



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNA FRANCYELLE DALL'OGGIO AREDES DE MIRANDA

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *PARAPIPTADENIA RIGIDA* (BENTH.) BRENAN (FABACEAE- MIMOSOIDEAE) POR MARCADORES MICROSSATÉLITES

BRUNA FRANCYELLE DALL'OGGIO AREDES DE MIRANDA

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *PARAPIPTADENIA RIGIDA* (BENTH.) BRENAN (FABACEAE- MIMOSOIDEAE) POR MARCADORES MICROSSATÉLITES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D144d Dall'Oglio Aredes de Miranda, Bruna Francielle.
Diversidade genética em populações de *Parapiptadenia rigida* (Benth.)
Brenan (Fabaceae - Mimosoideae) por marcadores microssatélites/ Bru-
na Francielle Dall'Oglio Aredes de Miranda. – Londrina, 2014.
58 f.: il.

Orientador: Paulo Maurício Ruas.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Lon-
drina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agro-
nomia, 2014
Inclui bibliografia

1. Genética florestal – Teses. 2. Genética vegetal – Teses. 3. Diversida-
de das plantas – Conservação – Teses. 4. Marcadores biológicos. I. Ruas,
Paulo Maurício. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências
Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 575.17:634.0.2

BRUNA FRANCYELLE DALL'OGGIO AREDES DE MIRANDA

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *PARAPIPTADENIA RIGIDA* (BENTH.) BRENAN (FABACEAE- MIMOSOIDEAE) POR MARCADORES MICROSSATÉLITES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador. Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Eduardo Augusto Ruas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Edmilson Bianchini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Claudete de F. Ruas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 21 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

A todos os docentes e funcionários deste Departamento que contribuíram direta e indiretamente para minha formação profissional e por compartilhar o conhecimento que possuem e por fazerem dos estudantes com a simples função de compartilhar seus ensinamentos, pessoas melhores.

Ao Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas, pela orientação e pela sua dedicação em nos ensinar a genética das árvores.

A Dra. Ana Paula Silva Campos Gaino pela sua partilha de conhecimentos, de sua paciência e de todo o carinho com o qual me fez chegar ao final deste curso.

Aos colegas do Laboratório de Marcadores Moleculares, Marcos Silva, Dhiego Gomes Ferreira, Sara Godoy, Gabriela Navarro, Luana Rodrigues e em especial à Camila Ronchi, por ter sido parceira em todas as etapas do trabalho sem medir esforços, à Kátia Rocha, pela presteza sem cansaço em me auxiliar no laboratório e no sequenciamento de DNA, à Camila Chaves, por todo apoio na fase da estatística e da escrita do trabalho.

Ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo, agradeço por autorizar a coleta dos indivíduos de *P. rigida* na reserva floresta da Estação Ecológica dos Caetetus.

A empresa Monsanto do Brasil na pessoa de Alejandro Ansorena Peralta e Marcelo Giovanini, pelo apoio total nas minhas decisões e por terem acreditado na minha capacidade profissional. E aos demais colegas de trabalho, parceiros da rotina e do cansaço que faz bem a mente e ao corpo, o trabalho.

Em memória do meu avô Nelson e minha avó Cacilda que me mostraram a importância de fazer o bem e tratar com respeito a todos. Por sua dedicação e cuidado.

À minha família, em especial as mulheres que amo e admiro, Margareth, Marlene por terem me apoiado nos estudos e desejarem sempre o melhor para mim e também, à minha irmã Juliana, sobrinhas Eduarda e Rafaela, pelo amor puro e verdadeiro.

Ao meu marido, Wallace Júnior, parceiro dos dias, amigo na horas felizes e difíceis, enfermeiro nos dias de imunidade baixa, cozinheiro nos momentos sem tempo, protetor de todas as horas, amor para toda a vida. Obrigada pela compreensão da minha ausência em todas as noites da semana, finais de semana e feriados. Agradeço também pelo amor recíproco.

À família que ganhei, Sr. Wallace, Dna. Regina e filhos, Dna. Gisele, Sr. Beto e Paulo pelo carinho e atenção.

Aos meus amigos que nunca me decepcionaram e às irmãs do coração que, mesmo distantes, estão presentes em minha saudade, Milana, Mariana, Graciele, Jakeline, Roberta, Fernandas e Paula.

DALL'OGGIO AREDES DE MIRANDA, Bruna Francielle. **Diversidade genética em populações de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Fabaceae - Mimosoideae) por marcadores microssatélites.** 2014. 58 f. Dissertação do Mestrado em Agronomia de curso da Pós-Graduação em Agronomia - Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2014.

RESUMO

A família Fabaceae-Mimosoideae apresenta, aproximadamente, 40 gêneros incluindo *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan, a qual ocorre com maior frequência nos três estados do sul do Brasil. *P. rigida* é uma árvore de sucessão secundária precoce, característica da floresta tropical, a qual é de grande importância ecológica na recuperação de áreas degradadas. Foram utilizados oito pares de locos de microssatélites para estudar a variabilidade e estrutura genética de 14 populações de *P. rigida* e obteve-se um total de 137 alelos com os valores médios de heterozigosidade esperada e observada de 0,32 e 0,53, respectivamente. Todas as populações estudadas mostraram déficits de heterozigotos. A maior parte da diversidade genética foi encontrada dentro de populações, enquanto o nível de diferenciação genética foi moderado (12,91%) entre as populações. Níveis diferentes de fluxo gênico entre as populações foi verificado. Valores de *F_{is}* positivos e significativos foram calculados para todas as populações e o teste de Wilcoxon para excesso de heterozigosidade mostrou que um recente gargalo genético ocorreu em 12 das 14 populações estudadas. O dendrograma construído pelo método UPGMA mostrou a formação de dois grupos. A presença de vários pares de locos em desequilíbrio de ligação confirma o fato de que estas populações perderam variabilidade genética por deriva genética. O teste de correlação de Pearson não foi significativo para a relação entre distância genética e distância geográfica. Os resultados mostraram que é necessário a aplicação de estratégias de manejo para a conservação destas populações de *P. rigida* pois, a viabilidade das próximas gerações está severamente comprometida.

Palavras-chave: Mimosoideae. Espécie arbórea tropical. Conservação. Marcadores moleculares.

DALL'OGGIO AREDES DE MIRANDA, Bruna Francielle. **Genetic diversity in populations of *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Fabaceae - Mimosoideae) with microsatellites markers.** 2014. 58 p. Dissertation of Masters degree – Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2014.

ABSTRACT

Fabaceae-Mimosoideae Family has approximately 40 genera including *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan and these species occur with greater frequency in the three Southern States from Brazil. *P.rigida* is a tropical early secondary succession tree characteristic of the Tropical Rainforest that is of great ecological importance in the recovery of degraded areas. We used eight pairs of microsatellite loci to study the genetic variability and population genetic structure in fourteen populations and obtained a total of 137 alleles with an average observed and expected heterozygosity of 0.32 and 0.53, respectively. All the populations studied showed heterozygosity deficits. Most of the genetic diversity was found within populations; while the level of genetic differentiation was moderate (12.91%) between populations. Different levels of gene flow among the populations were detected. Positive and significant values of F_{is} were found for all the populations and the Wilcoxon test for excess of heterozygosity indicate that a recent bottleneck occurred in twelve of fourteen populations studied. The dendrogram constructed by the UPGMA method revealed the formation of two groups. The presence of several pairs of loci in linkage disequilibrium confirms that these populations experienced a loss of genetic diversity caused by genetic drift. Pearson correlation test was not significant for genetic and geographic distances. The results showed that it is necessary to develop management strategies for the conservation of these populations of *P. rigida* as the viability of the next generations are severely compromised.

Keywords: Mimosoideae. Tropical tree species. Conservation. Molecular markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – *Parapiptadenia rigida*. A - Plântula. B - Indivíduo jovem. C - Indivíduo adulto. D – Tronco tipo árvore.....22
- Figura 2** – Locais de ocorrência natural de *Parapiptadenia rigida* no Brasil.....24
- Figura 3** – *Parapiptadenia rigida*. A - Folhas. B - Flores. C – Flores em detalhe. D – Frutos verdes. E – Frutos secos. F – Sementes25
- Figura 4** – Mapa das áreas de coleta nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo, Brasil.....33
- Figura 5** – Dendrograma dos agrupamentos das 14 populações de *Parapiptadenia rigida*, considerando a distância genética de Nei (1978). Número de ramificações representam *bootstrap* baseado em 1.000 replicações.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Locais de coleta das amostras de <i>Parapiptadenia rigida</i> na região sul e sudeste-brasileira e número (n) de indivíduos	32
Tabela 2 – Sequência de pares de <i>primers</i> desenvolvidos para <i>Parapiptadenia rigida</i> com as respectivas, tamanho de pares de bases (pb) e temperaturas de anelamento (Ta)	35
Tabela 3 – Medidas da diversidade para oito locos de microssatélites para 14 populações de <i>Parapiptadenia rigida</i>	37
Tabela 4 – Presença do desequilíbrio de ligação de 8 locos de microssatélites em 14 populações de <i>Parapiptadenia rigida</i>	38
Tabela 5 – Análise de variância molecular (AMOVA) em 14 populações de <i>Parapiptadenia rigida</i> utilizando oito locos microssatélites	39
Tabela 6 – Distância geográfica em km, acima da diagonal, e valores de <i>Fst</i> par a par das populações de <i>Parapiptadenia rigida</i> abaixo da diagonal.....	39
Tabela 7 – Teste de Wilcoxon para desequilíbrio de mutação-deriva, excesso/deficiência de heterozigosidade, utilizando Bottleneck (LUIKART et al., 1998), para oito locos de microssatélites em 14 populações de <i>Parapiptadenia rigida</i>	40
Tabela 8 – Médias das distribuições de proporção de indivíduos não-migrantes e migrantes para 14 populações de <i>Parapiptadenia rigida</i> , com intervalo de confiança de 95%, baseado no método de atribuição bayesiana de Wilson e Rannala (2003)	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	A FRAGMENTAÇÃO DAS FLORESTAS E AS SUAS CONSEQUÊNCIAS GENÉTICAS.....	13
2.2	ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM ESPÉCIES ARBÓREAS	15
2.3	ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MARCADORES MICROSSATÉLITES	18
2.4	ISOLAMENTO DAS REGIÕES CONTENDO MICROSSATÉLITES	20
2.5	A ESPÉCIE <i>PARAPIPTADENIA RIGIDA</i> – ANGICO	22
3	JUSTIFICATIVA	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	OBJETIVOS GERAIS	28
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5	ARTIGO: DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE <i>PARAPIPTADENIA RIGIDA</i> (BENTH.) BRENAN (FABACEAE - MIMOSOIDEAE) POR MARCADORES MICROSSATÉLITES	29
5.1	INTRODUÇÃO	30
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.2.1	Amostragem	31
5.2.2	Extração de DNA.....	33
5.2.3	Amplificação de Microsatélites.....	34
5.2.4	Análise Estatística	35
5.3	RESULTADOS.....	36
5.4	DISCUSSÃO	43
5.4.1	Diversidade Genética	43
5.4.2	Estrutura Genética.....	44
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A devastação das florestas brasileiras atreladas à competição humana e seu crescimento desordenado é uma das principais causas da redução dos habitats naturais e também, da divisão dos remanescentes em fragmentos menores (ARAÚJO, 2005). Com consequente influência nas condições atmosféricas que, por sua vez, contribui para a mudança do clima global.

O solo das florestas tropicais semidecíduais é o mais adequado para a agricultura e para a pecuária do que, o solo das florestas tropicais úmidas (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Isto é apenas um dos motivos e não menos devastador, indicando que o processo de desmatamento tem relação direta com a economia do país. Conforme Begon et al. (2007), a ação do homem com a geração de energia para a realização do trabalho dá o poder de transformar paisagens terrestres e aquáticas.

A família botânica Fabaceae inclui a subfamília Mimosoideae que constitui cerca de 80 gêneros distribuídos em diversas regiões mundiais com grande representatividade em regiões de florestas tropicais e subtropicais. Dentro desses gêneros encontra-se a espécie *Parapiptadenia rigida*, conhecida popularmente como gurucaia, angico-vermelho, angico, angico-da-mata, angico-verdadeiro, monjoleiro entre outros nomes de acordo com a localidade. Essa espécie é componente importante das Florestas Estacional Decidual, em Floresta Semidecidual, em Floresta Tropical/Subtropical Perenifólia e Floresta Subtropicais, em Floresta Ombrófila Mista ou Floresta com Araucária. (HIGUCHI et al., 2012; SCHEER; BLUM, 2011; SAUERESSIG, 2012).

É uma planta secundária, decídua, perenifólia, heliófita, sistema sexual hermafrodita no qual podem ser encontradas como árvores, arvoreta que possuem de 4 a 20 m de altura e 40 a 70 cm de DAP. Sua madeira tem alta densidade de massa específica, resistente ao cupim tornando-a excelente para o uso comercial. No entanto sua aplicabilidade abrange desde a utilização em construção, carvão, resina, arborização urbana, medicina, produtos apícolas, combustíveis, fibras, ornamentais e produtos bioquímicos. Essa espécie é também crucial para fins de proteção ambiental, pois é referência ao que tange a reflorestamento de áreas degradadas e plantações de mata ciliares.

