RÔMULO MACIEL DE MORAES FILHO

Efeitos genéticos da fragmentação florestal sobre a espécie de sub-bosque *Metrodorea nigra* em áreas remanescentes de floresta estacional semidecidual em Ribeirão Preto-SP.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética)

Orientadora: Dr^a. Ana Lilia Alzate-Marin

**Ribeirão Preto, SP
2014**

DEDICATÓRIA

**Às minhas duas mães, Lívia Moraes
e Taty Rocha (In Memoriam)**

AGRADECIMENTOS

- Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética.
- Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado, sem a qual eu não teria conseguido concluir o projeto.
- A minha orientadora Dr^a Ana Lilia Alzate Marin, pelos conselhos, orientações e pela confiança depositada em mim durante o curso do meu doutorado.
- A Dr^a. Olga Kotchetkoff-Henriques e ao sr. Alexandre Carvalho Gouvêa pelas amostras e autorização de coleta no Bosque Municipal de Ribeirão Preto.
- Agradeço aos meus pais Livia e Rômulo Moraes, e demais familiares pelo apoio e suporte, sem o qual o desenvolvimento deste trabalho seria impossível.
- Aos meus colegas de laboratório, Ronai, Marcela, Juliana, Paulo, Diana, Fernando e Gabriel pelo companheirismo e bons momentos durante todo o nosso período de convivência.
- Aos amigos Erico Torrieri, Igor Medici, Marco Prata e Murilo Soares sempre presentes nos momentos bons e também nos mais difíceis durante os últimos anos na pós-graduação.
- Aos colegas, docentes e funcionários do bloco B pelo acolhimento e bons momentos que fizeram meu período na faculdade sempre mais agradável.
- Aos meus vários companheiros de curso de doutorado, pela amizade durante esta jornada.
- Aos amigos André Ayres, Romulo Vicente e Leonardo Silva por estarem sempre presentes, mesmo estando geograficamente distantes.
- Aos amigos que conheci em Ribeirão Preto, em especial, Barbara Haikal, Daniel Carmo, Danielle Nogueira, Fernanda Dias, Francielle Oliveira, Gabriela Leite, Heloisa Paixão, Juliana Duarte, Leon Gomes, Leonardo Frederico, Luiz Passari, Larissa Colombari, Marco Asato, Stela Loren e Vitor Venâncio.
- E a cada um que, voluntariamente ou inconscientemente, me ajudou e estimulou a ir além, e completar objetivos cada vez maiores. A todos, eu serei eternamente grato.

SUMÁRIO

Ítem	Pg.
Lista de Figuras	5
Lista de Tabelas	7
RESUMO	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1. O Bioma Mata Atlântica	13
1.2. A região de Ribeirão Preto, no Interior do Estado de São Paulo	17
1.3. Fragmentação Florestal	21
1.4. Estrutura Genética Espacial e Fluxo Gênico	24
1.5. Sistemas de reprodução	30
1.6. Marcadores Moleculares e Estudos de Diversidade Genética	33
1.6.1. Marcadores ISSR	34
1.6.2. Marcadores microssatélites (SSR)	35
1.7. A espécie florestal <i>Metrodorea nigra</i>	37
1.8. Espécies Indicadoras	39
2. OBJETIVOS	42
2.1 Objetivos Específicos	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
4. RESULTADOS	58
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÕES	89
7. CONSIDERAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE	91
8. REFERENCIAS	95
ANEXOS	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Extensão e distribuição das várias fitofisionomias componentes do Bioma da Mata Atlântica no Brasil. Fonte: www.rbma.org.br/anuario/mata_02_eco_ssistema.asp	14
Figura 2. Extensão original e atual da Mata Atlântica brasileira (Galindo-Leal & Câmara, 2005).	16
Figura 3. Município de Ribeirão Preto indicando a área urbana, a área de expansão urbana e os fragmentos florestais remanescentes (Kotchetkoff-Henriques, 2003).	19
Figura 4. Serraria no início do Séc. XX, onde trabalhavam os imigrantes que chegavam para trabalhar na lavoura do café recém chegados da Itália e Espanha (fonte: Foto 06.19: http://www.cidadederibeiraopreto.com.br/fotosantigas/ . B. Foto atual da paisagem do município de Ribeirão Preto.	20
Figura 5. Esquema ilustrativo das principais consequências genéticas da fragmentação florestal para populações de plantas (Guidugli, 2011).	27
Figura 6. Padrões de distribuição espacial que podem ser exibidos por espécies florestais (adaptado de Ghazoul, 2005).	28
Figura 7. <i>Metrodorea nigra</i> em um fragmento florestal da Região de Ribeirão Preto (Foto: Moraes Filho, RM.)	37
Figura 8. Flores, frutos e sementes de <i>M. nigra</i> em um fragmento florestal da Região de Ribeirão Preto (Fotos: Moraes Filho, RM.)	38
Figura 9: Fragmentos florestais – M15, M11 e M13 - Fazenda da Bomba – Ribeirão Preto-SP – 164, 117 e 64 hectares, respectivamente.	44
Figura 10. Indícios de queimada e efeito de borda no fragmento florestal M13-Rib. – 64 hectares.	45
Figura 11. Bosque Municipal Fábio Barreto – Ribeirão Preto – 18 hectares.	46
Figura 12. Fragmento florestal – CRV- Fazenda Águas Claras – Cravinhos-SP – 8 hectares.	47
Figura 13. Fragmentos selecionados na Região de Ribeirão Preto SP) para realização desta pesquisa (Fonte: Google Earth).	45
Figura 14. Coordenadas GPS (Quadrante 23k) dos indivíduos coletados, para as populações M13-Rib(a), BSQ-Rib (b) FAC-Crav (c).	51
Figura 15. Frequência e distância para o vizinho mais próximo dos indivíduos coletados, para as populações M13-Rib (A), BSQ-Rib (B) FAC-Crav (C).	52
Figura 16. Recuperação dos fragmentos ligados hibridizados por meio de beads magnéticas	55

Figura 17. Segundo enriquecimento: Fragmentos RsaI do DNA genômico da espécie <i>Metrodorea nigra</i> amplificados com o <i>primer</i> Rsa21 (à esquerda) e Fragmentos RsaI do DNA genômico da espécie <i>Metrodorea nigra</i> , selecionados por complementaridade com as sondas para SSRs, inseridos em vetor pGEM-T Easy e amplificados por PCR utilizando <i>primers</i> M13 <i>forward</i> e <i>reverse</i> (à direita). M: 100 bp Ladder GE. (Imagens do Fotodocumentador GE Lab. Genética vegetal USP/RP).	55
Figura 18. Sequenciamento e desenho do primer Mtn 87, seguindo os programas Websat. http://wsmartins.net/websat/ e http://frodo.wi.mit.edu/ Primer 3	57
Figura 19. Ancestralidade das três populações analisadas por meio de Marcadores ISSR (acima) e Marcadores SSR (abaixo).	72
Figura 20. Análise de Coordenadas Principais ISSR (Acima) e SSR (Abaixo)	73
Figura 21. Dendrograma UPGMA gerado pela análise com marcadores ISSR para 200 indivíduos de <i>M. nigra</i> .	74
Figura 22. Análise de Coordenadas Principais ISSR (Acima) e SSR (Abaixo)	75
Figura 23. Análise de Mantel para as populações M13-Rib (a), BSQ-Rib (b) e Fac-Crav (c) a partir de dados de marcadores ISSR (A.1, B.1, C.1) e SSR (A.2, B.2, C.2).	77
Figura 24. Correlogramas de Autocorrelação Espacial para as populações M13-Rib (a), BSQ-Rib (b) e Fac-Crav (c) a partir de dados de marcadores ISSR (A1, B1 e C1) e SSR (A2, B2 e C2). Linhas tracejadas representam o intervalo de confiança (95%) para $r = 0$. Linhas verticais representam o intervalo de confiança (95%) para cada valor de r calculado. Pontos marcados com caixas denotam valores de r significativamente diferentes de 0 indicando estruturação genética.	78
Figura 25. Correlogramas de Autocorrelação Espacial para as populações M13-Rib (a), BSQ-Rib (b) e Fac-Crav (c) a partir de dados de marcadores ISSR (esquerda) e SSR (direita) considerando as gerações de adultos e juvenis. Linhas tracejadas representam o intervalo de confiança (95%) para $r = 0$. Linhas verticais representam o intervalo de confiança (95%) para cada valor de r calculado. Pontos marcados com caixas denotam valores de r significativamente diferentes de 0 indicando estruturação genética.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Área e porcentagem de remanescentes florestais e reflorestamentos em Ribeirão Preto (SIFESP, 2009).	22
Tabela 2. Características dos fragmentos florestais avaliados.	50
Tabela 3. Sequências e características dos <i>primers</i> utilizados .	53
Tabela 4. Sequências e características dos loci desenvolvidos.	57
Tabela 5. Sequências e características dos 5 loci selecionados de Guidugli et al., (2012).	58
Tabela 6. Polimorfismo dos <i>primers</i> ISSR utilizados	62
Tabela 7. Estimativas de diversidade genética por marcadores ISSR das três populações analisadas.	63
Tabela 8. Características dos loci microssatélites analisados.	63
Tabela 9. Característica dos sete loci microssatélites em três populações de <i>M. nigra</i> .	64
Tabela 10. Desvio do Equilíbrio de HW para os loci Mn.	66
Tabela 11. Caracterização da diversidade genética por população.	67
Tabela 12. Coeficiente de parentesco mínimo, médio e máximo por população.	68
Tabela 13. Diferenciação Genética das populações estudadas.	69
Tabela 14. Análise de Variância Molecular (AMOVA).	69
Tabela 15. Similaridade Genética de Nei's (1978) (acima da diagonal) e distância geográfica entre os fragmentos (km) (acima da diagonal).	70
Tabela 16. Valor dos logaritmos das probabilidades <i>a posteriori</i> $\log P(X K)$ e valores médios de alfa para cada K atribuído.	71
Tabela 17. Proporção de ancestralidade dos <i>clusters</i> genéticos assumidos entre as três populações.	71
Tabela 18. Caracterização da estrutura genética espacial dos três fragmentos.	76
Tabela 19. Caracterização da estrutura genética espacial dos três fragmentos em diferentes gerações.	79

RESUMO

MORAES FILHO, R. M. **Efeitos genéticos da fragmentação florestal sobre a espécie de sub-bosque *Metrodorea nigra* em áreas remanescentes de floresta estacional semidecidual em Ribeirão Preto-SP.** 2014. 116 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Metrodorea nigra St. Hill., (Rutaceae) é uma espécie arbórea monoica e perene que pode atingir até cinco metros de altura, típica do sub-dossel das florestas estacionais semidecíduais, onde ocorre em alta densidade populacional, sendo conhecida popularmente como “carrapateira” ou “caputuna-preta”. *M. nigra* é considerada como espécie-chave na dinâmica de nutrientes das florestas semidecíduais, estando altamente adaptada às condições de sub-bosque. No entanto, sob condições de fragmentação, e especialmente abertura de clareiras e corte seletivo, observa-se uma redução de sua densidade e frequência ou até mesmo seu completo desaparecimento. Embora a importância estratégica desta espécie nas florestas estacionais semidecíduais, poucos estudos a nível genético têm sido realizados. Assim, o objetivo geral desta pesquisa foi avaliar se a redução e a fragmentação de habitat podem causar modificações na estrutura genética de populações naturais de *Metrodorea nigra* ocorrendo em áreas remanescentes de floresta estacional semidecidual na região de Ribeirão Preto-SP, com histórico e intensidade de fragmentação diferenciados. Para isto, foram amostradas populações de adultos e juvenis da espécie *M. nigra* localizadas em três fragmentos florestais da região (M13-Rib, BSQ-Rib e FAC-Crav) e analisadas por meio de marcadores moleculares ISSR e SSR. Como resultados, foram observados um total de 136 loci ISSR (média de 17/primer), sendo 133 polimórficos (97,79%). A diversidade genética de Nei ($\hat{H}_e$) foi relativamente alta considerando-se o total dos indivíduos (0,31), e os valores por população foram de

0, 27 (BSQ-Rib), 0,26 (M13-Rib) e 0,24 (FAC-Crav). Pela análise de marcadores SSR observou-se um alto número de alelos ($K = 104$) com uma média de 14,85 alelos por locus. A heterozigosidade esperada média para os três fragmentos foi de $He = 0,771$. Os valores por fragmento foram, $He = 0,688$ (FAC-Crav), $He = 0,704$ (M13-Rib) e $He = 0,765$ (BSQ-Rib). A heterozigosidade observada média foi de $Ho = 0,516$, sendo praticamente idêntica nos três fragmentos. Todos os conjuntos amostrais analisados exibiram índice de fixação positivo e significativamente diferente de zero, indicando endogamia, que pode ser oriunda da estrutura natural das populações devido ao sistema de dispersão barocórico de sementes, no qual as sementes são disseminadas próximas ao parental materno. As análises com ambos os marcadores indicaram estruturação entre as populações sendo maiores os valores observados na análise com os marcadores ISSR. Não foram observadas diferenças significativas entre as gerações de adultos e juvenis em nenhum dos fragmentos, indicando a resiliência da espécie *M. nigra* aos efeitos da fragmentação e redução de habitat. As análises da estrutura genética espacial (EGE), realizadas com ambos os marcadores, mostraram autocorrelações positivas, entre as distancias genéticas e geográficas nas primeiras classes de distância avaliadas (até 20m), de maneira semelhante ao esperado dentro do modelo de isolamento por distância (IBD). A população do fragmento BSQ-Rib exibiu a maior EGE, provavelmente devido ao seu histórico de corte seletivo e a atual presença de uma trilha em seu interior. Na análise entre gerações, foram observadas diferenças nos padrões de estrutura genética espacial apenas no fragmento FAC-Crav, onde não se observou estruturação genética entre as árvores adultas. Os resultados desta pesquisa nos levam a concluir que *M. nigra* é uma espécie tolerante à redução de habitat, conseguindo se manter em fragmentos de pequeno tamanho. No entanto parece ser pouco tolerante à abertura de clareiras e corte seletivo, pois depende da

sombra de outras árvores para que suas sementes germinem e se estabeleçam. Assim, esta característica torna a *M. nigra* uma espécie ideal para o monitoramento da qualidade ambiental dos remanescentes da floresta estacional semidecidual da região de Ribeirão Preto (SP).

Palavras Chave: Rutaceae. Marcadores moleculares. Diversidade genética. Estrutura genética espacial.

ABSTRACT

MORAES FILHO, R. M. **Genetic effects of forest fragmentation over the understory species *Metrodorea nigra* in semideciduous forest remnant areas in Ribeirão Preto-SP.** 2014. 116 p. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Metrodorea nigra St. Hill. (Rutaceae) is a monoic and perennial tree species that can reach up to five meters of height, typical of sub - canopy of semideciduous forests, which occurs in high population density, known popularly as "carrapateira" or "caputuna preta". *M. nigra* is considered a key species in the nutrient dynamics of the semideciduous forests and is highly adapted to the conditions of the understory. However, under conditions of fragmentation, open glades and selective logging, there is a reduction of their density and frequency or even its complete disappearance. Although the strategic importance of this species in semideciduous forests, few studies have been conducted genetic level. Thus, the objective of this research was to assess whether the reduction and fragmentation of habitat can change the genetic structure of natural populations of *M. nigra* occurring in forest remnants in the region of Ribeirão Preto-SP, with differentiated historic and intensity of fragmentation. Thus, populations of *M. nigra* species located in three forest fragments in the region (M13-Rib, BSQ-Rib and FAC-Crav) were sampled and analyzed by SSR and ISSR molecular markers. As a result, a total of 136 ISSR loci (average 17/primer) and 133 polymorphic (97.79 %) were observed. The Nei genetic diversity (H_e) was relatively high considering the total number of individuals (0.31), and values per population were 0.27 (BSQ-Rib), 0.26 (M13-Rib) and 0,24 (FAC-Crav). By the SSR analysis we observed a high number of alleles ($K = 104$) with an average of 14.85 alleles per locus. The average expected heterozygosity for the three fragments was $H_e = 0.771$. The values per fragment were, $H_e = 0.688$ (FAC-Crav), $H_e = 0.704$ (M13-

Rib) and $H_e = 0.765$ (BSQ-Rib). The average observed heterozygosity was $H_o = 0.516$, being statistically identical in the three fragments. All sets of samples analyzed showed positive and significantly different from zero fixation indexes, indicating inbreeding, which may arise from a natural population structure due to barocoric seed dispersal system, in which seeds are scattered near the maternal parental. Analyses with both markers showed structuration among populations with higher values observed in the ISSR analysis. No significant differences between juvenile and adult generations in any of the fragments were observed, indicating the resilience of the species to the effects of fragmentation and reduced habitat. The analysis of the spatial genetic structure (SGS) performed with both markers showed positive autocorrelations between genetic and geographic distances in the first distance classes (up to 20m) in a similar manner to that expected in the insulation distance model by (IBD). The population of the BSQ-Rib fragment exhibited the largest EGE, probably due to its history of selective logging and the current presence of a trail inside. The analysis between generations showed differences in the patterns of spatial genetic structure only in FAC-Crav fragment where no genetic structure among adult trees was observed. These results lead us to conclude that *M. nigra* is tolerant to habitat reduction, managing to maintain its genetic diversity in fragments of small size. However it seems to be susceptible to glades opening and selective logging, as it depends on the shade from other trees for their seeds to germinate and establish. Thus, this feature makes *M. nigra* ideal for monitoring the environmental quality of the remnants of tropical semideciduous forest in the region of Ribeirão Preto (SP).

Keywords: Rutaceae. Molecular markers. Genetic diversity. Spatial genetic structure.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Bioma Mata Atlântica

Originalmente o bioma da Mata Atlântica ostentava uma extensão de aproximadamente 150.000.000 km² ao longo da costa brasileira e áreas mais interiores até o nordeste da Argentina e leste do Paraguai (Tabarelli et al., 2010). Considerado como um dos biomas mais importantes e ricos em biodiversidade do mundo, a Mata Atlântica é também conhecida por ser um dos mais ameaçados. Abrigando milhares de espécies endêmicas, sendo mais de 8.000 espécies vegetais e mais de 650 espécies de vertebrados, a Mata Atlântica é internacionalmente reconhecida como um dos mais importantes *hot spots* em termos de biodiversidade (Mittermeier, 2005).

Segundo a decisão adotada pelo conselho nacional do meio ambiente (CONAMA), o domínio da Mata Atlântica é constituído pelas Florestas Ombrófilas Densas e Abertas (abrangendo as matas pluviais montanas, submontanas, de baixada e tabuleiros costeiros), as Florestas Ombrófilas Mistas (que correspondem às matas sulinas com predominância de araucárias e lauráceas) geralmente ocorrendo em baixas a médias altitudes (até 1.000 m) e as Florestas Estacionais e Semidecíduas (que abrangem as matas subtropicais dos estados do Sul e as matas decíduas do Nordeste) geralmente em altitudes acima dos 600 m em relação ao nível do mar (Figura 1) (Leitão-Filho & Morellato 1997; Morellato & Haddad, 2000; Galindo-Leal & Câmara, 2005).

Devido à constante umidade vinda do oceano, as florestas ombrófilas densas da faixa costeira apresentam uma vegetação exuberante e diversificada. Nas regiões correspondentes aos Estados do Sul e Sudeste do Brasil, três formações distintas podem ser identificadas por sua composição e estrutura: as matas das planícies

costeiras, as matas de encostas com alta umidade e as matas de altitude. A diversidade florística dessas matas é maior no sul da Bahia e na região Sudeste do país, diminuindo gradualmente para o sul.

Figura 1. Extensão e distribuição das várias fitofisionomias componentes do Bioma da Mata Atlântica no Brasil. Fonte: www.rbma.org.br/anuario/mata_02_eco_ssistema.asp

Nesse trecho, massas de ar carregadas de vapor de água vindas do oceano tornam o ambiente geralmente nebuloso e intensamente úmido. Os índices de precipitação chegam a 4.000 mm por ano, e são os mais altos do Brasil. Em direção ao interior, a pluviosidade cai gradativamente, atingindo 1.000 mm por ano em

algumas regiões da Serra do Mar (Oliveira-Filho & Fontes, 2000; Galindo-Leal & Câmara, 2005).

A destruição em grande escala, do Ecossistema da Mata Atlântica iniciou-se com a colonização européia no ano de 1500, inicialmente em busca do abundante pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) e em seguida para a abertura de áreas para ocupação, plantio e obtenção de combustível. No século XVIII, com o início do ciclo da cana-de-açúcar, vastas áreas de mata nativa foram devastadas desde o litoral do Estado de São Paulo até o Rio Grande do Norte. No interior, as atividades mineradoras foram responsáveis pela devastação das matas do interior do Estado de Minas Gerais, São Paulo e Goiás. Seguindo-se ao ciclo da cana-de-açúcar, no século XIX, veio o ciclo do café, onde áreas remanescentes de mata nos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo foram severamente degradadas e substituídas por esta cultura. No século XX, a indústria madeireira quase eliminou completamente as matas de araucária nos Estados do Sul do Brasil, cuja madeira era utilizada na fabricação das formas de concreto usadas na construção civil ligada ao rápido crescimento das cidades. As madeiras-de-lei também eram exploradas, até mesmo como combustível, sem qualquer preocupação com uma produção sustentável (Galindo-Leal & Câmara, 2005).

No início do século XXI, a Mata Atlântica apresenta-se severamente reduzida e fragmentada estando restrita à aproximadamente 98.000 km², ou 7,6% de sua constituição original (Figura 2) (Morellato & Haddad, 2000; Galindo-Leal & Câmara, 2005). Boa parte de sua cobertura florestal remanescente encontra-se sobre intensa pressão antrópica e várias de suas espécies sofrem iminente risco de extinção em fragmentos de em média 50 ha (Ribeiro et al., 2009).

Na atualidade, observa-se uma grande discrepância nos dados referentes à sua real extensão de acordo com o método de análise

utilizado, variando de 7% (SOS Mata Atlântica/INPE, 2000) a 27% (IESB et al., 2007) (Ribeiro et al., 2009).

Figura 2. Extensão original e atual da Mata Atlântica brasileira (Galindo-Leal & Câmara, 2005).

Apesar da degradação sofrida, relata-se na Mata Atlântica uma extraordinária biodiversidade, com regiões de alto nível de endemismo incluindo aves, mamíferos, répteis, anfíbios e plantas vasculares, totalizando mais de 8.000 espécies (Turner & Corlett, 1996; Myers et al., 2000; Chomitz et al., 2005). Este bioma é conhecido por abrigar uma das regiões de maior riqueza de espécies vegetais no mundo, como as matas no sul do Estado da Bahia, sendo assim incluso como um dos 25 *hotspots* mundiais de biodiversidade

prioritários para conservação (Thomas et al., 1998; Myers et al., 2000).

