_{p(m)d}$	0,905 (0,094)
Correlação multiloco de paternidade entre frutos: $r_{p(m)e}$	0,383 (0,080)
Índice de fixação na geração de árvores adultas: F_p	0,202 (0,1200 a 0,3017) ^a
Índice de fixação nas progênies: F_o	0,393 (0,1830 a 0,406) ^a
Coancestria média dentro de progênies: Θ_{xy}	0,341 (0,190 a 0,507) ^a
Tamanho efetivo de variância: $N_{e(v)}$	1,42 (0,98 a 2,45) ^a
Número médio de árvores polinizadoras: $1/r_{p(m)}$	2,15
Número médio de árvores polinizadoras dentro de frutos: $1/r_{p(m)d}$	1,10
Número médio de árvores polinizadoras entre frutos: $1/r_{p(m)e}$	2,61
Número de árvores para reter o tamanho efetivo de 100: m	70,42

() Desvio padrão da média, obtido por 1.000 reamostragens *bootstraps*.

^a Intervalo de confiança a 95 % de probabilidade, estimado para 1.000 reamostragens *bootstraps*.

Tabela 24. Estimativas por família dos parâmetros do sistema de reprodução durante um evento reprodutivo da espécie florestal *Anadenanthera colubrina*. n é o número de progênies analisadas por árvore matriz; t_m é a taxa de cruzamento multiloco; $r_{p(m)}$ é a correlação multiloco de paternidade; Θ_{xy} é o coeficiente de coancestria nas progênies; $N_{e(v)}$ é o tamanho efetivo de variância. EP(95%) é o erro padrão de cada estimativa que o antecede, a 95% de probabilidade.

Matrizes	n	t_m	EP(95%)	$t_m \cdot t_s$	EP(95%)	$r_{p(m)}$	EP(95%)	Θ_{xy}	$N_{e(v)}$
M1	30	1,200	0,512	0,682	0,058	0,644	0,274	0,514	0,97
M2	33	0,866	0,424	0,039	0,054	0,246	0,129	0,220	2,19
M3	33	0,677	0,316	0,122	0,077	0,322	0,154	0,271	1,80
M5	33	0,296	0,136	0,128	0,084	0,746	0,349	0,393	1,26
M10	33	0,655	0,304	0,248	0,090	0,691	0,319	0,394	1,26
M14	33	0,713	0,355	0,228	0,060	0,541	0,278	0,279	1,75
M16	28	0,628	0,312	0,157	0,042	0,375	0,186	0,400	1,24
M27	33	0,624	0,309	0,171	0,066	0,517	0,269	0,331	1,49
M28	33	0,477	0,226	0,105	0,072	0,436	0,221	0,338	1,46
M29	33	0,196	0,089	0,028	0,079	0,999	0,45	0,596	0,84

Em concordância com tais resultados, foi detectada endogamia na geração de árvores adultas ($F_p = 0,202$; IC 95% 0,1200 a 0,3017) e nas gerações de progênies descendentes ($F_o = 0,393$; IC 95% 0,1830 a 0,406).

Os cruzamentos biparentais foram medidos pela correlação de paternidade $r_{p(m)}$ (Ritland, 1989). A correlação $r_{p(m)}$ mede a proporção de indivíduos de cruzamentos que foram gerados pelas mesmas árvores genitoras (ou seja, irmãos completos) (Ritland, 1989). No presente trabalho, a estimativa da correlação de paternidade foi dividida em dois componentes: entre progênies de diferentes frutos em uma mesma árvore ($r_{p(m)e}$) e entre progênies de um mesmo fruto ($r_{p(m)d}$). Ambas as estimativas foram altas e estatisticamente diferentes de zero nos dois conjuntos amostrais (Tabela 23). Os cálculos mostraram que, em um mesmo fruto, uma média de 90% dos cruzamentos são biparentais nas árvores de *A. colubrina* em Ribeirão Preto, ou seja, apenas uma árvore parental poliniza cada flor de angico. Já quando são analisados frutos distintos, apenas 38% dos cruzamentos foram geradas pelo mesmo parental materno e paterno. Sun e Ritland (1998) atribuíram os cruzamentos biparentais ao comportamento dos polinizadores, visitando de forma sistemática árvores próximas. Além disso, variações ambientais podem também afetar o comportamento e/ou a densidade das populações de animais polinizadores, levando a alterações na taxa de cruzamento das espécies em diferentes populações (Murawski e Hamrick, 1991; 1992). Os polinizadores de angico são principalmente as abelhas e diversos insetos pequenos, que visitam os indivíduos no período de floração e tendem a forragear em árvores próximas (Lorenzi, 2002). Dessa forma, a elevada densidade de árvores num espaço pequeno e a florada sincronizada podem ter favorecido o comportamento sistemático dos vetores de polinização em árvores próximas, elevando a correlação de paternidade.

A diferença entre as correlações de paternidade uniloco e multiloco ($r_{p(s)} - r_{p(m)}$) foi utilizada para quantificar a presença de parentesco entre os doadores de pólen. Para a população de *A. colubrina* analisada, esta estimativa foi negativa para o evento reprodutivo analisado (Tabela 23), indicando que o pólen dos cruzamentos foi oriundo de árvores não aparentadas.

A partir da correlação de paternidade também foi possível estimar o número médio de polinizadores efetivos por árvore ($1/r_{p(m)}$), ou seja, a média do número provável de indivíduos que contribuíram com pólen no evento de reprodução de uma árvore materna. Assim, as correlações de paternidade média populacional sugeriram que 2,51 árvores efetivamente polinizaram cada uma das

árvores matrizes de *A. colubrina*. Contudo, analisando estas estimativas em nível de frutos, torna-se claro que os diferentes frutos de uma mesma árvore podem ter recebido pólen de aproximadamente três (2,6) indivíduos distintos, enquanto um fruto único pode ter se originado do pólen de apenas uma árvore (Tabela 23). O número médio de árvores efetivamente polinizadoras foi comparável aos encontrados em outras espécies florestais (James et al., 1998; Sebbenn et al., 2001; Rocha e Aguilar 2001; Dunphy et al., 2004; Moraes et al., 2004; Azevedo et al., 2007; Carneiro et al., 2007; Feres et al., 2012b).

A taxa de cruzamento multilocos (t_m) obtida para *A. colubrina*, combinada com a correlação de paternidade nas matrizes da população, permitiu afirmar que não houve diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de progênies originadas por autofecundação ($\hat{P}_{IA} = \hat{s}$), cruzamentos aleatórios [$P_{MI} = t_m(1 - r_p)$] (sendo aparentadas no grau de meio-irmãos) e no grau de irmãos completos ($P_{IC} = r_p t_m$). Ou seja, a proporção média de cada um dos tipos dessas progênies foi igualmente distribuída no angical estudado. Por outro lado, embora as proporções médias tenham sido equilibradas, dentro das famílias houve bastante variação, como pode ser notado na Tabela 25. Isso mostra a enorme flexibilidade do sistema de cruzamento em *A. colubrina*, semelhante ao reportado para *Tabebuia roseo-alba* (Feres et al., 2012b).

Em concordância com os elevados valores de autofecundação e cruzamentos correlacionados, o coeficiente de coancestralidade médio dentro de progênies ($\Theta_{xy} = 0,341$ – Tabela 23) atingiu valor próximo ao esperado para progênies de irmãos completos (0,25). Entretanto, tendo em vista que foram detectados cruzamentos entre indivíduos aparentados, parte das progênies geradas por cruzamentos aleatórios e biparentais devem ser aparentadas em grau superior ao de irmãos completos, como pode ser verificado na Tabela 24.

Tabela 25. Proporção média de pares de irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{IA} = \hat{s}$), meios-irmãos [$\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m(1 - \hat{r}_p)$] e irmãos-completos ($\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m \hat{r}_p$) contidos nas progênie de *Anadenanthera colubrina*.

Famílias/Matrizes	$\hat{P}_{IA} = \hat{s}$	$\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m(1 - \hat{r}_p)$	$\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m \hat{r}_p$
M1	0,644	0,000	0,356
M2	0,246	0,134	0,653
M3	0,322	0,323	0,459
M5	0,746	0,704	0,075
M10	0,691	0,345	0,202
M14	0,541	0,287	0,327
M16	0,375	0,372	0,393
M27	0,517	0,376	0,301
M28	0,436	0,523	0,269
M29	0,999	0,804	0,000
Média	0,465	0,381	0,331
Limite inferior ^a	0,383	0,317	0,309
Limite superior ^a	0,547	0,445	0,342

^a: Intervalo de confiança a 95 % de probabilidade, estimado para 1.000 reamostragens *bootstraps*.

A reprodução parcial por autofecundação, associada à correlação de paternidade, implica no aumento da coancestria nas progênie e a necessidade de se ter maiores tamanhos amostrais para a conservação *ex situ* do que o necessário se a população fosse perfeitamente panmítica. No grupo de angicos estudado em Ribeirão Preto, por exemplo, a coancestria das progênie foi maior que a esperada para meios irmãos (0,125) e às vezes até maior que irmãos completos (0,25) e a estimativa do tamanho da variância de uma única progênie foi 1,42. Em consequência disso, o tamanho efetivo de variância ($N_{e(v)}$), dentro das progênie, foi igualmente menor do que o esperado em populações panmíticas (variando de 0,84 a 2,19 – Tabela 24). A partir destes coeficientes, estimou-se que a geração de árvores adultas tem um tamanho efetivo de 14,26. Isto significa que as 30 árvores adultas reprodutivas amostradas no angical correspondem a apenas 14 árvores não endogâmicas e parentes entre si, resultando em uma relação entre o tamanho efetivo e o número censo (N_e / N) de 0,46. Assim, são necessárias sementes de pelo menos 70 árvores matrizes do angical com intuito de reter amostras de progênie com tamanho efetivo de 100.

Com base nos resultados sobre o sistema reprodutivo de *Anadenanthera colubrina*, o que fica mais evidente é a variação dos parâmetros citados acima nas

dez famílias de polinização aberta estudadas. Estas variações não são incomuns em espécies arbóreas como reportado em *Ceiba pentandra* (Malvaceae; Murawski e Hamrick, 1992; desde autofecundação completa até alogamia), *Swietenia macrophylla* (Meliaceae, Lemes 2000, *apud* Ward et al., 2005), *Dicorynia guianensis* (Fabaceae; Latouche-Hallé et al., 2004) e em *Tabebuia roseo-alba* (Feres et al., 2012b). Por outro lado, diferenças interpopulacionais nas características do sistema reprodutivo também têm sido observadas para diferentes espécies de plantas. Mudanças na paisagem, tais como corte seletivo de espécies arbóreas, desflorestamento e destruição de habitat, alteram a densidade populacional, estrutura demográfica, fenologia, diversidade e comportamento do polinizador, implicando em mudanças no sistema reprodutivo de certas espécies (Lowe et al., 2005). Embora a maioria das espécies tropicais hermafroditas apresentem fortes barreiras para autofecundação (Seavey e Bawa, 1986), estudos recentes baseados em análises moleculares têm demonstrado uma maior flexibilidade do sistema reprodutivo de espécies arbóreas tropicais (Feres et al., 2012b). Sebbenn et al. (2001) ressaltam que os mecanismos para evitar autofecundação podem não ocorrer obrigatoriamente em todos os indivíduos de uma população e durante todo o período de florescimento, podendo ter origem genética e ocorrer apenas em fases específicas do florescimento.

A taxa de cruzamento em plantas hermafroditas, como *A. colubrina*, depende de fatores tais como: presença e intensidade de mecanismos de autoincompatibilidade; grau de protogenia e protandria; comportamento forrageiro dos polinizadores entre e dentro de árvores (o qual é influenciado pela densidade de florescimento das árvores na população) e aborto seletivo de frutos e sementes de autofecundação (Murawski e Hamrick, 1991). Portanto, para confirmação e identificação de como se processaria esse controle genético da auto-compatibilidade em *A. colubrina*, estudos futuros mais específicos são necessários. Os resultados do presente delineamento experimental fundamentam a conclusão de que *A. colubrina*, presente em agrupamentos de elevada densidade, num ambiente pobre em remanescentes florestais, comporta-se como uma espécie de reprodução mista, cuja taxa de cruzamento varia enormemente entre os indivíduos de um mesmo angical.