O estudo de espécies arbóreas tropicais é de suma importância, principalmente, aquelas inclusas na lista de sucessão ecológica, como *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Mimosoideae). E, de acordo com Seoane et al. (2005), existe uma escassez de trabalhos que comparem populações em locais com diferentes intensidades de perturbação antrópica.

Como forma de recuperar as áreas degradadas, podemos conservar ambientes estáveis, como as unidades de conservação. Para tanto, é necessário em primeiro lugar, o conhecimento da estrutura genética populacional, para posteriormente, o desenvolvimento de ações conservacionistas. Desde 1970, foram criadas mais áreas protegidas do que as previamente existentes devido ao reconhecimento da rápida destruição de espécies e de muitos ecossistemas tropicais e da importância na proteção das unidades de conservação para manter a biodiversidade remanescente (BENSUSAN, 2006).

A genética da conservação permite a avaliação da variabilidade genética intra e interespecífica buscando uma melhor compreensão da dinâmica de populações das espécies. É também, importante por proporcionar esclarecimentos da causa do potencial evolutivo de longo prazo (BEGON et al., 2007) e interferir de maneira positiva no monitoramento de projetos de reintrodução e manejo de populações naturais (SANTOS et al., 2004). A exposição de espécies arbóreas, a condições extremas de exploração e manejo inadequados pode levá-las à perda da diversidade genética, aumento da endogamia e conseqüentemente, a depressão endogâmica. A consequência da perda de diversidade genética para uma espécie significa a redução no número de locos heterozigotos e perda de alelos nas populações e conseqüente redução na capacidade adaptativa (GAINO et al., 2010).

O conhecimento da estrutura genética é fundamental para a compreensão da genética das populações de árvores e outras plantas. A diversidade ou a variabilidade genética devida a diferenças nos alelos pode ocorrer: a) de espécies dentro de ecossistemas, b) de populações dentro de espécies e c) de indivíduos dentro de populações da espécie. A caracterização desses diferentes níveis de diversidade é imprescindível para o planejamento da conservação genética (KAGEYAMA, 1987).

De modo geral, as espécies arbóreas da floresta tropical apresentam alta proporção de locos polimórficos e maior nível de diversidade genética dentro de populações que entre populações e o sistema de cruzamento é misto (BERG;

HAMRICK, 1997), com predominância de alogamia (WARD et al., 2005). Entretanto, as florestas tropicais possuem uma grande diversidade de espécies arbóreas com diferentes sistemas reprodutivos, associados às complexas interações com agentes polinizadores e dispersores de sementes (GROSS, 2005; MACHADO; LOPES, 2004; OLIVEIRA; GIBBS, 2000).

O conhecimento do sistema reprodutivo é de grande importância para os programas de melhoramento e conservação dos recursos genéticos da espécie, pois permite delinear estratégias que otimizem a amostragem da variabilidade genética e também indica os modelos genético-estatísticos apropriados para a estimativa dos parâmetros genéticos (SOUZA et al., 2003; FREITAS et al., 2006).

Análises da variabilidade e da diversidade genética permitem chegar a conclusões sobre a estrutura das populações, interações genótipo/ambiente, processos evolutivos e relações taxonômicas (CAVALLI, 2003). Neste sentido, para o estudo da diversidade genética desta espécie, os marcadores moleculares são uma excelente ferramenta, pois contribuem para direcionar o enriquecimento da base genética (FALEIRO, 2007). Dentre os tipos de marcadores moleculares, os microssatélites são os mais utilizados em estudos de populações de espécies arbóreas. Isso se deve ao fato de serem marcadores codominantes, multi-alélicos e possuírem um elevado grau de polimorfismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A FRAGMENTAÇÃO DAS FLORESTAS E AS SUAS CONSEQUÊNCIAS GENÉTICAS

A fragmentação das florestas é uma situação alarmante e atual, resultante do processo econômico de países desenvolvidos e subdesenvolvidos. No Brasil, a fragmentação das florestas esteve presente em todas as etapas da ocupação territorial (VIANA et al., 1992).

Nos Estados sulinos, assim como no restante do país, o processo de fragmentação teve início com a ocupação e o desenvolvimento das atividades agrícolas. Desde sua ocupação até os dias de hoje, a atividade agrícola é predominante nos Estados sulinos que são um dos principais produtores de grãos. Consequentemente, as áreas de remanescentes florestais tornaram-se extremamente restritas, estrangulando a diversidade da flora e da fauna. O histórico da cobertura vegetal do estado do Paraná demonstrava-se tão drasticamente reduzido que restavam apenas cerca de 2% da cobertura original há mais de 10 anos (ANJOS, 1998; MEDRI et al., 2002).

A extensiva ocupação e exploração de florestas tropicais reduz a ocorrência de várias espécies arbóreas tropicais. A sustentabilidade das florestas aliada a conservação da biodiversidade e diversidade genética contrapõem-se com interesses econômicos (CIAMPI et al., 2007). O tipo de comunidade encontrada em determinado local, não depende apenas do clima, mas também, das propriedades físicas e químicas do solo, da topografia, da altitude, da composição da mata original e das funções de todas estas espécies de uma comunidade (MONTAGNINI; JORDAN, 2005). A fragmentação afeta as populações de plantas e os fragmentos tornam-se as populações de origem das futuras gerações das espécies arbóreas que ali vivem (HAMILTON, 1999). A forma mais correta de conservar estes recursos genéticos seria pela preservação *in situ*, ou seja, no meio em que se encontra em estado de equilíbrio no seu ecossistema e que, mantenha as condições para sua evolução (CARVALHO, 2009).

Conforme Gonçalves et al. (2010), os estudos de fenologia reprodutiva associados à informações demográficas, de estabelecimento das plântulas e da estrutura genética dos regenerantes da espécie no local são abordagens importantes para o futuro.

Como as árvores são geralmente organismos de vida longa e muitos indivíduos remanescentes nos fragmentos são oriundos de tempos pré-fragmentação, espera-se levantar poucos efeitos da fragmentação nas árvores adultas dependendo da espécie. E também, o modo de reprodução e o sistema de cruzamento característicos da espécie de interesse determinam como a variabilidade genética se organiza no espaço e no tempo, sendo essas informações necessárias para o estudo, o monitoramento e a manutenção da variabilidade genética em programas de conservação (RIBAS, 1999).

Entretanto, a longevidade de árvores, combinada com sementes viáveis e imigração de pólen, pode aumentar a resistência aos efeitos negativos da fragmentação florestal (HAMRICK, 2004; JUMP; PENUELAS, 2006). Assim, os elementos fundamentais para avaliar os impactos da fragmentação florestal sobre a diversidade genética das populações remanescentes são o nível de fluxo de genes, via pólen e semente, entre as populações (HAMILTON, 1999; HAMRICK, 2004) e a caracterização da distribuição genética espacial dentro de vizinhanças reprodutivas (SEBBENN, 2002).

Os impactos da fragmentação das populações sobre a diversidade genética, diferenciação, endogamia e risco de extinção dependem do nível de fluxo gênico entre os fragmentos. Sendo assim, é possível formar corredores ecológicos, através da recuperação de áreas que sejam estratégicas para o fluxo gênico entre os fragmentos florestais, considerando os topos de morros e áreas de vegetação ciliar, já que estes representam as zonas intersticiais mais propícias ao restabelecimento do fluxo gênico entre populações (SILVA et al., 2004). O fluxo gênico é o mecanismo evolutivo responsável por manter a coesão genética de uma espécie (DICK et al., 2003). Em populações naturais, o fluxo gênico intenso, efetivamente, contrapõe os efeitos detrimenais da deriva genética ou seleção natural e pode ser a origem de novos alelos nas populações (BURCZYK et al., 2004).

Este por sua vez, é dependente de algumas condições como: números de fragmentos populacionais; distribuição geográfica das populações; distância entre os fragmentos; habilidade de dispersão das espécies; ambiente da matriz entre os fragmentos e seu impacto sobre a dispersão; tempo desde a fragmentação; taxas de extinção e recolonização nos fragmentos (FRANKHAM et al., 2008; SEBBENN, et al., 2010). A consequência da perda de variabilidade para uma espécie significa a redução no número de locos heterozigotos das populações e

principalmente, ausência de adaptação. A depressão endogâmica, em condições adversas, promove a redução da sobrevivência de indivíduos inaptos e a geração de indivíduos de baixa fecundidade (AMOS; BALMFORD, 2001).

Na estratégia de conservação de uma espécie com risco de extinção é importante dispor de informações sobre a estrutura genética populacional dos remanescentes protegidos, especialmente quanto à diversidade genética, pois atualmente, as poucas reservas existentes são áreas limitadas e com pequeno número de indivíduos (OLIVEIRA et al., 2006). A estrutura genética de populações de espécies arbóreas impõe algumas restrições às estratégias de manejo e conservação. Se as árvores tropicais usualmente ocorrerem em populações pequenas e endogâmicas, como pressuposto pela hipótese de Fedorov (1966), tem-se que uma espécie pode ser preservada a partir de poucos indivíduos de cada população (MORAES et al., 1999).

Jump e Peñuelas (2006) estudaram um fragmento e concluíram que as áreas florestais fragmentadas oferecem a oportunidade de avaliar os efeitos da fragmentação do habitat e para testar as previsões teóricas, demonstraram que espécies estão em risco significativo de fragmentação do habitat, sendo estas, implicações importantes para a gestão da floresta remanescente natural e seminatural em todo o mundo.

Portanto, é urgente que as orientações baseadas em pesquisas de vários âmbitos sejam consideradas a fim de acelerar o processo de entendimento sobre as espécies que estão em risco de extinção e aquelas que necessitam de prevenção contra este risco.

2.2 ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM ESPÉCIES ARBÓREAS

Para a conservação de *P. rigida* são utilizadas as seguintes estratégias: a conservação *in situ* que busca a proteção do ecossistema, permitindo a evolução contínua das espécies e manutenção da diversidade inter e intra-específica de populações e de indivíduos e genes e; a conservação *ex situ* que prioriza o germoplasma e faz a sua preservação, disponibilizando-o para a pesquisa e recuperação de áreas degradadas (FAO, 1984). O conhecimento da quantidade e distribuição da variabilidade genética nas populações naturais torna-se, portanto, um pré-requisito

fundamental para o estabelecimento de estratégias eficazes de conservação genética (ASINS; CARBONELL, 1987).

A variabilidade genética possui um papel fundamental para a evolução da espécie e é estimada pelo polimorfismo de sequência de DNA. Uma vez que a seleção natural ocorra, os indivíduos mais adaptados terão sucesso reprodutivo. Portanto, quanto maior a variabilidade existente na população, maior será a probabilidade de perpetuação da espécie (CIAMPI et al., 2007). Desta forma, ela pode ocorrer em níveis distintos: das espécies nos ecossistemas; populações dentro de espécies, e os indivíduos dentro de populações de uma espécie. A estrutura genética de uma espécie pode ser definida como a distribuição da variabilidade genética dentro e entre suas populações, como resultado direto da combinação entre mutação, migração, seleção e deriva genética (SILVA et al., 2012).

Em espécies florestais a fragmentação de habitats pode causar perda de variabilidade genética por duas vias: redução do tamanho populacional e deriva. A redução do tamanho populacional cria gargalos genéticos, pois os indivíduos que ficam contêm apenas uma pequena amostra do “pool” gênico original, e como consequência, a pequena população remanescente, caso permaneça isolada por muitas gerações, terá contínua perda de alelos devido à deriva genética aleatória (SOUZA et al., 1997; BALERONI, 2003). Nesse sentido, a variabilidade genética é elevada importância para o potencial evolutivo de uma espécie, e determina suas chances de sobrevivência em longo prazo (FLEISHMAN et al., 2001; JONES et al., 2001).

Um dos principais focos da biologia de conservação é a diversidade genética, pois esta é o fator potencial adaptativo e evolutivo de uma espécie. E conhecer a composição genética de uma espécie e a estruturação em suas população se torna crucial, para investigar se a estruturação encontrada é uma característica natural da espécie em estudo ou, é consequência de barreiras físicas causadas pelo homem, como por exemplo, a fragmentação do habitat (FRANKHAM et al., 2008).

O uso de tais ferramentas nos fornece uma visão muito mais profunda com base em vários resultados abordando características da população e sua genética no que tange aos ciclos das árvores as quais têm um impacto profundo sobre a dinâmica e sobrevivência das florestas (MORGANTE et al., 1996). Morin et al. (2004), relataram o SNPs (Single nucleotide polymorphism) como um marcador para muitas aplicações em ecologia de populações, evolução e genética da conservação,

por causa do potencial para maior eficiência de genotipagem, a qualidade dos dados, a cobertura do genoma e simplicidade de análise. Damasceno et al. (2011), estudaram um fragmento florestal utilizando os marcadores AFLP e puderam concluir que a variabilidade genética encontrada dentro desta região pode ser usado como fonte de diversidade genética para projetos futuros em relação à recuperação de áreas degradadas.

Para estudar o impacto causado pela fragmentação, marcadores moleculares são utilizados há mais de 20 anos, principalmente para estudos de variabilidade. Com os avanços das ferramentas tecnológicas na biologia molecular, há uma tendência muito forte na atualidade da sua utilização em estudos da conservação dos recursos genéticos.