Baseado na quase total destruição deste bioma e no seu alto número de espécies endêmicas altamente especializadas às condições de seu ambiente, é razoável supor que várias espécies já foram extintas antes mesmo de serem descritas e muitas outras seguirão esse caminho, caso não se implemente em políticas eficientes visando sua preservação (Morellato & Haddad, 2000).

1.2. A região de Ribeirão Preto, no Interior do Estado de São Paulo

A substituição da vegetação nativa, especialmente da cobertura florestal, pela expansão das fronteiras agropecuárias e das malhas urbanas, assim como o extrativismo indiscriminado, ocasionou no interior do Estado de São Paulo, a fragmentação dos ecossistemas florestais, condicionando-os a pequenas manchas ou fragmentos isolados (Salgueiro et al., 2004; Zorzetto et al., 2003).

O município de Ribeirão Preto está situado na região Sudeste do Brasil, no Estado de São Paulo possuindo 651 km², estando inserido nas bacias hidrográficas do Rio Pardo e Mogi-Guaçu junto aos municípios de Cravinhos, Serrana, Jardinópolis, Brodósqui, Guataporã, Dumont e Sertãozinho. A altitude do município varia de 500 a 800 m. Seu clima se caracteriza pela sazonalidade do regime de chuvas, apresentando inverno seco e verão chuvoso. A temperatura média é de 22,6°C, variando de 6,2°C a 35,1°C no período de 1981 a 2002. A precipitação média no período de 1937 a 2002 foi de 1.467,9 mm de chuva anuais, com mínima de 735,4 mm (1966) e máxima de 2.211,2 mm (1984). Os meses de outubro a março concentram 80% do total de chuvas, e, nos meses mais secos, junho a agosto, ocorrem apenas 5% da precipitação (IPT 2000; Kotchetkoff-Henriques, 2003).

Grande parte da extensão do município é recoberta por Latossolo Roxo (aproximadamente 73%), e em menor extensão por Latossolo Vermelho Escuro e Vermelho Amarelo (17%). Em pequena extensão também ocorrem Solos Litólicos (5%) e Hidromorficos (4,5%) (Oliveira & Prado 1983; Kotchetkoff-Henriques et al., 2005).

A região de Ribeirão Preto apresenta um dos maiores históricos de devastação do Estado de São Paulo principalmente em localidades próximas aos mananciais e indústrias de cana-de-açúcar. No período entre 1962 e 2000 houve grande redução na cobertura vegetal do município devido à expansão da área urbana e do cultivo de cana-de-açúcar, no entanto a maior parte da supressão da vegetação natural de Ribeirão Preto é anterior a este período, estando associada ao cultivo do café. Desta forma alguns fragmentos ainda existentes podem estar isolados a mais de 100 anos (Kotchetkoff-Henriques, 2003).

No período entre 1962 e 1984, o cultivo de cana-de-açúcar aumentou sobre áreas ocupadas pela vegetação de cerrado. Atualmente devido ao processo de ocupação populacional, a vegetação natural encontra-se extremamente fragmentada (Figura 3) 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 aumento na incidência de fogo (Kotchetkoff-Henriques, 2003).

Figura 3. Município de Ribeirão Preto indicando a área urbana, a área de expansão urbana e os fragmentos florestais remanescentes (Kotchekoff-Henriques, 2003).

A floresta estacional semidecidual foi o tipo florestal que sofreu o processo de devastação mais rápido e extenso do estado de São Paulo devido à expansão da fronteira agrícola em busca dos férteis solos da região. Neste processo, as matas foram suprimidas para a implantação de monoculturas, principalmente cana-de-açúcar, café, soja e, em algumas regiões, pela pecuária (Durigan et al., 2000) (Figura 4).

Figura 4. Serraria no início do Séc. XX, onde trabalhavam os imigrantes que chegavam para trabalhar na lavoura do café recém chegados da Itália e Espanha (fonte: Foto 06.19: <http://www.cidadederibeiraopreto.com.br/fotosantigas/>). B. Foto atual da paisagem do município de Ribeirão Preto.

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 1) (SIFESP, 2009).

Tabela 1. Área e porcentagem de remanescentes florestais e reflorestamentos em Ribeirão Preto (SIFESP, 2009).

Cobertura vegetal	Área (ha)	% *
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 a área do Município (64.200 ha)

1.3. Fragmentação Florestal

A fragmentação de habitat é um dos maiores desafios atuais para a conservação da diversidade biológica no mundo inteiro. Este processo pode ser subdividido em três grandes componentes: A própria perda de habitat, a geração de fragmentos remanescentes de tamanho reduzido e o aumento do isolamento espacial dos fragmentos remanescentes (Andrén, 1994). Pequenos fragmentos tendem a conter pequenas populações, que são mais vulneráveis a extinção. Flutuações aleatórias nas frequências gênicas (deriva genética aleatória) podem causar perda de variação genética, levando eventualmente ao aumento de homozigosidade e perda de adaptabilidade (*fitness*) às mudanças ambientais (Lande, 1988).

O avanço da fronteira agrícola sobre áreas florestais tem levado à perda de diversidade biológica e alteração de suas funções ecológicas (Morellato & Haddad, 2000). No caso das espécies arbóreas, a degradação de habitat ocorre como consequência da divisão de florestas em fragmentos espacialmente isolados e pela posterior derrubada de árvores por processos extrativistas como o corte seletivo (Lowe et al., 2005). Um fragmento florestal é uma área de vegetação natural interrompida por barreiras antrópicas ou por

barreiras naturais capazes de diminuir significativamente o fluxo de animais, pólen ou sementes (Viana, 1990).

O desmatamento das florestas tropicais ocorre atualmente em níveis alarmantes. Em muitos locais, a floresta tropical é restrita a fragmentos pequenos e isolados. Enquanto apenas a preservação de grandes áreas pode resguardar inteiramente a sua biota, um substancial número de espécies florestais podem persistir por décadas em florestas fragmentadas (Chiarello, 2000). No entanto, grandes vertebrados são altamente sensíveis à fragmentação florestal. Inevitavelmente pequenos fragmentos se tornaram o refúgio de muitas espécies tropicais à beira da extinção. Apesar disso, em áreas com poucos remanescentes florestais, estes fragmentos podem servir como fonte de material genético vegetal para o restabelecimento do bioma em grandes áreas (Turner & Corlett, 1996).

A fragmentação da vegetação original promovida por ações humanas tem produzido uma série de novos fatores no desenvolvimento e na evolução de populações naturais de plantas e animais. Essas mudanças afetam de forma diferenciada os parâmetros demográficos de mortalidade e natalidade de diferentes espécies, assim como, a estrutura e dinâmica de ecossistemas. Levando-se em consideração as espécies arbóreas, a alteração na abundância de polinizadores, dispersores, predadores e patógenos frequentemente alteram as taxas de recrutamento de plântulas. Também os incêndios e mudanças microclimáticas, que atingem de forma mais intensa as bordas dos fragmentos, alteram as taxas de mortalidade de árvores, causam perda da biodiversidade microbiológica do solo, da flora e da fauna, a perda da diversidade genética, a redução da densidade ou abundância e a alteração da estrutura da vegetação, dentre outros (Viana & Pinheiro, 1998; Eckert et al., 2010).

Observa-se em toda região tropical a substituição das matas nativas por florestas secundárias, como resultado de várias formas de perturbação e exploração dos recursos naturais, como extração madeireira, formação de pastagens, expansão agrícola e proximidade de centros urbanos (Viana & Pinheiro, 1998). Estes fenômenos levam à formação de um mosaico de fragmentos florestais diferenciados, cercados por áreas urbanas e agrícolas. Os remanescentes florestais exibem diferentes tamanhos e formas, exibindo condições diferentes da vegetação original. Quanto menores e mais isolados se tornam estes fragmentos, mais grave é a degradação e maior é o risco de perda de alelos, populações e numa situação mais drástica, a extinção de espécies (Lowe et al., 2005). Dependendo do grau de isolamento de um fragmento, as populações que estão nele inseridas podem ter o fluxo gênico interrompido, o que pode ocasionar aumento dos cruzamentos endogâmicos, do índice de fixação e da perda de alelos, o que altera a sua diversidade genética (Viana & Pinheiro, 1998; Pezzuti & Silva, 2009). No entanto, a resposta das espécies vegetais aos diversos tipos de perturbações oriundas da fragmentação florestal são extremamente variáveis (Lowe et al., 2005).

Espécies de fecundação cruzada são mais susceptíveis à redução de habitat do que espécies que realizam autofecundação, sendo as últimas, mais resilientes aos processos de fragmentação florestal. No entanto a redução do tamanho populacional, nem sempre, ocasiona perda de diversidade genética ou a fixação de alelos, sendo observado em alguns casos que a perda de habitat pode levar a uma substancial redução das taxas de deriva gênica (Ezard & Travis, 2006; Honnay & Jacquemyn, 2007).

Seguindo-se o atual ritmo de fragmentação e degradação, a redução dos tamanhos populacionais se tornará cada vez mais comum, sendo assim de grande importância a busca do entendimento dos impactos da fragmentação de habitat tanto na diversidade

genética dentro e entre as espécies que os ocupam, o entendimento da estrutura genética das espécies existentes nos fragmentos florestais remanescentes, a quantificação do efeito das perturbações antrópicas sobre o sistema reprodutivo e a modificação da estrutura das populações confinadas, para que com isso possam ser tomadas decisões e implantadas estratégias de manejo e conservação para os próximos anos (Kageyama, 1987; Eckert et al., 2010; Nazareno & Jump 2012).

1.4. Estrutura Genética Espacial e Fluxo Gênico

Populações naturais encontram-se, muitas vezes, divididas em unidades menores, chamadas subpopulações, seja por barreiras físicas, comportamentais ou ecológicas. Nestes casos, o nível de conectividade entre as unidades populacionais depende primariamente da taxa de fluxo gênico efetivo ocorrendo entre as subpopulações. Quando o fluxo gênico entre os grupos é alto, observa-se um processo de homogeneização de sua variação genética. Quando há baixa ocorrência de fluxo gênico, observa-se que fenômenos como deriva genética, seleção e mutação podem levar à diferenciação genética entre as subpopulações (Morales & Carlo 2006; Navarro et al., 2009; Hedrick, 2011).

Uma espécie é normalmente constituída por um conjunto de populações locais, que variam em número de indivíduos e no padrão de distribuição espacial. Estas populações podem exibir estruturação (variação genética entre suas partes constituintes), por diversas razões, sejam evolutivas, ambientais ou por influência antrópica, tornando o entendimento destes processos altamente complexo (Martins, 1987; Hedrick, 2011).

A subdivisão de uma espécie em populações isoladas espacialmente afeta sua evolução de várias formas. A estruturação populacional ocasiona acasalamentos não aleatórios, simplesmente

porque os indivíduos tem maior probabilidade de cruzar com seus vizinhos do que com indivíduos espacialmente mais afastados. Isto resulta num excesso de homozigotos em relação ao esperado no caso de cruzamentos aleatórios (Whitlock, 2002). A estrutura genética de muitas espécies é caracterizada por um padrão de isolamento por distancia (*Isolation by Distance* – IBD) (Wright 1943), onde indivíduos geograficamente próximos tendem a ser geneticamente mais similares em relação a indivíduos que estão mais distantes (Meirmans, 2012).

Os padrões de distribuição espacial de espécies vegetais são determinados por interações intra e interespecíficas que contribuem para o estabelecimento de um padrão para cada população (Hay et al., 2000). A distribuição e organização dos indivíduos de uma espécie podem ser estudadas em escala macro (biogeográfico), meso (comunidades) ou micro (distribuição espacial dos indivíduos dentro de uma comunidade) (Pielou, 1969; Hay et al., 2000). Nestas escalas, a ocorrência de determinados processos, podem gerar alterações nos padrões de distribuição espacial dos indivíduos de uma população uma vez que cada espécie reage de forma particular às mudanças ambientais (Levin, 1992).

Em populações naturais, os indivíduos raramente estão distribuídos de forma aleatória, estando frequentemente estruturados e organizados em gradientes, agregados ou outras formas de estrutura espacial (Legendre & Fortin, 1989). A estruturação genética espacial se caracteriza pela distribuição não aleatória de genótipos de uma espécie em um espaço bidimensional. Fatores bióticos, como a dispersão limitada de pólen e sementes, e abióticos, como corte seletivo, extinção local e recolonização por migrantes, podem levar a um aumento da EGE, e formação de agrupamentos de indivíduos geneticamente relacionados (Epperson, 1992; Shapcott, 1995; Young et al., 1996; Hardy et al., 2006). Em uma menor escala espacial, no

entanto, a causa mais prevalente é a formação de agregados familiares locais como resultado de fluxo gênico limitado.

Por serem organismos sésseis, as plantas, têm sua limitada capacidade de fluxo gênico como o principal fator determinante para a EGE (Loveless & Hamrick 1984; Vekemans & Hardy, 2004; Nazareno et al., 2013). Nos vegetais superiores, o fluxo gênico ocorre primariamente por dois processos. O fluxo de embriões diplóides (fluxo de sementes) e o fluxo de gametas masculinos haplóides (fluxo de pólen). Algumas espécies são polinizadas e dispersas pelo vento e sendo assim, um fator abiótico é o principal vetor de pólen e sementes. Outras se especializaram em relações ecológicas com animais e dependem destes para a realização dos processos de polinização e dispersão, tendo desenvolvido ao longo do curso evolutivo, flores e frutos capazes de atrair polinizadores e dispersores de sementes de locais distantes (Ghazoul, 2005; Holderegger et al., 2010). Desta forma, o nível de fluxo gênico entre fragmentos florestais e subpopulações está diretamente ligado tanto a distância física separando as populações, quanto ao alcance dos agentes dispersores de pólen e sementes (Figura 5). Devido às diferentes estratégias, as espécies florestais respondem de forma diferente às condições que são submetidas (Holderegger & Di Giulio, 2010).

O aumento da estruturação genética espacial também é uma das consequências esperadas da fragmentação de habitat devido ao aumento do cruzamento entre indivíduos aparentados e autofecundação o que consequentemente leva ao aumento da similaridade genética entre indivíduos geograficamente próximos (De Lucas et al., 2009). É esperado que fragmentos isolados sofram com maior intensidade efeitos da deriva genética, efeito do fundador e erosão genética devido aos pequenos números populacionais e endogamia (Aguilar et al., 2008). Desta forma, o conhecimento da EGE é fundamental para o estudo da genética de populações de espécies vegetais visando à conservação destas espécies.

Figura 5. Esquema ilustrativo das principais consequências genéticas da fragmentação florestal para populações de plantas (Guidugli, 2011).

A distribuição de indivíduos de uma população em uma área pode ocorrer de várias formas (Figura 6). Alguns parâmetros como abundância, frequência relativa, densidade e fragmentação podem influenciar na distribuição da diversidade genética e no fluxo gênico dentro da população. Mesmo em áreas fragmentadas, onde as populações estão fisicamente separadas umas das outras, o fluxo gênico ainda pode ser sustentado por ação de polinizadores animais, ou por meios efetivos de polinização pelo vento. A mesma ideia se aplica ao fluxo de sementes. Neste caso, o isolamento reprodutivo dependerá do raio de alcance dos agentes polinizadores e dispersores, e não apenas pela existência de uma barreira física (Epperson, 1992; Ghazoul, 2005).

Figura 6: Padrões de distribuição espacial que podem ser exibidos por espécies florestais (adaptado de Ghazoul, 2005).

Fatores como a constituição da matriz (área que separa os fragmentos florestais), também é determinante para a eficiência do fluxo de pólen e sementes. Algumas matrizes são mais permeáveis, permitindo o fluxo de animais dela para o interior dos fragmentos, facilitando os processos dispersivos. Outras matrizes podem dificultar este tipo de locomoção e impossibilitar o trânsito de polinizadores e dispersores, inviabilizando o fluxo de material genético entre fragmentos (Colli et al., 2005; Vogel et al., 2007).

O fluxo gênico pode ser estimado por meios diretos e indiretos. As estimativas diretas podem ser feitas por marcadores genéticos altamente variáveis, como os marcadores microssatélites. Estes marcadores tornam possível a identificação genética dos indivíduos parentais, e assim estimar o movimento espacial de gametas e

sementes entre as gerações, avaliando-se assim o fluxo gênico contemporâneo (atual). As estimativas indiretas se utilizam de técnicas para estudar a estrutura genética das populações, como as estatísticas *F* e outras medidas, acessando assim o fluxo gênico histórico (passado) (Ouborg, 1999; Ashley, 2010; Hedrick, 2011).

Estimativas diretas do fluxo gênico consistem basicamente na genotipagem de todos os indivíduos adultos reprodutivos de uma população e sua comparação com uma amostra representativa de progênes oriundas de polinização natural, já estabelecidas *in situ* (regenerantes), ou não (Ouborg, 1999). A partir disto, pode-se utilizar métodos de máxima verossimilhança (Meagher & Thompsom, 1987) ou outras formas de análises de exclusão de paternidade (Devlin et al., 1988; Devlin & Ellestrand, 1990) para tentar identificar os prováveis parentais de cada indivíduo juvenil. A distância entre o parental paterno e sua progênie evidencia o alcance do fluxo de pólen. A distância entre o parental materno e as progênes evidencia o alcance da dispersão de sementes (Ouborg, 1999).

Este método de estimativa de fluxo gênico é extremamente atrativo, pois permite identificar os prováveis parentais envolvidos nos cruzamentos, avaliar o sucesso reprodutivo dos indivíduos, detectar fluxo de pólen externo e inferir sobre os padrões de dispersão de pólen e sementes (Wang, 2004; Sato et al., 2006; Bittencourt & Sebben, 2007; Collevatti et al., 2010; Guidugli, 2011; Sebbenn et al., 2011; Ferreira-Ramos, 2012).

1.5. Sistemas de reprodução

Define-se por *Deme* um grupo de indivíduos intercruzantes da mesma espécie que vivem em proximidade suficiente, de forma a partilhar um sistema de reprodução em comum (Templeton, 2011). Desta forma, dependendo da escala geográfica envolvida e das capacidades de reprodução e dispersão dos indivíduos em questão, um *Deme* pode incluir a população de uma espécie inteira, ou subpopulações restritas em uma pequena região da distribuição total da espécie. Logo, diferentes populações em diferentes condições podem exibir taxas de cruzamento distintas.

As espécies vegetais, ao longo da evolução, têm se adaptado a diferentes formas de reprodução. Observa-se nos grupos atuais a ocorrência de reprodução sexuada e assexuada. As estratégias de reprodução assexuada são classificadas em duas categorias. Reprodução vegetativa e reprodução apomítica. Em ambos os casos, não há participação de gametas, a descendência é gerada a partir de tecidos de um só organismo, somente por divisões mitóticas, portanto, toda a progênie resultante tem a mesma constituição genética de seu genitor (Karasawa et al., 2009).

Nos vegetais superiores, observa-se em sua maioria a ocorrência da reprodução pela via sexual. A reprodução sexuada é o processo pelo qual ocorre a união de gametas masculinos e femininos para dar origem ao zigoto. Esta se fundamenta em dois princípios: a geração de variabilidade por meio da recombinação, segregação e fusão sexual (singamia), e pela promoção de fluxo gênico pela troca e pela incorporação de genes e alelos (Richards, 1997; Finkeldey, 1998).

As espécies vegetais exibem três estratégias principais de reprodução sexual: alogamia, autogamia e cruzamentos mistos (Fryxell, 1957). A alogamia consiste no cruzamento entre indivíduos diferentes. São consideradas alógamas, as espécies que apresentam

níveis de cruzamento acima de 95%. A autogamia é definida pela ocorrência preferencial de autofecundação (acima de 95%). Já o cruzamento misto, ocorre nas plantas que exibem níveis de fecundação cruzada entre 5% e 95%, onde observa-se tanto a ocorrência de autofecundação quanto de fecundação cruzada (Bespalkov et al., 2009; Karasawa et al., 2009).

Nas florestas tropicais, observa-se predominantemente espécies com flores hermafroditas, e em seguida, espécies dióicas, enquanto nas temperadas predomina a monoícia (Raven et al., 2001). Estima-se que a unissexualidade ocorra em 10% das espécies de Angiospermas. Estas espécies unissexuais estão distribuídas entre 75 % das famílias, sugerindo que tenham surgido por eventos evolutivos independentes, tendo evoluído como um sistema promotor da alogamia. A fecundação cruzada evita os efeitos deletérios do endocruzamento e promove a heterozigosidade, aumentando assim a variabilidade genética e, conseqüentemente, gerando vantagem adaptativa (Santos, 2003).

Bawa (1974), estudando o sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais na floresta tropical semidecídua da Costa Rica, por meio de polinização controlada e observações da biologia floral, verificou que, de 130 espécies, 14% eram autocompatíveis, 54% autoincompatíveis, 68% hermafroditas, 22% dioicas e 10% monoicas. Estes resultados mostraram claramente as estratégias adotadas pelas espécies florestais para evitar a autofecundação e forçar o cruzamento, e a manutenção de alta variabilidade genética nas suas populações.

O sistema de cruzamento exibido por uma população está ligado ao sistema sexual de sua espécie (dioícia, monoícia ou hermafroditismo). As espécies dioicas, por exemplo, são exclusivamente alógamas, visto que os gametas masculinos e femininos são produzidos sempre por indivíduos diferentes. Já nas plantas monoicas, a separação espacial dos sexos dentro de um

mesmo indivíduo favorece a fertilização cruzada, mas não impede a ocorrência de autofecundação. Nas plantas hermafroditas, observa-se frequentemente, misturas de cruzamentos e autofecundação (Finkeldey, 1998).

O sistema reprodutivo tem uma grande influência na distribuição da variabilidade genética dentro e entre as espécies vegetais, afetando importantes aspectos ecológicos e evolutivos, incluindo se seus indivíduos são majoritariamente homozigotos ou heterozigotos. O aumento da endogamia leva rapidamente também a um aumento da frequência de homozigotos e da expressão de mutações recessivas deletérias que podem implicar em redução de sua sobrevivência e fertilidade (Depressão endogâmica) (Loveless & Hamrick, 1984; Byers & Waller, 1999; Charlesworth, 2006).

O conhecimento dos sistemas reprodutivos das plantas e de sua interação com os fatores ecológicos é de grande importância para a estudos populacionais. Fenômenos como a fragmentação florestal pode levar a modificação das taxas de fecundação cruzada simplesmente pela baixa disponibilidade de doadores de pólen, ou de polinizadores. O nível de endogamia pode ser afetado pela ausência de indivíduos não aparentados disponíveis para cruzamento. Desta forma, observa-se que o sistema de cruzamento de uma espécie vegetal é fortemente afetado não só pela biologia da planta, mas por fatores ambientais e disponibilidade de recursos do local onde está se desenvolve (Charlesworth, 2006).