CORRELAÇÕES ENTRE SUCESSO REPRODUTIVO VS. SISTEMA DE CRUZAMENTO

Com base nas análises individuais de cada fruto coletado, foi possível construir uma tabela com os valores médios das quantidades de lóculos (número

possível de sementes), de sementes viáveis e de sementes inviáveis em cada família de polinização aberta amostrada em *Anadenanthera colubrina* (Tabela 26). Como foram calculados parâmetros do sistema reprodutivo para cada uma dessas famílias, foi possível correlacionar dados do sistema reprodutivo obtidos através de dados genéticos com o sucesso reprodutivo da espécie.

Tabela 26. Produção média de sementes viáveis em cada família de polinização aberta analisada e suas respectivas medidas de taxa de cruzamento multiloco TM, cruzamento entre parentes (*tm-ts*) e correlação de paternidade (*r_{p(m)}*).

Família	Quantidade de lóculos no fruto	Sementes viáveis	Sementes inviáveis	<i>t_m</i>	<i>tm-ts</i>	<i>r_{p(m)}</i>
M1	8,111	3,222	4,889	1,000	0,682	0,644
M2	8,000	6,333	1,667	0,866	0,039	0,313
M3	6,667	3,778	2,889	0,677	0,122	0,322
M5	6,333	3,667	2,667	0,292	0,128	0,746
M10	8,714	5,571	3,000	0,655	0,248	0,691
M14	6,300	2,600	3,400	0,713	0,228	0,541
M16	10,000	5,125	4,875	0,628	0,157	0,375
M27	9,000	4,625	4,375	0,624	0,171	0,517
M28	6,667	4,444	2,222	0,477	0,105	0,436
M29	5,200	3,500	1,600	0,196	0,028	0,999

Dessa forma, através das análises utilizando o coeficiente de correlação de Spearman, foi constatado que a porcentagem de sementes viáveis não teve correlação com a taxa de cruzamento constatada para cada família ($\rho = -0,39$; valor de $P = 0,2649$) e com a correlação de paternidade ($\rho = -0,08$, valor de $P = 0,8277$).

Por outro lado, a taxa de cruzamento entre parentes (*tm-ts*) foi significativamente correlacionada com o número de sementes viáveis ($\rho = -0,78$ valor de $P = 0,007$). O coeficiente ρ de Spearman varia entre -1 e 1. Quanto mais próximo estiver destes extremos, maior será a associação entre as variáveis. A correlação negativa indica que o crescimento de uma das variáveis implica, em geral, no decréscimo da outra. A correlação positiva indica, em geral, o crescimento ou decréscimo concomitante das duas variáveis consideradas. Assim, conclui-se que quanto maior a taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados, menor é o número de sementes viáveis por fruto em cada árvore matriz. Nossas análises não puderam especificar de que maneira o número de sementes viáveis diminui (aborto, maior susceptibilidade à predação) conforme aumenta o número de cruzamentos entre parentes, mas dá indícios de que, embora

A. colubrina seja auto compatível, podem existir mecanismos reprodutivos que ajudem a manter a variabilidade genética da espécie.

FLUXO DE PÓLEN

Baseando-se na análise de paternidade e no nível de confiança relaxado (de 80 %), foi possível identificar o parental paterno para 225 das 322 progênes de polinização aberta amostradas, o que indica uma taxa de imigração de pólen de aproximadamente 30 % (Tabela 27). Com um nível de confiança restrito (95%), a taxa de paternidade atribuída cai para 25%. Para as análises, foram incluídas a possibilidade de autofecundação na espécie e também a endogamia parental.

Os resultados mostraram que das 225 paternidades atribuídas, 103 foram resultados de eventos de autofecundação, confirmando o sistema misto de reprodução e a autocompatibilidade sugerida pela análise do sistema reprodutivo. Além disso, das 30 árvores adultas reprodutivas analisadas dentro do angical, 22 delas (73,3 %) foram doadores de pólen para a formação das progênes. Cinco dessas 30 árvores foram responsáveis pelo fornecimento de pólen para a geração de 52% das progênes, como pode ser visualizado na Figura 17.

Tabela 27. Perfis do fluxo de pólen para 10 matrizes de *Anadenanthera colubrina* localizadas em Ribeirão Preto (SP). *n*, número de progênes; *s*, autofecundação; *A_{ep}*, área de vizinhança efetiva de polinização; DP, desvio padrão.

Família	<i>n</i>	<i>s</i>	%	Fluxo de pólen				Distância de Dispersão	
				Dentro	%	Fora	%	Distância média em metros (DP)	<i>A_{ep}</i> (ha)
M1	30	24	80	0	0	6	20	0	0
M2	33	6	18	21	64	6	18	252,93 (184,82)	2,145
M3	33	6	18	10	30	17	52	281,68 (190,10)	2,269
M5	33	16	48	8	24	9	27	170,58 (122,48)	0,942
M10	33	0	0	11	33	22	67	355,52 (302,06)	5,730
M14	28	10	36	10	36	8	29	162,96 (191,01)	2,530
M16	33	5	15	19	58	9	27	192,40 (218,03)	3,296
M27	33	9	27	16	48	8	24	421,73 (231,41)	3,363
M28	33	15	45	9	27	9	27	388,23 (264,34)	4,388
M29	33	12	36	18	55	3	9	450,02 (95,41)	0,572
Total	322	103		122		97		299,88 (222,44)	2,54 (1,76)

Figura 17. Padrão de doação de pólen por árvore matriz de *Anadenanthera colubrina* analisada.

As distâncias do movimento do pólen, dentro da área de coleta, medidas entre as árvores maternas e paternas determinadas pelas análises de paternidade, variaram entre 7,07 e 768,46 metros, com uma média de 299,88 (DP 222,44m). Metade dos eventos de polinização ocorreu a distâncias menores que 250 m (~52 %; Figura 18) e a distribuição da distância de dispersão de pólen apresentou uma mediana de 237,3 m.

Figura 18. Distância de dispersão de pólen para a espécie *Anadenanthera colubrina* determinada por análises de paternidade em progênes de polinização aberta.

As análises de paternidade também indicaram níveis relativamente altos de fluxo de pólen (30 %, ou seja, 96 progênes sem paternidade atribuída dentro da área de estudo) oriundo de indivíduos distantes do angical e que não foram

amostradas para esse estudo. Isso sugere que estejam ocorrendo eventos de polinização a distâncias superiores a 768m na espécie florestal *A. colubrina*.

O poder de exclusão teórico do segundo parente, calculado com base nos genótipos dos adultos, variou de 0,428 (Acol 17) a 0,878 (Acol 05), com valor combinado entre os locos de 0,956. Esse baixo valor combinado de poder de exclusão do conjunto de *primers* refletiu em uma altíssima probabilidade de fluxo gênico crítico teórico 0,628 ($=1-0,956^{22}$). Portanto, cerca de 50 % das progênes podem ter o parental paterno determinado erroneamente, indicando que os níveis de fluxo gênico crítico podem afetar substancialmente as taxas de imigração de pólen estimadas pela análise de paternidade.

Comparando o poder de exclusão do conjunto de locos utilizados no presente trabalho com outros estudos de fluxo gênico (Sato et al., 2006; Bittencourt e Sebbenn, 2007), há forte indício de que o fluxo gênico externo ao angical pode ser ainda maior. É interessante notar que o poder de exclusão gerado por esse conjunto de locos em indivíduos de angicais diferentes em Ribeirão Preto (ver Capítulo I e Feres et al., 2012a) é muito diferente. Através dessa comparação, nota-se que o conjunto dos marcadores tem potencialidade para excluir parentais, desde que amostrados indivíduos distantes. Esse cenário pode ser explicado pelo padrão reprodutivo da espécie, que favorece a formação de grupos (angicais) monoespecíficos com indivíduos semelhantes geneticamente, o que gera baixa diversidade genética. Mesmo diante desse artefato apresentado pela técnica, os resultados obtidos são de alta relevância na compreensão do fluxo gênico desta importante espécie.

Assim, com base nessas análises, podemos sugerir que o agrupamento de *A. colubrina* estudado apresentou dois níveis de dispersão de pólen: um componente a curta distância dentro do angical e outro a longa distância, entre o fragmento e árvores de outras localidades que não foram amostradas. Esse segundo nível de dispersão de pólen diminui o risco de perda da diversidade genética das populações de *A. colubrina*, o que é crucial para sua sobrevivência em longo prazo, especialmente em ambientes onde a fragmentação florestal é tão recorrente, como na Região de Ribeirão Preto. Segundo Young et al. (1996), é possível que o processo de fragmentação do habitat possa favorecer o fluxo de pólen mediado pelo vento através da paisagem, mantendo assim altos níveis de diversidade em pequenos fragmentos isolados. Diversos estudos também têm detectado fluxo de pólen a longa distância em populações naturais isoladas de outras espécies arbóreas, tais como *Quercus macrocarpa* (Dow e Ashley, 1996),

Pinus flexilis (Schuster e Mitton, 2000), *Cecidiphyllum japonica* (Sato et al., 2006), *Araucaria angustifolia* (Bittencourt e Sebbenn, 2007) e *Cariniana estrellensis* (Guidugli, 2011).

Levando em consideração que eventos de polinização possam ocorrer através de longas distâncias, fragmentos florestais considerados isolados podem, de fato, formar uma população contínua para algumas das espécies arbóreas. Dentro desse contexto, Smulders et al. (2009) pontuam a necessidade de determinar o fator preponderante para se delimitar uma “população” para as espécies em estudo. No caso dos angicos da região de Ribeirão Preto, não há como considerar cada aglomerado (angical) como uma população, já que são muitos e espalhados por um ambiente complexo (fragmentos florestais, trechos urbanos, malhas viárias) e que, de acordo com nossos resultados, são capazes de se conectar através do fluxo de pólen. Portanto, limitar uma população de angico, seria muito complexo e acarretaria erros conceituais.

As análises de paternidade revelaram também que a área de vizinhança efetiva de polinização ($A_{ep} = 2,54$ ha; Tabela 27) foi muito semelhante à área ocupada pelo angical ($\sim 2,6$ ha). Wright (1943) definiu uma “vizinhança” como a área de um deme dentro da qual os cruzamentos são aleatórios, considerando espécies hermafroditas. Dyer e Sork (2001) pontuam a importância de estudos voltados para a compreensão dos fatores que possam influenciar o movimento do pólen dentro das populações, pois se o movimento de pólen é restrito, árvores reprodutivamente ativas podem ser super representadas nas gerações subsequentes.

Os eventos reprodutivos da espécie nos anos de 2010 e 2011 foram acompanhados e apresentaram grande sincronismo de florescimento (dados não publicados). Assim, grande quantidade de indivíduos florescendo sincronicamente e em locais marginais (bordas de fragmentos florestais e angicais isolados) deve favorecer o cruzamento da grande vizinhança reprodutiva observada. Finalmente, a grande capacidade de dispersão de fluxo de pólen detectada indica que a fragmentação dificilmente isolará reprodutivamente as árvores de *A. colubrina*, reforçando a importância de estudos conservacionistas voltados para a compreensão e manejo de populações arbóreas naturais.