Esta tendência tem demonstrado que os marcadores moleculares apresentam plasticidade de acordo com a espécie e o objetivo em estudo. Marcadores co-dominantes são necessários para a geração de estimativas padrão de diversidade genética, fluxo gênico e diferenciação da população. Devido a heterogeneidade dos determinantes evolutivos da variação genética, marcadores genéticos específicos são necessários para estudar seus efeitos. Dependendo da natureza dos determinantes evolutivos, marcadores individuais podem ou não responder a elas. Por exemplo, na ausência de seleção, variação genética será afetada pela mutação, fluxo gênico e deriva. Estes processos irão afetar todos os locos, independentemente de sua função (WANG; SZMIDT, 2001).

Árvores adultas e regenerantes de *P. rigida* ocorrem agrupadas, provavelmente, devido à dispersão de sementes próximas às árvores matrizes, levando ao aparecimento de estrutura genética espacial intrapopulacional (GAINO et al., 2010). Como a seleção natural é um fato, acredita-se que os níveis de endogamia medidos em termos de índice de fixação sejam maiores na fase de plântulas e, menores ou ausentes na fase adulta, devido à eliminação de genótipos endogâmicos.

E por esta razão, essa espécie arbórea torna-se alvo de investigação e preocupação científica para conhecer a base da diversidade genética das populações naturais afim de conservação dos recursos genéticos e prevenção de extinção dessa espécie.

2.3 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MARCADORES MICROSSATÉLITES

Os marcadores moleculares são ferramentas eficientes para estimar a variabilidade genética em espécies arbóreas e os mais indicados para estudar sua estrutura genética são os marcadores microsatélites. Estes definem-se como sequências simples repetidas ou ainda, repetições em tandem de unidades mono-, di-, tri- ou tetranucleotídeos fornecendo individualmente, marcadores específicos para um local altamente polimórficos. Mesmo se um microsatélite não é específico para um local, as regiões adjacentes são. O polimorfismo no comprimento do microsatélite amplificado pode ser revelado com sequenciadores automáticos (WANG; SZMIDT, 2001; VIENNE et al., 2003; KRUTOVSKY et al., 2012).

Algumas propriedades de tais marcadores que os tornam mais adequados do que os marcadores fenotípicos são: tanto as regiões codantes como não codantes de caracteres são analisadas; o número de marcadores analisados pode ser da ordem das centenas, enquanto para as variáveis fenotípicas, normalmente, é da ordem das dezenas; obtenção de dados em qualquer fase do desenvolvimento da espécie vegetal; e, principalmente, sem interferência das influências ambientais (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Os genomas eucariotos são compostos por sequências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem e estas sequências de DNA que flanqueiam os microsatélites são, geralmente, conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (CAIXETA; BORÉM, 2006). Krutovsky et al. (2012) define os microsatélites como codominantes, com elevado polimorfismo, a neutralidade seletiva, considerável número de locos, e viabilidade para análises de alto rendimento, torná-los um dos melhores, se não a melhor, ferramenta para estudos de diversidade genética, estrutura genética e fluxo gênico.

Powell et al. (1996) trata os microsatélites como eficazes para inferir a relação genética dentro de uma determinada janela de valores de semelhança genética e um número relativamente pequeno de locos parece ser suficiente para obter estimativas de alta resolução de parentesco.

Nos últimos anos, os microsatélites têm sido utilizados para uma variedade de aplicações como exames das relações genéticas entre os indivíduos,

mapeamento de genes úteis, construção de mapas de ligação, seleções assistidas por marcadores e retrocruzamentos e também genética de populações e estudos filogenéticos (KALIA et al., 2011). Em contraste com as medidas indiretas de fluxo gênico inferidas a partir de diferenciação entre as populações, as medidas instantâneas são independentes em modelos evolutivos e referem-se a migração ocorrendo entre as duas últimas gerações. Com o aumento do desenvolvimento dos microssatélites, impressões digitais genéticas pode ser atribuídas a cada genótipo de uma dada população natural (KREMER; MARIETTE, 2003).

Silva et al. (2012) enfatizaram a necessidade do desenvolvimento de marcadores microssatélites (SSR) para o estudo de espécies tropicais de árvores com o objetivo de colaborar no conhecimento do genoma das espécies, ajudar na investigação da determinação genética e evolução de algumas adaptações importantes, bem como para avaliar os efeitos da fragmentação de habitats sobre a diversidade genética das matas ciliares.

Locos de microssatélites são os mais utilizados atualmente, para verificar como a devastação florestal afeta a variabilidade genética de arbóreas. Esta preferência deve-se às muitas características dos SSRs tais como, a pequena quantidade de DNA necessária por amostra, a facilidade de detecção por PCR, a facilidade de análise, a herança codominante, o multi-alelismo, assim como a alta informatividade e abundância no genoma (POWELL et al., 1996; GUPTA; VARSHNEY, 2000).

A importância dos microssatélites para estudos genéticos tem sido demonstrada desde o início de 1994 (SAGHAI MAROOF et al., 1994; BECKER; HEUN, 1995; LIU et al., 1996; STRUSS; PLIESKE, 1998). Posteriormente, mapas enriquecidos em microssatélites passaram a ser construídos para muitas espécies (RAMSAY et al., 2004; LI et al., 2003). Na maioria dos estudos os marcadores SSRs foram obtidos com a técnica de seleção de pequenos insertos de bibliotecas genômicas enriquecidas com *motifs* de microssatélites. Em espécies de interesse econômico, o uso de SSRs é facilitado devido à disponibilidade de grande volume de informações de seqüências nucleotídicas depositadas em banco de dados biológicos e ao desenvolvimento de várias ferramentas de bioinformática, que torna possível identificar e desenvolver SSRs (PILLEN et al., 2000; THIEL et al., 2003; RAMSAY et al., 2004; VARSHNEY et al., 2006).

2.4 ISOLAMENTO DAS REGIÕES CONTENDO MICROSSATÉLITES

Em virtude da tecnologia poderosa desenvolvida em biologia molecular, é possível isolar qualquer fragmento de DNA no genoma de um organismo. O procedimento de isolamento (clonagem) envolve a inserção do fragmento de DNA num vetor capaz de replicação num microrganismo, que permite a produção de grandes quantidades de fragmento de DNA para análise física ou biológica. O uso de cada vetor é normalmente limitada a uma tarefa específica: a construção de bibliotecas genômicas (ZABAROVSKI, 2006).

Com os avanços da bioinformática, a construção de uma biblioteca genômica de microssatélites também está atrelada a mineração de dados de sequência nucleotídicas, tornando assim uma estratégia relativamente fácil e de redução de custos para todos os organismos com dados de DNA suficientes depositados em plataformas de sequencias biológicas (TONG et al., 2009). A partir de dados moleculares é possível suprir áreas da biologia, agronomia, conservação e outras áreas que envolvam organismos.

Há vários métodos para isolar *primers* que amplifiquem SSR: por meio de buscas em bancos dados públicos, tentativa de transferibilidade de *primers* entre espécies correlacionadas ou pela construção de uma biblioteca genômica enriquecida para regiões microssatélites. O isolamento de microssatélites pode ser por métodos tradicionais de construção de bibliotecas ou por enriquecimento das mesmas para as regiões repetidas. Os métodos tradicionais consistem de: digestão de DNA, clonagem e sequenciamento (CIAMPI et al., 2007).

Techen et al. (2010) demonstrou em seus estudos, resultados de bibliotecas enriquecidas com microssatélites para quatro organismos, um nematóide, um fungo, uma planta cultivada e uma árvore e demonstrou que o protocolo funcionou eficazmente através de filós e considerou o protocolo uma ferramenta eficaz para a geração de marcadores moleculares a partir de uma variedade de espécies.

Nunome et al. (2006) relatam que, no protocolo tradicional o DNA genômico é digerido com uma enzima de restrição que gera extremidades coesivas, e os fragmentos desejados são recuperados e desfosforilados para bloquear a ligação de fragmentos de DNA genômico para o outro. Porém, desenvolveram um protocolo melhorado para a construção de bibliotecas enriquecidas com microssatélites que digere DNA genômico com uma enzima de restrição produtoras de extremida-

des cegas diferentes e os fragmentos amplificados podem ser clonados em vetores, sem purificação. Desta forma, permite o enriquecimento eficiente e clonagem de seqüências microssatélites, resultando em uma biblioteca com um baixo nível de redundância.

A construção de uma biblioteca para microssatélites pode ser realizada por meio de vários protocolos de enriquecimento podendo-se aplicar mais de um protocolo na mesma biblioteca. Os principais listados por CIAMPI et al. (2007) são: **Digestão do DNA com o objetivo de** selecionar as enzimas que proporciona uma maior digestão na região de 300 a 800 pb (com esses tamanhos de fragmentos se torna possível a ligação com o plasmídeo e o sequenciamento do fragmento completo). Seguindo o protocolo de Billotte et al. (1999), os fragmentos de DNA são ligados a adaptadores com o sítio específico para as reações de PCR futuras e para a ligação com o plasmídeo; **Construção da biblioteca genômica** enriquecida com estreptavidina consiste de bio-oligos (biotina+oligos (TC)₁₃) acoplados às contas magnéticas, na qual os oligos irão se hibridizar com os fragmentos de DNA que contêm repetições dinucleotídicas AG/TC. Os fragmentos enriquecidos são amplificados por PCR (*primers* complementares aos adaptadores); **Seleção dos clones com microssatélites onde** os fragmentos são ligados ao plasmídeo, como por exemplo o plasmídeo pGEM-T (Promega) e transformados em células competentes *E.coli* e; **Sequenciamento gerados dos** Produtos de PCR, pela amplificação do inserto plasmídeo positivo e submetidos à eletroforese em um equipamento de seqüenciamento genético. As seqüências com microssatélites de 20pb são selecionadas criteriosamente, onde é identificado o adaptador e levado a uma plataforma *online* para desenho dos *primers* como o programa Primer 3 output.

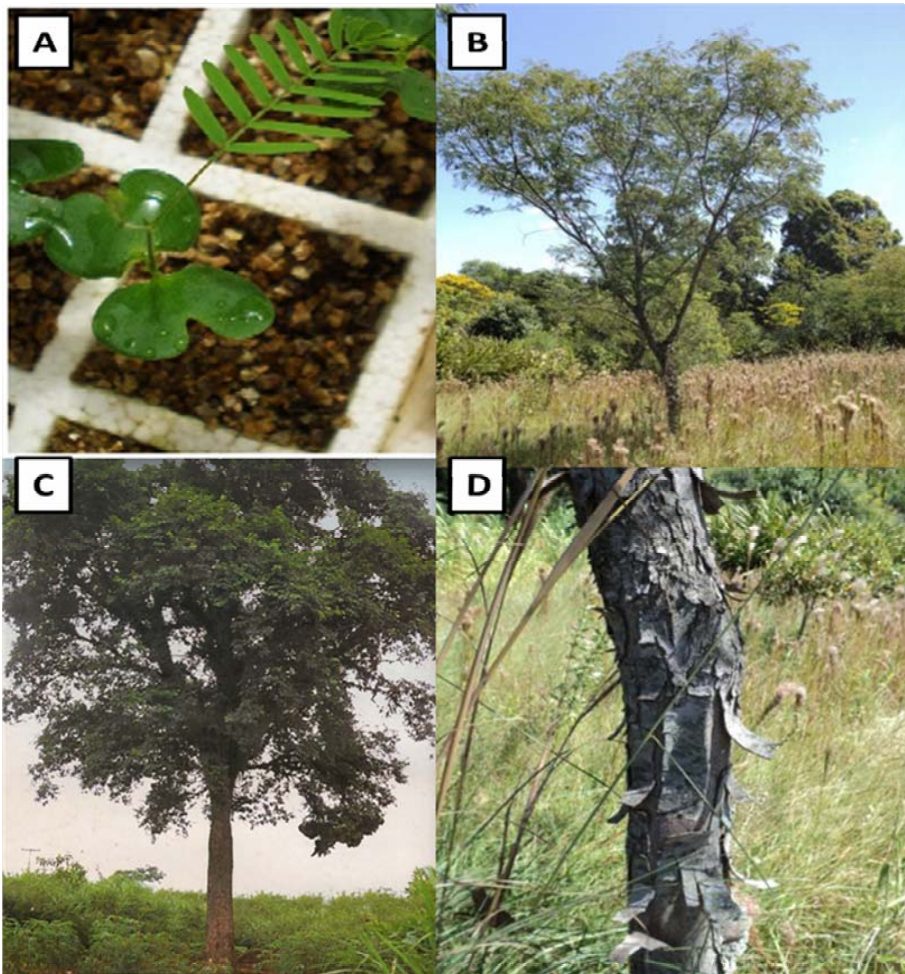
Costa et al. (2012), desenvolveram nove *primers* microssatélites para caracterizar a espécie *P. rigida* e estudar sua estrutura genética. Esta seria uma das etapas em qualquer estudo de microssatélites e envolve a precisão na coleta, extração e quantificação do DNA, construção de uma biblioteca genômica para desenvolver e otimizar um conjunto útil de pares de *primers* de microssatélites e amplificação destes.

2.5 A ESPÉCIE *PARAPIPTADENIA RIGIDA* – ANGICO

A Família Fabaceae compreende uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas (JOLY, 1993) e considerada umas das famílias mais representativas nas formações das florestas. Estas podem ser plantas de hábito muito variado vivendo em diferentes latitudes e altitudes.