O conhecimento do sistema reprodutivo, taxas de cruzamento e distâncias de dispersão efetiva do pólen em populações naturais de plantas determinam como os genes são recombinados e mantidos pela espécie para a perpetuação de sua variabilidade genética natural, base do seu contínuo potencial evolutivo (Sebbenn et al., 2000; Brown, 1978; Ritland & Jain, 1981; Alves, 2002; Sork et al., 2002). É assim, como o sucesso de um método de seleção, visando o melhoramento genético, ou a amostragem visando a conservação vai

depende da magnitude da variação genética disponível na população e do sistema reprodutivo da espécie. A redução no tamanho das populações, associada à baixa densidade populacional, favorece a ocorrência de baixo número de indivíduos reprodutivos e, se o movimento dos vetores de polinização e dispersão de sementes também for reduzido pela fragmentação, os fragmentos se tornam unidades genética e demograficamente isoladas de pequenos tamanhos efetivos, tornando as espécies vulneráveis à extinção local (Nason & Hamrick, 1997).

1.6. Marcadores Moleculares e Estudos de Diversidade Genética

Marcadores Moleculares tem sido frequentemente utilizados para estudos de diversidade genética em diversas espécies vegetais (Kumar, 1999; Wünsch & Hormaza, 2007), entre esses, os marcadores de DNA, com base em reações de PCR com *primers* inespecíficos tem se tornado extremamente populares pela não necessidade de informações genéticas sobre as espécies estudadas, sendo assim úteis em estudos de espécies pouco conhecidas geneticamente, o que acontece com a maioria das espécies florestais (Nybom 2004). Entre esses marcadores, destacam-se o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) (Borém & Caixeta, 2009).

A grande desvantagem desses métodos é a produção de um padrão de bandas multilocus e bialelico. Neste tipo de análise não há como separar indivíduos homozigotos de heterozigotos, e os fragmentos amplificados são analisados por presença e ausência. Como consequência as bandas devem ser tratadas como marcadores de herança dominante. Fórmulas de análise de diversidade genética para a estimativa de diversidade entre e dentro de populações ainda são aplicadas, no entanto de uso controverso (Nybom, 2004).

Marcadores codominantes são mais informativos para estudos populacionais sendo os Microssatélites (SSR) frequentemente utilizados. Os marcadores SSR-microssatélites, por serem altamente polimórficos, co-dominantes, reprodutíveis e de fácil interpretação e com possibilidade de transferência entre espécies correlacionadas, vêm se destacando pelo seu uso em estudos de diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo gênico contemporâneo (Fernandes-Fernandez et al., 2006; Selkoe & Toonen, 2006).

1.6.1. Marcadores ISSR

Marcadores ISSR (*Inter simple sequence repeats*) são marcadores moleculares de característica dominante, altamente informativos e capazes de diferenciar indivíduos altamente aparentados, sendo importantes para as estimativas da base genética de populações vegetais em programas de melhoramento e conservação de espécies florestais (Ansari et al., 2012).

Esta técnica envolve amplificação de segmentos de DNA entre duas regiões de microssatélites idênticas. O ISSR-PCR utiliza um único *primer* com cerca de 16 e 25 pares de bases. Este consiste em um di, tri, tetra ou penta nucleotídeos repetidos *in tandem* e de dois a quatro nucleotídeos arbitrários degenerados na extremidade 3' ou 5'. Por estas características os marcadores ISSR combinam vantagens de metodologias como AFLP e SSR com a universalidade dos marcadores RAPD. Como desvantagem, estes marcadores compartilham a característica de dominância dos marcadores RAPD e AFLP (Borém & Caixeta, 2009; Shasavar et al., 2007). Marcadores ISSR tem sido usados para caracterização de germoplasma (Shasavar et al., 2007) e análises de diversidade genética do gênero *Citrus* (Fang & Roose, 1999; Kumar et al., 2010; Moraes Filho et al., 2011), *Trichilia pallida* (Xia et al., 2007), *Polylepis australis* (Julio et al.,

2008) *Myrcia splendens* (Brandão, 2011), *Cymbidium goeringii* (Wang et al., 2009) e *Tectona grandis* (Ansari et al., 2012), entre outros.

1.6.2 Marcadores microssatélites (SSR)

Os marcadores moleculares microssatélites ou SSR (Sequências Simples Repetidas) consistem de sequências curtas de 1 a 6 nucleotídeos repetidas na mesma ordem, encontrados frequentemente e aleatoriamente em todos os DNAs nucleares eucarióticos examinados (Tautz & Renz, 1984; Gupta et al., 1996; Oliveira et al., 2006). Estes marcadores apresentam uma alta taxa de mutação, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração, sendo que a maioria das mutações é ocasionada por alterações no número das unidades de repetição (Eisen, 1999; Schlöterer, 2000). De acordo com Weber (1990), os microssatélites podem ser classificados em três classes. (I) Perfeitos: quando a sequência repetida não é interrompida por qualquer base que não pertença ao motivo; (II) Imperfeitos: quando existe entre os motivos pares de bases que não correspondem ao mesmo; (III) Compostos: quando a sequência contém duas sequências distintas adjacentes.

As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, e frequentemente, entre espécies correlatas, permitindo a seleção de *primers* específicos que possibilitarão à amplificação via PCR, de fragmentos de DNA repetitivo de diversos genótipos. Quando os microssatélites são individualmente amplificados, eles quase que invariavelmente demonstram polimorfismo para tamanho. Esta variação para tamanho é decorrente da variação do número de repetições dos motivos dentro da estrutura do microssatélite (Morgante & Olivieri, 1993; McCouch et al., 1997; Cregan et al., 1999). Desta forma, vários alelos podem ser detectados para uma determinada população. Indivíduos homozigóticos possuem o mesmo

número de repetições nos cromossomos homólogos, enquanto os indivíduos heterozigóticos possuem um número de repetições diferentes nos dois homólogos sendo esta diferença identificada por este marcador, que é definido como co-dominante (Oliveira, 2006).

Deste modo, os microssatélites são considerados marcadores ideais para estudos genéticos em plantas por possuírem uma série de características desejáveis como: distribuição ao acaso e ocorrência em grande quantidade em genomas de eucariotos; co-dominância dos alelos, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados no gel; facilidade de detecção via PCR e alta diversidade alélica (Dayanandan et al., 1997; Chase et al., 1996; Rossetto et al., 1999). Além disso, estes marcadores são suficientemente estáveis para serem utilizados em análises genéticas e de evolução de populações naturais, especialmente em espécies arbóreas altamente heterozigóticas, como já vem sendo demonstrado para espécies tropicais (White & Powell, 1997; Ciampi et al., 2000; Collevatti et al., 1999; Brondani et al., 2003; Alves, 2002; Zucchi, 2002, Ferreira-Ramos et al., 2008, Alzate-Marin et al., 2011; Feres et al., 2012; Gonela et al., 2013).

No Brasil, o desenvolvimento e o uso de marcadores microssatélites de espécies florestais tem sido empregados em estudos populacionais de espécies como *Caryocar brasiliense* (Collevatti et al., 1999), *Ceiba pentandra* (Brondani et al., 2003), *Oenocarpus bacaba* (Lepsch-Cunha et al., 2003), *Swietenia macrophylla* (Lemes et al., 2002), *Euterpe edulis* (Gaiotto et al., 2003), *Copaifera langsdorffii* (Ciampi et al., 2000; Gonela et al., 2013), *Hymenaea courbaril* (Guidugli et al., 2006; Feres et al., 2009a), *Eugenia uniflora* (Ferreira-Ramos et al., 2008), *Tabebuia roseo-alba* (Feres et al., 2009b), *Cariniana estrellensis* (Guidugli et al., 2009), *Cariniana legalis* (Guidugli et al., 2010) e *Metrodorea nigra* (Guidugli et al., 2012).

1.7. A espécie florestal *Metrodorea nigra*

Metrodorea nigra St. Hill., é uma espécie arbórea pertencente à família Rutaceae e conhecida popularmente como “carrapateira” ou “caputuna-preta”. Chegando a atingir cinco metros de altitude é uma espécie típica do sub-dossel das florestas semidecíduas da bacia do Rio Paraná e da Floresta Pluvial Atlântica do Brasil. É uma espécie monóica, perene e tolerante a sombreamento (Figura 7) (Lorenzi, 2002)

Figura 7. *Metrodorea nigra* em um fragmento florestal da Região de Ribeirão Preto (Foto: Moraes Filho, RM.)

M. nigra possui flores hermafroditas e polinizadas por moscas, frequentemente pelas espécies *Pseuoptiloleps bigripoda* (Muscidae) e *Fannia* spp. (Fanniidae) (Pombal & Morellato 2000). Apesar desses polinizadores terem o hábito de visitar todas as flores de uma mesma

inflorescência antes de partir para outra, *M. nigra* produz frutos gerados apenas por fertilização cruzada (Pombal & Morellato, 2000). Seus frutos capsulares deiscentes são classificados como *Coccarium* (Figura 8). Produz anualmente uma baixa quantidade de sementes e a dispersão destas se dá por barocoria: os frutos, quando secos, quebram e liberam as sementes de forma explosiva (Lorenzi, 2002; Souza et al., 2008).

Figura 8. Flores, frutos e sementes de *M. nigra* em um fragmento florestal da Região de Ribeirão Preto (Fotos: Moraes Filho, RM.)

M. nigra desenvolve-se preferencialmente à sombra e em regiões mais internas das matas. É recomendada para adensamento de remanescentes de florestas degradadas. Sua madeira é frequentemente usada na construção civil. Em alguns fragmentos florestais do estado do Paraná, foi observado o consumo por macacos de sementes imaturas para alimentação (Lorenzi, 2002; Souza et al., 2004).

A distribuição da espécie vai desde o Estado da Bahia até o Estado do Paraná (Lorenzi, 2002), sendo reportada frequentemente

em alta densidade populacional (Duringan et al., 2000; Villela et al., 2006; Cassola, 2008; Tanaka, 2009; Marcondelli, 2010).

Diversos autores relatam sua ocorrência no Estado de São Paulo destacando-a como espécie de grande importância ecológica, e altamente adaptada às condições do sub-bosque da floresta estacional semidecidual (Duringan et al., 2000; Bertoncini, 2003; Kotchetkoff-Henriques, 2003; Cassola, 2008; Tanaka, 2009; Marcondelli, 2010; Schwarcz et al., 2010) sendo de grande importância na dinâmica de nutrientes em matas mesófilas (Villela et al., 2006). No entanto, sob condições de fragmentação, abertura de clareiras e corte seletivo, observa-se uma redução de sua frequência (Bertoncini, 2003; Villela et al., 2006) ou completo desaparecimento (Cassola, 2008).

No município de Ribeirão Preto, a espécie foi relatada em 16 fragmentos de mata estacional semidecidual e um fragmento de mata decidual (Kotchetkoff-Henriques et al., 2005).

1.8. Espécies Indicadoras

De uma forma geral, o termo “espécie indicadora” pode ser aplicado a qualquer forma de vida usada para mensurar e monitorar propriedades e atributos de um sistema. Mais especificamente, bioindicadores são definidos como uma espécie ou um grupo de espécies que são particularmente associados a recursos específicos da paisagem, reagindo e indicando impactos e mudanças ambientais sejam estas devido a efeitos bióticos ou abióticos (Seitz, 1994; McGeoch, 1998; Silva, 2010). Estes indicadores devem apresentar quatro características básicas: viabilidade; baixo custo efetivo para amostragem; fácil e confiável identificação; e uma resposta aos distúrbios que possa ser avaliada e medida de maneira consistente (Pearce & Venier, 2006).

Dentre os bioindicadores, destacam-se os indicadores ecológicos. Um indicador ecológico é uma espécie ou grupo de espécies que são sensíveis ao estresse relacionado aos processos ambientais, e assim, demonstram os efeitos desse estresse na biota (Silva, 2010). Seu uso se baseia no pressuposto de que sua presença ou ausência, assim como, flutuações em algumas de suas características em uma dada comunidade, possam refletir mudanças ocorridas no ambiente, seja em nível de genes, espécies ou até em uma comunidade inteira (Noon et al., 1999). Sendo assim, estes indicadores têm a capacidade de fornecer um indicativo precoce de mudanças no ambiente, podendo ser utilizados para diagnosticar a causa de um problema ambiental (McGeoch, 1998; Dale & Beyeler, 2001).

Indicadores ecológicos possuem inegável utilidade para conservacionistas, administradores de terra e governos, por serem uma forma eficiente e barata de avaliar e compreender os efeitos de distúrbios ambientais sob um ecossistema, tendo uma ampla utilização na ecologia e na análise de impactos ambientais (Carignan & Villard, 2002), existindo atualmente diversas aplicabilidades, conceitos, objetivos e formas de análise propostas por diversos autores (McGeoch, 1998; Dale & Beyeler, 2001; Silva, 2010).

Observa-se que a espécie *M. nigra* encontra-se associada à presença de espécies de grande porte, por estar adaptada a condições de sub-bosque e sombreamento (Duringan et al., 2000; Bertoncini, 2003; Villela et al., 2006; Cassola 2008; Marcondelli, 2010). A fragmentação e a abertura de clareiras são prováveis causas da redução de sua densidade e até desaparecimento em fragmentos onde ocorre abertura de clareiras e corte seletivo (Bertoncini, 2003; Villela et al., 2006; Cassola, 2008).

Devido à alta frequência e densidade em que a espécie é observada na floresta estacional semidecidual, *M. nigra* foi classificada como espécie de grande importância ecológica (Duringan

et al., 2000; Villela et al., 2006; Cassola, 2008; Tanaka, 2009), sendo sugerido o uso da espécie como indicador de efeitos de distúrbios antrópicos, como corte seletivo e fragmentação e para o monitoramento da qualidade de fragmentos florestais (Villela et al., 2006).

A espécie *M. nigra* foi escolhida para o presente estudo, visando sua possível recomendação como indicador ecológico para os efeitos de fragmentação florestal da região de Ribeirão Preto (SP) devido a: 1) sua ocorrência nos fragmentos remanescentes da região de Ribeirão Preto; 2) sua preferência de habitat (sub-bosque e áreas mais conservadas da floresta); 3) seu tamanho (até cinco metros) o que facilita a coleta de folhas e observação de polinizadores; 4) estudos prévios detalhados sobre sistema reprodutivo e agentes polinizadores (Pombal & Morellato, 2000; Souza et al., 2004) e dispersores (Pombal & Morellato, 2000).

Desta forma, as questões abordadas neste trabalho foram: a) Quais os níveis de diversidade genética nas três populações avaliadas?; b) Existe estruturação genética entre as três populações?; c) Existiu fluxo gênico entre os três fragmentos?; d) As populações exibem estruturação genética espacial?; e e) Existem diferenças entre a diversidade e estrutura genética entre as gerações de adultos e juvenis nas três populações?

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo teve por **objetivo geral** avaliar se a redução e a fragmentação de habitat podem causar modificações na estrutura genética de populações naturais de *Metrodorea nigra* ocorrendo em áreas remanescentes de floresta estacional semidecidual na região de Ribeirão Preto-SP, com histórico e intensidade de fragmentação diferenciados.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estimar e comparar os níveis de diversidade genética entre gerações de Adultos e Juvenis das populações de *M. nigra* nos três fragmentos amostrados utilizando marcadores moleculares SSR e ISSR como ferramentas de análise.
- b) Avaliar a estrutura genética entre os três fragmentos selecionados e a possível ocorrência de fluxo gênico histórico entre eles.
- c) Estudar a Estrutura Genética Espacial em micro-escala, a distribuição dos indivíduos de *M. nigra* nas três populações analisadas e determinar a distância mínima de coleta de sementes para programas de reflorestamento utilizando esta espécie.
- d) Considerar a indicação da espécie *M. nigra* como indicador ecológico para os efeitos de fragmentação florestal e outros distúrbios em regiões de floresta estacional semidecidual.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. REMANESCENTES FLORESTAIS DA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO (SP)

3.1.1. Mapeamento, observação e seleção dos remanescentes a serem estudados

Para o desenvolvimento do presente trabalho, cinco fragmentos florestais localizados na região de Ribeirão Preto (SP) entre as bacias dos rios Pardo e Mogi-Guaçu foram inspecionados: Fragmentos M11, M13 e M15 na Fazenda da Bomba – Ribeirão Preto/SP (21°19'45.90"S; 47°55'30.38"O), Fragmento Florestal Fazenda Águas Claras – CRV, no município de Cravinhos/SP (21°10'26.37"S; 47°48'1.49"O) e o Fragmento Florestal do Bosque Municipal de Ribeirão Preto (SP) (21°17'54.22"S; 47°40'28.10"O).

Os fragmentos M11 e M15 (Figura 9) apresentaram intenso efeito de borda, com grande presença de lianas, indícios de corte seletivo e queimadas. Apesar do fragmento M11 ser o maior dos fragmentos visitados (161 ha) só foi encontrado um indivíduo de *M. nigra*. Similarmente, no fragmento M15 (117 ha) apenas nove indivíduos foram encontrados.

Figura 9. Fragmentos florestais – M15, M11 e M13 - Fazenda da Bomba – Ribeirão Preto-SP – 117, 164 e 64 hectares, respectivamente (Fonte: Google Earth).

O fragmento M13, apesar de ser o menor dos três fragmentos visitados dentro da Fazenda da bomba (64 ha), apresentou-se em melhores condições, desde que possui uma população da espécie *M. nigra* ocorrendo na região central e mais fechada da mata. De acordo as observações, este fragmento passa por um processo de regeneração, devido provavelmente a uma queimada e/ou corte seletivo (Figura 10). Grandes porções deste fragmento exibem efeito de borda e presença de lianas.

Figura 10. Indícios de queimada e efeito de borda no fragmento florestal M13-Rib – 64 hectares (Foto de satélite - Fonte: Google Earth. Demais Fotos: Moraes Filho, R.M.)

O fragmento BSQ-Rib (Bosque municipal de Ribeirão Preto-SP- $21^{\circ}10'24.71''\text{S}$; $47^{\circ}47'59.38''\text{O}$, Figura 11) faz parte do Parque Municipal do Morro de São Bento. Possui 18 ha de área total, e 3 ha de mata estacional semidecidual sendo o último reduto natural deste

tipo de mata no interior da cidade (Kotchekoff-Henriques, 2003). A sua amostragem, foi autorizada pelo Dr. Alexandre Carvalho Gouvêa, Chefe da Seção Bosque Zoológico Municipal Ribeirão Preto/SP.

Encontra-se completamente cercado por matriz urbana próximo ao centro do município. Foi encontrada uma população de *M. nigra* ao longo de uma trilha e na encosta do morro. Possui diversas árvores de grande porte e algumas árvores mortas tombadas. Além da trilha, o fragmento exhibe várias clareiras e é periodicamente visitado por pessoas em atividades educacionais do Zoológico.

Figura 11. Bosque Municipal Fábio Barreto – Ribeirão Preto – 3 hectares (Fonte: Google Earth)

O fragmento florestal de 8 ha da fazenda águas claras (Cravinhos - SP) (FAC-Crav) (Figura 12) aparenta estar em bom estado de conservação por estar cercado e sofrer menos contato com populações humanas. A espécie *M. nigra* foi encontrada por toda a extensão da mata, principalmente nas partes mais internas e sombreadas. Poucas clareiras foram observadas e apesar de estar

circulado por plantio de cana-de-açúcar, não foram encontrados indícios de queimadas.

Figura 12: Fragmento florestal – CRV- Fazenda Águas Claras – Cravinhos-SP – 8 hectares (Fonte: Google Earth).

3.1.2. Seleção de Remanescentes da floresta estacional semidecidual.

Pelas suas melhores condições e ocorrência da espécie *M. nigra*, foram selecionados para os estudos genéticos, os fragmentos M13-Rib, BSQ-Rib e FAC-Crav (Figura 13). Em todos os locais de coleta foi observada a presença de vários indivíduos juvenis cercando adultos, formando aglomerados locais. Alguns poucos indivíduos isolados também foram identificados. Amostras de tecido foliar e coordenadas GPS (GARMIN eTrex Vista Cx, Garmin International, Olathe, Kansas, USA) foram coletadas de 200 indivíduos dentre os três fragmentos selecionados (Anexo 1, Tabela 2). Para a amostragem do material biológico foi imprescindível à colaboração do Dr. Ronai Ferreira

Ramos e do especialista Rafael Campos (Estudante de Mestrado da FFCLRP-USP). A identificação da espécie foi realizada com a ajuda do especialista em rutáceas Dr. Milton Groppo Jr, professor da FFCLRP, quem também coletou uma exsicata na fazenda Águas Claras (coletor Groppo #1971) a qual foi depositada no herbário do departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto (Herbário SPFR) com numero de identificação - SPFR 12706.

Todas as amostras foram identificadas, embaladas em papel alumínio e armazenadas a -20 °C até a extração do DNA genômico.

Figura 13. Fragmentos selecionados na Região de Ribeirão Preto SP) para realização desta pesquisa (Fonte: Google Earth).

Os indivíduos amostrados dos três fragmentos selecionados (Fig. 13) foram classificados como adultos ou juvenis segundo o critério de Perímetro a Altura do Peito (PAP), sendo definidos como juvenis, indivíduos com PAP < 11 cm e Adultos indivíduos com PAP $\geq$ 11 (Tabela 2).

Tabela 2. Características dos fragmentos florestais avaliados.

	Área (ha)	N total	N Adultos	N Juvenis	Histórico	Altitude (m)	Acesso	Matriz
M13- Rib	64	80	37	43	Quei/CS	601	Aberto	Cana-de-açúcar
BSQ- Rib	3	60	32	28	CS/Tri	570	Fechado	Urbana
FAC- Crav	8	60	27	33	Iso	610	Fechado	Cana-de-açúcar

Legenda: Quei: Histórico de Queimadas; CS: Histórico de corte seletivo; Tri: Abertura de trilhas; Iso: Histórico de isolamento.

Nos três fragmentos, foram observados sempre arvores adultos cercados por plantas jovens formando agrupamentos semelhantes a famílias. As figuras 14 mostra a disposição dos indivíduos nos três fragmentos.

Na figura 15, observa-se que a maior parte dos indivíduos amostrados encontra-se sempre próximo de outros da mesma espécie e raramente indivíduos isolados foram encontrados.