De fato, Robledo-Arnuncio e Austerlitz (2006) determinaram, através de um modelo de estudo de populações espacialmente agregadas, que a agregação espacial pode realmente ter uma influência substancial sobre a variação axial de dispersão de pólen e o tamanho efetivo de doadores de pólen (N_{ep}). Eles

demonstraram que, dentro do intervalo de parâmetros considerados, a agregação poderia gerar valores de N_{ep} até 35% mais baixo do que a expectativa de uma população distribuída de forma aleatória, para uma escala de dispersão suficientemente grande em relação à de aglomeração. Isto corresponde a um aumento superior a 50% na proporção de irmãos completos dentro dos grupos. Se este aumento de paternidades correlacionadas é seguido por dispersão limitada, como é geralmente o caso, ele vai favorecer um aumento na estrutura genética espacial e na quantidade de cruzamentos endogâmicos na próxima geração (Wells e Young, 2002; Epperson, 2004). Como este processo continua ao longo do tempo, a interação entre a agregação espacial e a dispersão do pólen eficaz irá aumentar o grau de parentesco local, especialmente na ausência de um sistema de incompatibilidade genética, como é o caso de *Anadenanthera colubrina*. Além disso, nesse tipo de agregação populacional, foi demonstrado que a distância axial de dispersão de pólen sofrerá uma redução de até 50%, fazendo com que o agrupamento tenda a reduzir a dimensão espacial da diferenciação genética local. Essa redução, combinada com a seleção diferencial, pode reduzir também a adaptação local na população (Robledo-Arnuncio e Austerlitz, 2006). Os dados de diversidade genética, diferenciação entre angicais e estruturação genética espacial apresentados no Capítulo II corroboram tais indicativos.

3.2. *ANADENANTHERA PEREGRINA*

ANÁLISE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

O teste de desequilíbrio gamético foi realizado para adultos e progênies com o uso da correção de Bonferroni para que fossem evitados falsos positivos. Dessa forma, nossa análise detectou desequilíbrio gamético em 11 dos 21 pares de locos testados nas progênies (Tabela 28). Nas árvores adultas nenhum indício de desequilíbrio de segregação foi detectado. Contudo, como o teste de desequilíbrio de ligação é altamente sensível a grandes tamanhos amostrais e não foram encontrados indícios de um mesmo par de locos nas duas gerações, podemos supor que tais desequilíbrios não sejam decorrentes de ligação física entre os marcadores microssatélites analisados.

O desequilíbrio de ligação não implica obrigatoriamente na ligação física dos locos (evidenciando primers num mesmo grupo de ligação), mas sim que certas combinações de alelos aparecem mais frequentemente do que esperado

pelo acaso. O desequilíbrio gamético pode ser causado por fatores como deriva genética, efeito fundador, efeito gargalo genético e pelo sistema de reprodução a partir de autofecundações, cruzamentos entre parentes e cruzamentos correlacionados. Como será visto nas análises do sistema de reprodução e dispersão de pólen subsequentes, dentro do angical estudado ocorreram autofecundações, cruzamentos entre parentes e cruzamentos correlacionados e esta é provavelmente a principal causa do desequilíbrio de ligação observado. Sendo assim, consideramos o conjunto de locos utilizados aptos para o desenvolvimento desta etapa do trabalho.

Tabela 28. Desequilíbrio de ligação entre os locos microssatélites de *A. peregrina*. Os valores na tabela são as probabilidades após 1.000 permutações. O valor limite de significância após correção de Bonferroni é 0,0023.

Pares de locos	Matrizes	Progênies
Acol 09 x Acol 11	0,04048	0,05000
Acol 09 x Acol 12	0,16071	0,00119
Acol 09 x Acol 13	0,20595	0,00357
Acol 09 x Acol 14	0,77976	0,00119
Acol 09 x Acol 15	0,50952	0,01429
Acol 09 x Acol 20	0,95595	0,00714
Acol 11 x Acol 12	0,35714	0,06310
Acol 11 x Acol 13	0,17976	0,07381
Acol 11 x Acol 14	0,47143	0,00119
Acol 11 x Acol 15	0,72024	0,00119
Acol 11 x Acol 20	0,10000	0,00119
Acol 12 x Acol 13	0,72976	0,00119
Acol 12 x Acol 14	0,38214	0,00119
Acol 12 x Acol 15	0,61667	0,00476
Acol 12 x Acol 20	0,32381	0,00119
Acol 13 x Acol 14	0,68929	0,00595
Acol 13 x Acol 15	0,00952	0,00357
Acol 13 x Acol 20	0,02619	0,00238
Acol 14 x Acol 15	0,09643	0,00119
Acol 14 x Acol 20	0,22738	0,00119
Acol 15 x Acol 20	0,60119	0,00119

ANÁLISE DE DIVERSIDADE GENÉTICA E ENDOGAMIA

Na amostra total de 355 indivíduos (adultos+progênies), foram observados 66 alelos (Tabela 29). O número de alelos por locos foi relativamente alto, variando de 6 (Acol 09) a 12 (Acol 14), com média de 9,428 (+/-0,227) alelos. O número

efetivo de alelos por locos (média de 2,939 $\pm$ 0,117) foi muito menor que o número de alelos nos locos, indicativo de que, embora existam muitos alelos nos locos, muitos deles têm baixa frequência.

A heterozigosidade observada variou de 0,387 (Acol 20) a 0,670 (Acol 13), com média de 0,540 $\pm$ 0,014. A diversidade genética variou de 0,370 (Acol 09) a 0,779 (Acol 14), com média de 0,627 $\pm$ 0,0159.

Tabela 29. Poder de exclusão e diversidade genética de sete locos microssatélites em árvores adultas e progênie de *A. peregrina*. *N* é o número de indivíduos analisados; *K* é o número total de alelos; *A_e* é o número efetivo de alelos nos locos; *H_o* é a heterozigosidade observada; *H_E* é a heterozigosidade esperada; *Pr(Ex1)* e *Pr(Ex2)* são respectivamente as probabilidades de excluir o primeiro e o segundo parente. EP é o erro padrão da estimativa a 95% de probabilidade.

Locos	<i>N</i>	<i>K</i>	<i>A_e</i>	<i>H_o</i>	<i>H_E</i>	<i>Pr(Ex1)</i>	<i>Pr(Ex2)</i>
Acol 09	326	6	1,590	0,420	0,370	0,930	0,804
Acol 11	304	8	3,356	0,655	0,701	0,730	0,567
Acol 12	350	11	3,049	0,626	0,671	0,742	0,581
Acol 13	294	10	2,506	0,670	0,600	0,809	0,672
Acol 14	318	12	4,695	0,560	0,779	0,605	0,428
Acol 15	323	10	2,597	0,464	0,619	0,772	0,590
Acol 20	302	9	2,786	0,387	0,598	0,807	0,664
Média +/- EP	316,7	9,428 +/-0,227	2,939 +/-0,117	0,540 +/-0,014	0,627 +/-0,015	---	---
Total	355	66				0,84640	0,97013

Esse baixo número efetivo de alelos por loco teve consequências, assim como em *A. colubrina*, sobre o poder de exclusão desses marcadores. Sendo assim, o poder de exclusão total para identificação de um candidato a pai em uma progênie arbitrária, quando nenhum dos pais é conhecido (*Pr(Ex1)*) foi estimado em 0,84640. Quando é conhecido o genótipo de um dos pais, a probabilidade de exclusão (*Pr(Ex2)*) do conjunto de locos foi de 0,97013 (Tabela 29).

A Tabela 30 expõe os resultados da diversidade genética encontrada nas gerações de adultos e progênie, separadamente. Quando analisadas as gerações separadamente, foi observado que os adultos apresentaram um número maior de alelos (57) do que os observados na geração de progênie (55), evidenciando um possível processo de deriva genética na geração de filhos, já que nem todos os alelos presentes nas matrizes foram passados. Foram encontrados oito alelos

exclusivos nas matrizes e onze nas progênies, o que evidencia a presença de fluxo gênico fora do local amostrado.

Conforme pode ser visto na Tabela 30, a riqueza alélica do conjunto amostral, feita por rarefação com base em 55 indivíduos, teve média de 7,768 (+/- 0,187) (geração de adultos) e de 6,095 (+/-0,147) na geração de progênies.

Tabela 30. Características de sete locos microssatélites em duas gerações da espécie *A. peregrina*. Tamanho amostral (*N*); número total de alelos (*K*); número efetivo de alelos nos locos (*A_e*); Riqueza alélica (*R*); heterozigosidade observada (*H_o*); heterozigosidade esperada (*H_E*); índice de fixação (*F*).

População de matrizes (<i>N</i> = 55)							
Locos	<i>N</i>	<i>K</i>	<i>A_e</i>	<i>R</i>	<i>H_o</i>	<i>H_E</i>	<i>F</i>
Acol 09	55	6	1,934	5,992	0,482	0,483	-0,036
Acol 11	49	7	4,274	7,000	0,717	0,766	0,094
Acol 12	55	10	3,891	9,722	0,877	0,743	-0,147
Acol 13	54	7	3,175	6,898	0,667	0,685	0,054
Acol 14	50	10	3,636	9,940	0,704	0,725	0,145
Acol 15	55	7	2,288	6,891	0,552	0,563	0,064
Acol 20	52	8	2,985	7,937	0,382	0,665	0,451
Média	52,6	7,881 (+/-0,183)	3,169 (+/-0,097)	7,768 (+/-0,187)	0,625 (+/-0,018)	0,661 (+/- 0,013)	
Total	55	57	-	-	-	-	0,091*
População de progênies (<i>N</i> = 300)							
Locos	<i>N</i>	<i>K</i>	<i>A_e</i>	<i>R</i>	<i>H_o</i>	<i>H_E</i>	<i>F</i>
Acol 09	272	6	1,534	4,324	0,408	0,348	-0,17
Acol 11	260	7	3,185	5,073	0,662	0,686	0,065
Acol 12	294	8	2,874	6,097	0,578	0,652	0,108
Acol 13	245	9	2,347	6,205	0,669	0,574	-0,172
Acol 14	269	10	4,902	8,118	0,584	0,796	0,258
Acol 15	268	9	2,660	6,361	0,455	0,624	0,286
Acol 20	250	8	2,755	6,491	0,472	0,637	0,273
Média	26	8,143 (+/-0,167)	2,893 (+/-0,117)	6,095 (+/-0,147)	0,547 (+/-0,011)	0,616 (+/-0,017)	
Total	300	55	-	-	-	-	0,119*

*P<0,05

Ao analisarmos os intervalos dessa estimativa, nota-se que ela diferiu estatisticamente entre as duas gerações. Isso reforça os indícios de deriva genética e/ou migração de pólen para o angical estudado. As heterozigosidades observada

e esperada foram também significativamente maiores nos adultos do que nas progênies, sugerindo uma redução na diversidade genética entre as gerações.

Os resultados apresentados foram similares àqueles obtidos em *A. colubrina* e deixam evidente que a geração de árvores matrizes tem maior diversidade genética do que sua geração descendente.

Em relação ao índice de fixação, observou-se que seus valores médios diferiram estatisticamente de zero ($P < 0,05$) nas duas gerações analisadas, indicando endogamia na espécie (Tabela 30). Esse resultado é devido ao sistema misto de reprodução (maiores detalhes a frente), e, assim como em *A. colubrina*, evidencia a falta de mecanismos naturais contra a autofecundação e o acasalamento entre parentes. Com relação à dinâmica de endogamia entre as gerações, podemos notar que o índice de fixação aumentou significativamente na geração de progênies. Essa característica foi também observada em *A. colubrina* e, mais uma vez, reforça a ideia de diminuição das áreas verdes do entorno, assim como a quantidade de polinizadores, dispersores e coespecíficos, favorecendo o endocruzamento.

O resultado dessas mudanças entre as gerações de *A. peregrina* (presença de alelos exclusivos, diminuição da riqueza alélica e aumento da endogamia) refletiu em uma pequena divergência genética positiva entre as gerações de adultos e progênies ($G_{ST}' = 0,036$, Tabela 31). Assim, as diferenças genéticas apontadas entre as gerações devem ter surgido como consequência de deriva genética no processo de reprodução, combinado com o fluxo gênico de outros coespecíficos localizados no entorno, como sugerido em Seoane et al. (2005).