O sistema de classificação taxonômica da espécie em estudo *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan corresponde a seguinte organização hierárquica: Divisão Magnoliophyta (Angiospermae), Classe Magnoliopsida (Dicotyledonae), Ordem Fabales, Família Fabaceae-Mimosoideae, Gênero Parapiptadenia, Espécie *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (CARVALHO, 2002) (Figura 1).

Figura 1 – *Parapiptadenia rigida*. A - Plântula. B - Indivíduo jovem. C - Indivíduo adulto. D – Tronco tipo árvore



Fonte: A - MACIEL et al. (2012); B e D – FERRERA (2012) C - LORENZI (2000)

Apresenta-se com variados nomes populares dependentes da sua localização, no Brasil é chamada de gurucaia (CHAGAS E SILVA et al., 1995), angico-vermelho (KIPPER et al., 2010; FERRERA, 2012), angico na Bahia, no Paraná, no Rio Grande do Sul, em Santa Catarina e em São Paulo, angico-da-mata, angico-verdadeiro (LORENZI, 2000), monjoleiro (SAUERESSIG, 2012), angelim-amarelo, na Bahia e em Santa Catarina; angico-branco, em Minas Gerais e em São Paulo. Em outros países é conhecida como anchico, no Uruguai, anchico colorado e curupay-rá, na Argentina, kari kara na Bolívia, kurupay'ra, no Paraguai (CARVALHO, 2002).

A subfamília Mimosoideae possui aproximadamente, 80 gêneros que são na sua maioria tropical e subtropical na distribuição e principais componentes de regiões áridas e semi-áridas de todo o mundo (LUCKOW et al., 2003). Segundo Lorenzi e Souza (2008), a subfamília possui folhas geralmente bipinadas, flores actinomorfas, diclamídeas, corola com prefloração valvar, frequentemente gamopétala-da, estames em número igual ou duplo ao das pétalas e sementes com pleurograma.

Abundantes das regiões tropicais a *Parapiptadenia* é considerada uma segregação dos gêneros de *Piptadenia* de Benth (JOBSON; LUCKOW, 2007 apud LIMA; LIMA, 1984) e as espécies com sementes aladas foram reconhecidos como pertencentes ao gênero *Parapiptadenia* Brenan (JOBSON; LUCKOW, 2007 apud BRENAN, 1963). O significado etimológico decorre de *Parapiptadenia*, do grego *pará* (semelhante) ao gênero *Piptadenia* Benth, por ser semelhante ou próximo a este gênero; *rigida*, do latim *rigidus* (rijo,duro), provável alusão à dureza do lenho (BURKART, 1979). *P. rigida* é bem distinta das demais espécies brasileiras e caracteriza-se, principalmente, pelas flores amarelo-esverdeadas e pelos folíolos linear-falcados com nervura principal submarginal (LIMA; LIMA, 1984). As espécies de *Parapiptadenia* são muito afins das de *Piptadenia*, mas diferenciam-se pelas sementes aladas. (LIMA, 1985).

Sua distribuição geográfica no Brasil (Figura 2) é larga e ocorre em Floresta Estacional Decidual (HIGUCHI et al., 2012), em Floresta Semidecidual (SCHEER; BLUM, 2011), em Floresta Tropical/Subtropical Perenifólia e Floresta Subtropicais (INPE, 2008), em Floresta Ombrófila Mista ou Floresta com Araucária (SAUERESSIG, 2012). Sua ocorrência natural incide desde nordeste da Argentina, no leste do Paraguai, no norte do Uruguai (MARTINEZ-CROVETTO, 1963; GAR-

TLAND et al., 1995; LOPEZ et al., 1987; LOMBARDO, 1964). E no Brasil ocorre nos estados Espírito Santo (LOPES et al., 2000), Mato Grosso do Sul (SOUZA et al., 1997), Minas Gerais (CARVALHO et al., 1999), Paraná (CEZARE et al., 1998; FOWLER; CARPANEZZI, 1998; SOARES-SILVA et al., 1998), Rio de Janeiro (PÍFIA-RODRIGUES et al., 1997), Rio Grande do Sul (COSTA et al., 2000), Santa Catarina (NEGRELLE; SILVA, 1992), São Paulo (CAMARGO; CAVASSAN, 1999).

Figura 2 – Locais de ocorrência natural de *Parapiptadenia rigida* no Brasil



Fonte: CARVALHO (2002)

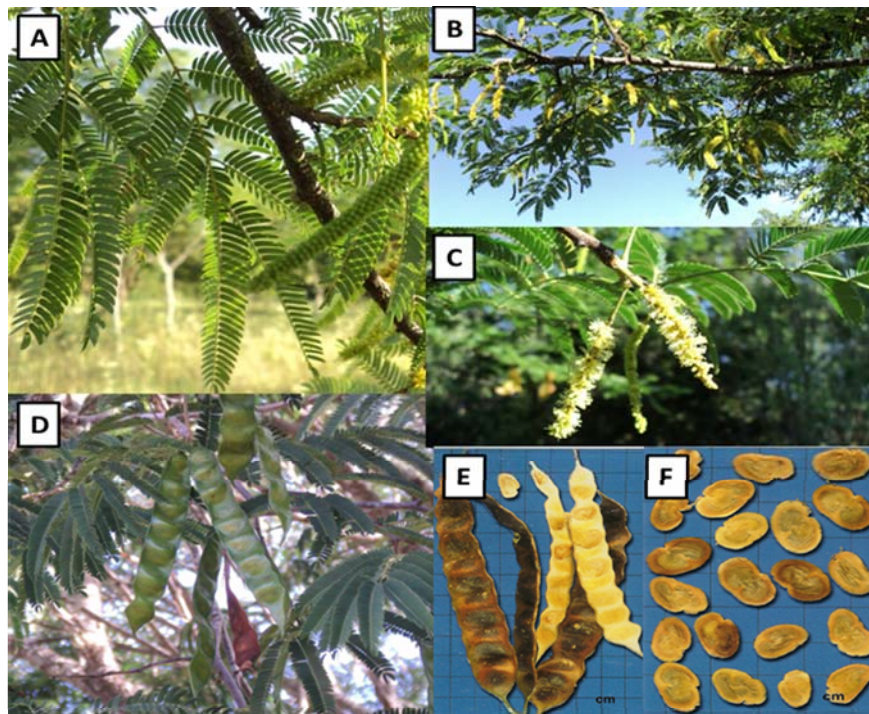
Planta decídua, heliófita, indiferente às condições físicas do solo, apresenta maior frequência nas matas menos abertas e menos densas e principalmente, nas associações secundárias mais evoluídas (LORENZI, 2000) ou seja, uma planta secundária inicial (VACARRO et al., 1999; BORGHI et al., 2004; KIPPER et al., 2010; COELHO et al., 2011).

Arvoreta a árvore comumente semidecidual, mas existem exemplares perenifólios. Geralmente com 4 a 20 m de altura e 40 a 70 cm de DAP, podendo atingir até 35 m de altura e 140 cm de DAP, na idade adulta (CARVALHO, 2002). A emergência ocorre com 5 dias e sua germinação é do tipo epígea com raiz pivotante (LOPES et al., 2012). Planta com sistema sexual hermafrodita (CARVALHO, 2002) produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis e sua dispersão pode ser anemocoria, autocoria, principalmente barocoria, por gravidade e também hidrocoria, devido a sua ocorrência frequente junto aos cursos de água (BURKART, 1979;

COELHO et al., 2011) e seu principal vetor de polinização são as abelhas (CAVALHEIRO; AMEXEIRO, 1992).

Fenologicamente (Figura 3) ocorre a queda foliar da espécie de maio a novembro (caducifolia) e o brotamento de julho a novembro, as emissões dos botões florais em novembro a dezembro e em maio; a antese de novembro a fevereiro e em maio e; a frutificação imatura de dezembro a junho e a madura de março a agosto (FERRERA, 2012).

Figura 3 – *Parapiptadenia rigida*. A - Folhas. B - Flores. C – Flores em detalhe. D – Frutos verdes. E – Frutos secos. F – Sementes



Fonte: A a D – FERRERA (2012); E e F - LORENZI (2000)

Em relação aos solos encontrados, a espécie cresce tanto em solos úmidos como em secos, sendo mais abundante nos bem drenados, adapta-se bem a solos rasos, principalmente os derivados de basalto, sendo, por isso, freqüente nas encostas dos vales (EMBRAPA, 1988).

Schroder et al. (2013) define *P. rigida* com características de rápido crescimento e madeira de alta densidade de massa específica aparente de 0,75 a 1,00 g/cm³ a 15% de umidade e massa específica básica: 0,54 a 0,69 g/cm³, com madeira de alta durabilidade, em condições favoráveis ao apodrecimento. É considerada madeira imune ou muito resistente ao cupim (JANKOWSKI et al., 1990; SILVA

et al., 1982). IPEF (2013) define a utilização da espécie em construção, carvão, resina, arborização urbana, medicina, melífera e paisagismo. E ainda, UBESSI-MACARINI et al. (2011) relata a utilização da espécie em produtos apícolas, combustíveis, ecológicos, fibras, medicinais, ornamentais e produtos bioquímicos, aproveitando todas partes da planta.

A espécie também apresenta principalmente aplicabilidade e importância nos aspectos ambientais, pois se torna ideal para a restauração florestal e para o sequestro de carbono. Ela é recomendada para reposição de mata ciliar em locais com ausência de inundação ou com inundações periódicas de rápida duração (FERREIRA, 1983; SALVADOR, 1987; DURIGAN; NOGUEIRA, 1990), e ainda na recuperação de áreas degradadas (SOUTO, 1984). Nos plantios, apresenta boa deposição de folheto, que dificulta o aparecimento de vegetação invasora.

3 JUSTIFICATIVA

A fragmentação dos habitats naturais tem sido considerada um problema a nível global. Esta amplitude pode ser relacionada com a grande importância em estudar estes ambientes degradados ao que tange à fauna e à flora. A atividade humana tem participado ativamente, de formas diretas e indiretas, seja por necessitar dos recursos naturais, seja por praticar o desmatamento para ampliar a pecuária, a agricultura ou às zonas civis.

A crescente demanda da exploração dos recursos naturais e a cadeia de processo que a cerca (economia e política) demanda em acelerar os estudos e pesquisas científicas, a fim de manter o desenvolvimento econômico sustentável e a preservação dessas espécies ameaçadas por este círculo vicioso. Estudos nesta área demandam pessoas capacitadas em ter conhecimento de diversas áreas a fim de proporcionar resultados que denotem o passado ao presente e, ao futuro, o qual poderemos não ter as florestas que hoje já não são mais intactas.

O estudo com a espécie *Parapiptadenia rigida* apresenta sua relevância para aprofundar o conhecimento sobre a espécie a nível molecular. As tecnologias empregadas no campo das ciências incluem os marcadores moleculares os quais são ferramentas essenciais nas pesquisas com espécies arbóreas. Os micros-satélites sendo os mais informativos, propõem a compreensão da estrutura genética da espécie podendo inferir dados de fluxo gênico, deriva genética e distâncias inter e intra-populações. Tais inferências são valiosas ao colaborar para o acervo da conservação genética.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Estimar a diversidade genética de populações de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Fabaceae-Mimosoideae) utilizando marcadores microssatélites a fim de relacionar se a mesma encontra-se em perigo de extinção e analisar se há relação com o habitat fragmentado da região onde a espécie se encontra.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Quantificar a variabilidade genética inter e intrapopulacional de quatorze populações de *P. rigida* distribuídas nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo;
2. Associar os resultados aos padrões reprodutivos e demográficos com a diversidade genética intra e interpopulações;
3. Estimar a divergência genética entre as população em estudo comparando com as distâncias geográficas dos diferentes fragmentos amostrados;
4. Estabelecer uma relação entre os dados moleculares analisados, as áreas de coleta e o impacto do histórico de fragmentação que ocorreu na região de estudo.

5 ARTIGO: DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *PARAPIPTADENIA RIGIDA* (BENTH.) BRENNAN (FABACEAE - MIMOSOIDEAE) POR MARCADORES MICROSSATÉLITES.

RESUMO: A família Fabaceae-Mimosoideae apresenta, aproximadamente, 40 gêneros incluindo *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan, a qual ocorre com maior frequência nos três estados do sul do Brasil. *P. rigida* é uma árvore de sucessão secundária precoce, característica da floresta tropical, a qual é de grande importância ecológica na recuperação de áreas degradadas. Foram utilizados oito pares de locos de microsatélites para estudar a variabilidade e estrutura genética de 14 populações de *P. rigida* e obteve-se um total de 137 alelos com os valores médios de heterozigosidade esperada e observada de 0,32 e 0,53, respectivamente. Todas as populações estudadas mostraram déficits de heterozigotos. A maior parte da diversidade genética foi encontrada dentro de populações, enquanto o nível de diferenciação genética foi moderado (12,91%) entre as populações. Níveis diferentes de fluxo gênico entre as populações foi verificado. Valores de *Fis* positivos e significativos foram calculados para todas as populações e o teste de Wilcoxon para excesso de heterozigosidade mostrou que um recente gargalo genético ocorreu em 12 das 14 populações estudadas. O dendrograma construído pelo método UPGMA mostrou a formação de dois grupos. A presença de vários pares de locos em desequilíbrio de ligação confirma o fato de que estas populações perderam variabilidade genética por deriva genética. O teste de correlação de Pearson não foi significativo para a relação entre distância genética e distância geográfica. Os resultados mostraram que é necessário a aplicação de estratégias de manejo para a conservação destas populações de *P. rigida* pois, a viabilidade das próximas gerações está severamente comprometida.