Figura 14. Coordenadas GPS (Quadrante 23k) dos indivíduos da espécie *M. nigra* coletados na Região de Ribeirão Preto (SP), para as populações M13-Rib (a), BSQ-Rib (b) FAC-Crav (c).

Figura 15. Frequência e distância para o vizinho mais próximo dos indivíduos da espécie *M. nigra* coletados na Região de Ribeirão Preto (SP), para as populações M13-Rib (A), BSQ-Rib (B) FAC-Crav (C).

3.2. Material Vegetal e Extração de DNA

O DNA das amostras de folhas coletadas dos 200 indivíduos das três populações foi extraído de acordo a Alzate-Marin et al., (2009), tendo sua pureza e concentração determinada em espectrofotometro (Nanodrop). Em seguida, o DNA total foi diluído para uma concentração de 10 ng/ul.

3.3. Marcadores Moleculares

3.3.1. *Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR)*

Os oito *primers* ISSR foram selecionados dentre os utilizados por Moraes Filho et al., (2011) de acordo com seu polimorfismo e número de loci amplificados (Tabela 3).

Tabela 3. Sequências e características dos *primers* utilizados

Marcadores ISSR		
Primer	Sequencia	TA(°C)
UBC#1	ACACACACACACACT	50
UBC#2	GAGAGAGAGAGAGAT	50
UBC#820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	50
UBC#834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	50
UBC#851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG	50
UBC#858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT	50
UBC#860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA	50
UBC#886	VDV CTC TCT CTC TCT CT	50

N = (A,G,C,T), R = (A,G), Y = (C,T), B = (C,G,T), D = (A,G,T), H = (A,C,T), V = (A,C,G)

3.3.2. Marcadores *Simple Sequence Repeats (SSR)*

Previamente, Guidugli et al., (2012) desenvolveram um grupo de 12 marcadores SSR para a espécie *M. nigra*. No entanto, apenas 5 exibiram alto nível polimorfismo dentre os indivíduos amostrados.

Visando aumentar o número de primers SSR disponíveis para análises, uma nova bateria de primers foi desenvolvida de acordo ao protocolo descrito por Guidugli et al. (2012), incluindo um duplo

enriquecimento de acordo ao protocolo proposto por Diniz et al., (2007) com adaptações para as condições do laboratório de genética vegetal-FMRP/USP seguindo as seguintes etapas:

Construção de biblioteca enriquecida em microssatélites.

Inicialmente, o DNA de uma árvore adulta da espécie foi extraído e quantificado (~5 µg). Subsequentemente, foi realizada a digestão do DNA com uma enzima de restrição de corte frequente (*RsaI*, Invitrogen) obtendo-se fragmentos entre 300 e 600 pb. Em seguida, os fragmentos obtidos foram ligados a adaptadores com sequências conhecidas de 21 e 25 pb (*Rsa21* - 5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3' e *Rsa25* 5'TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA3') e uma pré-amplificação usando como *primer* o oligonucleotídeo *Rsa21* foi realizada. O produto de amplificação foi purificado (*Quiaquick PCR Purification Kit*, Qiagen) e submetido ao passo de duplo enriquecimento da biblioteca para fragmentos contendo microssatélites, por meio da hibridização com os oligonucleotídeos biotinilados (GT)₈ e (CT)₈ (Figura 16). Esses fragmentos foram recuperados pela ligação entre as moléculas de biotina e as moléculas de *streptavidina* associadas com partículas magnéticas (*Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles*, Promega).

Os fragmentos selecionados foram então amplificados novamente usando o oligonucleotídeo *Rsa21*, e posteriormente, foram ligados a um vetor de clonagem (*pGEM-T Vector System*, Promega) (Figura 17). Essa construção foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue de acordo com a metodologia de Avi Levy. As colônias recombinantes foram selecionadas para resistência ao antibiótico ampicilina e pelo sistema branco-azul, transferidas para placas ELISA e mantidas em culturas gliceroladas com meio 2YT-HMFM à -80 °C.

Figura 16. Recuperação dos fragmentos ligados hibridizados por meio de *beads* magnéticas.

Figura 17. Segundo enriquecimento: Fragmentos *RsaI* do DNA genômico da espécie *Metrodorea nigra* amplificados com o *primer* *Rsa21* (à esquerda) e Fragmentos *RsaI* do DNA genômico da espécie *Metrodorea nigra*, selecionados por complementaridade com as sondas para SSRs, inseridos em vetor pGEM-T Easy e amplificados por PCR utilizando *primers* M13 *forward* e *reverse* (à direita). **M:** 100 bp Ladder GE. (Imagens do Fotodocumentador GE Lab. Genética vegetal USP/RP).

Sequenciamento. Após a construção do banco com fragmentos enriquecidos em microssatélites foi realizada a etapa de sequenciamento dos clones. Para tanto, foi isolado o DNA plasmidial de cada um dos clones por meio da metodologia de lise alcalina. A obtenção das sequências foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular com a colaboração da Dra. Andrea Quiapim e da Profa. Maria Helena Goldman - FFCLRP/USP/RP.

Identificação de microssatélites. Para identificação dos microssatélites dentro das sequências obtidas foi utilizada a ferramenta de busca "WEBSAT - A Web Software for MicroSatellite Marker Development" (Martins et al., 2009) disponível na página <<http://wsmartins.net/websat/>>.

Desenho dos *primers*. Os *primers* direto e reverso de cada SSR foram desenhados com o auxílio do programa Primer3, disponibilizado na internet, de acordo com os seguintes critérios: não conter bases redundantes; estar a uma distância adequada dos SSRs (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 duas bases G, ou C, ou G e C, se possível; e ter temperatura de anelamento entre 45 e 60 °C, com diferença máxima de 2 °C entre as temperaturas dos *primers* direto e reverso (Figura 18).

Por este processo, foram obtidas 11 sequências contendo microssatélites e os *primers* foram desenhados e sintetizados (Tabela 4). Deste conjunto, dois *primers* que exibiram polimorfismo e boas condições de amplificação foram selecionados para esta pesquisa (Mtn 87 e Mtn 95), os quais foram utilizados em conjunto com outros cinco *primers* SSR previamente desenvolvidos para a espécie (Guidugli et al., 2012) (Tabela 5).

TCAGAAGAGGATGAGCCITATAGCCCAAGTGTCTGAAGTGAATATCTAGGAGGACAGTGAGAATGAAACAC
CAGTGGAGTATGGTAATTTCTATGACAGCTTTACTAATAAGGACAATGAAGTGGATCAAATCTGGCTTGA
GGTCCAGGGCGTGACAAGAACTGGCCGATTCTATCAGAGCGATAAGCAGGTGGATGGGAAAAATTAAAGAA
GTTGACCCTGATAAGGAGAGGGGAAGAGTTAGAAAAATTAAGAAGAGGAAGAGAAGAAGAAGAAGAATATTA
TCTTCCAAACAGATTAAAGAAAACTAGGGCCAGATAAAGCTTTGGGACTTGTATCAGT

Using 1-based sequence positions

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
OLIGO							
LEFT PRIMER	161	20	59.94	55.00	4.00	2.00	
CTGGCCGATTCTATCAGAGC							
RIGHT PRIMER	313	23	60.01	43.48	6.00	2.00	
TCTGGGCCCTAGTTTTCTTTAAC							
SEQUENCE SIZE: 336							
INCLUDED REGION SIZE: 336							

```
TARGETS (start, len)*: 239,47
```

[illegible]

Figura 18. Sequenciamento e desenho do primer Mtn 87, seguindo os programas Websat: <http://wsmartins.net/websat/> e Primer 3 <http://frodo.wi.mit.edu/>

Locus	Motivo	Tamanho (pb)	TA(°C)
Mtn26	(gt) ₂₂	203	60
Mtn27	(tg) ₈ (gc) ₇ (tg) ₃	231	56
Mtn35	(gt) ₁₉ (ct) ₃ (gt) ₁₆	187	57
Mtn51	(tg) ₂₇	197	59
Mtn52	(ca) ₁₄	237	53
Mtn67	(tg) ₆ (g) ₂ (tg) ₇ (g) ₂ (tg) ₂₀	167	61
Mtn71	(gt) ₂₉	205	60
Mtn87*	(aga) ₉	153	60
Mtn88	(tg) ₅ (cat)(gt) ₅ (a)(g) ₃ (gt) ₁₁	209	60
Mtn91	(tg) ₂₁	150	59
Mtn95*	(tg) ₁₈	248	59

*primers SSR desenvolvidos e utilizados nesta pesquisa

Tabela 5. Sequências e características dos 5 loci selecionados de Guidugli et al., (2012).

Primer	Motivo	Tamanho esperado (pb)	Ta(°C)
Mtn1	(TG) ₈	144	56
Mtn3	(CA) ₁₀ N ₈ (CG) ₅ (CA) ₆	275	50
Mtn13	(GT) ₁₄	213	56
Mtn16	(TG) ₃ CA(TG) ₁₀	203	50
Mtn19	(TA) ₃ (TG) ₉ (TA) ₃ (TG) ₁₀ TT(TG) ₃	193	56

3.3.3. Reações em Cadeia da Polimerase e Eletroforese

As reações de amplificação utilizando os marcadores ISSR foram realizadas em um volume total de 20 µl, utilizando-se o Kit GoTaq mastermix (PromegaTM), consistindo em 8 µl de H₂O mili-q, 8 µl do master mix (400 nM de cada desoxinucleotídio e 3 mM MgCl₂), 1,5 µM de *primer* e 25 ng de DNA molde. As amplificações foram realizadas seguindo as seguintes programações: desnaturação inicial a 95° por 15 minutos, seguidos de 30 a 35 ciclos de desnaturação a 94° por 30 segundos, temperatura de anelamento de 50° por 45 segundos e extensão a 72° por 2 minutos, e extensão final a 72° por 7 minutos ao fim dos ciclos de amplificação em termociclador Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)

As reações de amplificação utilizando marcadores SSR foram realizadas em um volume total de 15 µl, utilizando-se o Kit GoTaq (PromegaTM), consistindo em 6 µl de H₂O mili-q, 6 µl do master mix (400 nM de cada desoxinucleotídio e 3 mM MgCl₂), 1 µM de cada *primer* e 20 ng de DNA molde. O protocolo de PCR consistiu de uma desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguidos por 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, um 1 minuto em temperatura de anelamento específica para cada primer (tabelas 4 e 5), 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos em termociclador Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese sob condições não-desnaturantes (ISSR) e desnaturantes (SSR) em

géis de poliacrilamida 8% e 10% respectivamente. Os fragmentos amplificados foram detectados em coloração com nitrato de prata (20%) segundo protocolo de Sanguinetti et al. (1994). A determinação dos tamanhos dos alelos foi feita utilizando-se marcadores de 50 (ISSR) e 10 (SSR) pares de base (Invitrogen™).

3.3.4. Análises Estatísticas

3.3.4.1. Caracterização da diversidade genética

Marcadores ISSR. O polimorfismo obtido pela técnica ISSR foi tabulado segundo presença (1) ou ausência (0) de bandas. Cada banda ISSR foi considerada um locus único e bi alélico, com um alelo amplificável e um alelo nulo. O Software GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) foi utilizado para gerar a matriz de distância genética segundo Nei (1972) e para calcular a Diversidade Genética de Nei ($\hat{H}_e$), Número de alelos (N_a), Número efetivo de alelos (N_e), e porcentagem de loci polimórficos (PLP).

Marcadores SSR. A diversidade genética foi caracterizada pelos índices: número médio de alelos por loco (N_a), número efetivo de alelos por loci (N_e), heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e). Os índices de diversidade, os coeficientes de parentesco, o índice de fixação e as probabilidades de exclusão do primeiro (P.Ex1) e do segundo parental (P.Ex2) foram calculados utilizando-se o GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012), o teste de aderência ao EHW foi realizado, usando-se o programa GDA (Lewis & Zaykin, 2002) e a frequência de alelos nulos foi estimada utilizando-se o programa CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007). Para a análise de diferenças entre as médias foram realizados testes de análise de variância (ANOVA), seguido de teste T de Student para cada par de médias.

3.3.4.2. Estrutura Genética

A estimativas de diferenciação genética entre populações foram calculadas a partir dos parâmetros, G_{st} (Nei, 1973), F_{st} (Weir & Cockerham, 1984) e também pela análise de variância molecular (AMOVA - Φ_{st}) (Excoffier et al., 1992) utilizando-se o software GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). O software Popgene 1.31 (Yeh et al., 1999) foi utilizado para o cálculo do parâmetro G_{st} com base nos dados obtidos com marcadores ISSR.

3.3.4.3. Análise de Ancestralidade e Agrupamento

A partir dos resultados obtidos com os marcadores ISSR e SSR, foi utilizado o software Structure 2.0 (Pritchard et al., 2000) para averiguar a estrutura genética e ancestralidade das populações a partir de uma análise de agrupamentos baseada em modelos (*model-based clustering*). O método assume a existência de um número K de populações (ou agrupamentos), cada qual com suas frequências alélicas características. O número K de populações é calculado utilizando-se uma inferência Bayesiana de probabilidade, geralmente dentro do intervalo de um a cinco. Além de inferir o número de agrupamentos mais provável, o programa atribui probabilisticamente os indivíduos amostrados a cada um dos K agrupamentos, a partir de seus genótipos. Cada agrupamento é formado por indivíduos semelhantes geneticamente. A relação de ancestralidade entre os indivíduos das três populações foi gerada assumindo-se um valor de 1 a 3. Para esta análise três modelos foram gerados com 10^6 iterações MCMC (Markov Chains Monte Carlo) e 30.000 *Burn-in-periods*. O valor ótimo de K foi escolhido de acordo com as indicações dos autores (ver resultados) (Pritchard & Wen 2003).

A partir das matrizes de distância genética, a análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada pelo software GenAlex

6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Adicionalmente, o software MEGA5 (Tamura et al., 2011) foi utilizado para a geração de um dendrograma de dissimilaridade genética com base no algoritmo UPGMA.

3.3.4.4. Estrutura Genética Espacial

A análise de autocorrelação espacial emprega um método de análise multivariada combinando os loci em vez de se utilizar de uma análise locus por locus (Smouse & Peakall 1999). Um coeficiente de autocorrelação r é gerado entre distâncias genéticas e geográficas dentro de classes de distâncias definidas pelo usuário. O coeficiente r oferece uma medida da similaridade genética entre pares de indivíduos amostrados em que a separação geográfica cai dentro de uma classe de distância específica. Este coeficiente de correlação varia entre -1 e 1, onde o valor 0 significa ausência de autocorrelação. Valores acima de 0 significam autocorrelações positivas e abaixo de 0 autocorrelações negativas. Testes para significância estatística de r para cada classe de distância foram realizados a partir de 1000 permutações aleatórias e *bootstrapping* como descrito por Peakall et al. (2003) (Carriconde et al., 2008). As análises de coordenadas principais, Mantel e Autocorrelação espacial utilizadas para o estudo de estruturação genética espacial foram geradas pelo software GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

No presente estudo, foram realizadas análises de autocorrelação espacial utilizando-se matrizes de distância genética (Nei, 1972) obtidas pelos marcadores ISSR e matrizes de coeficiente de parentesco (Lynch & Ritland, 1999) geradas a partir dos marcadores SSR contra matrizes de distância geográfica entre os indivíduos, calculadas por meio de suas coordenadas GPS. Todas as três matrizes foram geradas pelo software GenAlex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

4. RESULTADOS

4.1. DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE GERAÇÕES DE ADULTOS E JUVENIS DE TRÊS POPULAÇÕES DE *M. NIGRA* UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES SSR E ISSR.

Marcadores ISSR. Pela metodologia ISSR foram amplificados um total de 136 loci, sendo destes 133 polimórficos (97,79%). Os oito *primers* utilizados geraram em média 17 loci variando entre 11 (UBC#820) e 25 (UBC#2) (Tabela 6).

Tabela 6. Polimorfismo dos *primers* ISSR utilizados

Primer	NºLoci	LP	LM	$\hat{H}_e$
UBC#1	12	12	0	0,293
UBC#2	25	24	1	0,276
UBC#820	11	11	0	0,270
UBC#834	13	11	2	0,299
UBC#851	20	20	0	0,326
UBC#858	24	24	0	0,349
UBC#860	19	19	0	0,338
UBC#886	12	12	0	0,338

LP: Loci Polimórficos; LM: Loci Monomórficos

A proporção de loci polimórficos variou entre 78,68% (FAC-Crav), 83,09% (BSQ-Rib) e 89,71% (M13-Rib). A diversidade genética de Nei ($\hat{H}_e$) foi relativamente alta para todas as populações (0,31). Não se observaram diferenças significativas entre as populações dos três fragmentos, exceto para o Número de Alelos, onde a população do fragmento M13-Rib exibiu um valor estatisticamente superior ($N_a = 1,88$) às restantes. Entre as gerações analisadas, os indivíduos juvenis obtiveram valores de diversidade ligeiramente superiores, nas três populações, mas diferenças significativas não foram observadas entre as gerações, há exceção do número efetivo de alelos que foi estatisticamente inferior ($N_e = 1,36$) nos indivíduos adultos do fragmento FAC-Crav. A tabela 7 ilustra os valores encontrados para todas as populações e gerações.

Tabela 7. Estimativas de diversidade genética por marcadores ISSR das três populações analisadas

População	NL	LP	PLP	LM	Na	Ne	He
M13-Rib (adultos)	136	107	78,68%	29	1,75 (0,04)	1,42 (0,03)	0,25 (0,01)
M13-Rib (Juvenis)	136	113	83,09%	23	1,81 (0,04)	1,42 (0,03)	0,25 (0,01)
BSQ-Rib (adultos)	136	102	75%	34	1,67 (0,05)	1,43 (0,03)	0,26 (0,01)
BSQ-Rib (Juvenis)	136	107	78,68%	29	1,7 (0,05)	1,43 (0,03)	0,26 (0,01)
FAC-Crav (adultos)	136	99	72,79%	37	1,60 (0,06)	1,36*(0,03)	0,22 (0,02)
FAC-Crav (Juvenis)	136	102	75%	34	1,64 (0,06)	1,42 (0,03)	0,24 (0,02)
P-ANOVA	-	-	-	-	0,040	0,389 ^{NS}	0,407 ^{NS}
Média	-	-	-	-	1,707	1,417	0,249

População	NL	LP	PLP	LM	Na	Ne	He
M13-Rib	136	122	89,71%	14	1,88*(0,03)	1,43 (0,03)	0,27 (0,01)
BSQ-Rib	136	113	83,09%	23	1,76 (0,05)	1,46 (0,03)	0,27 (0,02)
FAC-Crav	136	107	78,68%	29	1,68 (0,06)	1,40 (0,03)	0,24 (0,02)
P-ANOVA	-	-	-	-	0,010	0,404 ^{NS}	0,370 ^{NS}
Média	-	-	-	-	1,777	1,431	0,260

Dados expostos em médias. Erro Padrão entre Parênteses. NL = Número de Loci; LP = Loci Polimórficos; PLP= Porcentagem de Loci Polimórficos; LM = Loci Monomórficos; Na= Número de alelos; Ne= Número efetivo de alelos; He = Diversidade Genética de Nei;
 * P < 0,05 pelo teste T de Student

Marcadores SSR. Na análise de diversidade com marcadores SSR, todos os loci analisados exibiram polimorfismo. Um total de 104 alelos foram amplificados, com uma média de 14,85, variando de 5 (Mtn 1) a 28 (Mtn 95). A menor heterozigosidade observada foi verificada no locus Mtn 1 (0,342) e a maior no locus Mtn 87 (0,735). As tabelas 8 e 9 apresentam detalhadamente os valores de diversidade obtidos para todos os loci analisados no conjunto total dos indivíduos e em cada população.

Tabela 8. Características dos loci microssatélites analisados.

Locus	Na	Ne	Ho	He	F	P.Ex1	P.Ex2	FAN
Mtn1	5	1,790	0,342	0,441	0,226	0,226	0,100	0,1337
Mtn3	18	9,380	0,658	0,893	0,263	0,784	0,643	0,1509
Mtn13	24	11,727	0,475	0,915	0,481	0,830	0,710	0,3195
Mtn16	7	3,889	0,477	0,743	0,358	0,520	0,343	0,2256
Mtn19	13	3,068	0,423	0,674	0,372	0,491	0,299	0,2459
Mtn87	9	4,491	0,735	0,777	0,055	0,576	0,398	0,0274
Mtn95	28	22,043	0,503	0,955	0,473	0,908	0,832	0,3108
Total	104	-	-	-	-	0,999	0,996	-
Média	-	8,05	0,516	0,771	0,318	-	-	-

Na= número de alelos; Ne= número efetivo de alelos; Ho= heterozigosidade observada; He= heterozigosidade esperada; F= Índice de fixação; P.Ex1= Probabilidade de exclusão do primeiro parental; P.Ex2= Probabilidade de exclusão do segundo parental; FAN = Frequência de alelos nulos.

Tabela 9. Característica dos sete loci microssatélites em três populações de *M. nigra*

Adultos M13-Rib					
Locus	Na	Ne	Ho	He	F
Mtn1	4	1,790	0,371	0,441	0,158
Mtn3	10	5,794	0,647	0,827	0,218
Mtn13	15	7,585	0,400	0,868	0,539
Mtn16	7	4,003	0,676	0,750	0,099
Mtn19	4	1,377	0,139	0,274	0,492
Mtn87	8	4,713	0,833	0,788	-0,058
Mtn95	18	12,517	0,545	0,920	0,407
Média	9,429	5,397	0,516	0,695	0,265
Ic Inf	-	4,210	0,463	0,658	0,220
Ic Sup	-	6,067	0,579	0,766	0,319
Juvenis M13-Rib					
Locus	Na	Ne	Ho	He	F
Mtn1	4	1,773	0,279	0,436	0,360
Mtn3	9	6,051	0,762	0,835	0,087
Mtn13	16	6,938	0,488	0,856	0,429
Mtn16	6	3,556	0,628	0,719	0,126
Mtn19	4	1,465	0,122	0,317	0,616
Mtn87	8	5,654	0,762	0,823	0,074
Mtn95	21	15,611	0,524	0,936	0,440
Média	9,714	5,864	0,509	0,703	0,305
Ic Inf	-	4,239	0,467	0,664	0,253
Ic Sup	-	6,597	0,574	0,767	0,343
Adultos BSQ-Rib					
Locus	Na	Ne	Ho	He	F
Mtn1	4	2,010	0,344	0,502	0,316
Mtn3	11	5,971	0,500	0,833	0,399
Mtn13	15	6,400	0,563	0,844	0,333
Mtn16	4	2,946	0,267	0,661	0,596
Mtn19	9	6,132	0,531	0,837	0,365
Mtn87	6	3,308	0,645	0,698	0,075
Mtn95	20	15,626	0,710	0,936	0,242
Média	9,857	6,056	0,508	0,759	0,332
Ic Inf	-	4,461	0,475	0,729	0,288
Ic Sup	-	6,730	0,549	0,801	0,375
Juvenis BSQ-Rib					
Locus	Na	Ne	Ho	He	F
Mtn1	4	2,299	0,423	0,565	0,251
Mtn3	12	5,661	0,429	0,823	0,479
Mtn13	13	8,253	0,607	0,879	0,309
Mtn16	4	1,989	0,222	0,497	0,553
Mtn19	9	6,423	0,556	0,844	0,342
Mtn87	5	3,344	0,741	0,701	-0,057
Mtn95	20	13,754	0,679	0,927	0,268
Média	9,571	5,960	0,522	0,748	0,307
Ic Inf	-	4,661	0,486	0,718	0,266
Ic Sup	-	6,622	0,572	0,790	0,367

Continuação Tabela 9.