Tabela 31. Parâmetros de diferenciação genética entre as gerações de adultos e progênies de *A. peregrina*. G_{ST}' é a diferenciação genética entre as populações segundo Hedrick.

Loco	G_{ST}'
Acol 02	0,010
Acol 05	0,050
Acol 15	0,095
Acol 16	0,075
Acol 17	0,052
Acol 18	0,020
Acol 20	-0,005
Média	0,036*

* $P < 0,05$

SISTEMA DE REPRODUÇÃO

De acordo com a estimativa da taxa de cruzamento multilocus (t_m), *A. peregrina* é uma espécie predominantemente alógama (Tabelas 32 e 33). A estimativa da taxa de cruzamento multilocus foi significativamente diferente da unidade (0,905), o que confirma a presença de autofecundações. A taxa de cruzamento unilocos foi significativamente menor do que a unidade. Consequentemente, a diferença entre a taxa de cruzamento multilocus e unilocos foi alta (0,216 – Tabela 32), evidenciando cruzamento entre árvores aparentadas.

Tabela 32. Estimativa de parâmetros de sistema de reprodução e endogamia em *Anadenanthera peregrina*.

Parâmetros	
Número de árvores matrizes doadoras de sementes: n_m	10
Número total de progênies analisadas: n_p	300
Taxa de cruzamento multiloco: t_m	0,905 (0,025)
Taxa de cruzamento uniloco: t_s	0,690 (0,053)
Taxa de cruzamento entre parentes: $t_m - t_s$	0,216 (0,032)
Correlação multiloco de paternidade: $r_{p(m)}$	0,677 (0,089)
Correlação uniloco de paternidade: $r_{p(s)}$	-0,999 (0,022)
Presença de parentesco entre doadores de pólen: $r_{p(s)} - r_{p(m)}$	-1,676 (0,091)
Correlação multiloco de paternidade dentro de frutos: $r_{p(m)d}$	0,805 (0,110)
Correlação multiloco de paternidade entre frutos: $r_{p(m)e}$	0,298 (0,090)
Índice de fixação na geração de árvores adultas: F_a	0,091 (0,060 a 0,122) ^a
Índice de fixação nas progênies: F_o	0,119 (0,097 a 0,141) ^a
Coancestria média dentro de progênies: Θ_{xy}	0,214 (0,190 a 0,507) ^a
Tamanho efetivo de variância: $N_{e(v)}$	2,336 (0,158 a 2,552) ^a
Número médio de árvores polinizadoras: $1/r_{p(m)}$	1,48
Número médio de árvores polinizadoras dentro de frutos: $1/r_{p(m)d}$	1,24
Número médio de árvores polinizadoras entre frutos: $1/r_{p(m)e}$	3,35
Número de árvores para reter o tamanho efetivo de 100: m	42,8

() Desvio padrão da média, obtido por 1.000 reamostragens *bootstraps*.

^a Intervalo de confiança a 95 % de probabilidade, estimado para 1.000 reamostragens *bootstraps*.

A estimativa da correlação de autofecundação ($r_s = 0,392 \pm 0,131$) foi significativamente maior que zero, revelando a ocorrência de variação individual

na taxa de cruzamento, revelada na Tabela 33, em que nota-se uma variação na taxa individual de autofecundação de zero a 21%. De fato, Costa et al. (1992) descreveram *A. peregrina* como sendo uma espécie preferencialmente alógama, atribuindo esse fato ao elevado grau de defasagem no tempo de receptividade dos grãos de pólen detectada. Através das nossas estimativas, foi possível observar um maior número de sementes formadas por cruzamentos entre diferentes matrizes.

Mecanismos para evitar autofecundação podem não ocorrer obrigatoriamente em todos os indivíduos de uma população e durante todo o período de florescimento, podendo ter origem genética e ocorrer em apenas fases específicas do florescimento (Murawski e Hamrick, 1991; Sebbenn et al., 2001). Pode existir variação nas taxas de cruzamento e autofecundação entre diferentes populações de uma mesma espécie em resposta, por exemplo, a mudanças de polinizadores e fragmentação florestal (Lobo, 2005).

Tabela 33. Estimativas por família dos parâmetros do sistema de reprodução durante um evento reprodutivo da espécie florestal *Anadenanthera peregrina*. N é o número de progênies analisadas por árvore matriz; t_m é a taxa de cruzamento multiloco; $r_{p(m)}$ é a correlação multiloco de paternidade; Θ_{xy} é o coeficiente de coancestria nas progênies; $N_{e(v)}$ é o tamanho efetivo de variância e EP é o erro padrão, a 95% de confiança, da estimativa que o antecede.

Matrizes	N	t_m	EP (95%)	T_m-T_s	EP (95%)	$r_{p(m)}$	EP (95%)	Θ_{xy}	$N_{e(v)}$
M1	30	0,791	0,073	0,360	0,048	0,999	0,053	0,300	1,61
M2	33	1,200	0,002	0,432	0,064	0,601	0,113	0,335	1,45
M3	33	0,875	0,087	0,092	0,067	0,305	0,056	0,218	2,15
M4	33	0,875	0,090	0,374	0,064	0,790	0,162	0,272	1,76
M5	33	0,833	0,087	0,343	0,060	0,801	0,125	0,277	1,73
M6	33	0,901	0,076	0,265	0,060	0,404	0,105	0,224	2,10
M7	28	1,200	0,002	0,275	0,072	0,297	0,107	0,275	1,75
M8	33	0,830	0,087	0,322	0,056	0,901	0,094	0,286	1,69
M9	33	0,931	0,081	0,108	0,072	0,312	0,087	0,201	2,32
M10	33	0,961	0,104	0,190	0,089	0,866	0,120	0,265	1,81

A análise individual mostrou que a taxa de cruzamentos correlacionados (T_m-T_s) variou de aproximadamente 9% a 43% (Tabela 33). De fato, foi observado que parte dos cruzamentos ocorridos nas populações foram entre árvores aparentadas, já que tanto as árvores adultas quanto as progênies tiveram índices de endogamia estatisticamente diferentes de zero.

Para os valores médios populacionais, a correlação de paternidade foi partida em dois componentes: a correlação de paternidade entre sementes de um mesmo fruto ($r_{p(m)d}$) e a correlação de paternidade entre sementes de diferentes

frutos de uma mesma árvore ($r_{p(m)}$). Ambas as estimativas foram positivas e diferentes de zero, acusando uma média de aproximadamente 67% ($r_{p(m)} = 0,677$) de cruzamentos correlacionados, sendo que a maior parte deles ocorreu entre progênies (Tabela 32) obtidos de um mesmo fruto, assim como observado em *A. colubrina*. A estimativa da correlação multilocos de paternidade foi também significativamente diferente de zero em todas as famílias analisadas, com valores variando de 0,999 a 0,297 (Tabela 33). Esses resultados apontam que parte das progênies de cruzamentos compartilham o mesmo parental materno e paterno e que as progênies não são compostas exclusivamente por meios-irmãos, mas por uma mistura de meios-irmãos, irmãos completos e irmãos de autofecundação. Em geral, em espécies com frutos que possuem muitas sementes, como é o caso das espécies de *Anadenanthera*, a correlação de paternidade tem sido observada maior dentro de frutos do que entre frutos (Quesada et al., 2001; Cascante et al., 2002; Silva et al., 2011). Altas correlações de paternidade têm sido descritas em estudos com espécies arbóreas tropicais (ver James et al., 1998; Seoane et al., 2001; Alves et al., 2003; Feres et al., 2012b; Ferreira-Ramos, 2012).

Com os cruzamentos correlacionados, a média do número efetivo de doadores de pólen foi baixo (1,48) e o coeficiente de coancestria médio dentro das famílias foi próximo ao esperado em progênies de irmãos completos ($\theta_{xy} = 0,214$ - Tabela 32), tendo apresentado valores individuais desta estimativa que variaram de 0,201 a 0,335 (Tabela 33).

A partir das correlações de paternidade particionadas, foi possível estimar o número de indivíduos polinizadores por árvore (3,35) e por fruto (1,24). Estes valores indicam a média do número de indivíduos que contribuíram com pólen no evento de reprodução de uma árvore materna e de um único fruto dessa árvore. O número de árvores polinizadoras de um único fruto foi extremamente baixo, não chegando a dois, resultando em muitos irmãos completos no fruto. Por outro lado, o número de árvores polinizadoras de uma árvore matriz foi maior, muito semelhante ao observado, no presente estudo, para *A. colubrina* e aproximando a estimativa encontrada a valores já reportados em outras espécies florestais (ver Feres et al., 2012b).

A reprodução parcial por autofecundação, associada à elevada correlação de paternidade, implicou no aumento da coancestria nas progênies, que variou de 0,201 a 0,335 (Tabela 33), sempre superior ao esperado para meios-irmãos (que é a referência para populações panmíticas). Esse aspecto do sistema reprodutivo de *A. peregrina* refletiu a necessidade de maiores tamanhos amostrais para a

conservação *ex situ* do que seria necessário para uma população perfeitamente panmítica.

Assim como para *A. colubrina*, a taxa de cruzamento multilocos (t_m) obtida foi combinada com a correlação de paternidade para estimar a porcentagem de progênies originadas por autofecundação, cruzamentos aleatórios (sendo aparentadas no grau de meio-irmãos) e no grau de irmãos completos. Na Tabela 34 foram resumidos os valores dessas proporções para cada uma das famílias analisadas. Houve predominância na proporção de meios-irmãos, embora essa estimativa não tenha sido estatisticamente diferente da proporção de irmãos-completos. Por outro lado, embora as proporções médias tenham sido equilibradas, dentro das famílias houve bastante variação, assim como para *A. colubrina*.

A estimativa do tamanho da variância média populacional ($N_{e(v)}$) foi 2,336 (variando de 1,45 a 2,32 entre as famílias– Tabela 33), cerca de 47% menor do que o esperado para populações ideais (4). Essa baixa representatividade genética, em que muitos adultos compartilham genes idênticos por descendência, gerando redundância na diversidade, torna necessária a coleta de sementes de muitas árvores matrizes de diferentes angicais para manter um tamanho efetivo de 100 nos reflorestamentos.

Tabela 34. Proporção média de pares de irmãos de autofecundação ($\hat{P}_{IA} = \hat{s}$), meios-irmãos [$\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m(1 - \hat{r}_p)$] e irmãos-completos ($\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m\hat{r}_p$) contidos nas progênies de *Anadenanthera peregrina*.

Famílias/Matrizes	$\hat{P}_{IA} = \hat{s}$	$\hat{P}_{MI} = \hat{t}_m(1 - \hat{r}_p)$	$\hat{P}_{IC} = \hat{t}_m\hat{r}_p$
M1	0,209	0,001	0,790
M2	0,000	0,479	0,721
M3	0,125	0,608	0,267
M4	0,125	0,184	0,691
M5	0,167	0,166	0,667
M6	0,099	0,537	0,364
M7	0,000	0,844	0,356
M8	0,170	0,082	0,748
M9	0,069	0,641	0,290
M10	0,039	0,129	0,832
Média	0,095	0,550	0,355
Limite inferior ^a	0,069	0,447	0,197
Limite superior ^a	0,121	0,653	0,513

^a: Intervalo de confiança a 95 % de probabilidade, estimado para 1.000 reamostragens *bootstraps*.

**CORRELAÇÕES ENTRE SUCESSO REPRODUTIVO VS. SISTEMA DE CRUZAMENTO EM
*ANADENANTHERA PEREGRINA***

Assim como em *A. colubrina*, para *A. peregrina* também analisamos a correlação entre a produção de sementes e os dados de sistema reprodutivo obtidos nesse estudo. Porém, para *A. peregrina* temos dados sobre produção de sementes apenas para quatro das dez famílias de polinização aberta estudadas (Tabela 35). Isso porque nas primeiras coletas pouca atenção foi dada a esse tipo de informação, sendo possível obtê-la somente nas últimas matrizes amostradas. Ainda assim, pudemos calcular dados preliminares de correlação entre a produção de sementes viáveis e as estimativas de sistema de cruzamento obtidas geneticamente.