Palavras-chave: Mimosoideae. Espécie arbórea tropical. Conservação. Marcadores moleculares.

ABSTRACT: Fabaceae-Mimosoideae Family has approximately 40 genera including *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan which occurs with great frequency in the three Southern States from Brazil. *P. rigida* is a tree of early secondary succession characteristic of the Tropical Rainforest that is of great ecological importance in the recovery of degraded areas. We used eight pairs of microsatellite loci to study the genetic variability and population genetic structure in fourteen populations and obtained a total of 137 alleles with an average observed and expected heterozygosity of 0.32 and 0.53, respectively. All the populations studied showed heterozygosity deficits. Most of the genetic diversity was found within populations; while the level of genetic differentiation was moderate (12.91%) between populations. Different levels of gene flow among the populations were detected. Positive and significant values of *Fis* were found for all the populations and the Wilcoxon test for excess of heterozygosity indicate that a recent bottleneck occurred in twelve of fourteen populations studied. The dendrogram constructed by the UPGMA method revealed the formation of two groups. The presence of several pairs of loci in linkage disequilibrium confirms that these populations experienced a loss of genetic diversity caused by genetic drift. Pearson correlation test was not significant for genetic and geographic distances. The results showed that it is necessary to develop management strategies for the conservation of these populations of *P. rigida* as the viability of the next generations are severely compromised.

Keywords: Mimosoideae. Tropical tree species. Conservation. Molecular markers.

5.1 INTRODUÇÃO

A devastação das florestas brasileiras atreladas à competição humana e seu crescimento desordenado é uma das principais causas da redução dos habitats naturais e também, da divisão dos remanescentes em fragmentos menores (ARAÚJO, 2005). Isto, conseqüentemente, modifica e desequilibra a biodiversidade a qual constitui uma propriedade dos ecossistemas com a característica básica de manutenção da natureza em seu longo processo evolutivo.

A genética da conservação permite a avaliação da variabilidade genética intra e interespecífica buscando uma melhor compreensão da dinâmica de populações das espécies. É também, importante por proporcionar esclarecimentos da causa do potencial evolutivo a longo prazo (BEGON et al., 2007) e interferir de maneira positiva no monitoramento de projetos de reintrodução e manejo de populações naturais (SANTOS et al., 2004).

O estudo de espécies tropicais é de suma importância, principalmente, aquelas inclusas na lista de sucessão ecológica, como *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Mimosoideae). A Família Fabaceae compreende uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas (JOLY, 1993) e a subfamília Mimosoideae possui aproximadamente, 80 gêneros que são na sua maioria tropical e subtropical na distribuição e principais componentes de regiões áridas e semi-áridas de todo o mundo (LUCKOW et al., 2003). Pertencendo a esta subfamília, a espécie *P. rigida* apresenta-se com variados nomes populares como gurucaia (CHAGAS E SILVA et al., 1995), angico-vermelho (KIPPER et al., 2010; FERRERA, 2012), angico (LORENZI, 2000) ou ainda, monjoleiro (SAUERESSIG, 2012).

Sua distribuição geográfica no Brasil é ampla, se estendendo do Nordeste ao Sul, é característica das Florestas Estacional Decidual (HIGUCHI et al., 2012) e Semidecidual (SCHEER; BLUM, 2011), mas ocorre também na Floresta Ombrófila Densa e Ombrófila Mista (SAUERESSIG, 2012) com menor frequência. É uma planta secundária inicial (VACARRO et al., 1999; BORGHI et al., 2004; KIPPER et al., 2010; COELHO et al., 2011), monóica com sistema sexual hermafrodita (CARVALHO, 2002), alógama e possivelmente apresenta um sistema de auto-incompatibilidade (RIBAS, 1999), devido ao seu comportamento pioneiro e de sucessão secundária inicial, com crescimento rápido sendo utilizada em sistemas de restauração florestal e sequestro de carbono. Árvores adultas e regenerantes de *P.*

rigida ocorrem agrupadas, provavelmente devido à dispersão de sementes próximas às árvores matrizes, levando ao aparecimento de estrutura genética espacial intra-populacional.

Neste sentido, para o estudo da diversidade genética desta espécie, os marcadores moleculares são uma excelente ferramenta, pois contribuem para direcionar o conhecimento da base genética (FALEIRO, 2007). Dentre os tipos de marcadores moleculares, os microssatélites são os mais utilizados em estudos de populações de espécies arbóreas, para verificar como a devastação florestal afeta a variabilidade genética.

Essa espécie arbórea torna-se alvo de investigação e preocupação científica para conhecer a base da diversidade genética de suas populações naturais. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo investigar a diversidade genética da *P. rigida* sob a hipótese de que esta espécie sofreu e está sofrendo os efeitos da fragmentação com a consequente perda de sua variabilidade genética nestes fragmentos e associar os resultados aos padrões reprodutivos e demográficos com a diversidade genética contribuindo com a conservação dos recursos genéticos desta espécie arbórea tropical.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Amostragem

Realizou-se a amostragem de 14 populações de *P. rigida* (Tabela 1) entre 2010 e 2012 sendo nove no Paraná, duas em Santa Catarina, duas no Rio Grande do Sul e uma em São Paulo (Figura 4). Foram amostrados, aproximadamente, 30 indivíduos aleatoriamente em cada população, mantendo uma distância mínima de 10m entre as árvores a fim de evitar a coleta de indivíduos aparentados e de modo a abranger toda sua área de distribuição no fragmento. Algumas amostras foram coletadas em gelo e posteriormente mantidas a -20°C até a extração do DNA, enquanto outras foram mantidas em sílica. A populações de Alvilândia, Cornélio Procópio e Londrina foram coletadas nas reservas florestais da Estação Ecológica de Caetetus, Parque Estadual Mata São Francisco e Parque Estadual Mata dos Godoy, respectivamente, onde estes fragmentos são preservados.

Tabela 1 – Locais de coleta das amostras de *Parapiptadenia rigida* na região sul e sudeste-brasileira e número (n) de indivíduos

Siglas	Cidade/Estado Coordenada	Área Total do Fragmento	Altitude média	Formação Florestal
TOM	TOMAZINA Paraná -23.773591°S -49.938178°W	754.000m²	494	Floresta Estacionária Semidecídua
WES	FREDERICO WESTPHALEN Rio Grande do Sul -27.343946°S -53.383690°W	365.000m²	532	Floresta Estacionária Decídua
PMT	PALMITAL Paraná -24.876823°S -52.162961°W	310.550m²	915	Floresta Estacionária Semidecídua
BIV	IRAÍ Rio Grande do Sul -27.185187°S -53.249438°W	110.000m²	221	Floresta Estacionária Decídua
LUP	LUPIONÓPOLIS Paraná -22.760173°S -51.664464°W	83.800m²	425	Floresta Estacionária Semidecídua
MGY	LONDRINA Paraná -23.443281°S -51.243259°W	15.150.000m²	551	Floresta Estacionária Semidecídua
STA	SANTA CECÍLIA DO PAVÃO Paraná -23.488199°S -50.816302°W	414.000m²	665	Floresta Estacionária Semidecídua
CPR	CORNÉLIO PROCÓPIO Paraná -23.250000°S -50.733333°W	380.000m²	665	Floresta Estacionária Semidecídua
EOR	ORTIGUEIRA (Entrada) Paraná -24.204534°S -50.942049°W	145.000m²	821	Floresta Estacionária Semidecídua
CRV	CURIÚVA Paraná -24.016667°S -50.433333°W	35.140.000m²	831	Floresta Estacionária Semidecídua
BNH	ORTIGUEIRA (Banhadão) Paraná -24.150000°S -50.866667°W	240.000m²	821	Floresta Estacionária Semidecídua
CNV	VARGEM Santa Catarina -27.497352°S -50.881842°W	1.500.300m²	937	Floresta Estacionária Decídua/ Floresta Ombrófila Mista
LAV	LAGES Santa Catarina -28.183333°S -50.716667°W	3.720.000m²	885	Floresta Ombrófila Mista

CTT	ALVILÂNDIA São Paulo -22.380492°S -49.674468°W	23.510.000m ²	670	Floresta Estacionária Semidecídua
-----	--	--------------------------	-----	---

Figura 4 – Mapa das áreas de coleta nos estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo, Brasil



5.2.2 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo Doyle e Doyle (1987), as amostras foram maceradas utilizando o macerador Retsch MM400 (Haan, Germany); adicionando-se posteriormente, 1.000µl de CTAB 2% e levados ao banho-maria pré-aquecido a 65°C onde ficaram incubadas por 30 minutos, agitando-se a cada 10min.

Os microtubos foram retirados e resfriados a temperatura ambiente acrescentando-se 450µl de clorofórmio álcool isoamílico (24:1) e agitados até homo-

geinizar; centrifugados a 14.000 *rpm* por 5 minutos; recuperando o sobrenadante e transferindo para outro microtubo (3 alíquotas de 180 μ l); acrescentando 400 μ l de isopropanol gelado (-20°C) e; centrifugando a 7.500 *rpm* por 10 minutos para formar o *pellet*.

Descartou-se o máximo de sobrenadante e lavou-se duas vezes o *pellet* com 500 μ l de etanol 70% e com 1.000 μ l de etanol absoluto. Retirou-se o máximo possível deste e quando o *pellet* secou, acrescentou-se 50 μ l de tampão TE 0.01mM contendo 5 μ l/MI de RNase. As amostras foram incubadas na estufa por 30 min a 37°C e conservou-se em freezer a - 20°C por 24 horas para eletroforese.

5.2.3 Amplificação de Microssatélites

A análise dos locos de microssatélites foi realizada no laboratório multiusuário (LAMM-UEL/Pr). As reações de amplificação utilizaram 8 *primers* desenvolvidos por COSTA et al. (2012): Prig21, Prig26, Prig 28, Prig29, Prig33, Prig 38, Prig62, Prig87 (Tabela 2). As reações de PCR foram compostas de 1 μ l de DNA genômico (50ng); 4,5 μ l Go Taq Green Master Mix 1X, 0,16 μ l a 5pmol do primer direito com a cauda para o M13, 0,32 μ l a 5pmol de cada *primer* reverso e M13 marcado com fluoróforos FAM, HEX e MED e água ultra pura para completar volume final da reação de 10 μ l. As reações de amplificação (MJ Research PTC-200) foram programadas para as seguintes condições: uma denaturação inicial de 4 min a 94°C seguidos de 11 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 65-53°C (1°C/ciclo) e 30 seg a 72°C mais 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C e 30 seg a 72°C seguidos de 8 ciclos de 30 seg a 94°C, 45 seg a 53°C e 45 seg a 72°C e uma extensão final de 60°C após 40 min e 10°C *hold*.

Após amplificação, os produtos foram submetidos a eletroforese capilar no sequenciador 3500xL (Life Technologies, California, USA) e analisados para estimativa do tamanho dos alelos.

Tabela 2 – Sequência de pares de primers desenvolvidos para *Parapiptadenia rigida* com as respectivas, tamanho de pares de bases (pb), temperaturas de anelamento (Ta)

Locus/Nr acesso GenBank	Sequência (5'-3')	Motifs	Tamanho do alelo(pb)	Ta
Prig 21/JQ042252	F: GGTGGGGATCGGATTATTT R: CTATTGATGCGCATGTGAGT	(AC) ₁₀	179	56
Prig 26/JQ042253	F: GGCAGAGCTGTCAGGATCA R: GACCTCTTCCACCCTTTTCC	(AG) ₁₉	218	60
Prig 28/JQ042254	F: CATTGAACCTATTCCCCTGA R: GGGACAAATAACATGTCTGACG	(TAT) ₃ ...(GA) ₄	168	54
Prig 29/JQ042255	F: ACCCCCGGTATTTCCATAAC R: GGAGGGGTCATGTCTTTGAA	(CA) ₄ ...(GT) ₁₁	200	58
Prig 33/JQ042256	F: TTTGCTTTTGCCATTGAAGA R: TTGGTGGGCTTAGGCAAATA	(AC) ₉	206	56
Prig 38/JQ042257	F: TGGTCCTTCTTCTGCAGGTT R: CTAGCTTCATGGGCTTTTGG	(TG) ₅ ...(CT) ₅ AT (GT) ₇ -GA(GT) ₃	194	55
Prig 62/JQ042259	F: GTTCAAAGCTTTTGC GTGGT R: CAGGGAAGACAAACCTGGAA	(TG) ₈	244	57
Prig 87/JQ042260	F: CCTGCTTCCCTTACGACAC R: TGTGATGAGCTAGGGCATTG	(AC) ₉	192	59

Fonte: COSTA et al. (2012)

5.2.4 Análise Estatística

O tamanho dos alelos foram determinados utilizando-se o marcador de peso molecular GeneScan™ – 600 LIZ® Size Standard (Life Technologies, California, USA), pelo programa GeneMarker v.1.6 (Life Technologies, California, USA) posteriormente os dados foram organizados em matrizes e submetidos a programas computacionais. Os dados foram analisados quanto a presença de alelos nulos, bandas *stutter* e alelos *drop-out* que afetam a leitura dos microssatélites, através do programa Micro-Checker 2.2.3. (VAN OOSTERHOUT et al., 2004).