Adultos FAC-Crav					
Locus	Na	Ne	Ho	He	F
Mtn1	2	1,385	0,259	0,278	0,067
Mtn3	9	6,976	0,778	0,857	0,092
Mtn13	12	6,231	0,444	0,840	0,471
Mtn16	4	1,420	0,333	0,296	-0,128
Mtn19	7	3,219	0,630	0,689	0,087
Mtn87	6	3,951	0,778	0,747	-0,041
Mtn95	15	10,563	0,231	0,905	0,745
Média	7,857	4,820	0,493	0,659	0,185
Ic Inf	-	3,863	0,446	0,618	0,091
Ic Sup	-	5,393	0,537	0,722	0,237
Juvenis FAC-Crav					
Locus	Na	Ne	Ho	He	F
Mtn1	2	1,619	0,394	0,382	-0,030
Mtn3	9	6,101	0,788	0,836	0,058
Mtn13	15	6,277	0,364	0,841	0,567
Mtn16	4	1,870	0,576	0,465	-0,238
Mtn19	7	3,050	0,727	0,672	-0,082
Mtn87	7	4,071	0,636	0,754	0,156
Mtn95	18	11,720	0,290	0,915	0,683
Média	8,857	4,958	0,539	0,695	0,159
Ic Inf	-	3,831	0,498	0,658	0,072
Ic Sup	-	5,515	0,581	0,747	0,225

Na= número de alelos; Ne= número efetivo de alelos; Ho= heterozigosidade observada; He= heterozigosidade esperada; F= Índice de fixação. Ic: Intervalo de confiança calculado via reamostragem jackknife.

Para todos os loci, exceto Mtn87, as frequências genotípicas mostraram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Analisando-se individualmente a população FAC-Crav, apenas três loci exibiram desvios significativos do EHW, enquanto as outras populações M13-Rib e BSQ Rib exibiram novamente 6 loci com desvios significativos (Tabela 10).

Tabela 10. Desvio do Equilíbrio de HW para os loci Mn.

Pop.	Geração	Mtn1	Mtn3	Mtn13	Mtn16	Mtn19	Mtn87	Mtn95
M13-Rib	Adultos	0,0562	0,002*	0*	0,0004*	0,0012*	0,6111	0*
	Juvenis	0,0025*	0,4139	0*	0*	0*	0,0274*	0*
	Total	0,0012*	0,0007*	0*	0*	0*	0,1497	0*
Bsq-Rib	Adultos	0,0484*	0*	0,00455*	0*	0,0001*	0,8142	0,0002*
	Juvenis	0,0007*	0*	0*	0,0002*	0,006*	0,5552	0*
	Total	0*	0*	0*	0*	0*	0,4412	0*
Crav-Rib	Adultos	0,5677	0,3164	0*	1	0,2827	0,5898	0*
	Juvenis	1	0,0006*	0*	0,5407	0,9644	0,5017	0*
	Total	1	0*	0*	0,6643	0,54	0,6492	0*
Total	Adultos	0,0002*	0*	0*	0*	0*	0,2286	0*
	Juvenis	0*	0*	0*	0*	0*	0,0009*	0*
	Total	0*	0*	0*	0*	0,0014*	0*	0*

*Desvio significativo ($P < 0,05$)

Como pode ser observado na tabela 11, os valores de K variaram entre os conjuntos amostrais, sendo o menor valor encontrado entre os indivíduos juvenis da população FAC-Crav ($K = 55$) e o maior entre os indivíduos juvenis da população BSQ-Rib ($K = 69$). Comparando-se as populações como um todo, o valor de K variou de 72 (FAC-Crav) a 80 (BSQ-Rib). Não houveram diferenças significativas entre as populações quanto ao número efetivo de alelos. Este índice variou de 5,444 (FAC-Crav) a 6,73 (BSQ-Rib). As populações exibiram elevados valores de heterozigosidade observada e esperada, ($H_o = 0,515$, $H_e = 0,765$ – BSQ-Rib; $H_o = 0,513$, $H_e = 0,704$ – M13-Rib; $H_o = 0,513$, $H_e = 0,688$ – FAC-Crav), no entanto não foram observadas diferenças significativas entre os conjuntos amostrais. O índice de fixação (F) foi positivo e diferente de zero para todos os conjuntos amostrais, indicando deficiência de heterozigotos, devido provavelmente a endogamia, ou ainda à presença de alelos nulos, cuja frequência por loco (FAN) pode ser observada na tabela 8. Os menores valores de F foram observados na população FAC-Crav (0,180) e os maiores na população BSQ-Rib (0,329) no entanto as diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 11. Caracterização da diversidade genética por população

População	N	K	Ne	Ho	He	F
M13-Rib (adultos)	37	66	5,397 (1,44)	0,516 (0,09)	0,695 (0,09)	0,265 (0,08)
M13-Rib (Juvenis)	43	68	5,864 (1,81)	0,509 (0,09)	0,703 (0,09)	0,305 (0,08)
BSQ-Rib (adultos)	32	62	6,056 (1,64)	0,508 (0,06)	0,759 (0,06)	0,330 (0,06)
BSQ-Rib (Juvenis)	28	69	5,960 (1,26)	0,522 (0,07)	0,748 (0,06)	0,307 (0,07)
FAC-Crav (adultos)	27	55	4,82 (1,25)	0,493 (0,09)	0,659 (0,1)	0,185 (0,12)
FAC-Crav (Juvenis)	33	63	4,958 (1,32)	0,539 (0,07)	0,695 (0,08)	0,159 (0,13)
P-ANOVA	-	-	0,987 ^{NS}	0,999 ^{NS}	0,955 ^{NS}	0,718 ^{NS}
Média	-	63,8	5,509	0,515	0,710	0,259

População	N	K	Ne	Ho	He	F
M13-Rib	80	76	6,02 (1,87)	0,513 (0,09)	0,704 (0,09)	0,291 (0,08)
BSQ-Rib	60	80	6,73 (2,05)	0,515 (0,06)	0,765 (0,06)	0,329 (0,07)
FAC-Crav	60	72	5,444 (1,66)	0,519 (0,08)	0,688 (0,09)	0,180 (0,12)
P-ANOVA	-	-	0,889 ^{NS}	0,999 ^{NS}	0,777 ^{NS}	0,500 ^{NS}
Média	-	76	6,065	0,515	0,719	0,267

(^{NS}) Erro Padrão, N= Número de indivíduos, K número total de alelos, Ne= número efetivo de alelos; Ho= heterozigosidade observada; He= heterozigosidade esperada; F= Índice de fixação

Na análise considerando as diferentes gerações em cada população, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos parâmetros analisados.

Como pode ser visto na tabela 12, as populações exibiram valores de Coeficiente de Parentesco (r) (Valor análogo ao Coeficiente de Coancestria Θ) próximo de zero para os três métodos analisados.

Para o prosseguimento da análise, foi escolhido o coeficiente de parentesco segundo Lynch & Ritland (1999), por ter oferecido valores intermediários aos outros dois métodos. Os valores de r calculados segundo esta metodologia exibiram uma variação de -0,297 (não há relação de parentesco) a 0,901 (próximo aos valores de indivíduos clonais). Analisando-se as populações individualmente, observa-se os maiores valores de r na população M13-Rib (0,858), seguido das populações BSQ-Rib (0,742) e FAC-Crav (0,727), revelando a presença de indivíduos altamente aparentados dispersos no meio de indivíduos sem correlação de parentesco dentro das populações.

Tabela 12. Coeficiente de parentesco mínimo, médio e máximo por população.

	Valor	RI	LR	QG
M13-Rib	Médio	-0,009	-0,013	-0,015
	Mínimo	-0,125	-0,296	-0,835
	Máximo	0,623	0,858	0,713
Bsq-Rib	Médio	-0,010	-0,017	-0,016
	Mínimo	-0,114	-0,281	-0,465
	Máximo	0,522	0,742	0,744
Fac-Crav	Médio	-0,011	-0,018	-0,018
	Mínimo	-0,117	-0,355	-0,520
	Máximo	0,432	0,727	0,754

RI= Coeficiente de Parentesco segundo Ritland (1996); LR= Coeficiente de Parentesco segundo Lynch & Ritland (1999), QG: Coeficiente de Parentesco segundo Queller & Goodnight (1989).

4.2. ESTRUTURA GENÉTICA, ANCESTRALIDADE E ANÁLISES DE AGRUPAMENTO DE TRÊS POPULAÇÕES DE *M. NIGRA* UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES SSR E ISSR.

Estrutura genética. A estrutura genética das populações dos três fragmentos em questão foi acessada por duas metodologias neste trabalho. Segundo a Análise de Variância Molecular (AMOVA), a maior parte da variabilidade genética se encontra dentro das populações, tendo a análise por marcadores ISSR indicado um valor maior ($\Phi_{st} = 0,27$) do que a análise por marcadores SSR ($\Phi_{st} = 0,13$) (Tabela 13). A análise da estatística F indicou baixa diferenciação entre as populações (ISSR: $G_{st} 0,159$; SSR: $G_{st} 0,062$ e $F_{st} 0,062$), sendo observado um alto valor de fluxo gênico histórico entre os fragmentos ($N_m = 2,633$ /ISSR e $N_m = 7,510$ /SSR) (Tabela 14).

Tabela 13. Análise de Variância Molecular (AMOVA).

Marcadores ISSR				
Valor	gl	SQ	VE.	%*
Entre populações, Φ_{st}	2	811,881	5,912	27%
Dentro de populações, Φ_{ct}	197	3103,333	15,753	73%
Total	199	3915,214	21,665	100%
Marcadores SSR				
Valor	gl	SQ	VE.	%*
Entre populações, Φ_{st}	2	144,760	0,994	13%
Dentro de populações, Φ_{ct}	197	1330,600	6,754	87%
Total	199	1475,360	7,749	100%

Graus de Liberdade (gl), soma dos quadrados (SQ), variância estimada (VE) e porcentagem da variância total (%). * $P < 0.001$

Tabela 14. Diferenciação Genética das populações estudadas.

Marcadores ISSR					
	H_t	H_s	G_{st}	F_{st}	N_m
Média	0,309	0,259	0,159	-	2,633
Desvio Estatístico	0,024	0,019	-	-	-
Marcadores SSR					
	H_t	H_s	G_{st}	F_{st}	N_m
Média	0,772	0,719	0,062	0,062	7,510
Desvio Estatístico	0,066	0,068	-	-	-

H_t = Heterozigosidade total; H_s = Heterozigosidade media intrapopulacional; G_{st} = Coeficiente de diferenciação; N_m = fluxo gênico histórico.

As populações dos fragmentos FAC-Crav e BSQ-Rib exibiram maior similaridade genética entre si do que em relação à população do fragmento M13-Rib na análise pelos dois marcadores, sendo maiores os valores de similaridade genética indicados pelos marcadores ISSR (Tabela 15).

Tabela 15. Similaridade Genética de Nei's (1978) (acima da diagonal) e distância geográfica entre os fragmentos (km) (abaixo da diagonal).

Marcadores ISSR			
Pop ID	M13-Rib	BSQ-Rib	FAC-Crav
M13-Rib	-	0,8874	0,8938
BSQ-Rib	21,25	-	0,9263
FAC-Crav	26,25	19,10	-
Marcadores SSR			
Pop ID	M13-Rib	BSQ-Rib	FAC-Crav
M13-Rib	-	0,694	0,708
BSQ-Rib	21,25	-	0,758
FAC-Crav	26,25	19,10	-

Ancestralidade. Os resultados da análise de ancestralidade e estrutura genética sugerem que as populações dos fragmentos estudados dividem-se em três clusters genéticos. Dos três cenários avaliados, o modelo onde se atribuiu um valor de $K = 3$ apresentou a maior probabilidade *a posteriori* logaritmizada ($\log P(X|K)$) nas análises com ambos os marcadores. Os valores médios de *Alpha* obtidos sugerem uma baixa mistura entre as três populações (Tabela 16). A tabela 17 exibe a proporção de ancestralidade dos três clusters genéticos assumidos para as três populações. Observa-se que a população mais “pura” é a população do fragmento FAC-Crav, que exibe as maiores proporções de composição genética de um único cluster (B). A população com mais mistura genética é a população BSQ-Rib, sendo este resultado mais claramente observado na análise por marcadores SSR (Figura 19).

Tabela 16. Valor dos logaritmos das probabilidades *a posteriori* $\log P(X|K)$ e valores médios de alfa para cada K atribuído.

Marcadores ISSR		
K	$\log P(X K)$	Alpha médio
3	-9789,4	0,0312
2	-10496,7	0,0381
1	-11809,9	-
Marcadores SSR		
3	-4992,1	0,0557
2	-5198,6	0,0800
1	-5546,8	

Tabela 17. Proporção de ancestralidade dos *clusters* genéticos assumidos entre as três populações da espécie *M. nigra* na Região de Ribeirão Preto (SP).

Marcadores ISSR				
Pop/Cluster	A (Vermelho)	B (Verde)	C (Azul)	N
M13-Rib (1)	0,006	0,019	0,975	80
BSQ-Rib (2)	0,969	0,013	0,018	60
Fac-Crav (3)	0,007	0,987	0,006	60
Marcadores SSR				
M13-Rib (1)	0,060	0,085	0,855	80
BSQ-Rib (2)	0,671	0,082	0,247	60
Fac-Crav (3)	0,082	0,869	0,049	60

Figura 19. Ancestralidade de três populações da espécie *M. nigra* na Região de Ribeirão Preto (SP), analisadas por meio de Marcadores ISSR (acima) e Marcadores SSR (abaixo).

Análises de agrupamento. Tanto na análise de coordenadas principais (PCoA) (Figura 20) quanto no dendrograma UPGMA (Figura 21) gerados pelos dados obtidos com marcadores ISSR, os indivíduos das três populações de *M. nigra* formaram grupos separados. A análise PCoA foi utilizada para investigar a posição relativa das

populações em um espaço multidimensional. A maior parte da variância ficou dividida entre as duas primeiras coordenadas (38,89% e 21,77%). Um gráfico de dispersão dessas duas coordenadas separou claramente as três populações e ilustrou ausência de sub-populações totalmente diferenciadas dentro delas.

Figura 20. Análise de Coordenadas Principais de três populações (M13-Rib em azul, BSQ-Rib em vermelho e FAC-Crav em verde) da espécie *M. nigra* na Região de Ribeirão Preto (SP) realizadas com marcadores ISSR (Acima) e SSR (Abaixo).

Quando realizada a análise utilizando-se dados dos marcadores SSR a PCoA indicou uma tendência de separação entre as populações, no entanto, no centro do gráfico, indivíduos dos três grupos se encontram misturados indicando grande similaridade genética entre eles. A divergência entre a análise entre os dois marcadores deve-se provavelmente ao menor número de loci analisados por meio de marcadores SSR (apenas 7), apesar destes serem mais informativos que os marcadores ISSR.

Figura 21. Dendrograma UPGMA gerado pela análise com marcadores ISSR para 200 indivíduos pertencentes a três populações de *M. nigra* (M13-Rib, BSQ-Rib e Fac-Crav) na região de Ribeirão Preto (SP).

Com ambos os marcadores, quando realizada a PCoA, separando adultos e juvenis, observou-se que não existe diferenciação genética entre as duas gerações (Figura 22).

Figura 22. Análise de Coordenadas Principais de três populações da espécie *M. nigra*, considerando-se indivíduos adultos (azul) e juvenis (vermelho) na Região de Ribeirão Preto (SP) realizadas com marcadores ISSR (Acima) e SSR (Abaixo)

4.3. ESTRUTURA GENÉTICA ESPACIAL EM MICRO-ESCALA E DISTRIBUIÇÃO DOS INDIVÍDUOS EM TRÊS POPULAÇÕES DE *M. NIGRA* UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES SSR E ISSR.

Estrutura genética espacial entre as populações. A análise de autocorrelação espacial detectou uma alta e significativa estruturação genética espacial (EGE) nas três populações em nas primeiras classes de distância, tendo ambos os marcadores, demonstrado resultados semelhantes (Figuras 23 e 24). A população do fragmento BSQ-Rib exibiu EGE mais forte que os outros fragmentos estudados. Autocorrelações positivas e significativas foram observadas nos primeiros metros em cada um dos três grupos genéticos. A população M13-Rib exibiu correlações positivas em menores distancias (até 15m) enquanto as populações do BSQ-Rib e FAC-Crav exibiram correlações positivas até as distâncias de 25 e 40m. Interseções ao eixo x ocorreram entre 25,1 e 47,5 m na análise por marcadores ISSR e 16,5 e 24,8 metros, com os marcadores SSR (Tabela 18). Em todos os correlogramas foram observadas oscilações entre valores altos e baixos de r em maiores classes de distância. A população BSQ-Rib também exibiu correlações negativas e significativas nas classes de distância acima de 40 metros e menor similaridade genética entre indivíduos mais distantes geograficamente.

Tabela 18. Caracterização da estrutura genética espacial dos três fragmentos

Marcador	População	N	Int	r^1	P
ISSR	M13-Rib	80	25,1	0,133	0,001*
	BSQ-Rib	60	33,12	0,21	0,001*
	FAC-Crav	60	47,58	0,153	0,001*
SSR	M13-Rib	80	22,91	0,093	0,001*
	BSQ-Rib	60	24,82	0,08	0,001*
	FAC-Crav	60	16,58	0,039	0,002*

N: Número de indivíduos, Int: Distância da primeira interseção ao eixo X, r^1 : Coeficiente de autocorrelação espacial na primeira classe de distância, P: Significância do valor de r a 95%. NS: ausência de autocorrelação.

Figura 23. Análise de Mantel para as populações M13-Rib (a), BSQ-Rib (b) e Fac-Crav (c) a partir de dados de marcadores ISSR (A.1, B.1, C.1) e SSR (A.2, B.2, C.2).

Figura 24. Correlogramas de Autocorrelação Espacial para as populações M13-Rib (a), BSQ-Rib (b) e Fac-Crav (c) a partir de dados de marcadores ISSR (A1, B1 e C1) e SSR (A2, B2 e C2). Linhas tracejadas representam o intervalo de confiança (95%) para $r = 0$. Linhas verticais representam o intervalo de confiança (95%) para cada valor de r calculado. Pontos marcados com caixas denotam valores de r significativamente diferentes de 0 indicando estruturação genética.

Estrutura genética espacial entre as gerações. Na análise considerando as diferentes gerações todos os conjuntos amostrais exibiram estruturação genética espacial na primeira classe de distância (10 m), a exceção dos indivíduos adultos da população FAC-Crav (Tabela 19, Figura 25). Nos fragmentos M13-Rib e BSQ-Rib não foram observadas diferenças entre as duas gerações. Os maiores valores de r foram observados nos adultos e juvenis da população BSQ-Rib indicando maior EGE nestes conjuntos amostrais. Interseções ao eixo x ocorreram entre 19,4 e 30,1 metros para os marcadores ISSR e 11,9 e 25,9 m para os marcadores SSR. Para as populações M13-Rib e BSQ-Rib, foram observadas oscilações entre valores altos e baixos de r em maiores classes de distância ocorrendo correlações negativas e significativas nas classes de distância acima de 40 metros, sugerindo que nestes fragmentos indivíduos mais distantes geograficamente são geneticamente menos similares.

Tabela 19. Caracterização da estrutura genética espacial dos três fragmentos em diferentes gerações.

Marcador	População	N	Int	r^1	P
ISSR	M13-Rib (adultos)	37	23,47	0,125	0,001*
	M13-Rib (Juvenis)	43	22,58	0,088	0,001*
	BSQ-Rib (adultos)	32	29,25	0,156	0,001*
	BSQ-Rib (Juvenis)	28	30,18	0,196	0,001*
	FAC-Crav (adultos)	27	19,4	0,039	0,17 ^{NS}
	FAC-Crav (Juvenis)	33	21,7	0,058	0,001*
SSR	M13-Rib (adultos)	37	24,85	0,072	0,001*
	M13-Rib (Juvenis)	43	25,94	0,075	0,001*
	BSQ-Rib (adultos)	32	18,40	0,085	0,001*
	BSQ-Rib (Juvenis)	28	19,15	0,054	0,001*
	FAC-Crav (adultos)	27	28,14	0,02	0,175 ^{NS}
	FAC-Crav (Juvenis)	33	11,9	0,039	0,019*

N: Número de indivíduos, Int: Distância da primeira interseção ao eixo X, r^1 : Coeficiente de autocorrelação espacial na primeira classe de distância, P: Significância do valor de r a 95%. NS: autocorrelação não significativa.

Figura 25. Correlogramas de Autocorrelação Espacial para as populações M13-Rib (a), BSQ-Rib (b) e Fac-Crav (c) a partir de dados de marcadores ISSR (esquerda) e SSR (direita) considerando as gerações de adultos e juvenis. Linhas tracejadas representam o intervalo de confiança (95%) para $r = 0$. Linhas verticais representam o intervalo de confiança (95%) para cada valor de r calculado. Pontos marcados com caixas denotam valores de r significativamente diferentes de 0 indicando estruturação genética.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho se apresenta o primeiro estudo da diversidade e estrutura genética, ancestralidade, agrupamento e estrutura genética espacial de três populações, com diferentes históricos de conservação e tamanho, da espécie florestal *Metrodorea nigra* na Região de Ribeirão Preto (SP).

5.1. Diversidade Genética

Apesar das grandes diferenças em tamanho e histórico dos três fragmentos seleccionados para esta pesquisa (FAC-Crav/, BSQ-Rib/, M13-Rib), todas as populações de *M. nigra* analisadas exibiram altos valores de polimorfismo e de diversidade genética com ambos os marcadores moleculares utilizados, os quais foram eficientes para diferenciar os 200 indivíduos amostrados. Apesar de uma menor porcentagem de loci polimórficos e número de alelos terem sido observadas nas populações FAC-Crav e BSQ-Rib, em relação à população M13-Rib, nenhum dos outros parâmetros avaliados diferiram estatisticamente entre os três conjuntos populacionais, indicando que por si só, a redução de habitat tem pouco efeito sobre a variabilidade genética da espécie *M. nigra*.