Tabela 35. Produção de sementes viáveis em cada família de polinização aberta analisada e suas respectivas medidas de taxa de cruzamento multiloco TM, cruzamento entre parentes (*tm-ts*) e correlação de paternidade ($r_{p(m)}$).

Família	Quantidade de lóculos no fruto	Sementes viáveis	Sementes inviáveis	t_m	$tm-ts$	$r_{p(m)}$
7	12,273	9,364	2,818	1,2	0,275	0,297
8	11,556	4,222	7,333	0,83	0,322	0,901
9	12,083	6,500	5,583	0,931	0,108	0,312
10	14,500	7,857	6,643	0,961	0,19	0,866

Diferente de *A. colubrina*, o coeficiente de correlação de Spearman não indicou nem uma correlação entre a porcentagem de sementes viáveis com as taxas de cruzamento multiloco ($\rho = -0,34$; valor de $P = 0,456$), cruzamento entre parentes ($\rho = -0,34$; valor de $P = 0,356$) nem com a correlação de paternidade ($\rho = -0,22$, valor de $P = 0,7677$).

FLUXO GÊNICO

As análises do fluxo gênico em *A. peregrina* foram feitas usando apenas a movimentação de pólen no angical.

O poder de exclusão teórica do segundo pai no agrupamento estudado foi muito baixa, variando de 0,428 (Loco Acom 14) a 0,804 (Loco Acol 09), com valor combinado sobre locos de 0,97013 (Tabela 29). Uma prova desse baixo poder de exclusão é o fato de terem sido constatados 41 candidatos a pais sem apresentar nem uma divergência entre seu genótipo e o filho (sem *mismatching* no trio de locos combinado) cuja paternidade não fora atribuída. Como resultado disso, a

probabilidade de fluxo gênico crítico foi alto, 0,744 (1-0,97013⁴⁵). Consequentemente, o número de paternidades erroneamente atribuídas dentro do fragmento de *A. peregrina* pode ter enviesado os resultados. Resultados semelhantes foram encontrados e discutidos para *A. colubrina*, mostrando que o gênero tem a característica de apresentar baixa diversidade genética dentro dos aglomerados (angicais).

Dessa forma, baseando-se na análise de paternidade e no nível de confiança relaxado (de 80 %), foi possível identificar o parental paterno para 193 (64%) das 300 progênies de polinização aberta amostradas. Com o nível de confiança de 95%, o número de atribuições de paternidade cai para 20%. Assim como para *A. colubrina*, foram incluídas na análise de paternidade realizadas pelo Cervus a possibilidade de autofecundação na espécie e também a endogamia parental.

De qualquer forma, mesmo com as dificuldades para análise, devido ao baixo poder de exclusão dos locos quando analisados os angicais, podemos concluir que os adensamentos de *A. peregrina* não são isolados reprodutivamente. Foi possível sugerir uma taxa de migração por volta de 35% (Tabela 36), denotando a importância da espécie para transporte e manutenção de polinizadores na devastada paisagem ribeirãopretana.

Os resultados acusaram 30 filhos gerados por autofecundação (10% - Tabela 36), confirmando o sistema misto de reprodução e a autocompatibilidade sugerida pela análise do sistema reprodutivo. Dessa forma, conclui-se que, na região de Ribeirão Preto, o gênero *Anadenanthera* ocorrendo de forma adensada (angicais) é autocompatível.

Porém, fica bastante evidente a diferença entre as quantidades de autofecundantes formados pelas duas espécies. *A. colubrina* apresentou 73 filhos formados por autofecundação a mais que *A. peregrina*. Como foi discutido anteriormente, houve grande variação na taxa de cruzamento entre as famílias analisadas das duas espécies. Isso mostra que para ambas existe uma plasticidade do sistema reprodutivo.

Tabela 36. Perfis do fluxo de pólen para 10 matrizes de *Anadenanthera peregrina* localizadas em Ribeirão Preto (SP) em que *n* é o número de progênies amostradas e *s* é a taxa de autofecundação estimada.

Família	<i>n</i>	<i>s</i>	%	Fluxo de pólen			
				Dentro	%	Fora	%
M1	30	7	23	18	60	5	16,6
M2	30	3	10	18	60	9	30
M3	30	0	0	17	57	13	43
M4	30	4	3	15	50	11	37
M5	30	2	7	19	63	9	30
M6	30	3	10	10	33	17	57
M7	30	1	3	12	40	17	57
M8	30	5	17	18	60	7	23
M9	30	3	10	15	50	12	40
M10	30	2	7	21	70	7	23
Total	300	30		163		107	

Dessa forma, fica difícil afirmar que *A. colubrina* possui predominantemente uma taxa de autogamia maior que *A. peregrina*, já que o constatado aqui representa apenas um evento reprodutivo. Nada exclui a possibilidade que essas taxas sejam mais próximas em outros eventos. Além disso, é necessária uma avaliação da taxa de sobrevivência das progênies analisadas de ambas as espécies em um período mais longo, para identificar possíveis eventos de depressão endogâmica pós fertilização. Talvez *A. colubrina* tenha um mecanismo mais tardio para evitar auto-fecundantes. A depressão por endogamia tem potencial para mudar e enviesar consideravelmente a taxa de cruzamento entre o momento de fertilização e de avaliação dos genótipos por marcadores moleculares. Este fato foi evidenciado e descrito nas espécies arbóreas tropicais *Pseudobombax mungumba* (Gribel e Gibbs, 2002), *Platypodium elegans* (Hufford e Hamrick, 2003), *Pinus chiapensis* (Del Castillo e Trujillo, 2008). Esse fenômeno também pode ter acontecido no caso de *A. peregrina*, resultando no aumento da taxa de cruzamento. Portanto, para uma conclusão mais robusta e definitiva quanto à auto-compatibilidade comparativa entre as duas espécies, seria necessário analisar mais de um evento reprodutivo para cada espécie, além de computar possíveis perdas por depressão endogâmica tardia.

Para as análises de distância de dispersão, foram considerados dois cenários: os angicais Aper/Est e Aper/Faz juntos e separados. Essa decisão foi tomada porque, embora eles sejam próximos, o baixo poder de exclusão do conjunto de locos usado nessa etapa da pesquisa poderia acusar falsas

paternidades, como discutido acima, interferindo nos cálculos de fluxo gênico. Porém, quando separados os angicais, não foram verificadas mudanças significativas nas atribuições dos pais. Dessa forma, para *A. peregrina*, foram constatadas distâncias de fluxo de pólen numa escala local (árvores vizinhas) e ainda entre árvores distantes, como mostra a Tabela 37. As atribuições locais foram maioria, 130 de 193 (~70%). Assim, ao analisar os angicais separadamente, a distância de dispersão de pólen variou de 1,414 a 193,258m, com média de aproximadamente 52 m e mediana de 30 m, desconsiderando as autofecundações (Tabela 37). Por outro lado, quando as análises foram feitas incluindo os dois grupos, a distância de dispersão de pólen variou com uma máxima de 714,689 m, e média e mediana aproximadas de 214 e 57 m, respectivamente (Tabela 37). Nota-se que as medianas se aproximam bastante, mostrando que a maioria dos cruzamentos ocorreu a distâncias mais curtas.

Das 54 matrizes amostradas, 45 (83%) delas foram doadoras de pólen para a formação das progênes (Figura 19).

A capacidade das abelhas em voar a longas distâncias não é um acontecimento novo e já foi relatado em muitos outros estudos de espécies arbóreas, como por exemplo, 1,509 m em *Dinizia excelsa* (Dick et al., 2003), 16 km em *Sorbus domestica* (Kamm et al., 2009), 890 m em *Myracrodruon urundeuva* (Gaino et al., 2010) e 2.608 m em *Tabebuia aurea* (Braga e Collevatti, 2011). Sendo assim, é perfeitamente possível que exista troca de pólen entre os angicais, corroborando ainda mais a hipótese de que os angicais do gênero *Anadenanthera*, na região de Ribeirão Preto, podem contribuir como ilhas de diversidade para a manutenção dos fluxos gênicos e diversidade de polinizadores.

Tabela 37. Perfis de distâncias de dispersão de pólen em *Anadenanthera peregrina*.

Família	Distância de dispersão					
	Aper/Est e Aper/Faz separados			Análise conjunta Aper/Est e Aper/Faz		
	Distância média em metros	Desvio Padrão	Aep (ha)	Distância média em metros	Desvio Padrão	Aep (ha)
M1	25,990	37,514	8,838	136,942	257,842	417,510
M2	62,573	44,345	12,349	62,573	44,345	12,349
M3	18,776	19,225	2,321	18,776	19,225	2,321
M4	20,259	15,753	1,558	20,259	15,753	1,558
M5	42,749	30,654	5,901	42,749	30,654	5,901
M6	53,993	20,560	2,655	53,993	20,560	2,655
M7	97,658	39,541	9,819	509,789	249,328	390,393
M8	16,428	9,265	0,539	360,450	316,693	629,849
M9	130,627	56,927	20,351	130,627	56,927	20,351
M10	260,566	221,234	307,371	476,377	240,633	372,313
Média	51,728	52,281	17,166	214,369	268,360	452,268
Mínimo	1,414	-	-	1,414	-	-
Máximo	193,258	-	-	714,689	-	-
Mediana	30,273	-	-	56,798	-	-

A_{ep} , área de vizinhança efetiva de polinização.

Figura 19. Padrão de doação de pólen por árvore reprodutiva de *Anadenanthera peregrina* analisada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi desenvolvido um conjunto de marcadores SSR para a espécie *Anadenanthera colubrina*, posteriormente transferidos para *A. peregrina*, duas espécies de ocorrência abundante nos fragmentos florestais da mata estacional semidecidual e cerrado remanescentes na região de Ribeirão Preto. Este primeiro conjunto de marcadores SSR desenvolvido abriu uma perspectiva para gerar dados genéticos sobre as duas espécies do gênero *Anadenanthera*, podendo auxiliar no planejamento de programas de conservação deste importante recurso genético brasileiro.

O elevado polimorfismo e a alta probabilidade de exclusão de paternidade do conjunto de marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie *Anadenanthera colubrina* e transferidos para *A. peregrina* demonstram que esses locos foram suficientemente informativos e ideais no emprego dos estudos genéticos. Porém, como foi demonstrado nos estudos de sistema reprodutivo e fluxo gênico subsequentes, deve-se ter cautela ao utilizá-los nos aglomerados de indivíduos (angicais), pois nessa condição perde-se considerável diversidade genética e poder de exclusão.

Estudos de estruturação genética espacial, sistema reprodutivo e fluxo gênico de *A. colubrina* e *A. peregrina* foram realizados em populações naturais localizadas em Ribeirão Preto (SP). Através dessas estimativas, foi possível concluir que, embora os angicais de *Anadenanthera* em Ribeirão Preto possuam muitas semelhanças quanto a diversidade genética, riqueza alélica, endogamia e parentesco, houve significativa diferença quanto a estruturação genética espacial. Dessa forma, *A. colubrina* apresentou forte estruturação, enquanto *A. peregrina* demonstrou ter uma dispersão de sementes aleatória. As características reprodutivas das espécies não mostraram divergências que pudessem justificar essa diferença. Para confirmar ser uma característica peculiar de cada uma das espécies quando presente em aglomerados, seria necessário amostrar mais angicais em outras regiões e Biomas brasileiros.