A diversidade genética de cada população foi caracterizada pelo número de alelos por locos (A), número de alelos efetivos (A_E), heterozigidade observada (H_o) e heterozigidade esperada (H_e) no programa PopGene v. 1.31. Os níveis de endogamia (F_{IS}; Wright, 1951) com correção de *Bonferroni* (95%, α=0,05), baseados em 2.240 randomizações foram geradas pelo programa FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2011). O teste exato para desvio do Equilíbrio de Hardy-

Weinberg (GUO; THOMPSON, 1992) e desequilíbrio de ligação foram obtidos pelo software Genepop 4.2.1 (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

A variabilidade genética entre populações, entre indivíduos dentro de populações, dentro de indivíduos bem como o índice de fixação alélica (F_{ST}) foram estimados utilizando a análise de variância molecular (AMOVA) pelo programa ARLEQUIN v.3.11 (EXCOFFIER et al., 2005), com o qual foi também calculado o F_{st} par a par.

Para verificar se as populações estudadas passaram por um efeito de Gargalo Genético recente foi utilizado o programa BOTTLENECK (CORNUET; LUIKART, 1996; PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999), a partir de três modelos evolutivos para locos de microssatélites, sendo eles *Infinite Allele Model* (IAM), *Two Phase Model* (TPM) e *Stepwise Mutation Model* (SMM). As probabilidades baseadas no excesso/deficiência de heterozigosidade foram derivadas do teste de Wilcoxon (Wilcoxon sign-rang test) (LUIKART et al., 1998). O teste de Wilcoxon fornece um poder relativamente alto para análises que utilizam poucos locos.

Distância genética de Nei (1978) foi usada para construir o dendrograma utilizando o método UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) (SOKAL; MICHENER, 1958) com software TFGA 1.3 (MILLER, 1997).

Já ocorrência de migração entre as populações foi estimada pelo método Bayesiano para a porcentagem de migrantes, pelo programa BAYESASS, versão 1.3 (WILSON; RANNALA, 2003). Para verificar uma possível correlação entre distância geográfica e genética, foi realizado o teste de correlação de Pearson, com base nos valores de F_{ST} entre pares de populações e as distâncias geográficas, pelo software Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007).

5.3 RESULTADOS

Neste estudo, somente o DNA das plantas que mostraram um bom nível de amplificação para todos os locos foram considerados, com o objetivo de eliminar desvios causados por alelos nulos. O teste para alelos nulos mostrou uma presença desprezível dos mesmos nas populações estudadas (Tabela 3).

Para os oito locos de microssatélites estudados nas 14 populações de *P. rigida* (Tabela 3), um total de 137 alelos foram identificados em 420 indivíduos. O número de alelos variou de 4,38 (PMT) a 7,88 (STA) com média de 6,05. O

número de alelos efetivos variou de 1,99 (TOM) a 4,32 (STA) com média de 3,01 por locos. As médias de heterozigozidade observada ($H_o = 0,33$) foram mais baixas do que a média de heterozigozidade esperada ($H_e = 0,52$), mostrando uma deficiência em heterozigotos. O teste de correlação linear de Pearson não mostrou relação entre a taxa de heterozigozidade e o tamanho do fragmento ($r = -0,0789$, $P = 0,7886$). Os valores do coeficiente de endogamia (F_{is}) para as 14 populações estudadas mostraram valores positivos e significativos. O teste exato para Equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrou que todas as populações estudadas desviaram significativamente do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3).

Tabela 3 – Medidas da diversidade para oito locos de microssatélites para 14 populações de *Parapiptadenia rigida*

População ^a	N	A (SD)	A _e (SD)	H _o (SD)	H _e (SD)	F _{is}	Null
TOM	29 ^x	4,50 (2,14)	1,99 (0,54)	0,18 (0,22)	0,46 (0,21)	0,60*	0,16
WES	28 ^x	4,63 (1,85)	2,28 (0,96)	0,27 (0,19)	0,49 (0,24)	0,46*	0,11
PMT	30 ^x	4,38 (2,56)	2,33 (1,64)	0,25 (0,27)	0,39 (0,33)	0,36*	0,20
BIV	28 ^x	6,00 (3,02)	3,12 (1,99)	0,28 (0,24)	0,57 (0,28)	0,50*	0,24
LUP	29 ^x	4,88 (2,17)	2,29 (0,78)	0,18 (0,16)	0,51 (0,24)	0,65*	0,18
MGY	33 ^x	7,13 (3,60)	3,41 (2,43)	0,33 (0,19)	0,56 (0,30)	0,41*	0,16
STA	29 ^x	7,88 (3,72)	4,32 (3,01)	0,39 (0,19)	0,64 (0,29)	0,40*	0,16
CPR	31 ^x	6,88 (3,18)	3,75 (2,40)	0,33 (0,19)	0,59 (0,32)	0,44*	0,09
EOR	31 ^x	6,38 (3,74)	3,31 (2,11)	0,39 (0,27)	0,55 (0,34)	0,28*	0,09
CRV	32 ^x	7,63 (4,27)	3,54 (2,68)	0,45 (0,24)	0,58 (0,30)	0,22*	0,12
BNH	30 ^x	7,25 (3,73)	3,32 (2,01)	0,41 (0,28)	0,57 (0,33)	0,27*	0,08
CNV	28 ^x	5,00 (1,77)	2,06 (1,16)	0,31 (0,20)	0,41 (0,24)	0,25*	0,11
LAV	29 ^x	5,13 (2,30)	2,79 (1,76)	0,38 (0,24)	0,53 (0,26)	0,28*	0,15
CTT	30 ^x	7,00 (2,93)	3,59 (2,15)	0,42 (0,26)	0,63 (0,23)	0,34*	0,15
Média loco	-	6,05 (2,93)	3,01 (1,83)	0,33 (0,22)	0,53 (0,28)	-	-

* Significância de F_{is} a 5 % de probabilidade por população em todos os locos

^x Significância a 5 % de probabilidade pelo teste exato de Fisher para equilíbrio de Hardy-Weinberg

^a Nomes das populações especificados na Tabela 1

N número de indivíduos por população, A número de alelos por locos, A_e número de alelos efetivos por locos, H_o heterozigozidade observada, H_e heterozigozidade esperada, F_{is} coeficiente de endogamia segundo Wright 1951, Null frequências médias do alelo nulo, SD desvio padrão para A, A_e, H_o e H_e.

O teste de desequilíbrio de ligação mostrou que 9 das 14 populações estudadas mostraram pares de locos em desequilíbrio de ligação. As populações de Alvilândia, Cornélio Procópio, Frederico Westphalen e Santa Cecília do Pavão mostraram três pares de locos em desequilíbrio de ligação enquanto as populações de Curiúva e Ortigueira (Banhadão) mostraram dois pares de locos em desequilíbrio de ligação. As populações de Ortigueira (Entrada), Palmital e Vargem mostraram somente um par de locos em desequilíbrio de ligação enquanto as populações de Iraí, Lages, Londrina, Lupionópolis e Tomazina não apresentaram locos em desequilíbrio de ligação.

Tabela 4 – Presença do desequilíbrio de ligação de 8 locos de microssatélites em 14 populações de *Parapiptadenia rigida*

Locos	Populações								
	WES	PMT	STA	CPR	EOR	CRV	BNH	CNV	CTT
Loco 21 / Loco 26			+						
Loco 21 / Loco 29					+				
Loco 21 / Loco 33			+						
Loco 21 / Loco 38	+								
Loco 21 / Loco 62				+			+		
Loco 21 / Loco 87		+							
Loco 26 / Loco 29							+		+
Loco 26 / Loco 33			+						
Loco 26 / Loco 38									+
Loco 26 / Loco 62							+		
Loco 29 / Loco 38						+			
Loco 29 / Loco 62				+					
Loco 29 / Loco 87				+					
Loco 38 / Loco 62	+								
Loco 38 / Loco 87	+								+
Loco 62 / Loco 87								+	

P > 0.05 (significativo usando o teste exato de Fisher)

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que 17,12% da variação genética é encontrada dentro das populações, 69,97% é encontrado dentro de indivíduos e apenas 12,91% é encontrado entre as populações (índice de diferenciação genética, $F_{st} = 12,9\%$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise de variância molecular (AMOVA) em 14 populações de *Parapiptadenia rigida* utilizando oito locos microssatélites

Fonte de variação	G.L.	Soma dos Quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variância
Entre populações	13	77,40	0,08	12,91**
Entre indivíduos dentro de populações	403	286,41	0,11	17,12**
Dentro de indivíduos	417	199,00	0,47	69,97**
Total	833	562,81	0,68	
Fst:	0,129			

**P ≤ 0,01 (significância dada pelo teste com 1.023 permutações)

Níveis baixos a elevados de diferenciação genética (Fst par a par) foram observados entre as populações, com as menores diferenças observadas entre as populações de Lupionópolis e Tomazina, Lages e Vargem. E as maiores distâncias genéticas entre as populações de Ortigueira (Entrada) e Iraí, Vargem e Ortigueira (Entrada) (Tabela 6). O teste de correlação de Pearson mostrou não existir relação entre o Fst par a par e entre as distâncias geográficas das populações ($r = 0,1256$; $p = 0,2355$).

Tabela 6 – Distância geográfica em km, acima da diagonal, e valores de *Fst* par a par das populações de *Parapiptadenia rigida* abaixo da diagonal.

	TOM	WES	PMT	BIV	LUP	MGY	STA	CPR	EOR	CRV	BNH	CNV	LAV	CTT
TOM	**	525	255	504	210	138	95	100	113	58	104	423	495	156
WES	0,02	**	299	22	537	483	500	527	425	473	435	248	279	665
PMT	0,12	0,07	**	276	240	184	206	232	144	200	154	315	394	375
BIV	0,13	0,11	0,05	**	515	461	477	505	404	450	412	238	274	643
LUP	0,01	0,03	0,10	0,07	**	88	119	110	177	188	175	530	608	209
MGY	0,02	0,01	0,11	0,14	0,04	**	44	56	90	105	88	450	528	200
STA	0,07	0,15	0,14	0,10	0,08	0,16	**	28	80	70	74	445	520	170
CPR	0,06	0,11	0,09	0,05	0,04	0,10	0,02	**	108	90	101	471	546	145
EOR	0,21	0,22	0,30	0,35	0,23	0,16	0,28	0,24	**	56	10	365	441	240
CRV	0,12	0,16	0,19	0,22	0,15	0,12	0,17	0,14	0,05	**	46	388	462	197
BNH	0,06	0,12	0,14	0,15	0,08	0,10	0,06	0,05	0,11	0,05	**	371	447	230
CNV	0,17	0,11	0,02	0,04	0,14	0,16	0,16	0,12	0,36	0,25	0,18	**	77	580
LAV	0,12	0,10	0,04	0,04	0,10	0,13	0,09	0,07	0,31	0,20	0,11	0,01	**	651
CTT	0,07	0,08	0,10	0,14	0,05	0,09	0,10	0,08	0,16	0,13	0,07	0,16	0,13	**

Valores significativos $P \leq 0,01$ dada por 1.023 permutações

O teste de Wilcoxon (Tabela 7) mostrou que a maioria das populações sofreram uma redução recente no tamanho efetivo, com exceção das populações de Cornélio Procópio e Palmital. A população de Vargem mostrou efeito de deriva genética recente pelos modelos IAM, SMM e TPM e as populações de Tomazina e Londrina mostraram efeitos significativos pelos modelos SMM e TPM. As nove populações restantes de Frederico Westphalen, Iraí, Lupionópolis, Santa Cecília do Pavão, Curiúva, Ortigueira (Entrada), Ortigueira (Banhadão), Lages e Alvilândia mostraram efeito de deriva genética somente pelo modelo SMM.

Tabela 7 – Teste de Wilcoxon para desequilíbrio de mutação-deriva, excesso/deficiência de heterozigiosidade, utilizando Bottleneck (LUIKART et al., 1998), para oito locos de microssatélites em 14 populações de *Parapip-tadenia rigida*

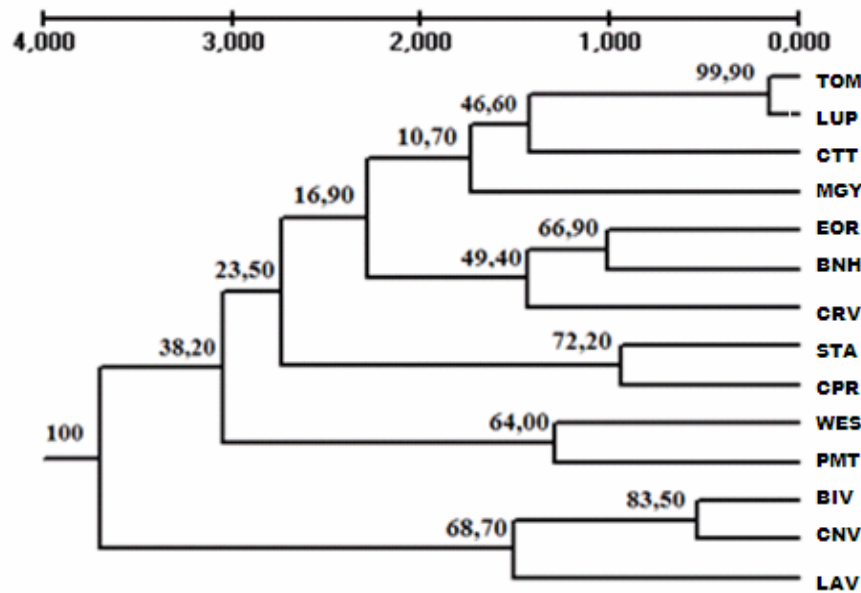
Population ^d	I.A.M. ^a	T.P.M. ^b	S.M.M. ^c
TOM	0,375	0,016*	0,008*
WES	0,844	0,250	0,012*
PMT	0,469	0,109	0,078
BIV	0,297	0,109	0,017*
LUP	0,688	0,078	0,016*
MGY	0,742	0,039*	0,008*
STA	0,945	0,461	0,027*
CPR	1,000	0,461	0,195
EOR	0,688	0,375	0,023*
CRV	0,688	0,078	0,023*
BNH	0,469	0,109	0,039*
CNV	0,055*	0,021*	0,004*
LAV	0,641	0,641	0,027*
CTT	0,742	0,641	0,055*

a-Infinite Allele Model; b- Two Phase Model; c- Step Mutation Model

^d Os nomes das cidade estão especificados na Tabela 1.