Nenhum indivíduo clonal foi identificado, apesar de alguns exibirem altos valores de coeficiente de parentesco ($r > 0,5$), o que pode significar a ausência de apomixia nesta espécie. O valor médio de r de acordo com Lynch & Ritland (1999) observado foi próximo a 0 em todos os conjuntos de indivíduos avaliados, no entanto os valores máximos observados diferiram entre as três populações, sendo os maiores valores encontrados na população M13-Rib. Apesar do menor tamanho (3 ha), o fragmento BSQ-Rib exibiu um maior número de alelos, indicando que a população abriga a maior parte da variabilidade genética dentre os indivíduos analisados. No entanto, a

população também exibiu um alto valor de Índice de Fixação (F), o que indica uma alta deficiência de heterozigotos para este conjunto amostral. Segundo Nybom (2004) o déficit de heterozigotos observado em análises com microssatélites pode também ser devida a presença de alelos nulos dentro dos loci estudados.

O valor de F foi menor nas outras populações analisadas, sendo a população FAC-Crav a que apresentou o menor índice de fixação. Apesar de fragmentos menores terem a tendência de exibirem menores valores de diversidade, o fragmento FAC-Crav (8 ha) tem um melhor histórico de conservação, estando mais protegido de perturbações do que os fragmentos BSQ-Rib e M13-Rib, como sugerem também os resultados da análise de EHW onde quatro dos sete loci analisados foram observados em equilíbrio contra apenas um locus nas outras duas populações.

Na análise considerando as diferentes gerações tanto com os marcadores ISSR quanto com os marcadores SSR, não foram observadas diferenças estatísticas entre os índices de diversidade das gerações de indivíduos adultos e juvenis. Schwarcz et al., (2010) analisando populações naturais da espécie *M. nigra* com marcadores isoenzimáticos obteve valores médios de heterozigosidade esperada e observada de 0,633 e 0,224, sendo bastante inferiores aos encontrados no presente estudo, além de um valor médio do índice de fixação de 0,641, que é bem superior aos valores encontrados nas três populações analisadas. Observa-se, no entanto, que marcadores isoenzimáticos tem a tendência de exibir menor polimorfismo e menor número de alelos que os marcadores SSR o que pode explicar estas diferenças. De forma semelhante ao presente estudo, estes autores não encontraram diferenças marcantes entre as gerações de indivíduos adultos e juvenis, nem as populações de fragmentos de diferentes tamanhos o que é um forte indicativo da tolerância da espécie aos efeitos da fragmentação e redução de habitat.

Os resultados de diversidade genética observados para *M. nigra* contrastam com os esperados para populações em fragmentos florestais reduzidos, relacionados a menor diversidade genética e riqueza alélica devido ao efeito da deriva genética e aumento da endogamia (Templeton et al., 1990; Lowe et al., 2005). Altos níveis de diversidade genética em populações naturais fragmentadas foram também relatadas em diversas espécies florestais tropicais como *Caesalpinia echinata* (Cardoso et al., 1998), *Brongniartia vazquezii* (Gonzalez-Astorga & Núñez-Farfán, 2001), *Acrocomia aculeata* (Oliveira et al., 2012), *Dimorphandra mollis* (Oliveira et al., 2008), *Trichilia pallida* (Zimback et al., 2004) e *Cariniana strellensis* (Guidugli, 2011).

Marcadores dominantes, apesar do seu menor nível de informatividade em comparação a marcadores co-dominantes, têm sido frequentemente usados para estudos de diversidade em espécies vegetais, sendo a porcentagem de loci polimórficos (PLP) uma das medidas mais utilizadas como indicador de diversidade genética nessas espécies (Muhlen et al., 2000; Aga et al., 2005; Xia et al., 2007; Julio et al., 2008; Kumar, et al., 2009; Moraes Filho et al., 2013; Phong et al., 2011; Oliveira et al., 2012; Zhang et al., 2013). Os valores de PLP obtidos nesta análise foram bastante superiores aos observados por Xia et al. (2007) (21,97% a 48,8%) em populações naturais de *Rhodiola chrysanthemifolia*, e semelhantes aos observados por Zimback et al., (2004), (90,3% to 97,3%) em populações de *Trichilia pallida* e Zhang et al., (2013) (84% a 90%) em populações naturais de *Larix gmelinii*.

O número médio de alelos por loco encontrado nesta pesquisa (14,85) usando marcadores SSR, foi bastante semelhante ao observado em outras espécies arbóreas tropicais como *Eugenia uniflora* (14,4; Ferreira-Ramos et al., 2008) e *Euterpe edulis* (14,7; Conte et al., 2006). O índice de diversidade genética em *M. nigra* ($H_e=0,771$) foi compatível aos observados em outras espécies

florestais brasileiras como *Aspidosperma polyneuron* (0,611 Ferreira-Ramos, 2012), *Cariniana legalis* (0,721; Leal et al., 2014), *E. edulis* (0,781; Conte et al., 2006), *E. uniflora* (0,83; Ferreira-Ramos et al., 2008) e *Manilkara huberi* (0,86; Azevedo et al., 2007).

Assim, tanto a metodologia ISSR quanto a metodologia SSR, provaram-se ferramentas efetivas para o estudo de diversidade genética da espécie florestal *M. nigra*, dando respostas semelhantes em todos os aspectos analisados.

5.2. Estrutura Genética

Estimativas de diferenciação genética entre populações por meio de marcadores dominantes são frequentemente realizadas utilizando-se o parâmetro *Gst* de acordo com Nei (1973) ou a análise de variância molecular (AMOVA - Φ_{st}). Em estudos com marcadores ISSR os valores médios dos dois estimadores tem sido bastante similares. Para estudos com marcadores microssatélites, a diferenciação populacional é em geral estimada pelo uso do parâmetro *Fst* (Weir & Cockerham, 1984) e também pelo parâmetro *Gst* (Nybom, 2004).

Os resultados da análise com os marcadores ISSR mostraram uma maior diferenciação genética entre as populações do que os obtidos pelos marcadores SSR, tanto pelos parâmetros *Gst* e *Fst* quanto pela AMOVA. Apesar das diferenças, ambos os marcadores sugerem que há uma razoável diferenciação entre as populações, apesar da maior parte da variabilidade genética estar distribuída dentro das mesmas.

M. nigra é descrita como uma espécie alógama, auto-incompatível, e de dispersão barocórica de sementes. Seus principais polinizadores são moscas das famílias Muscidae e Faniidae que são atraídos por um odor desagradável característico, emitidos pelas suas flores (Pombal & Morellato, 2000; Souza et al., 2008). Espécies

alógamas e particularmente espécies arbóreas exibem a maior parte da diversidade genética dentro de suas populações (Hamrick, 1990; Aagaard, 1998).

Os valores de *Gst* observados nesse estudo concordam com o esperado para espécies de fecundação cruzada ($Gst < 19\%$) (Hamrick & Godt, 1996). Os altos valores de *Nm* encontrados também estão de acordo com o esperado para árvores tropicais (Reis, 1996), sugerindo, apesar do atual isolamento, a ocorrência de um forte fluxo gênico *histórico* entre as populações estudadas e que estas, evidenciando sua conexão no passado.

5.3. Ancestralidade e Análise de Agrupamento

A análise de ancestralidade pelo software Structure 2.0 corroborou os resultados da análise de agrupamento UPGMA e a análise de coordenadas principais atribuindo cada uma das três populações a um cluster genético distinto. Os valores de α observados nas análises com ambos os marcadores indicam uma baixa mistura genética entre as populações. Segundo Falush et al., (2003) valores de α superiores a 1 indicam alta homogeneização genética e valores próximos a 0 indicam diferenciação genética. Os valores obtidos pelos marcadores ISSR (0,0312) foram inferiores aos obtidos pelos marcadores SSR (0,0557) indicando uma maior resolução destes marcadores para diferenciar indivíduos de uma mesma população, o que se dá provavelmente pelo maior número de loci obtidos com esta técnica, apesar da sua menor informatividade devido à sua característica dominante. Os resultados obtidos com ambos os marcadores estão de acordo com o esperado para espécies autocóricas e com polinizadores de curto potencial de dispersão de pólen, sustentando o isolamento reprodutivo atual entre as três populações.

5.4. Estrutura Genética Espacial (EGE)

O conhecimento da EGE de espécies florestais é de grande importância para programas de conservação e reflorestamento. As classes de distâncias representadas nos correlogramas fornecem informações tanto para o manejo quanto para programas de melhoramento e recuperação de áreas degradadas indicando a distância mínima de coleta de germoplasma entre indivíduos de populações naturais de forma a obter maior variabilidade genética (Cloutier et al., 2007).

A análise da EGE considerando apenas os fragmentos indica que os indivíduos de *M. nigra* não estão aleatoriamente distribuídos em nenhuma das três populações. Autocorrelações espaciais positivas e significativas foram encontradas nas primeira e segunda classes de distância (10 e 20 metros) de todas as populações analisadas, como esperado dentro do modelo de isolamento por distância (Wright 1943). Os dados obtidos com ambos os marcadores indicam uma maior presença de EGE na população do fragmento BSQ-Rib. Fortes autocorrelações espaciais positivas foram observadas em um raio de 10 a 25 metros em todas as populações indicando a formação de agrupamentos familiares de indivíduos altamente aparentados. Autocorrelações espaciais negativas, no entanto, foram observadas principalmente na população BSQ-Rib, a partir dos 40 metros, o que demonstra que neste fragmento, indivíduos geograficamente afastados têm a tendência de serem geneticamente mais distintos. Este fato, aliado a alta deficiência de heterozigotos observada para esta população, pode indicar a ocorrência de efeito Wahlund, onde a formação de subpopulações como previsto no modelo de isolamento por distância reduz a heterozigosidade total de uma população.

Apesar da tendência de que a redução de habitat leve a um aumento na estruturação genética de populações pelo aumento dos

cruzamentos endogâmicos, observa-se, no entanto, que para *M. nigra* o tamanho do fragmento florestal não é o único fator determinante para a existência de EGE, devido à baixa estruturação genética observada na população FAC-Crav, de apenas 8 ha (Figura 12). Quando levadas em consideração as gerações isoladamente, observa-se que a geração de indivíduos adultos do fragmento FAC-Crav não exhibe estruturação genética espacial e uma baixa estruturação para a geração de indivíduos juvenis. Este fato pode ser explicado pelo nível de perturbação do fragmento florestal e pela ocorrência de fatores abióticos como corte seletivo e queimadas, as quais os fragmentos M13-Rib (64 ha) e BSQ-Rib (18 ha) vêm sendo submetidos nas últimas décadas (Kotchetskoff-Henriques, 2003), em contraste com o fragmento FAC-Crav que está isolado e cercado em uma propriedade particular.

Vekermans & Hardy (2004) demonstraram que a EGE de espécies florestais é significativamente relacionada com seu sistema de cruzamento e densidade populacional, sendo que espécies alógamas e com populações de alta densidade exibem menor estruturação genética. O corte seletivo, no entanto, pode modificar a estrutura genética espacial em uma determinada região, por alterar os padrões de fluxo gênico e de endogamia de uma espécie (Cloutier et al., 2007), o que parece ser o caso das populações de *M. nigra* nos fragmentos M13-Rib e BSQ-Rib.

A presença de altas relações de similaridade genética na vizinhança de até 15 metros é provavelmente devida ao sistema de dispersão barocórico de *M. nigra*, no qual as sementes são disseminadas nas vizinhanças do parental materno, formando grupos de indivíduos aparentados, geograficamente muito próximos um do outro. O sistema de dispersão de sementes de curto alcance tem sido associado com a estruturação genética espacial em espécies vegetais (Hardy et al., 2006; Azevedo et al., 2007; Bell et al., 2012; Vieira et al., 2010). A formação de famílias de indivíduos agregados

especialmente com altas relações de similaridade genética distribuídas dentro de uma população de indivíduos geneticamente menos relacionados, foi também observada em espécies como *Vaccinium angustifolium* (Bell et al., 2012), *Myrcia splendens* (Brandão et al., 2011) e *Manilkara huberi* (Azevedo et al., 2007) o que provavelmente se produz pela germinação de sementes na vizinhança do parental materno.

A baixa estruturação em distâncias maiores sugere a ocorrência de fluxo gênico entre os agregados familiares. O fluxo de pólen é o provável responsável pela distribuição dos alelos dentro das populações e a redução da endogamia entre estes agregados familiares geograficamente separados. Estudos recentes têm ressaltado a importância do fluxo de pólen para a distribuição da variabilidade genética em espécies florestais (Cloutier et al., 2007; Lourmas et al., 2007; Silva et al., 2008; Martins et al., 2012), no entanto, o corte seletivo de adultos e a abertura de clareiras pode limitar o movimento dos polinizadores e reduzir o cruzamento entre indivíduos mais distantes entre si.

As análises de estruturação genética espacial também indicam que a distância mínima ideal entre as árvores doadoras de sementes para programas de reflorestamento é de 40 metros, para que assim se capture uma maior variabilidade genética e se evite a coleta de sementes com alto parentesco genético.

6. CONCLUSÕES

1. Não foram observadas diferenças entre as gerações de adultos e juvenis em nenhuma das três populações, o que indica que as atuais pressões não alteraram a composição genética das populações analisadas.
2. As análises de agrupamento e ancestralidade demonstraram que as populações dos três fragmentos provavelmente já foram conectadas, dado os altos valores de fluxo gênico histórico, porém estão em processo de diferenciação genética, sendo este processo mais claramente observado na análise por marcadores ISSR.
3. Fragmentos de maior tamanho não necessariamente abrigam populações mais íntegras do ponto de vista genético, tendo também grande importância o histórico de conservação e perturbações as quais estes fragmentos estão submetidos.
4. Com a análise de EGE em micro-escala foi possível observar que *M. nigra* exibe estruturação genética espacial em curtas distâncias (até 20 metros), com formação de agregados familiares locais com indivíduos altamente relacionados geneticamente. A EGE foi mais forte no fragmento BSQ-Rib, provavelmente devido à presença de trilhas dentro do fragmento e ao seu histórico de corte seletivo.

5. O limitado sistema de dispersão de sementes da espécie, também é provável causa da formação destes agregados. Em contrapartida o fluxo gênico de pólen provavelmente atua como homogeneizador da população, realizando troca de alelos entre indivíduos mais distantes geograficamente, devida as altas similaridades genéticas entre indivíduos distando até 300 metros entre si no fragmento FAC-Crav.
6. Diferenças entre indivíduos adultos e juvenis foram observadas apenas no fragmento FAC-Crav, onde os indivíduos adultos não exibiram estrutura genética espacial, estando os seus genótipos distribuídos aleatoriamente.
7. Os marcadores ISSR e SSR exibiram elevado polimorfismo, sendo capazes de diferenciar indivíduos dentro e entre populações da espécie *M. nigra*, apresentando resultados semelhantes em todas as análises, sendo os marcadores ISSR razoavelmente mais sensíveis para a detecção de diversidade entre populações do que os marcadores SSR.

7. CONSIDERAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE

7.1. CONDIÇÃO ATUAL DOS FRAGMENTOS FLORESTAIS ESTUDADOS

O isolamento dos fragmentos da região de Ribeirão Preto (SP) analisados nesta pesquisa, provavelmente data da época do ciclo do café no século XIX quando grande quantidade de mata nativa foi suprimida.

Nos fragmentos M15 (161 ha) e M11 (117 ha) (Figura 9), apesar de serem os maiores remanescentes visitados, mostraram alto nível de degradação. Foram observados indícios de queimadas, além de presença de lianas crescendo nas clareiras deixadas pelo corte das árvores de maior porte (Figura 10). No fragmento M15, também observou-se entulho espalhado no meio da mata devido a sua localização próxima de populações humanas. Em ambos fragmentos poucos indivíduos de *M. nigra* foram avistados (9 em M15 e 1 em M11), provavelmente devido ao grande número de clareiras ou ao corte seletivo das árvores adultas dessa espécie e de outras típicas das matas estacionais semidecíduais.

O fragmento M13 (64 ha) (Figura 9) também exibiu sinais de queimada e corte de árvores, sendo boa parte de sua área ocupada por mato alto, arbustos e árvores de pequeno porte. No entanto, no centro da mata foi possível observar a ocorrência da espécie *M. nigra* em grande frequência e densidade.

Em geral observou-se que estes três fragmentos (M15, M11 e M13) encontram-se completamente abertos e susceptíveis tanto a queimadas, devido ao plantio próximo de cana-de-açúcar, quanto ao corte seletivo de árvores pela população rural do município (Kotchetkoff-Henriques, 2003).

O fragmento florestal da fazenda águas claras em Cravinhos, (FAC-Crav) (8 ha) apesar de ser menor que os anteriores remanescentes, apresentou melhores condições de conservação. Neste remanescente, as árvores de *M. nigra* crescem sob a sombra de árvores de grande porte como Peroba (*Aspidosperma polyneuron*, Ferreira-Ramos et al., 2011), pau-de-alho (*Gallesia integrifolia*) e Jequitibá-branco (*Cariniana estrellensis*, Guidugli et al., 2009), entre outras, e pouca ocorrência de clareiras. O fragmento encontra-se totalmente cercado e o acesso de pessoas e animais é controlado, embora no passado o gado podia invadir o remanescente, colocando em perigo a sobrevivência de regenerantes das diferentes espécies de este tipo de floresta (Guidugli, 2011; Ferreira-Ramos, 2012). Há no solo da floresta troncos de grandes árvores como resultado de quedas naturais e não foram observados sinais de corte seletivo ou de queimadas.

O fragmento florestal do Bosque Municipal de Ribeirão Preto (BSQ-Rib) (~3 ha), localizado no centro de Ribeirão Preto na área de proteção do Morro de São Bento, exibiu uma grande quantidade de indivíduos de *M. nigra* dos diferentes estágios de crescimento, dispostos ao longo de uma trilha e de um talude, os quais crescem sombreados por árvores de grande porte como Peroba (*Aspidosperma polyneuron*), Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*), entre outras. Observou-se a presença de animais como macacos e outros mamíferos de pequeno porte, além da ocorrência de clareiras formadas pela queda de algumas árvores tombadas naturalmente. Por ser fechado ao acesso público, atualmente encontra-se protegido contra pressões antrópicas, no entanto, existem relatos de agricultura e corte seletivo dentro da área do fragmento até a década de 60.

Nos fragmentos M13-Rib, FAC-Crav e BSQ-Rib, selecionados para esta pesquisa pelos seus diferentes tamanhos, localização e histórico de conservação e manejo, observou-se a presença de agrupamentos locais de indivíduos adultos e regenerantes da espécie

M. nigra, alvo desta pesquisa. As análises genéticas indicaram forte estruturação genética espacial nos fragmentos M13-Rib e BSQ-Rib, mas não no fragmento FAC-Crav, assim como um menor déficit de heterozigotos (menor F) para esta população.

Levando-se em consideração a diferença de tamanho entre os três fragmentos e a diferença nos padrões de estrutura genética espacial, é possível observar que a estruturação observada em M13-Rib e BSQ-Rib, com 64 e 3 hectares respectivamente, está mais relacionada ao seu estado de conservação e a alta presença de clareiras, do que com a área do fragmento em si, já que o fragmento FAC-Crav, de 8 hectares apresentou a menor EGE dentre as três áreas.

Apesar das diferenças em seu tamanho e sua constituição genética, os três fragmentos possuem populações com altos níveis de diversidade. Pelas suas localizações, BSQ-Rib e FAC-Crav dificilmente poderão um dia ser conectados a outros fragmentos florestais, estando suas populações condenadas ao isolamento. Recomenda-se para o BSQ-Rib o fechamento da trilha que se observa no meio do fragmento para que ocorra um adensamento da mata em todo o seu percurso e se evite a formação de sub-populações e o isolamento reprodutivo de alguns indivíduos. O fragmento M13-Rib, por se localizar próximo de outros fragmentos florestais (M11 e M15) e de uma região ribeirinha (e portanto, uma área de proteção permanente) (Figura 9) tem um maior potencial e valor de conservação, já tendo sido indicado para a formação de um corredor ecológico (Kotchetskoff-Henriques, 2003).

De acordo as observações em campo e aos resultados das análises genéticas geradas nesta pesquisa, a ocorrência de *M. nigra* em remanescentes da mata estacional semidecidual da região de Ribeirão Preto e dependente do estado de conservação do remanescente florestal, mais que ao tamanho do mesmo. Nos fragmentos que apresentam abertura de clareiras e corte seletivo,

observou-se uma redução da ocorrência de *M. nigra* (fragmento M11/117 ha) ou até quase seu completo desaparecimento (Fragmento M15/164 ha).

Assim, conclui-se, que a espécie florestal *M. nigra* se mostra como um potencial indicador ecológico, por sua ocorrência e densidade estar associada à integridade dos fragmentos da Floresta estacional semidecidual.

8. REFERÊNCIAS

- AAGAARD, J. E. et al., RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiations among populations and races of Douglas-fir. **Heredity**, v.81, n.1, p.69-78, 1998.
- AGA E.; BEKELE E.; BRYNGELSSON T. Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. **Genetica**. v. 124, n.2, p.213-221, 2005.
- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOBO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 5177-5188, 2008.
- ALVES, R. M. **Caracterização genética de populações de cupuazeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex. Spreng) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos**. ESALQ, 146p. Tese (Doutorado) – Departamento de Genética, ESALQ, Piracicaba, 2002.
- ALVES, R.M. et al., Mating system in natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Shumm. **Genetics and Molecular Biology**, v. 79, p. 20-31, 2003.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. An efficient and rapid DNA minipreparation procedure suitable for PCR/SSR and RAPD analyses in tropical forest tree species. **Braz. arch. biol. technol.** [online]. vol.52, n.5 1217-1224, 2009.
- ALZATE-MARIN, A.L.; FERREIRA-RAMOS, R.; GUIDUGLI, M.C.; MARTINEZ, C.A.; MESTRINER, M.A. Genetic diversity assessed in individuals of *Aspidosperma polyneuron* and *Cariniana estrellensis* used as seed donors in an forest gene bank. **BMC Proceedings**, v. 5, p. 8, 2011.
- ANDRÉN, H. Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat – a review. **Oikos**, v.71, p. 355-366, 1994.
- ANSARI, S.A.; NARAYANAN, C.; WALI, S.A.; KUMAR, R.; SHUKLA, N.; KUMAR, S.R. ISSR markers for analysis of molecular diversity and genetic structure of Indian teak (*Tectona grandis* L.f.) populations. **Annals of Forest Research**, v.55, n.1, p. 11-23, 2012.
- ARQUIVO PÚBLICO E HISTÓRICO DE RIBEIRÃO PRETO. História da fundação do bosque municipal. Disponível em: <http://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/scultura/arqpublico/i14index.php?pagina=/scultura/arqpublico/historia/i14indice.htm>. Acesso em 30/04/2014.