O sistema reprodutivo de ambas as espécies de *Anadenanthera* mostrou-se ser auto-compatível, com eventos de cruzamento entre parentes e coancestria na progênie. O número de doadores de pólen foi baixo e cada fruto parece ser polinizado por um único genitor masculino. A maior diferença encontrada entre *A. colubrina* e *A. peregrina* residiu na taxa de autofecundantes formados. Ambas mostraram uma grande variação das estimativas reprodutivas entre as matrizes

amostradas o que pode indicar que a taxa de autofecundação encontrada pode mudar, não caracterizando uma diferença entre as espécies. Em termos práticos, esta pesquisa já apresenta informações básicas para a determinação de tamanhos amostrais em programas de melhoramento, conservação genética e para a coleta de sementes visando a recuperação ambiental, bem como para o monitoramento da variabilidade genética em populações sob manipulação. Por exemplo, se o objetivo fosse coletar sementes para restauração ecológica, com a intenção de reter um tamanho efetivo de 100, seria necessário coletar sementes de pelo menos 70 e 43 árvores de *A. colubrina* e *A. peregrina*, respectivamente, com as características semelhantes às descritas nesse trabalho, a fim de garantir uma variabilidade genética suficiente para a manutenção da população a ser implantada. Além disso, essa coleta deveria priorizar árvores de grupos distintos de angico (angicais) e diferentes frutos de uma mesma árvore, para que a redundância genética seja diminuída.

Com relação ao fluxo gênico, embora as estimativas tenham mostrado grande viés devido ao baixo poder de exclusão dos sete locos, concluiu-se que os angicais receberam um elevado percentual de fluxo externo. Houve trocas locais, mas uma taxa significativa de fluxo de pólen a longas distâncias foi constatada. O maior indicativo disso foi o resultado da análise de dispersão de pólen de *A. peregrina* entre os dois angicais Aper/Faz e Aper/Est. Esse fato é de grande relevância para a conservação da biodiversidade local remanescente, visto que os angicais de *Anadenanthera* amplamente espalhados pela paisagem local podem desempenhar o papel de trampolins ecológicos (ou *Stepping-stones*). Isso significa supor que os angicais de *A. peregrina* e *A. colubrina* podem aumentar a conectividade entre os fragmentos remanescentes, além de permitir a viabilidade dos polinizadores locais.

A conectividade pode ser definida como a capacidade da paisagem de permitir fluxos biológicos de organismos, sementes e grãos de pólen (Urban et al., 1987). Vários estudos empíricos têm mostrado a importância da conectividade em processos de recolonização após extinção local e na manutenção de uma metapopulação em paisagens fragmentadas (Metzger, 1999), como aparenta ser o caso dos angicais na região de Ribeirão Preto. O conceito de conectividade é essencial, já que as espécies sobrevivem em habitats fragmentados (ou heterogeneamente dispersos na paisagem) e dependem da sua capacidade natural para atravessar as unidades da matriz. A matriz é uma unidade heterogênea da paisagem que controla sua dinâmica (Forman, 1995). Em geral, essa unidade pode

ser reconhecida por recobrir a maior parte da paisagem (é a unidade dominante em termos de recobrimento espacial) ou por ter maior grau de conexão em uma área (um menor grau de fragmentação). Geralmente, a matriz funciona como uma barreira ao movimento dos indivíduos entre os fragmentos, restringindo as populações locais aos limites dos fragmentos e intensificando o efeito de isolamento (Uezu, 2005). A intensidade do movimento dos organismos entre os habitats é regulada pela permeabilidade da matriz e pela habilidade inerente de cada espécie de se movimentar nesses ambientes (Uezu et al., 2008). Portanto, reconhecida a importância da conectividade entre os fragmentos para a manutenção da viabilidade dos remanescentes florestais e a biodiversidade presente neles, esforços têm sido feitos na tentativa de diminuir o isolamento entre os habitats. São conhecidas diversas estratégias para o aumento da conectividade entre os fragmentos, destacando-se o estabelecimento de corredores em matas ciliares e encostas, o aumento da porosidade da matriz (Viana e Pinheiro, 1998) e o estabelecimento dos chamados trampolins ecológicos (Uezu et al., 2008). O estabelecimento de tais medidas deve ser baseado em dados empíricos, especialmente relacionados à capacidade de fluxo das espécies naturais do ambiente em questão.

Como ressaltado por Ribeiro et al. (2009), os pequenos fragmentos remanescentes (menores que 50 há) desempenham um importante papel na conectividade na paisagem fragmentada, reduzindo a média de isolamento entre as populações florestais de 3.532 m para 1.441. Diante disso, e com base no estudo do fluxo gênico e no detalhamento das características reprodutivas das espécies de *Anadenanthera* na região de Ribeirão Preto (SP), podemos sugerir que os angicais desempenham o importante papel de conexão entre os poucos fragmentos remanescentes locais.

4. LITERATURA CITADA

- ALLARD, R.W. 1999. **Principles of plant breeding**. 2nd ed. John Wiley, New York, 254 pp.
- ALVES, R.M.; ARTERO, A.S.; SEBBENN, A.M.; FIGUEIRA, A. 2003. Mating system in a natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Shum. **Genetics and Molecular Biology** 26: 373-379.
- AZEVEDO, V.C.R.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; GRATTAPAGLIA, D. 2007. Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) A.Chev., a heavily logged Amazonian timber species. **Journal of Heredity** 98 (7): 646-654.
- BITTENCOURT, J. M.; SEBBENN, A. M. 2007. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity** 99: 580-591.
- BRAGA, A.C.; COLLEVATTI, R.G. 2011. Temporal variation in pollen dispersal and breeding structure in a bee-pollinated Neotropical tree. **Heredity** 106: 911-919.
- BURCZYK, J.; ADAMS, W.T.; SHIMIZU, J.Y. 1996. Mating patterns and pollen dispersal in a natural knobcone pine (*Pinus attenuata* Lemmon) stand. **Heredity** 77 (3): 251-260.
- BURCZYK, J.; DIFAZIO, S. P.; ADAMS, W. T. 2004. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel? **Forest Genetics** 11: 1-14.
- CARNEIRO, F. S.; SEBBENN, A. M.; KANASHIRO, B.; DEGEN, B. 2007. Low Interannual Variation of Mating System and Gene Flow of *Symphonia globulifera* in the Brazilian Amazon. **Biotropica** 39: 628-636.
- CASCANTE, A.; QUESADA, M.; LOBO, J. J.; FUCHS, E. A. 2002. Effects of dry Forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. **Conservation Biology** 16: 137-147.
- COCKERHAM, C.C. 1969. Variance of gene frequencies. **Evolution** 23: 72-84.
- COLES, J. F.; FOWLER, D. P. 1976. Inbreeding in neighboring trees in two White Spruce populations. **Silvae Genetica** 25: 29-34.
- COSTA, R.B.; KAGEYAMA, P.Y.; MARIANO, G. 1992. Estudo do sistema de cruzamento de *Anadenanthera falcata* Benth., *Vochysia tucanorum* Mart. e *Xylopia aromatica* Baill. Em área de cerrado. **Revista Brasileira de Sementes** 14 (1): 93-96.
- DEGEN, B. Genetic data analysis and numerical test. GDA-NT. Beta version 1.0. 2006.

- DEL CASTILLO, R. F.; TRUJILLO, S. 2008. Effect of inbreeding depression on outcrossing rates among populations of a tropical pine. **New Phytologist** 177: 517-524.
- DICK, C. W.; ETCHELECU, G., AUSTERLITZ, F. 2003. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology** 12: 753-764.
- DOW, B. D.; ASHLEY, M. V. 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of sampling in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Molecular Ecology** 5: 615-627.
- DUNPHY, B.K.; HAMRICK, J.L.; SCHWAGERL, J. 2004. A comparison of direct and indirect measures of gene flow in the bat-pollinated tree *Hymenaea courbaril* in the dry forest life zone of southwestern Puerto Rico. **International Journal of Plant Science** 165:427-436.
- DYER, R. J.; SORK, V. L. 2001. Pollen pool heterogeneity in shortleaf pine, *Pinus echinata* (Mill). **Molecular Ecology** 10: 859-866.
- EPPERSON, B. K. 2004. **Geographical genetics**. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- FERES, J.M.; MONTEIRO, M.; ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B.P.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. 2012a. Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* (Leguminosae), a neotropical tree species. **American Journal of Botany** 99(4):154-156.
- FERES, J. M. ; SEBBENN, A. M. ; GUIDUGLI, M. C. ; MESTRINER, M. A. ; MORAES, M. L. T. ; Alzate-Marin, A. L. 2012b. Mating system parameters at hierarchical levels of fruits, individuals and populations in the Brazilian insect-pollinated tropical tree, *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniaceae). **Conservation Genetics**, 13 (2): 393-415.
- FERES, J.M.; SEBBENN, A.M.; GUIDUGLI, M.C.; MESTRINER, M.A.; MORAES, M.L.T.; ALZATE-MARIN, A.L. 2009. Mating system parameters at hierarchical levels of fruits, individuals and populations in the Brazilian insect-pollinated tropical tree, *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniaceae). **Conservation Genetics** 13(2): 393-405.
- FINKELDEY, R. 1998. **An introduction to tropical forest genetics. Lecture Notes**. Göttingen: Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding. 225 p.

- FORMAN, R.T.T. 1995. **Land Mosaics: The Ecology of Landscapes and Regions**. Cambridge University Press, Cambridge/New York. 632 pp.
- FRYXELL, P. 1957. Mode of reproduction of higher plants. **Botanical Review** 23: 135-233.
- FUCHS, E. J.; LOBO, J. A.; QUESADA, M. 2003. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology** 17: 149-157.
- GAINO, A. P. S. C.; SILVA, A.M.; MORAES, M.A.; ALVES, P.F.; MORAES, M.L.T.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M. 2010. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree *Myracrodruon urundeuva*. **Conservation Genetics** 11: 1631-1643.
- GOUDET, J. 2002. **FSTAT version 2.9.3** Institute of Ecology, Lausanne, Switzerland. Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- GRIBEL, R.; GIBBS, P. E. 2002. High outbreeding as a consequence of selfed ovule mortality and single vector bat pollination in the Amazonian tree *Pseudobombax mumgunba* (Bombaceae). **International Journal of Plant Sciences** 163: 1035-1043.
- GUIDUGLI, MC. 2011. **Estudos genéticos da espécie florestal *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze: diversidade, sistema de cruzamento e fluxo gênico contemporâneo**. 157f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- GUSSEON, E.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. 2006. Sistema de reprodução em populações de *Eschweilera ovata* (Cambess) Miers. **Revista árvore** 30: 491-503.
- HAMRICK, J. L. 2004. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management** 197: 323-335.
- HAMRICK, J. L. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M. et al. (Ed.) **Genetics and Conservation**. California: Benjamin Cummings Publishing Company, p. 335 – 348.
- HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. 1986. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: ESTRADA, A.; FLEMING, T. H. (eds) **Fugivores and Seed Dispersal**. Junk Publishers, 392 pp.

- HARDY, O.; VEKEMANS, X. 2002. SPAGeDi 1. 2: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, 2: 618-620, Disponível em: <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/software.html>
- HEDRICK, P. W. 2005. A Standardized Genetic Differentiation Measure. **Evolution** 59: 1633-1638.
- HUFFORD, K. M.; HAMRICK, J. L. 2003. Viability selection at three early life stages of the tropical tree, *Platypodium elegans* (Fabaceae, Papilionoideae). **Evolution** 57: 518-526.
- JAMES, T.; VEGE, S.; ALDRICH, P.; HAMRICK, J.L. 1998. Mating systems of three tropical dry forest tree species. **Biotropica** 30:587-594.
- KAMM, U. et al. 2009. Frequent long-distance gene flow in a rare temperate forest tree (*Sorbus domestica*) at the landscape scale. **Heredity** 103: 477-481.
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology** 16: 1099-1106.
- LATOUCHE-HALLÉ, C.; RAMBOER, A.; BANDO, E.; CARON, H.; KREMER, A. 2004. Long-distance pollen flow and tolerance to selfing in a neotropical tree species. **Molecular Ecology**. 14: 1055-1064.
- LEMES, M.R. 2000. Population genetic structure and mating system of *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) in the Brazilian Amazon: implications for Conservation. PhD Thesis. University of Stirling: Stirling, UK.
- LIAN, C.; MIWA, M.; HOTETSU, T. 2001. Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. **Heredity**, 87: 88-98.
- LOBO, J. A.; QUESADA, M.; STONER, K. E. 2005. Effects of pollination by bats on the mating system of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) populations in two tropical life zones in Costa Rica. **American Journal of Botany**, 92: 370-376.
- LORENZI, H. 2002. **Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, v. 4, p. 190.
- LOWE, A. J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for Neotropical trees. **Heredity**, 95: 255-273.