O dendrograma construído pelo método de UPGMA segundo a distância genética de Nei (1978) entre as populações mostrou a formação de diferentes grupos (Figura 5), com as populações de Iraí, Lages e Vargem isoladas das demais.

Figura 5 – Dendrograma dos agrupamentos das 14 populações de *Parapiptadenia rigida*, considerando a distância genética de Nei (1978). Número de ramificações representam *bootstrap* baseado em 1.000 replicações



Na análise Bayesiana encontramos fluxo gênico para todas as populações (Tabela 8). As populações de *P. rigida* apresentaram baixa taxa de migração, com média de 0,013 e taxa média de não-migrantes de 0,833. Na Tabela 8, podemos ver que as maiores taxas de migração são observadas nas populações de Londrina (32,4%), Tomazina e Palmital (32,3%) e a menor, foi verificada na população de Cornélio Procópio (1,1%). E inversamente a isto, as populações que contribuíram com o menor número de migrantes foram Iraí (2,3%), Tomazina, Palmital e Londrina (2,4%). As maiores contribuições foram verificadas para a população de Santa Cecília do Pavão (55,6%) contribuindo com menos não-migrantes do que as demais populações.

Tabela 8 – Médias das distribuições de proporção de indivíduos não-migrantes e migrantes para 14 populações de *Parapiptadenia rigida*, com intervalo de confiança de 95%, baseado no método de atribuição bayesiana de Wilson e Rannala (2003)

Populações ^a	Não mi-grantes	Migrantes
TOM	0,677	0,004 (WES, CNV, CTT); 0,003 (PMT, BIV, LUP, MGY, LAV); 0,270 (STA); 0,005 (CPR, EOR, BNH); 0,01 (CRV)
WES	0,985	0,001 (TOM, PMT, BIV, LUP, MGY, STA, CPR, EOR, CRV, BNH, CNV, LAV, CTT)
PMT	0,677	0,285 (WES); 0,003 (TOM, BIV, LUP, MGY, STA, CPR, EOR, CRV, BNH, CNV, LAV, CTT);
BIV	0,678	0,004 (TOM, PMT, LUP, MGY, STA, EOR, CRV, BNH, CTT); 0,005 (WES); 0,013 (CPR); 0,181 (CNV); 0,084 (LAV)
LUP	0,678	0,003 (TOM, CNV); 0,005 (WES, EOR); 0,003 (PMT, BIV, MGY); 0,268 (STA); 0,009 (CPR); 0,004 (CRV, BNH, CTT), 0,006 (LAV)
MGY	0,676	0,003 (TOM, PMT, BIV, LUP, STA, CPR, EOR); 0,005 (WES, CNV); 0,271 (CRV); 0,01 (BNH, CTT), 0,024 (LAV)
STA	0,679	0,003 (TOM, WES, PMT, BIV, MGY, EOR, CRV, CNV); 0,004 (LUP, BNH, LAV, CTT); 0,281 (CPR)
CPR	0,989	0,001 (TOM, WES, PMT, BIV, LUP, MGY, STA, EOR, CRV, BNH, CNV, LAV, CTT)
EOR	0,983	0,002 (BNH); 0,001 (TOM, WES, PMT, BIV, LUP, MGY, STA, CPR, EOR, CRV, CNV, LAV, CTT)
CRV	0,984	0,002 (BNH, EOR); 0,001 (TOM, WES, PMT, BIV, LUP, MGY, STA, CPR, CRV, CNV, LAV, CTT)
BNH	0,983	0,002 (CPR, EOR, CTT); 0,001 (TOM, WES, PMT, BIV, LUP, MGY, STA, CRV, CNV, LAV)
CNV	0,985	0,002 (LAV); 0,001 (TOM, WES, PMT, BIV, LUP, MGY, STA, CPR, EOR, CRV, BNH, CTT)
LAV	0,987	0,001 (TOM, WES, PMT, BIV, LUP, MGY, STA, CPR, EOR, CRV, BNH, CNV, CTT)
CTT	0,951	0,001 (TOM, WES, PMT, BIV, LUP, MGY, STA, CPR, EOR, CRV, BNH, CNV, LAV)

5.4 DISCUSSÃO

5.4.1 Diversidade Genética

A heterozigosidade média observada ($H_o = 0,33$) encontrada nas populações de *P. rigida* é menor do que a heterozigosidade média esperada ($H_e = 0,52$) a qual mostra uma deficiência de heterozigotos em todas as populações com valores de *Fis* positivos e significativos, indicando a presença de um processo intenso de endocruzamento nestas populações (Tabela 3). Conson et al. (2013), analisando a variabilidade genética de nove populações de *Luehea divaricata*, árvores secundária inicial a tardia, verificou pelo método de Wang (2007) um *Fis* significativo em todas as populações estudadas. Estes autores concluíram que a fragmentação do bioma da Floresta Atlântica resultante do recorrente ciclo de corte e queima da floresta pode ser considerado um dos fatores principais responsáveis pela diminuição da heterozigosidade de *L. divaricata*. Estas conclusões podem ser extendidas para as populações de *P. rigida*, onde os efeitos do desmatamento que originam a fragmentação podem ter reduzido os níveis de heterozigosidade nestas populações. O aumento na taxa de endocruzamento (*Fis*) é o principal fator deletério resultante direto da fragmentação do habitat de acordo com Ward et al. (2005), sendo que os efeitos do endocruzamento são observados imediatamente após a devastação. Estas observações são consistentes com os resultados encontrados em *P. rigida* neste estudo e em *L. divaricata* por Conson et al. (2013).

O teste de Wilcoxon (Tabela 7) mostrou que no processo de fragmentação que ocorreu no último século na região sul e sudeste do Brasil não ocasionou uma drástica redução do tamanho efetivo de *P. rigida* encontrada nos fragmentos localizados em Palmital e Cornélio Procópio pois, nos três modelos testados para detectar efeito recente de deriva genética (IAM, TPM e SMM), os mesmos foram não significativos. Em todas as outras populações conforme mostra a Tabela 7 ocorreu um efeito de gargalo genético, sendo em algumas populações mais drástico (Tomazina, Londrina e Vargem) do que nas outras (Frederico Westphalen, Iraí, Lupionópolis, Santa Cecília do Pavão, Ortigueira (Entrada), Curiúva, Ortigueira (Banhadão), Lages e Alvinlândia). A aplicação do teste de Wilcoxon nas nove populações de *Luehea divaricata* (CONSON et al., 2013) mostraram um efeito maior de gargalo genético que as populações de *P. rigida*. Isto pode ser explicado pelo fato

das populações de *L. divaricata* terem sofrido um maior efeito de redução do seu tamanho efetivo do que as populações de *P. rigida* pois, as árvores de *L. divaricata* foram seletivamente extraídas dos fragmentos fato que não ocorreu com frequência em *P. rigida*. Este evento pode também ser verificado pelo teste de desequilíbrio de ligação (Tabela 4), que de acordo com Futuyma (2005) é resultado direto dos altos níveis de *Fis*, os quais são responsáveis pela manutenção do desequilíbrio de ligação nas populações. Embora, tenha sido encontrado valores significativos de *Fis* calculados segundo Wright (1951) em todas as populações estudadas e ocorrência de deriva genética recente na maioria das populações, as mesmas ainda mostram um número razoável de alelos por locos (*A*), número de alelos efetivos por locos (*A_e*) e heterozigosidade observada (Tabela 3), isto é, estas populações ainda mantêm níveis altos de diversidade genética pois, os efeitos de endocruzamento (*Fis*) é observado imediatamente após a devastação da floresta porém, a queda na diversidade genética será vagarosa através das sucessivas gerações (WARD et al., 2005; AGUILAR et al., 2008; KRAMER et al., 2008). Estes resultados foram também observados por Souza et al. (2013), em estudo de AFLP em *P. rigida* com sete populações também analisadas neste trabalho (Lupionópolis, Londrina, Cornélio Procopio, Ortigueira, Curiúva, Vargem e Lages), mostrando altas taxas de polimorfismo e diversidade gênica na maioria das populações analisadas, sugerindo que a perturbação seja devido a um processo recente de fragmentação.

5.4.2 Estrutura Genética

Mesmo tendo sido verificado em todas as populações de *P. rigida* valores significativos de *Fis*, a análise da variância molecular (AMOVA, Tabela 5) mostrou que 69,97% da variabilidade genética é encontrada dentro de indivíduos, 17,12% dentro das populações, e apenas 12,91% entre as populações. O valor de *Fst* = 12,9% indica uma diferenciação genética moderada entre as populações, fato característico de espécies arbóreas de reprodução alógama (HAMRICK; GODT, 1989). Isto é confirmado pelo fato de *P. rigida* ter a suas sementes dispersadas pelo vento, água ou barocoria e os pólenes serem dispersos por abelhas de pequeno e médio porte (KAGEYAMA, 1987). Além disso, segundo Ribas (1999) esta espécie é hermafrodita com auto-incompatibilidade, fato que favorece a manutenção de sua alta variabilidade dentro de indivíduos.

A Correlação de Pearson para distância genética e geográfica mostrou um $r = 0,12$; $p = 0,23$, ou seja, não existe uma associação entre distância genética e geográfica para as populações estudadas. As populações com maiores distâncias geográficas (Frederico Westphalen e Alvilândia), localizadas cerca de 665 km de distância uma da outra mostraram uma distância genética de somente 0,08 e as populações de Tomazina e Frederico Westphalen com distâncias de 525 km entre si, mostraram uma distância genética menor ainda de somente 0,02 (Tabela 6). Já as populações de Ortigueira (Entrada), Ortigueira (Banhadão), Frederico Westphalen e Iraí mostraram uma distância genética de 0,11 sendo as distâncias geográficas de 10 km e 22 km, respectivamente. As populações de Santa Cecília do Pavão e Cornélio Procopio com distância geográfica de 28 km mostraram uma distância genética de somente 0,02. O mesmo padrão observamos quando analisamos as porcentagens de migrantes e não-migrantes. As populações de Ortigueira (Entrada) e Ortigueira (Banhadão) com distâncias geográficas de somente 10 km mostraram porcentagens de não-migrantes de 0,983 (Tabela 8) isto é, embora sejam populações próximas estão isoladas geneticamente uma das outras. Resultado semelhante foi observado entre as populações de Ortigueira (Banhadão) e Curiúva situadas a 46 km uma da outra pois, as mesmas apresentam 0,983 de não-migrantes. De acordo com Ward et al. (2005) a fragmentação de habitat aumenta o isolamento entre os fragmentos reduzindo o fluxo gênico. Esta redução pode ser responsável pela diminuição de migrantes em cada população e combinada com a ação da deriva genética pode ser responsável pelo aumento de diferenciação genética entre os fragmentos perturbados. Vários destes fragmentos, principalmente os localizados no Estado do Paraná, estão cercados por fazendas agropastoris. Fato este que impede a ocorrência de fluxo gênico entre os mesmos.

Os dados da distância genética de Nei (1978) usados para construir o dendrograma gerado pelo método UPGMA separou as populações em dois grupos (Figura 5), sendo um dos grupos compostos pelas populações de Iraí, Lages e Vargem e o outro grupo composto pelas outras onze populações. A separação em dois grupos concorda com os resultados obtidos por Souza et al. (2013) aplicando a técnica de AFLP em populações de *P. rigida*. Também neste estudo Souza et al. (2013) mostraram uma forte associação entre as populações de Lages e Vargem. Observando ainda a Figura 5, podemos destacar a grande similaridade entre as populações de Tomazina e Lupionópolis, embora estes fragmentos estejam separados por

210 km. Para nos fornecer uma melhor compreensão do grau de isolamento entre as populações, a análise Bayesiana mostrou que várias populações apresentaram uma taxa de migrantes em torno de 30% (Tabela 8) enquanto em outras populações a taxa de migrantes foi extremamente baixa. Estes dados confirmam que nem todas as populações foram drasticamente isoladas o que de acordo com Ward et al. (2005), pode ser devido a presença de poucos indivíduos que sobreviveram entre os fragmentos, os quais serviriam como pontes para o fluxo gênico entre os fragmentos. *P. rigida* tem as suas sementes dispersas pelo vento o que pode fazer que as mesmas alcancem longas distâncias (HORN et al., 2001) sendo que este tipo de dispersão de sementes pode ser favorecido pela fragmentação (GHAZOUL, 2005) e nos Estados de Santa Catarina e Paraná ainda ocorre a presença de vários fragmentos menores localizados entre os fragmentos maiores que foram amostrados para este trabalho.