ASHLEY, M. V. Plant parentage, pollination, and dispersal: how DNA microsatellites have altered the landscape. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 26, p. 373-379, 2003.

AZEVEDO, V. C. R. et al., Genetic structure and mating system of *Manilkara huberi* (Ducke) a. chev. a Heavily Logged Amazonian Timber Species. **Journal of Heredity**, v. 97, n.7, p. 646-654, 2007.

BAWA, K.S. Breeding of tropical hardwoods: an evaluation of underlying bases, current status and future prospects. In: Burley, J.; Styles, B. T. (Eds.) **Tropical trees: variation breeding and conservation**, London: Academic Press, 1976. P. 43-50.

BAWA, K.S. Breeding systems of tree species for a lowland tropical community. **Evolution**, v.28, p. 85-92, 1974.

BELL, D.J.; ROWLAND, L.J.; DRUMMOND, F.A. Fine-scale spatial genetic structure associated with *Vaccinium angustifolium* Aiton (Ericaceae). **International Journal of Modern Botany**, v.2, n.4, p.72-82, 2012.

BERTONCINI, A.P. **Estrutura e dinâmica de uma área perturbada na terra indígena Araribá, Avaí-SP: implicações para o manejo e a restauração florestal**. 162p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Uso e conservação do germoplasma**. In BESPALHOK, J. C. F.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. Melhoramento de Plantas. Disponível em <www.bespa.agrarias.ufpr.br/conteudo> (2007). Acesso em 06 de out. 2012.

BITTENCOURT, J. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v. 99, p. 580-591, 2007.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. 2ª. Ed. UFV – Viçosa. 2009. 532p.

BRANDÃO, M.M.; VIEIRA, F.A.; CARVALHO, D. Estrutura genética em microescala espacial de *Myrcia splendens* (Myrtaceae). **Revista Árvore**, v. 35, n. 5, p. 957-964, 2011.

BRONDANI, R. P. V.; GAIOTO, F. A.; MISSIAGGIA, A. A.; GRIBEL, R.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for *Ceiba pentandra* (Bombacaceae), an endangered tree species of the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 2, p.177 - 179, 2003.

BROWN, A.H.D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. **Theoretical Applied Genetics**, v.52, p.145-157, 1978.

BYERS, D.L.; AND WALLER, D.M. Do plant populations purge their genetic load? Effects of population size and mating history on inbreeding depression. **Annuary Reviews of Ecology and Systematics**. v.30, p. 479–513, 1999.

CARDOSO, M.A.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRA, P.C.G.; OLIVEIRA D.E. High genetic differentiation among remnant populationsof the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**, v. 7, p. 601–608, 1998.

CARVALHO, S. **Biodiversidade e pioneirismo na Floresta da USP Ribeirão Preto**, 2010. Acesso em 10/02/2010 - <http://biofecunda.wordpress.com/2008/10/23/biodiversidade-e-pioneirismo-na-floresta-da-usp-ribeirao-preto/>

CASSOLA, H. **Aspectos da estrutura fitossociológica e silvigenética em fragmentos de floresta estacional semidecídua com diferentes histórias de perturbação em Botucatu, SP**. 86f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

CHARLESWORTH, B. Fundamental concepts in genetics: effective population size and patterns of molecular evolution and Variation. **Nature Reviews Genetics**. v.10, p. 195–205, 2009.

CHARLESWORTH, D. Evolution of plant breeding systems. **Current Biology**. v.16, p. 726–735, 2006.

CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany** v.83, p.51-57, 1996.

CHIARELLO, A.G. Conservation value of a native forest fragment in a region of extensive agriculture. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, n.2, p. 237-247, 2000.

CHOMITZ, K.M.; ALGER, K.;THOMAS, T.S.; ORLANDO, H.; VILA NOVA, P. Opportunity costs of conservation in a biodiversity hotspot: the case of southern Bahia. **Environment and Development Economy**, v.10, p. 293–312, 2005.

CIAMPI, A. Y.; BRONDANI, R. P. V.; GRATTAPAGLIA, D. **Otimização de sistemas fluorescentes de genotipagem multiloco e desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Copaifera langsdorfii* Desf. (Copaiba) Leguminosae-Caesalpinioideae**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 40 p.

CLOUTIER, D. et al., Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, v.16, n.4, p.797- 809, 2007.

- COLLEVATTI, R. G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J. D. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. **Tree Genetics & Genomes**, v.6, p. 555-564, 2010.
- COLLEVATTI, R.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterisation of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v. 83, p. 748 - 756, 1999.
- COLLEVATTI, R.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, v. 06, p. 60-67, 2001.
- COLLI, G. R.; ACCACIO, G. de M.; ANTONINI, Y.; CONSTANTINO, R.; FRANCESCHINELLI, E. V.; LAPS, R. R.; SCARIOT, A.; VIEIRA, M. V.; WIEDERJECKER, H. C. A fragmentação dos ecossistemas e a biodiversidade brasileira: uma síntese. In: RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, D. A. S. DE (Ed.). **Fragmentação de Ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. 2 ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2005. p. 318-324.
- CONTE, R.; REIS, M.R.; VENCOVSKY, R. Effects of management on the genetic structure of *Euterpe edulis* Mart. populations based on microsatellites **Scientia Forestalis**, v. 72, p. 81-88, 2006.
- COSTA T.S.; SILVA, A.V.C.; LEDO, A.S.; SANTOS, A.R.F.; JUNIOR, J.F.S. Diversidade genética de acessos do banco de germoplasma de mangaba em Sergipe. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v. 46, n. 5, p. 499-507, 2011.
- CREGAN, P.B; MUDGE, J.; FICKUS, E. W.; MAREK, L.F.; DANESH, D.; DENNY, R.; SHOEMAKER, R.C.; MATTHEWS, B.; JARWIK, T; YOUNG, N.D. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.919-928, 1999.
- DALE, V. H.; BEYELER, S. C. Challenge in the development and use of ecological indicators. **Ecological Indicators**, v.1, p. 3-10, 2001.
- DAYANANDAN, S.; BAWA, K.S.; KESSELI, R. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v.84, p.1658-1663, 1997.
- DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1585-1592, 1999.

DE-LUCAS, A.I., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C., VENDRAMIN, G.G., HIDALGO, E., HEUERTZ, M. Spatial genetic structure in continuous and fragmented populations of *Pinus pinaster* Aiton. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 4564-4576, 2009.

DEVLIN, B.; ELLESTRAND, N.C. The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis. **Evolution**, v. 44, p. 248-259. 1990.

DEVLIN, B.; ROEDER, K.; ELLSTRAND, N. C. Fractional paternity assignment: theoretical development and comparison to other methods. **Theoretical Applied Genetics**, v.76, p.369-380, 1988.

DINIZ, F. M.; IYENGAR, A.; LIMA, P. S. da C.; MACLEAN, N.; BENTZEN, P. Application of a double-enrichment procedure for microsatellite isolation and the use tailed primers for high throughput genotyping. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 380-384, 2007.

DURIGAN, G.; FRANCO, G. A. D. C.; SAITO, M.; BAITELLO, J. B. Estrutura e diversidade do componente arbóreo da floresta na Estação Ecológica dos Caetetus, Gália, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v.23, n. 4, p.371-383, 2000.

ECKERT, C. G.; KALISZ, S.; GEBER, M. A.; SARGENT, R.; ELLE, E.; CHEPTOU, P-O.; GOODWILLIE, C.; JOHNSTON, M. O.; KELLY, J. K.; MOELLER, D. A.; PORCHER, E.; REE, R. H.; VALLEJO-MARIN, M.; WINN, A. A. Plant mating systems in a changing world. **Trends in Ecology and Evolution**, v.25, p. 35-43, 2010.

EISEN, J. A **Mechanistic basis for microsatellite instability**. In: GOLDSTEIN, D. B et al.,(Ed.) Microsatellites – evolution and applications. Oxford: Oxford University Press, 1999, p. 34 - 48.

EPPERSON, B.K. Spatial structure of genetic variation within populations of forest trees. **New Forests**, v.6, p.257-278, 1992.

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

EZARD, T.H.G.; TRAVIS, J.M.J. The impact of habitat loss and fragmentation on genetic drift and fixation time. **Oikos**, v. 114, n. 2, p. 367-375, 2006.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v. 164, p. 1567-1587, 2003.

FANG, D. Q.; ROOSE, M.L. Inheritance of intersimple sequence repeat markers in citrus. **Journal of Heredity**. v.90, p.247-249, 1999.

FAO's report. Global forest resources assessment 2000, tropical South America. **FAO Forest Paper**, v.140, p.287 - 291, 2001.

FERES, J. M. ; MARTINEZ, M.L.L. ; MARTINEZ, C.A.H. ; MESTRINER, M. A. ; ALZATE-MARIN, A. L. Transferability and characterization of nine microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia roseo-alba*. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 434-437, 2009b.

FERES, J. M. **Diversidade genética, sistema reprodutivo e fluxo de pólen em duas populações de Tabebuia roseo-alba (Ridl.) Sand.: Implicações para conservação.** 142f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

FERES, J. M.; GUIDUGLI, M. C.; MESTRINER, M. A.; SEBBENN, A.M.; CIAMPI, A.Y.; ALZATE-MARIN, A. L. Microsatellite diversity and effective population size in a germplasm bank of *Hymenaea courbaril* L. var *stilbocarpa* (Leguminosae), an endangered tropical tree: recommendations for conservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 56, n. 6, p. 797-807, 2009a.

FERES, J.M.; MONTEIRO, M.; ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* (Leguminosae), a neotropical tree species. **American Journal of Botany**, (on line), p 154-156, 2012.

FERES, J.M.; SEBBENN, A.M.; GUIDUGLI, M.C.; MESTRINER, M.A.; MORAES, M.L.T.; ALZATE-MARIN, A.L. Mating system parameters at hierarchical levels of fruits, individuals and populations in the Brazilian insect-pollinated tropical tree, *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniaceae). **Conservation Genetics**, v. 13, p. 393-405, 2012.

FERNANDES-FERNANDEZ, F.; HARVEY, G. & JAMES, C.M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from European pear (*Pyrus communis* L.). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 1039-1041. 2006.

FERREIRA-RAMOS, R. **Sistema de cruzamento, fluxo de pólen e isolamento genético de *Aspidosperma polyneuron* müll. arg. em um fragmento localizado no interior de São Paulo.** 174f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

FERREIRA-RAMOS, R.; LABORDA P.R.; SANTOS M.O.; MAYOR, M.S. GUIDUGLI, M. MESTRINER, M. A.; SOUZA, A.P.; ALZATE-MARIN, A. L. Genetic analyses of Forest species *Eugenia uniflora* L. through of newly developed SSR markers. **Conservation Genetics**, v. 9, p. 1281-1285, 2008.

FERREIRA-RAMOS, R.; MONTEIRO, M.; ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B., MARTINEZ, C.A.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. Microsatellite markers for *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae), an endangered tropical tree species. **American Journal of Botany**, (on line), v. 98, p. e300-e302, 2011.

FINKELDEY, R. **An introduction to tropical forest genetics**. Lecture Notes. Göttingen: Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding. 1990. 225 p.

FRYXELL, P. Mode of reproduction of higher plants. **Botanical Review**, v. 23, p. 135-233, 1957.

GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOSKY, R.; Genetic structure, mating system and long distance gene flow in Heart-of-palm (*Euterpe edulis* Mart). **Journal of Heredity**, v. 94, n. 1, 2003.

GALINDO-LEAL, C. E.; CÂMARA, I. G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. **Mata Atlântica : biodiversidade, ameaças e perspectivas**. Fundação SOS Mata Atlântica — Belo Horizonte, 2005. pp. 3-11.

GHAZOUL J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. **Biological Reviews**, v. 80, p. 413-443, 2005.

GONELA, A.; SEBBENN, A.M.; SORIANI, H.H.; MESTRINER, M. A.; MARTINEZ, C.A.H.; ALZATE-MARIN, A. L. Genetic Diversity and the Mating System of *Copaifera langsdorffii* (Leguminosae) in an Ex Situ Gene Bank. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 569-580, 2013.

GONZÁLEZ-ASTORGA, J.; NÚÑEZ-FARFÁN, J. Effect of habitat fragmentation on the genetic structure of the narrow endemic *Brongniartia vazquezii*. **Evolutionary Ecology Research**, v. 3, p. 861-872, 2001.

GUIDUGLI, M. C. et al., Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). **Genetic and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, 2010.

GUIDUGLI, M. C.; FERREIRA-RAMOS, R.; DE SOUSA, A. C. B.; CIDADE, F. W.; MARCONI, T. G.; MESTRINER, M. A.; GROPPA, M.; ALZATE-MARIN, A. L. Genetic diversity of *Metrodorea nigra* (Rutaceae) from a small forest remnant in Brazil assessed with microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 10-16, 2012.

GUIDUGLI, M. C.; HILDEBRAND, H. S.; CANAS, M. C. T.; PIMENTEL, A. L.; CIAMPI, A. Y.; MESTRINER, M. A.; SILVA, A. J.; ALZATE-MARIN, A. L. Diversidade genética de populações naturais da espécie florestal *Hymenaea courbaril* no Noroeste de São Paulo. In: **Congresso Brasileiro de Genética**, 52. Foz do Iguaçu: CD-ROM... Foz do Iguaçu: SBG, p. 1002. 2006.

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. Development and characterization of 15 microsatellite loci for *Cariniana estrellensis* and transferability to *Cariniana legalis*, two endangered tropical tree species. **Conservation Genetics**, v.10, p. 1001-1004, 2009.

GUIDUGLI, M.C. **Estudos genéticos da espécie florestal *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze: diversidade, sistema de cruzamento e fluxo gênico contemporâneo.** 170f. Tese (Doutorado em Genética) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

GUPTA, P. K.; BALYAN, H. S.; SHARMA, P. C.; RAMESH, B. Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. **Current Science**, v. 70, p. 45 – 54, 1996.

HAMILTON, M. B. Tropical tree gene flow and dispersal. **Nature**, v. 401, p. 129-130, 1999.

HAMRICK, J.L.; GODT, M. J. W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Biological Sciences*, v. 351, n. 1345, **Plant Life Histories: Ecological Correlates and Phylogenetic Constraints**, p. 1291-1298, 1996.

HAMRICK, J.L. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations. In **Isozymes in plant biology** (D.E. Soltis & P.S. Soltis, eds.). Chapman & Hall, London, p.87-105, 1990.

HAY, J.D.; BIZERRIL, M.X.; CALOURO, A.M.; COSTA, E.M.N.; FERREIRA, A.A.; GASTAL, M.L.A.; GOES-JUNIOR, C.D.; MANZAN, D.J.; MARTINS, C.R.; MONTEIRO, J.M.G.; OLIVEIRA, S.A.; RODRIGUES, M.C.M.; SEYFFARTH, J.A.S.; WALTER, B.M.T. Comparação do padrão da distribuição espacial em escalas diferentes de espécies nativas do Cerrado, em Brasília, DF. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, n. 3, p. 341-347, 2000.

HEDRICK P.W. **Genetics of populations**. 4th ed. Boston: Jones and Bartlett, 2011.

HOLDEREGGER, R.; BUEHLER, D.; GUGERLI, F.; MANEL, S. Landscape genetics of plants. **Trends in Plant Science**, v. 15, p. 675-682, 2010.

HOLDEREGGER, R.; DI GIULIO, M. The genetic effects of roads: a review of empirical evidence. **Basic Applied Ecology**, v. 11, p. 522-53, 2010.

HONNAY, O.; JACQUEMYN, H. Susceptibility of rare and common plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation. **Conservation Biology**, v. 21, p. 824-831, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal – Ribeirão Preto. 2010 Disponível em: <http://cod.ibge.gov.br/EKLV>.

IPT. 2000. Diagnóstico da situação atual dos Recursos Hídricos e estabelecimento de diretrizes técnicas para elaboração do Plano da Bacia Hidrográfica do rio Pardo - Relatório Zero, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, SP (<http://www.sigrh.sp.gov.br>).

JULIO, N.; SOBRAL, A.; DUEÑAS, J.; RIENZO, J.; RENISON D.; HENSEN, I. RAPD and ISSR markers indicate diminished gene flow due to recent fragmentation of *Polylepis australis* woodlands in central Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 329-335, 2008.

KAGEYAMA, P. Y. Conservação "in situ" de recursos genéticos de plantas, **IPEF**, n.35, p.7-37, 1987.

KALINOWSKI, ST.; TAPER, ML.; MARSHALL, TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, p. 1099-1006, 2007.

KARASAWA, M. M. G.; DORNELAS, M. C.; ARAÚJO, A. C. G.; OLIVEIRA, G. C. X. Biologia e genética dos sistemas reprodutivos. In: KARASAWA, M. M. G. (Ed.) **Diversidade reprodutiva de Plantas**. Ribeirão Preto, SBG, 2009, p. 26-52.

KOTCHETKOFF-HENRIQUES, O. **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, 2003.

KUMAR, L. S. DNA markers in plant improvement: an overview. **Biothechnology Advances**, v.17, p.143-182, 1999.

KUMAR, S.; JENA, S. N.; NAIR, N. K. ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east India. **Scientia Horticulturae**, v.123, n. 3, p. 350-359, 2010.

LACERDA, A.B.; SEBBEN, A. M.; KANASHIRO, M. Long-pollen movement and deviation of random mating in a lowdensity continuous population of *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, v. 40, p. 462-470, 2008.

- LANDE, R.. Genetics and demography in biological conservation. **Science**, v. 241, p. 1455-1460, 1998.
- LEAL, J.B.; SANTOS, R.P.; GAIOTTO, F.A. Effect of selective logging on genetic diversity and gene flow in *Cariniana legalis* sampled from a cacao agroforestry system. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 626-635, 2014.
- LEGENDRE, P.; FORTIN, M. J. Spatial pattern and ecological analysis. **Vegetatio**, v. 80, p. 107-138, 1989.
- LEITÃO-FILHO, H. F.; MORELLATO, L. P. C. **Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: Reserva de Santa Genebra**. Campinas: Editora Unicamp, 136p, 1995.
- LEMES, M. R., BONDANI, R. P., GRATTAPAGLIA D. Multiplexed systems of microsatellite markers for genetic analysis of mahogany, *Swietenia macrophylla* king (Meliaceae), a threatened neotropical timber species. **Journal of Heredity**, v. 93, n. 4, p. 287 -291, 2002.
- LEPSCH-CUNHA, N.; LUND, C. A.; HAMILTON, M. B. Isolation and characterization of nuclear microsatellite locos in the tropical arboreal palm *Oenocarpus bacaba* (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 3, p. 435 - 437, 2003.
- LEVIN, S.A. The problem of pattern and scale in ecology. **Ecology**, v. 76, n. 6, p. 1943-1967, 1992.
- LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. GDA - Genetic Data Analysis: version 1.1 for Windows 95/NT. <http://www.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>, 2002.
- LEWONTIN, R.C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, v. 6, p. 381-398, 1972.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum, v. 4, p. 190, 2002.
- LOURMAS, M.; KJELLBERG, F.; DESSARD, H.; JOLY, H.; CHEVALLIER, M.H. Reduced density due to logging and its consequences on mating system and pollen flow in the African mahogany *Entandrophragma cylindricum*. **Heredity**, v.2, n. 99, p.151-60, 2007.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95, 1984.
- LOWE, A. J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for Neotropical trees. **Heredity**, v. 95, p. 255-273, 2005.
- LYNCH, M.; RITLAND, K. 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. **Genetics**, v. 152, p. 1753-1766, 1999.

MANOEL, R. O. **Distância e padrões de dispersão contemporânea de pólen e sistema de reprodução em fragmento isolado de *Copaifera langsdorffii* Desl. (Leguminosae - Caesalpinoideae).** 72f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Agronomia), Faculdade de Engenharia - UNESP, Ilha Solteira, 2011.

MARCONDELLI, A.C.B. **Estrutura de uma comunidade arbórea de floresta estacional semidecídua não perturbada no noroeste paulista em relação à outra comunidade como indicadores de perturbação.** 47p. Dissertação (Mestrado). Instituto de biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

MARTINS, W.S., LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F.S.; BERTIOLI, D.J. WebSat - A Web Software for MicroSatellite Marker Development. **Bioinformation**, v. 3, n. 6., p. 282-283, 2009.

MARTINS, K. et al. Pollen and seed flow patterns of *Carapa guianensis* Aublet. (Meliaceae) in two types of Amazonian forest. **Genetics and Molecular Biology**, v.35, n.4, p. 818-826. 2012.

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

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “in situ”. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, v. 35, p. 71-78, 1987.

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

McGEOCH, M.A. The selection, testing and application of terrestrial insects as bioindicators. **Biological Reviews**, v. 73, p. 181-201, 1998.

MEAGHER, T. R., THOMPSON, E. A. Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamelirium luteum* (Liliaceae). **Ecology**, v. 68, p. 803-812, 1987.

MITTERMEIER, R.A., DA FONSECA, G.A.B., RYLANDS, A.B., BRANDON, K.,. A brief history of biodiversity conservation in Brazil. **Conservation Biology** v. 19, p. 601–607, 2005.

- MORAES FILHO, R. M.; JIMENEZ, H. J.; MONTARROYOS, A. V. V.; MUSSER, R. S.; SILVA, M. M.; SILVA, E. F.; MARTINS, L. S. S. Variabilidade genética em genótipos da coleção de germoplasma de *Citrus*, do Instituto Agrônomo de Pernambuco Brejão-PE, por meio de marcadores moleculares ISSR. **Citrus Research and Technology**, v. 32, p. 67-76, 2011.
- MORALES, J. M.; CARLO, T. A. The effects of plant distribution and frugivore density on the scale and shape of dispersal kernels. **Ecology**, v. 87, p. 1489-1496, 2006.
- MORELLATO, L.P.C. & HADDAD, C.F.B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v.32, p.786-792, 2000.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M PCR-amplified microsatellites as markers in plants genetics. **The Plant Journal**, v.3, p.175-182, 1993.
- MUHLEN, G. S. MARTINS, P. S. ANDO A. Variabilidade genética de etnovariedades de mandioca avaliada por marcadores moleculares de DNA. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 2, p. 319-328, 2000.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R.A; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-845, 2000.
- NASON, J.D.; HAMRICK, J.L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. **Journal of Heredity**, v.88, p.264-276, 1997.
- NAVARRO, T.; PASCUAL, V.; ALADOS, C. L.; CABEZUDO, B. Growth forms, dispersal strategies and taxonomic spectrum in a semi-arid shrubland in SE Spain. **Journal of Arid Environments**. v.73, p. 103-112, 2009.
- NAZARENO, A.G.; JUMP, A.S. Species-genetic diversity correlations in habitat fragmentation can be biased by small samples sizes. **Molecular Ecology**, v.21, p.2847-2849 2012.
- NEI M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **PNAS**, v. 70, p. 3321-3323, 1973.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p. 586-590, 1978.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.
- NOON, B.R., SPIES, T.A., RAPHAEL, M.G. Conceptual basis for designing an effectiveness monitoring program. In: Mulder, B.S., et al. (Eds.), **The Strategy and Design of the Effectiveness Monitoring Program for the Northwest Forest Plan**. US Department of Agriculture, Forest Service, Gen. Tech. Rep. Portland, OR, pp. 21-48, 1999.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143-1155, 2004.