- MARSHALL, T.C., SLATE, J., KRUUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, 7: 639-655.
- MEAGHER, T.R. 1986. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. **The American Naturalist** 128(2): 199-215.
- MEAGHER, T.R.; THOMPSON, E. 1987. Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamaelirium luteum* (Liliaceae). **Ecology** 68: 803-812.
- METZGER, J.P. 1999. Estrutura da paisagem e fragmentação: análise bibliográfica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 71: 445- 463.
- MORAES, M.L.T.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M. 2004. Correlated matings in dioecious tropical tree, *Myracrodruon urundeuva* Fr.All. **Forest Genetics**, Zvolen, 11: 55-61.
- MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. 1992. Mating system and phenology of *Ceiba petandra* (Bombacaceae) in central Panama. **J. Hered.** 83: 401-404.
- MURAWSKI, D.A.; HAMRICK, J.L. 1991. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. **Heredity** 67: 167-174.
- NEIGEL, J. E. 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review Ecology Systematics**, 28: 105-128.
- QUESADA, M.; FUCHS, E.; LOBO, J. 2001. Pollen load size, reproductive success and progeny kinship of natural pollinated flowers of the tropical dry forest tree, *Pachira quinta*. **American Journal of Botany**, Columbus, 88: 2113-2118.
- RITLAND, K. 1989. Correlated matings in the partial selfer, *Mimulus guttatus*. **Evolution** 43: 848-859.
- RITLAND, K. 2004. **Multilocus mating system program MLTR: Version 2.4**. British Columbia: University of British Columbia.
- RITLAND, K.; JAIN, S.K. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. **Heredity** 47: 35-52.
- ROBLEDO-ARNUNCIO, J.J.; AUSTERLITZ, F. 2006. Pollen Dispersal in Spatially Aggregated Populations. **The American Naturalist**. 168: 500-511.
- ROCHA, O.J.R.; AGUILAR, G. 2001. Variation in the breeding behavior of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica. **American Journal Botany** 89:1600-1606.

- SATO, T.; ISAGI, Y.; SAKIO, H.; OSUMI, K.; GOTO, S. 2006. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. **Heredity**, 96: 79–84.
- SCHUSTER, W. S.; MITTON, J. B. 2000. Paternity and gene dispersal in limber pine (*Pinus flexilis* James). **Heredity**, 84:348-361.
- SEAVEY SF, BAWA KS Late-acting self-incompatibility in angiosperms. 1986. **Bot Rev** 52: 195–218.
- SEBBENN, A.M. 2003. Tamanho amostral para conservação *ex situ* de espécies arbóreas com sistema misto de reprodução. **Revista do Instituto Florestal** 15: 147-162.
- SEBBENN, A.M.; SEOANE, C.E.; KAGEYAMA, P.Y.; LACERDA, M.C.B. 2001. Estrutura genética em populações de *Tabebuia cassinoides*: implicações para o manejo florestal e a conservação genética. **Revista do Instituto Florestal** 13:99-113.
- SEBBENN, A.M. 2006. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: HIGA, A.R.; SILVA, L. **Pomares de sementes de espécies nativas**, Curitiba: FUPEF, p. 193-198.
- SEOANE, C. E. C.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. 2001. Sistema reprodutivo em populações de *Esenbeckia leiocarpa*. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, p. 19-26.
- SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M. S.; BAWA, K.; SEBBENN, A. M. 2005. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Revista do Instituto Florestal**, 17: 25-43.
- SMOUSE, P. E.; SORK, V. L. 2004. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management**, 197: 21-38.
- SMULDERS, M. J. M.; COBBEN, M. M. P.; ARENS, P.; VERBOOM, J. 2009. Landscape genetics of fragmented forests: anticipating climate change by facilitating migration. **Forest Biogeosciences and Forestry**. 2: 128-132
- SILVA, C. R. S. et al. 2011. **Understanding the genetic diversity, spatial genetic structure and mating system at the hierarchical levels of fruits and individuals of a continuous *Theobroma cacao* population from the Brazilian Amazon**. London: Heredity.

- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. London: Copyright Ltd. 859 pp. 1981.
- SUN, M.; RITLAND, K. 1998. Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. **Heredity**, 80: 225-232.
- UEZU, A.; BEYER, D.D.; METZGER, J.P. 2008. Can agroforest woodlots work as stepping stones for birds in the Atlantic Forest region? **Biodiversity and Conservation**, 17: 1907-1922.
- UEZU, A.; METZGER, J.P.; VIELLIARD, J.M. 2005. The effect of structural and functional connectivity and patch size on the abundance of seven Atlantic Forest bird species. **Biology Conservation**, 123: 507-519.
- URBAN, D.L.; O'NEILL, R.V.; SHUGART, H.H. 1987. Landscape ecology. **BioScience**, 37: 119-127.
- VIANA, V.M.; PINHEIRO, L.A.F.V. 1998. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. **Série Técnica IPEF**, 12: 25-42.
- WARD, M.; DICK, C.W.; GRIBEL, R.; LOWE, A.J. 2005. To self, or not to self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in Neotropical trees. **Heredity**, 95:246- 254,
- WEIR, B. S. 1996. Genetics data analysis II – Methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, **Inc. Publishers**.
- WELLS, G. P.; A. G. YOUNG. 2002. Effects of seed dispersal on spatial genetic structure in populations of *Rutidosia leptorrhychoides* with different levels of correlated paternity. **Genetical Research** 79: 219-226.
- WENDT, S. N. 2005. **Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil.** Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 165 pp.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. 1943. **Genetics**, 28: 114-138.
- WRIGHT, S. Systems of mating. 1921. **Genetics** 6: 11-178.
- YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, 11: 413-418.
- ZANETTINI, M.H.B.; CAVALLI, S.S. 2003. Variabilidade Genética em Função do Modo de Reprodução. In: Freitas, L. B.; Bered, F. (Eds.) **Genética & Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS. pp. 177-188.
- ZAR, J.H. 1996. **Biostatistical analysis**. Prentice-Hall, New Jersey.

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

Anexo I

AMERICAN JOURNAL OF
Botany

American Journal of Botany: e154–e156. 2012.

AJB PRIMER NOTES & PROTOCOLS IN THE PLANT SCIENCES

**DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKERS FOR
ANADENANTHERA COLUBRINA (LEGUMINOSAE),
A NEOTROPICAL TREE SPECIES¹**

JULIANA MASSIMINO FERES^{2,3}, MARIZA MONTEIRO⁴, MARIA I. ZUCCHI⁵, JOSÉ B. PINHEIRO⁴,
MOACYR A. MESTRINER³, AND ANA LILIA ALZATE-MARIN^{2,3,6}

²Programa de Pós-graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; ³Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; ⁴Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, Vila Independência 13400-970, Piracicaba, São Paulo, Brazil; and ⁵Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Rodovia SP 127, Km 30 Vila Fátima 13400-970, Piracicaba, São Paulo, Brazil

- **Premise of the study:** We developed and characterized nuclear microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina*, a tropical tree species widely distributed in South America.
- **Methods and Results:** Leaf samples of mature *A. colubrina* trees, popularly called “angico,” were collected from an area that is greatly impacted by agricultural practices in the region of Ribeirão Preto in São Paulo State in southeastern Brazil. Twenty simple sequence repeat (SSR) markers were developed, 14 of which had polymorphic loci. A total of 96 alleles were detected with an average of 6.86 alleles per polymorphic locus. The expected heterozygosity, calculated at polymorphic loci, ranged from 0.18 to 0.83. Finally, we demonstrated that 18 loci were cross-amplified in *A. peregrina*.
- **Conclusions:** A total of 14 polymorphic markers suggest a high potential for genetic diversity, gene flow, and mating system analyses in *A. colubrina*.

Key words: *Anadenanthera colubrina*; angico; forest conservation; genetic diversity; Leguminosae; simple sequence repeat markers.

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan (Leguminosae, subfamily Mimosoidae), commonly known as “angico,” is a native tree species that can reach up to 35 meters in height. This species is frequently found in montane and submontane semi-deciduous forests in Brazil, but is also found in Bolivia and Peru (Carvalho, 2002). *Anadenanthera colubrina* is an important pollen source for bees, and the bark of the tree also possesses medicinal properties (Carvalho, 2002; Monteiro et al., 2006). This species is widely used to facilitate the recovery of ecosystems and restoration of riparian forests (Carvalho, 2002).

Microsatellites, or simple sequence repeat (SSR) markers, are among the most suitable molecular markers to study the genetic structure, gene flow, and breeding of tree populations (Chase et al., 1996). Therefore, in this study, we developed and characterized for the first time a set of nuclear microsatellite

markers for *A. colubrina* to investigate the genetic structure, gene flow, and mating system in this species in detail. In addition, we evaluated the transferability of these loci to *A. peregrina* (L.) Speng., which is a close relative of *A. colubrina*.

METHODS AND RESULTS

We sampled 51 mature *A. colubrina* trees in two populations (30 individuals from 21°15'38.81"S, 47°49'8.17"W; 21 from 21°9'41.30"S, 47°51'51.33"W) that are located in a large area that is affected by agricultural practices of the sugar cane industry in the region of Ribeirão Preto, São Paulo State, southeastern Brazil. We observed a predominance of this species in areas with deciduous forests that are not suitable for agriculture. All trees were mapped using GPS (GARMIN eTrex Vista Cx, Garmin International, Olathe, Kansas, USA). The leaves were collected and stored at –20°C until DNA extraction. All DNA samples were extracted using a modified cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction procedure as described in Alzate-Marin et al. (2009). The modifications included the use of PVP to eliminate the polyphenols, only one chloroform-isoamyl alcohol step, and the addition of RNase immediately after extraction with chloroform. The leaf tissue from one individual tree (UTM 23 K 0202646; 7657299) was used to prepare the microsatellite-enriched library (Billotte et al., 1999). A voucher herbarium specimen was deposited at the Universidade de São Paulo Herbarium (SPF) and recorded as *J. Feres 1* (SPF). The DNA was digested using *RsaI*, ligated to the *Rsa21* and *Rsa25* adapters, and amplified using PCR. The PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Fragments containing microsatellite sequences were selected using hybridization with biotinylated oligonucleotide probes [(CT)_n, (GT)_n, and (CTT)_n] and recovered using streptavidin-coated paramagnetic beads. A second PCR was performed to increase the number of enriched fragments. An aliquot of the PCR product was ligated to the pGEM-T vector

¹Manuscript received 9 September 2011; revision accepted 29 January 2012.

The authors thank FAEPA and CAPES-PROEX. J.M.F. was supported by FAPESP (grant no. 2009/14200-6). A.L.A.M. was supported by grants from CNPq (PDS 150277/2009-1, PV 300140/2011-8). M.I.Z. and J.B.P. are fellow CNPq researchers. The authors thank Marco Aurélio C. dos Reis and Leonardo Borges for collaboration regarding sample collections. J.M.F., M.A.M., and A.L.A.M. are members of Centro de Estudos e Extensão Florestal da Universidade de São Paulo (CEEFLORUSP).

⁶Author for correspondence: anaalzate@rge.fmrp.usp.br

doi:10.3732/ajb.1100446

American Journal of Botany: e154–e156, 2012; http://www.amjbot.org/ © 2012 Botanical Society of America

(Promega, Madison, Wisconsin, USA) and transformed into *Escherichia coli* XL-1 Blue. A total of 174 clones were sequenced using the ABI 377 Genetic Analyzer and BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

All 51 samples were used for primer screening. The microsatellite loci were individually amplified in 10 μ L reactions, as previously described by Feres et al. (2009), in a final volume of 10 μ L containing 0.3 μ M of each primer, 1 U *Taq* DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain), 0.25 mM of each dNTP, 1 $\times$ MgCl₂-free reaction buffer (75 mM Tris-HCl [pH 9.0], 50 mM KCl, and 20 mM (NH₄)₂SO₄), 1.5 mM MgCl₂, and 2.5 ng of template DNA. Amplifications were performed using a Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) with the following conditions: 96°C for 4 min; 30 cycles at 94°C for 40 s, 50–58°C (Table 1) for 1 min, and 72°C for 1 min; and 72°C for 7 min. PCR products were separated using a 10% denaturing polyacrylamide gel and stained with silver nitrate. Allele sizes were estimated using the original DNA from the library and a 10-bp ladder standard (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). A total of 38 clones possessing microsatellite repeats (21.8%) were identified, and only 20 of these clones were suitable for primer design. The other 18 clones that were found to be inappropriate for primer design presented microsatellites located too close to the end of an insert to accommodate primer design, presented an unsuitable flanking sequence, or presented chimeric sequences (in which one of the flanking regions matches that of another clone). All primer pairs amplified. However, six loci were monomorphic (Acol 01, Acol 03, Acol 04, Acol 06, Acol 07, and Acol 08), whereas 14 loci were polymorphic (Table 1). Among the amplified loci, 17 were dinucleotides, one was trinucleotide (Acol 02), one was tetranucleotide (Acol 04), and one had compound loci (Acol 19). The most commonly

repeated motif was CA/TG, which was expected because the motif CT/GT was used for the enrichment of the library.

Statistical analyses were performed for the 14 identified polymorphic loci. Polymorphic loci were characterized based on the number of alleles per locus (*A*) and the expected (*H_e*) and observed (*H_o*) heterozygosities for each locus, averaged over all loci, and Wright's fixation index calculated using GDA 1.1 software (Lewis and Zaykin, 2002). The FSTAT software package version 2.9.3.2 (Goudet, 2002) was used to evaluate linkage disequilibrium for all loci, and sequential Bonferroni correction was applied for multiple comparisons (Rice, 1989). The cumulative exclusion probabilities for the first and second parents and the null allele frequency were calculated using CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007). Pairwise comparisons among loci did not indicate linkage disequilibrium after applying Bonferroni correction (95%, $\alpha = 0.05$) for multiple comparisons. These results suggest that these loci are suitable for parentage analysis. A total of 96 alleles were identified, ranging from three to 14 alleles per locus (average: 6.86) (Table 2). The genetic diversity ranged from 0.18 (Acol 05) to 0.83 (Acol 15 and Acol 16) with a mean of 0.59. The observed heterozygosities ranged from 0.14 (Acol 02 and Acol 14) to 0.83 (Acol 12) with a mean of 0.41. These results consolidate the positive and significant fixation index (Table 2), which could be due to mating system patterns and/or the Wahlund effect (i.e., population substructure). However, the loci presented evidence of a potential effect of null alleles. The cumulative exclusion probabilities for all 14 loci were high for the first ($P_{\text{excl}(1)} = 0.988$) and second ($P_{\text{excl}(2)} = 0.999$) parents, indicating that these sets were suitable for paternity analysis (Table 2).

TABLE 1. Analysis parameters for 20 loci of *Anadenanthera colubrina* that were analyzed in 51 individual samples.

Loci	Primer sequences (5'–3')	Repeat motif	Size (bp)	<i>T_a</i> (°C)	GenBank accession no.
Acol 01	F: GGTGAGATAGCTGAAGTTCC R: GAATTTCACCTCCCATG	(AT) ₆	181	50	JN098377
Acol 02	F: TGGCTATCACTCTCGGACTTC R: CATAATGCAACCGATGACC	(CTT) ₅	181	57	JN098378
Acol 03	F: TTAAGACCCCGCACAAAC R: CTATTCAAGTTCTCGCAATTA	(AATT) ₄	150	50	JN098379
Acol 04	F: GATGGTGGGCAAGTGAG R: GAAGCCGCGATGTATAAGAGT	(AT) ₃ G(AT) ₂ T(AT) ₂	246	50	JN098380
Acol 05	F: TGGACTTTTGGACTGGACAC R: CCCACCCACCTAGAACTGTC	(GA) ₂ A(GA) ₇	234	58	JN098381
Acol 06	F: TGGGAATGTGCTAGGAAAG R: CTCGTGAATTTTCGGGTGT	(AT) ₄ AG(AT) ₂	166	58	JN098382
Acol 07	F: GCTTGCCCTTATTATCACCA R: GGGGAACTTGGTAACATGG	(CA) ₄	166	57	JN098383
Acol 08	F: ATGTTAGTGTGATGGCC R: CTGACTGAAAGGCTTAA	(CA) ₄	222	53	JN098384
Acol 09	F: CCAGGGTCTCTCAGATTG R: ATGCTCCTCTCAACACACC	(CT) ₁₀ (AT) ₇	160	58	JN098385
Acol 10	F: CGTATGATAGTGGACTTAATATGC R: GCATGAAAGAAAGCTAATCACTC	(TG) ₃ C(GT) ₁₅ (GA) ₂₀	190	54	JN098386
Acol 11	F: GGAAATGCAAGATCAGAGGCTC R: GTTGGTTGATTGAGGATGTCCT	(CA) ₉	200	60	JN098387
Acol 12	F: CCCACATTAGAACAGGAG R: CCACCTTGGATGATGTTTC	(TA) ₉	118	58	JN098388
Acol 13	F: CTTATGCTACTCCCTAACCC R: GCATGGGGTCTTGTATCC	(AG) ₁₅	139	58	JN098389
Acol 14	F: GCGATACCCCTTGATG R: GCGGAATGACCATCTTATC	(GA) ₁₁	183	54	JN098390
Acol 15	F: CATATGTCCAATCAGGTAGAC R: CTCATTGGTGACTGTAAGC	(GA) ₁₀	124	58	JN098391
Acol 16	F: AAGGTCCAAGGTTATGC R: GGACGTTCTCTGTCTATGC	(TC) ₁₁ (CA) ₃ AA(CA) ₃	220	58	JN098392
Acol 17	F: ACTCTCGACAACAAGTAATCAAC R: CAACAGCCAATGACAATGATG	(AG) ₉	182	58	JN098393
Acol 18	F: GTCAGGTATTCAATCTTCTACGT R: CACCATACCTCCACCTCATC	(TG) ₁₀	160	52	JN098394
Acol 19	F: GACTGAAACCATCTTTTATC R: TGTGCGTATGTGGGTG	(CT) ₅ (CCCTCT) ₄ (CT) ₁₆ (AC) ₇	163	52	JN098395
Acol 20	F: CAACGCCACCATCAAAC R: AGTATACCATAGATCACAAGGATG	(GT) ₄ GGG(TG) ₆	136	56	JN098396

Note: *T_a* = annealing temperature.

TABLE 2. Statistical parameters from 14 polymorphic loci of *Anadenanthera colubrina*.

Loci	A	H _c	H _o	F	P _{excl(1)}	P _{excl(2)}	NAF	T _a (°C) A. peregrina ^a
Acol 01 ^b	—	—	—	—	—	—	—	50
Acol 02	4	0.31	0.13	0.56*	0.951	0.835	0.396	57
Acol 03 ^b	—	—	—	—	—	—	—	NA
Acol 04 ^b	—	—	—	—	—	—	—	50
Acol 05	3	0.18	0.15	0.13*	0.983	0.911	0.061	58
Acol 06 ^b	—	—	—	—	—	—	—	58
Acol 07 ^b	—	—	—	—	—	—	—	57
Acol 08 ^b	—	—	—	—	—	—	—	52
Acol 09	6	0.48	0.36	0.26*	0.869	0.706	0.571	58
Acol 10	9	0.78	0.21	0.72*	0.582	0.401	0.043	52
Acol 11	3	0.34	0.31	0.10	0.940	0.843	0.060	60
Acol 12	6	0.75	0.83	-0.10	0.654	0.478	0.120	58
Acol 13	6	0.78	0.59	0.24*	0.623	0.444	0.173	58
Acol 14	3	0.18	0.13	0.25*	0.983	0.907	0.052	54
Acol 15	14	0.82	0.72	0.12*	0.513	0.341	0.155	58
Acol 16	8	0.82	0.60	0.26*	0.798	0.523	0.139	57
Acol 17	8	0.67	0.50	0.24*	0.714	0.524	0.304	NA
Acol 18	7	0.67	0.36	0.46*	0.736	0.561	0.125	51
Acol 19	10	0.78	0.60	0.23*	0.588	0.409	0.587	53
Acol 20	9	0.64	0.17	0.73*	0.764	0.592	0.571	56
Average	6.86	0.59	0.41	0.31*	—	—	—	—
Total	96	—	—	—	0.988	0.999	—	—

Note: A = allele number; F = fixation index; H_c = expected heterozygosity; H_o = observed heterozygosity; NA = not amplified; NAF = null alleles frequency; P_{excl(1)} = first parental exclusion probability; P_{excl(2)} = second parental exclusion probability.

^aAnnealing temperatures of 18 loci cross-amplified in *A. peregrina*.

^bMonomorphic loci in *A. colubrina*.

*Significant deviation ($P < 0.05$).

Additionally, transferability of the 20 primer pairs was tested in 10 individuals of *A. peregrina* using the same PCR and polymorphism detection protocol described above. A voucher herbarium specimen was deposited for this species at the Universidade de São Paulo Herbarium (SPF) and recorded as *J. Feres* 2 (SPF). A total of 18 markers (90%) were cross-amplified in *A. peregrina* (Table 2), and 14 had more than one allele.

CONCLUSIONS

Our results provide new variable microsatellite markers for *A. colubrina* that may be used for the precise estimation of parameters such as genetic diversity, population structure, gene flow, and mating system. Species of the genus *Anadenanthera* are difficult to distinguish among each other. Therefore, since the markers we developed cross-amplified in *A. peregrina*, they might prove useful to identify distinguishing features among species.

LITERATURE CITED

- ALZATE-MARIN, A. L., M. C. GUIDUGLI, H. H. SORIANI, C. A. MARTINEZ, AND M. A. MESTRINER. 2009. An efficient and rapid DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. *Brazilian Archive of Biology and Technology* 52: 1217–1224.
- BILLOTTE, N., P. J. L. LAGODA, A. M. RISTERUCI, AND F. C. BAURENS. 1999. Microsatellite-enriched libraries: Applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277–288.
- CARVALHO, P. E. R. 2002. Angico-branco. Circular técnica 56. EMBRAPA-FLORESTAS, Colombo, Paraná, Brazil. Website <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/42015/1/CT0056.pdf> [accessed 22 February 2012].
- CHASE, M., R. KESSELI, AND K. BAWA. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany* 83: 51–57.
- FERES, J. M., M. L. L. MARTINEZ, C. A. H. MARTINEZ, M. A. MESTRINER, AND A. L. ALZATE-MARIN. 2009. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. *Molecular Ecology Resources* 9: 434–437.
- GOUDET, J. 2002. FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Website <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> [accessed 22 March 2011].
- KALINOWSKI, S. T., M. L. TAPER, AND T. C. MARSHALL. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099–1106.
- LEWIS, P. O., AND D. ZAYKIN. 2002. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Website <http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php> [accessed 22 March 2011].
- MONTEIRO, J. M., F. C. B. R. ALMEIDA, U. P. ALBUQUERQUE, F. P. LUCENA, T. N. FLORENTINO, AND L. C. OLIVEIRA. 2006. Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2: 6.
- RICE, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 43: 223–225.