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

OLIVEIRA, D.; MELO JÚNIOR, A.; BRANDÃO, M.; RODRIGUES, L.; MENEZES, E.; FERREIRA P. Genetic diversity in populations of *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) in the northern region of Minas Gerais, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.1, p. 531-538. (2012).

OLIVEIRA, D.A. et al. Variabilidade genética de populações de fava d'anta (*Dimorphandra mollis*) da região norte do estado de minas gerais. **Revista Árvore**, v.32, n.2, p.355-63, 2008.

OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 152f. Tese (Doutorado), Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

OLIVEIRA, J.B.; PRADO, H. **Levantamento pedológico semi-detalhado do Estado de São Paulo** - Quadrícula de Ribeirão Preto, escala 1:100.000. Convênio Embrapa - Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Coordenadoria da Pesquisa Agropecuária e Instituto de Agronomia - Seção de Pedologia, Campinas, 1983.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v. 32, p. 793-810, 2000.

ORTEGA, V. R.; ENGEL, V. L. Conservação da biodiversidade de remanescentes de Mata Atlântica na região de Botucatu, SP. **Revista do Instituto Florestal**, v. 4, p. 839-852, 1992.

OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; GROENENDAEL, J. M. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology** v. 87, p. 551-568, 1999.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, 2012.
<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2012/07/20/bioinformatics.bts460.full.pdf>

PEAKALL, R; RUIBAL, M.; LINDENMAYER, D.B. Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. **Evolution**, v. 57, p. 1182-1195, 2003.

PEARCE, J.L.; VENIER, L.A. The use of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) and spiders (Araneae) as bioindicators of sustainable forest management: a review. **Ecological Indicators**, v. 6, p. 780–793, 2006.

PEZZUTI, J.C.B.; SILVA, D. F. Síntese analítica do mapeamento das condições ambientais da macrorregião do Paragominas. National Art Education Association, 2009. Disponível em: http://www.ufpa.br/naea/gerencia/ler_publicacao.php?id=300

PIELOU, E.C. An introduction to mathematical ecology. **Wiley-Interscience**, New York. 1969.

PIRANI, J.R.; SKORUPA, L.A. Rutaceae. In: **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo** (Wanderley MGL, Shepherd GJ and Giulietti AM, eds.). Vol. 2. HUCITEC/FAPESP, São Paulo, 281-308, 2002.

POMBAL, E.C.P. & MORELLATO, L.P.C. Differentiation of floral color and odor in two fly pollinated species of *Metrodorea* (Rutaceae) from Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 221, p.141-156, 2000.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155: p.945–959, 2000.

PRITCHARD, J.K.; WEN, W. Documentation for STRUCTURE software: Version 2. 2003. <http://pritchardlab.stanford.edu/home.html>

QUELLER, D.C.; GOODNIGHT, KF. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**, v. 43, p. 258-275, 1989.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., p. 906, 2001.

REIS, M.S. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais em plantas. **Brazilian Journal of Genetics**. v. 19, n. 37-47, 1996.

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

RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems**, 2nd edn. London: Chapman & Hall. 1997.

RITLAND, K. Estimation of mating systems. In: TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. Part A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. p. 209-302, 1983.

RITLAND, K. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. **Genetical Research**, v. 67, p. 175-185, 1996.

RITLAND, K. Inferences about inbreeding depression based on changes of the inbreeding coefficient. **Evolution**, v. 44, p. 1230-1241, 1990.

RITLAND, K; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity**, v. 47, p. 35-52, 1981.

ROSSETTO, M.; McLAUCHLAN, A.; HARRISS, F.C.L.; HENRY, R.J.; BAVERSTOCK, P.R.; LEE, L.S.; MAGUIRE, T.L., EDWARDS, K.J. Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, p.1091-1098, 1999.

SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J. F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity and Distributions**, v.10, p. 201 - 210, 2004.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS, E.N.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechnology**, v. 17, p. 914 -921, 1994.

SANTOS, E. K. Determinação do sexo em angiospermas. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Ed.) **Genética & Evolução Vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p. 111-130.

SATO, T.; ISAGI, Y.; SAKIO, H.; OSUMI, K.; GOTO, S. Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. **Heredity**, v. 96, p. 79-84. 2006.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellites DNA. **Chromossoma**, v.109, p.365-371, 2000.

SCHWARCZ, K.D.; PATACA, C.L.; ABREU, A.G.; BARIANI, J.M. et al., Genetic diversity in Atlantic Forest trees: fragmentation effects on *Astronium graveolens* (Anacardiaceae) and *Metrodorea nigra* (Rutaceae), species with distinct seed dispersal strategies. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v.164: p. 326-336, 2010.

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C. SILVA, J. M. JOLIVET, C. MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorfii* Desf. **Heredity**, v. 106, p. 134-145, 2011.

SEBBENN, A.M.; SEOANE, C.E.S; KAGEYAMA, P.Y.; VENCovsky, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de Caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia forestalis**, v. 58, p. 123-143, 2000.

SEITZ, R. A. A regeneração natural na recuperação de áreas degradadas. In: **Simpósio sul-americano de áreas degradadas**. Foz do Iguaçu. Paraná-Brasil, 1994.

SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v.9, n.5, p. 615-29, 2006.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA P. Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M. S.; BAWA, K.; SEBBENN, A. M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Revista do Instituto Florestal**, v. 17, p. 25-43, 2005.

SHAHSAVAR A.R.; IZADPANAH K.; TAFAZOLI, E.; SAYED TABATABAEI, B.E. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Scientia Horticulturae**, v.112, 310-314, 2007.

SHAPCOTT, A. The spatial genetic structure in natural populations of the Australian temperate rainforest tree *Atherosperma moschatum* (Labill.) (Monimiaceae). **Heredity**, v.74, p.28-38, 1995.

SIFESP - SISTEMA DE INFORMAÇÕES FLORESTAIS DE SÃO PAULO
Mapa Geral SP. 2009. Disponível em
<<http://www.iflorestal.sp.gov.br/imagindex/mapainventario.pdf>>

SILVA, G.A.V. **Manual de avaliação e monitoramento de integridade ecológica, com uso de Bioindicadores e ecologia de paisagens**. 75f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Conservação Ambiental e Sustentabilidade – ECAS. Nazaré Paulista, São Paulo, 2010.

SILVA, M.B.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A.Y.; THOMPSON, I.; SEBBENN, A.M. Genetic effects of selective logging and pollen flow in a low-density population of the dioecious tropical tree *Bagassa guianensis* in the Brazilian Amazon. **For. Ecol. Manage.** v.255, p. 1548-1558, 2008.

SMOUSE, P.E.; PEAKALL, R. Spatial autocorrelation analysis of multi-allele and multi-locus genetic microstructure. **Heredity**. v. 82, p. 561-573, 1999.

SORK, V. L.; DAVIS, F.W.; SMOUSE, P.E.; APSIT, V.J.; DYER, R.J.; FERNANDEZ-M, J.F.; KUHN, B. Pollen movement in declining populations of California Valley oak, *Quercus lobata*: where have all the fathers gone?. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1657-1668, 2002.

SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S.; MOURÃO, K. S. M.; ROSA, S. M. Morphology and anatomy of the flower and anthesis of *Metrodorea nigra* St. Hill. (Rutaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, 107-112. 2004.

SOUZA, L.A.; ROSA, S.M.; MOSCHETA, I.S. Anatomy of the developing fruit of *Metrodorea nigra* A. St.- Hill. (Rutaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.51 n.6, p. 1171-1179, 2008.

TABARELLI, T.; AGUIAR, A.V.; RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; PERES, C.A. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: Lessons from aging human-modified landscapes. **Biological Conservation**, v.143, p.2328-41, 2010.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v.28, p. 2731-2739, 2011.

TANAKA, G. K. **Estrutura e florística do estrato arbóreo de um fragmento de floresta estacional semidecidual: Estação Ecológica de Ribeirão Preto, SP** Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v.12, p. 4127 - 4138, 1984.

TEMPLETON, A. R. **Genética de Populações e Teoria Microevolutiva**. 1. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto. 705 p, 2011.

TEMPLETON, A. R.; SHAW, K.; ROUTMAN, E.; DAVIS S.K. The Genetic Consequences of Habitat Fragmentation. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 77, n. 1, p. 13-27, 1990.

THOMAS, W.W.; CARVALHO, A.; AMORIM, A.M.A.; GARRISON, J.; ARBELAEZ, A.L. Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brazil. **Biodiversity and Conservation** v. 7, p. 311-322, 1998.

TURNER, I.M.; CORLETT, R.T.,. The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 330-333, 1996.

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

VIANA, V. M. Biologia e manejo de fragmentação de florestas naturais. In: **CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO**, Campos de Jordão. Anais. São Paulo: SPS-SBEF, v.1, p.113-118, 1990.

VIANA, V. M., PINHEIRO, L. A. F. V. Conservação da Biodiversidade em Fragmentos Florestais. **IPEF**, v. 12, n. 32, p. 25-42, 1998. Disponível em: <http://www.ipef.br/publicacoes/stecnica/nr32/cap03.pdf>

- VIEIRA, F. A. et al., Spatial pattern and fine-scale genetic structure indicating recent colonization of the palm *Euterpe edulis* in a Brazilian Atlantic forest fragment. **Biochemical Genetics**, v.48, n.1, p.96-103, 2010.
- VILLELA, D.M.; NASCIMENTO, M.T.; ARAGÃO, L.E.O.C.; GAMA, D. M.. Effect of selective logging on forest structure and nutrient cycling in a seasonally dry Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography** v.33, 506-516. 2006.
- VOGEL, H. F.; BUSS, C. E; METRI, R. Revisão sobre impactos decorrentes do processo de fragmentação florestal. In: **I Workshop Regional de Geografia e Mudanças Ambientais: Desafios da sociedade do presente e do futuro**. Guarapuava-PR. v. 6, 2007. p. 87-95.
- WANG, K.S. Gene flow in *European beech* (*Fagus sylvatica* L.) **Genetica**, v. 122, p. 105-113, 2004.
- WANG, H.Z.; WU, Z.X.; LU, J.J.; SHI, N.N.; ZHAO, Y.; ZHANG, Z.T. and LIU, J.J. Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Genetica**, v. 136, n. 3, p. 391-399, 2009.
- WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v.7, p.524-530, 1990.
- WHITE, G.; POWELL, W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. **Molecular Ecology**, v.6, p.1195-1197, 1997.
- WHITLOCK, M.C. Selection, load and inbreeding depression in a large metapopulation. **Genetics**, v. 160, p. 1191-1202, 2002.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, P. 1358-1370, 1984.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, p. 114-138, 1943.
- WÜNSCH, A.; HORMAZA, J.I. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. **Scientia horticulturae**, v.113, p. 37-43.2007.
- XIA, T.; CHEN, S.; ZHANG, D.; GAO, Q. et al., ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). **Biochemical and Systematic Ecology**, v. 35, p. 209-214, 2007.
- YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T. POPGEN, version 1.31. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta/CIFOR, Edmonton, 1999.

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

ZHANG, L.; ZHANGAND, H.G.; LI, X.F.. Analysis of genetic diversity in *Larix gmelinii* (Pinaceae) with RAPD and ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n.1, p.196-207, 2013.

ZIMBACK, L.; MORI, E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VEIGA, R.F.A. et al., Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, v.65, p. 114-119, 2004.

ZORZETTO, R.; FIORAVANTI, C.; FERRONI, M. A floresta renasce. **Pesquisa Fapesp**. v. 91, p.48 - 52, 2003.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 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

M13-RIB									
Indivíduo	PAP	Geração	Coord. X	Coord. Y	Indivíduo	PAP	Geração	Coord. X	Coord. Y
Rib1	30	Adulto	196220	7638737	Rib41	10	Juvenil	196331	7638711
Rib2	6	Juvenil	196202	7638744	Rib42	25	Adulto	196329	7638709
Rib3	3	Juvenil	196203	7638745	Rib43	9	Juvenil	196334	7638740
Rib4	3	Juvenil	196201	7638746	Rib44	12	Adulto	196335	7638736
Rib5	15	Adulto	196209	7638743	Rib45	25	Adulto	196335	7638733
Rib6	5	Juvenil	196209	7638744	Rib46	2	Juvenil	196326	7638736
Rib7	15	Adulto	196211	7638740	Rib47	2	Juvenil	196327	7638736
Rib8	5	Juvenil	196218	7638745	Rib48	9	Juvenil	196348	7638731
Rib9	15	Adulto	196218	7638737	Rib49	10	Juvenil	196351	7638731
Rib10	5	Juvenil	196214	7638739	Rib50	7	Juvenil	196344	7638728
Rib11	15	Adulto	196214	7638735	Rib51	7	Juvenil	196346	7638723
Rib12	15	Adulto	196216	7638739	Rib52	5	Juvenil	196334	7638712
Rib13	15	Adulto	196223	7638733	Rib53	5	Juvenil	196344	7638735
Rib14	15	Adulto	196223	7638735	Rib54	9	Juvenil	196343	7638731
Rib15	5	Juvenil	196225	7638735	Rib55	16	Adulto	196344	7638721
Rib16	15	Adulto	196199	7638736	Rib56	17	Adulto	196326	7638741
Rib17	18	Adulto	196230	7638689	Rib57	3	Juvenil	196325	7638737
Rib18	9	Juvenil	196296	7638687	Rib58	10	Juvenil	196318	7638724
Rib19	5	Juvenil	196302	7638689	Rib59	14	Adulto	196322	7638728
Rib20	24	Adulto	196356	7638700	Rib60	14	Adulto	196322	7638720
Rib21	5	Juvenil	196306	7638689	Rib61	10	Juvenil	196321	7638726
Rib22	8	Juvenil	196308	7638690	Rib62	11	Adulto	196323	7638726
Rib23	3	Juvenil	196302	7638690	Rib63	7	Juvenil	196326	7638721
Rib24	23	Adulto	196301	7638689	Rib64	13	Adulto	196325	7638719
Rib25	30	Adulto	196299	7638687	Rib65	12	Adulto	196323	7638735
Rib26	4	Juvenil	196347	7638681	Rib66	10	Juvenil	196327	7638705
Rib27	5	Juvenil	196321	7638705	Rib67	11	Adulto	196321	7638714
Rib28	35	Adulto	196308	7638701	Rib68	35	Adulto	196325	7638702
Rib29	11	Adulto	196308	7638700	Rib69	60	Adulto	196345	7638692
Rib30	15	Adulto	196309	7638696	Rib70	13	Adulto	196302	7638715
Rib31	15	Adulto	196322	7638736	Rib71	9	Juvenil	196301	7638714
Rib32	8	Juvenil	196320	7638739	Rib72	12	Adulto	196326	7638691
Rib33	10	Juvenil	196320	7638738	Rib73	13	Adulto	196338	7638692
Rib34	5	Juvenil	196317	7638739	Rib74	5	Juvenil	196392	7638691
Rib35	10	Juvenil	196315	7638740	Rib75	3	Juvenil	196325	7638702
Rib36	28	Adulto	196334	7638731	Rib76	5	Juvenil	196193	7638738
Rib37	11	Adulto	196343	7638724	Rib77	6	Juvenil	196194	7638735
Rib38	5	Juvenil	196342	7638723	Rib78	3	Juvenil	196202	7638729
Rib39	42	Adulto	196329	7638711	Rib79	10	Juvenil	196198	7638742
Rib40	4	Juvenil	196330	7638710	Rib80	12	Adulto	196198	7638743

BSQ-RIB									
Indivíduo	PAP	Geração	Coord. X	Coord. Y	Indivíduo	PAP	Geração	Coord. X	Coord. Y
Bsq1	27	Adulto	209049	7656215	Bsq31	2	Juvenil	209047	7656160
Bsq2	7	Juvenil	209047	7656219	Bsq32	8	Juvenil	209042	7656155
Bsq3	30	Adulto	209047	7656222	Bsq33	15	Adulto	209038	7656156
Bsq4	18	Adulto	209050	7656217	Bsq34	2	Juvenil	209037	7656156
Bsq5	15	Adulto	209050	7656215	Bsq35	2	Juvenil	209036	7656156
Bsq6	14	Adulto	209046	7656216	Bsq36	20	Adulto	209033	7656156
Bsq7	15	Adulto	209047	7656215	Bsq37	15	Adulto	209038	7656146
Bsq8	10	Juvenil	209042	7656203	Bsq38	20	Adulto	209041	7656146
Bsq9	13	Adulto	209053	7656184	Bsq39	6	Juvenil	209046	7656139
Bsq10	10	Juvenil	209052	7656189	Bsq40	12	Adulto	209049	7656140
Bsq11	10	Juvenil	209048	7656194	Bsq41	20	Adulto	209044	7656136
Bsq12	10	Juvenil	209047	7656199	Bsq42	30	Adulto	209040	7656119
Bsq13	15	Adulto	209046	7656202	Bsq43	20	Adulto	209040	7656120
Bsq14	20	Adulto	209031	7656225	Bsq44	10	Juvenil	209047	7656112
Bsq15	10	Juvenil	209045	7656198	Bsq45	6	Juvenil	209047	7656113
Bsq16	20	Adulto	209046	7656199	Bsq46	13	Adulto	209039	7656108
Bsq17	10	Juvenil	209050	7656208	Bsq47	8	Juvenil	209041	7656110
Bsq18	20	Adulto	209048	7656199	Bsq48	31	Adulto	209048	7656112
Bsq19	22	Adulto	209037	7656195	Bsq49	7	Juvenil	209050	7656114
Bsq20	18	Adulto	209036	7656209	Bsq50	2	Juvenil	209055	7656095
Bsq21	23	Adulto	209040	7656205	Bsq51	5	Juvenil	209058	7656096
Bsq22	22	Adulto	209038	7656199	Bsq52	2	Juvenil	209054	7656112
Bsq23	21	Adulto	209015	7656186	Bsq53	13	Adulto	209057	7656113
Bsq24	27	Adulto	209030	7656163	Bsq54	11	Adulto	209051	7656111
Bsq25	20	Adulto	209045	7656151	Bsq55	3	Juvenil	209056	7656112
Bsq26	30	Adulto	209044	7656156	Bsq56	10,5	Juvenil	209059	7656111
Bsq27	10	Juvenil	209041	7656158	Bsq57	9	Juvenil	209057	7656117
Bsq28	6	Juvenil	209040	7656158	Bsq58	4	Juvenil	209052	7656114
Bsq29	2	Juvenil	209038	7656165	Bsq59	3	Juvenil	209025	7656117
Bsq30	2	Juvenil	209039	7656146	Bsq60	35	Adulto	209024	7656099

FAC-CRAV									
Indivíduo	PAP	Geração	Coord. X	Coord. Y	Indivíduo	PAP	Geração	Coord. X	Coord. Y
Crav1	17	Adulto	222625	7642362	Crav31	10	Juvenil	222495	7642511
Crav2	17	Adulto	222624	7642363	Crav32	30	Adulto	222482	7642518
Crav3	6	Juvenil	222569	7642420	Crav33	9	Juvenil	222480	7642495
Crav4	12,5	Adulto	222582	7642402	Crav34	10	Juvenil	222472	7642501
Crav5	10	Juvenil	222571	7642423	Crav35	31	Adulto	222471	7642551
Crav6	2,5	Juvenil	222567	7642425	Crav36	34	Adulto	222463	7642547
Crav7	4	Juvenil	222568	7642413	Crav37	29	Adulto	222458	7642542
Crav8	2	Juvenil	222567	7642412	Crav38	9	Juvenil	222689	7642391
Crav9	8	Juvenil	222566	7642415	Crav39	8	Juvenil	222684	7642431
Crav10	28,5	Adulto	222582	7642462	Crav40	9,5	Juvenil	222643	7642451
Crav11	1,3	Juvenil	222583	7642464	Crav41	30	Adulto	222638	7642454
Crav12	2,1	Juvenil	222415	7642544	Crav42	9,5	Juvenil	222634	7642458
Crav13	1,8	Juvenil	222423	7642534	Crav43	10	Juvenil	222637	7642453
Crav14	2	Juvenil	222489	7642561	Crav44	11	Adulto	222635	7642450
Crav15	1,6	Juvenil	222481	7642560	Crav45	11	Adulto	222639	7642453
Crav16	2,3	Juvenil	222477	7642557	Crav46	10	Juvenil	222628	7642452
Crav17	53	Adulto	222455	7642546	Crav47	15	Adulto	222625	7642451
Crav18	2,1	Juvenil	222452	7642549	Crav48	15	Adulto	222471	7642583
Crav19	0,8	Juvenil	222546	7642549	Crav49	15	Adulto	222484	7642514
Crav20	1	Juvenil	222540	7642482	Crav50	15	Adulto	222483	7642507
Crav21	2,1	Juvenil	222452	7642560	Crav51	15	Adulto	222484	7642489
Crav22	0,8	Juvenil	222546	7642482	Crav52	15	Adulto	222470	7642507
Crav23	2,3	Juvenil	222546	7642480	Crav53	27	Adulto	222460	7642513
Crav24	11	Adulto	222547	7642482	Crav54	29	Adulto	222455	7642579
Crav25	20	Adulto	222551	7642487	Crav55	31	Adulto	222454	7642580
Crav26	10	Juvenil	222548	7642505	Crav56	10,5	Juvenil	222469	7642479
Crav27	9	Juvenil	222555	7642471	Crav57	34	Adulto	222478	7642469
Crav28	10,5	Juvenil	222556	7642473	Crav58	35	Adulto	222478	7642480
Crav29	9	Juvenil	222552	7642474	Crav59	32	Adulto	222481	7642482
Crav30	8	Juvenil	222548	7642476	Crav60	31	Adulto	222484	7642483