Os resultados deste trabalho permite-nos concluir que vários dos fragmentos ainda apresentam níveis altos de variabilidade genética mas em futuro próximo devido a pressão do endocruzamento (*F_{is}*) e deriva genética, mesmo nos fragmentos maiores se não for feito com urgência o seu manejo da variabilidade genética, a viabilidade destas populações será severamente comprometida. Mesmo as populações de Cornélio Procópio e Pamital onde não foi verificado efeito de deriva genética, mostrou-se um efeito severo de endocruzamento. Ainda na população de Cornélio Procópio verificou-se uma taxa baixa de não-migrantes o que pode levar nas futura gerações a uma perda severa de sua variabilidade genética.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIA-DIEGO, Y. LOBO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signal in plant traits and methodological approaches. **Mol Ecol**, n. 17, p. 5177–5188, 2008.
- AMOS, W.; BALMFORD, A. When does conservation genetics matter. **Heredity**, v. 87, p. 257-265, 2011.
- ANJOS, L. Consequências biológicas da fragmentação no norte do Paraná. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Londrina, v. 12, n. 32, p. 87-94, 1998.
- AYRES, M.; AYRES, J.R.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **Bioestat: 2,0 – aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológica e médicas**. Sociedade Civil, Mamirauá, Belém, 2007.
- ARAÚJO, G. **Gestão ambiental de área degradadas** – Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2005. 320p.
- ASINS, M. J.; CARBONELL, E. A. Concepts involved in measuring genetic variability and its importance in conservation of plant genetic resources. **Evolution Trends Plants**, v.1, p. 51-61, 1987.
- BALERONI, C. R. S. **Comportamento de populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All. procedentes de áreas com perturbação antrópica**. Ilha Solteira, 2003, 123 f. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2003.
- BECKER, J.; HEUN, M. Barley microsatellites: allele variation and mapping. **Plant Mol Biol**. v. 27, p. 835-845, 1995.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. 4 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2007. 752p.
- BENSUSAN, N. **Conservação da biodiversidade em áreas protegidas**. Rio de Janeiro: Editora FGV, 2006. 176p.
- BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal Forest Research**, Ottawa, v. 27, n. 3, p. 415-424, Mar. 1997.
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. R.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v. 54, p. 277–288, 1999.
- BORGHI, W. A.; MARTINS, S. S.; DEL QUIQUI, E. M.; NANNI, M. R. Caracterização e avaliação da mata ciliar à montante da Hidrelétrica de Rosana, na Estação Ecológica do Caiuá, Diamante do Norte, PR. **Cadernos da Biodiversidade**, Curitiba, v. 4, p. 9-18, 2004.

BURCZYK, J.; LEWANDOWSKI, A.; CHALUPKA, W. Local pollen dispersal and distant gene flow in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, n. 1, p. 39-48, 2004.

BURKART, A. **Leguminosas mimosoideas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1979. 299p.

CAIXETA, E. T.; BORÉM, A. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 374p.

CAMARGO, P. F. A.; CAVASSAN, O. Levantamento fitossociológico de um remanescente de Floresta Estacionai Semidecidual Submontana, no Município de Agudos, SP. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 50., 1999, Blumenau. **Programa e resumos**. Blumenau: Sociedade Botânica do Brasil/Universidade Regional de Blumenau, 1999. p.231.

CARVALHO, P. E. R. Angico-Gurucaia Taxonomia. **Embrapa Florestas**. Circular Técnica, 58. ISSN: 1517-5278. 2002

CARVALHO, S. **Parâmetros genéticos populacionais como indicadores de sustentabilidade em populações naturais de pimenta rosa – *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anarcadiaceae), no baixo São Francisco-SE/AL**. 2009. 47 f. Dissertação (Mestrado em Agrossistemas) - Universidade Federal de Sergipe, Alagoas, 2009.

CARVALHO, D. A.; OLIVEIRA-FILHO, A. T.; VILELA, E. A. Florística e fitossociologia da vegetação arbóreoarbusiva de floresta ripária decídua do baixo Paranaíba (Santa Vitória, Minas Gerais). **Revista Árvore**, Viçosa, v.23, n.3, p.311-320, 1999.

CAVALHEIRO, K. O.; AMEIXEIRO, C. A. C. Biologia floral de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v.8,n.25, p.11-13. 1992.

CEZARE, C. H. G.; GANDARA, F. B.; BERNARDI, A. C.; KAGEYAMA, P. Y. Distribuição diamétrica dos adultos e da regeneração de três espécies arbóreas em um fragmento florestal, no Município de Arapotí, PRo In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 49., 1998, Salvador. **Resumos**. Salvador: Universidade Federal da Bahia / Instituto de Biologia, 1998. p.328.

CHAGAS E SILVA, F.; FONSECA, E. P.; SOARES-SILVA, L. H.; MULLER, C.; BIANCHINI, E. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares da bacia do rio Tibagi. 3. Fazenda Bom Sucesso, Município de Sapopema, PR. **Acta Botânica Brasileira**. São Paulo. v. 9. 1995.

COELHO, G. C.; RIGO, M. S.; LABARDONI, J. B.; OLIVEIRA, R.; BENVENUTI-FERREIRA, G. Understory structure in two successional stages of a Semi-deciduous Seasonal Forest remnant of Southern Brazil. **Biota Neotropica**. v. 11. p. 63-74. 2011.

CONSON, A. R. O.; RUAS, E. A.; VIEIRA, B. G.; RODRIGUES, L. A.; COSTA, B. F.; BIANCHINI, E.; PRIOLI, J. A.; et al. Genetic structure of the Atlantic Rainforest tree species *Luehea divaricata* (Malvaceae). **Genetica**, v. 141, p. 205-215, 2013.

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

COSTA, C.S.; FREITAS, W.K.; SILVA, A.T. Levantamento fitossociológico das espécies arbóreas encontradas em trecho florestado em Rendotiba - Niterói – RJ (Remanescente de Mata Atlântica). In: CONGRESSO E EXPOSIÇÃO INTERNACIONAL SOBRE FLORESTAS, 6., 2000, Porto Seguro. **Resumos Técnicos**. Rio de Janeiro: Instituto Ambiental Biosfera, 2000. p.321-324.

COSTA, B. F.; RODRIGUES, L. A.; RUAS, E. A.; SOUZA, L. B.; RUAS, C. F.; VIEIRA, B. G.; CONSON, A. R. O.; RUAS, P. M. Characterization of nine microsatellite loci for the tree species *Parapiptadenia rigida* (Fabaceae-Mimosoideae) and their transferability. **Genetics and Molecular Research**, 11 (3): 2338-2342, 2012.

DAMASCENO, J.O.; RUAS, E. A.; RODRIGUES, L.A.; RUAS, C.F.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; RUAS, P.M. Jun. 2011. **Genetic differentiation in *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae) over a short geographic distance as assessed by AFLP markers**. Disponível em: < <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2011/vol10-2/pdf/gmr1126.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2013.

DICK, C. W.; ETCHELECU, G.; AUSTERLITZ, F. Pollen dispersal of Neotropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 753-764, 2003.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation for small quantities of leaf tissue. **Phytochem Bull**, n. 19, p. 11–15, 1987.

DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J.C.B. **Recomposição de matas ciliares**. São Paulo: Instituto Florestal, 1990. 14p.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas (Curitiba-Pfi). Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado de Santa Catarina. Curitiba: **EMBRAPA-CNPF**, 1988. 113p.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin vers. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolution Bioinformatics Online** 1: 47-50. 2005.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

FAO, 1984. A Guide to in situ conservation of genetic resources of tropical woody species. Based on the work of L. Roche & Durojeanni. Rome (FORGEN/MISC/84/2).

FEDOROV, A. A. The structure of the tropical rain forest and speciation in the humid tropics. **Journal of Ecology**, n. 54, p. 1-11, 1966.

FERRERA, T. S. **Fenologia de espécies arbóreas nativas no Jardim Botânico da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS**. 2012. 104 f. Dissertação

(Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

FERREIRA, L.A.B. Arborização dos cursos d'água. **Trigo e Soja**, Porto Alegre, n.68, p.16-21, 1983.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995. 220p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D.. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

FLEISHMAN, E.; LAUNER, A. E; SWITKY, K. R. Rules and exceptions in conservation genetics: genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. **Biological Conservation**, v. 98, p. 45-53, 2001.

FOWLER, J. A. P.; CARPANEZZI, A. A. Conservação de sementes de angico-gurucaia (*Parapiptadenia rigida* (Bentharn) Brenan). **Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo**, n.36, p.5-10, 1998.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A.; FRANCISCO, R.; FARIAS, I. P. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SP: SBG, 2008.

FREITAS, M. L. M.; AUKAR, A. P. A.; SEBBENN, A. M.; MORAES, M. L. T.; LEMOS, E. G. M. Variação genética em progênies de *Myracrodruon Urundeuva* F.F. & M.F. Allemão em três sistemas de cultivo. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n.3, p. 319-329, 2006.

FUTUYMA, D. J. **Evolution**. Sinauer Associates. Sunderland ,2005 .

GAINO, A. P. S. C.; SILVA, A. M.; MORAES, M. A.; ALVES, P. F.; MORAES, M. L. T. M.; FREITAS, M. L. M. F.; SEBBENN, A. M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree *Myracrodruon urundeuva* Freire Allemão. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 1631-1643, 2010.

GARTLAND, H. M.; BOHREN, A. V. Arboles de Misiones: *Bastardiopsis densiflora* (Hook et Arn) Hassl. Yvyrareta: **Eldorado**, v. 5 , n. 5 , p. 25-28, 1995.

GHAZOUL, J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. **Biol Rev**, n. 80, p. 413–443, 2005

GONÇALVES, A. C; REIS, C. A. F.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Estrutura genética espacial em populações naturais de *Dimorphandra mollis* (Fabaceae) na região norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.33, n.2, p.325-332, abr.-jun. 2010.

GOUDET, J. **FSTAT: a program to estimate and test diversities and fixation indices (version 2.9.3.2)**. Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution. Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Acesso: 15/03/2011.

GROSS, C. L. A comparison of the sexual systems in the trees from the Australian tropics with other tropical biomes—more monoecy but why? **American Journal of Botany**, Columbus, v. 92, n. 6, p. 907-919, June 2005.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, n. 48, p.361–372, 1992.

GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, n. 113, p. 163-165, 2000.

HAMILTON, M. B. Tropical tree gene flow and seed dispersal. **Nature**, London, v. 401, n. 6749, p. 129-130, 1999.

HAMRICK, J. L. Response of forest trees to global environmental changes. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 197, p. 323-335, 2004.

HAMRICK, J.L.; GODT, M. J. W. **Allozyme diversity in plant species**. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L. WEIR, B. S. Plant population genetics, breeding and genetic, 1989.

HIGUCHI, P.; SILVA, A. C.; FERREIRA, T. S.; SOUZA, S.T.; GOMES, J.P.; SILVA, K.M.; SANTOS, K.F. Floristic composition and phytogeography of the tree Component of Araucaria Forest fragments in southern Brazil. São Paulo, **Brazilian Journal of Botany**, v. 35, 2012.

HORN, H. S.; NATHAN, R. KAPLAN, S. R. Long-distance dispersal of tree seeds by wind. **Ecol Resour**, n. 16, p. 877–885, 2001.

INPE, INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **SOS Mata Atlântica**. 2008. Disponível em: <<http://www.inpe.br/>>. Acesso em: 23 dez. 2013.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS. Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/nativas/detalhes.asp?codigo=13>>. Acesso em: 01 jan. 2014.

JANKOWSKY, I. P.; CHIMELO, J. P.; CAVANCANTE, A. A.; GALINA, I. C. M.; NAGAMURA, J.C.S. Madeiras brasileiras. Caxias do Sul: **Spectrum**, 1990. 172p.

JOBSON, R. W.; LUCKOW, M. Phylogenetic Study of the Genus Piptadenia (Mimosoideae: Leguminosae) using Plastid trnL-F and trnK/matK Sequence Data. **Systematic Botany**. Washington, v. 32, p. 569-575, 2007.

JOLY, Aylton Brandão. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 11 ed - São Paulo: Editora Nacional, 1993. 777p.

JONES, B.; GLIDDON, C.; GOOD, J.E.G. The conservation of variation in geographically peripheral populations: *Lloydia serotina* (Liliaceae) in Britain. **Biological Conservation**, v.101, p.147-156, 2001.

JUMP, A. S.; PENUELAS, J. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, p. 8096-8100, 2006.

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

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**, Netherlands, v. 177, n. 3, p. 309-334, fev. 2011.

KIPPER, J.; CHAMBÓ, E.D.; STEFANELLO, S.; GARCIA, R.C. Levantamento florístico de um componente arbóreo de Mata Ciliar do Rio Paraná, Marechal Cândido Rondon. **Scientia Agraria Paranaensis**. Cascavel, v. 9, p. 82-92, 2010.

KRAMER, A. T.; ISON, J. L.; ASHLEY, M. V.; HOWE, H. F. The paradox of forest fragmentation genetics. **Conserv Biol**, n. 22, p. 878-885, 2008.

LI, J. Z.; SJAKSTE, T. G.; RÖDER, M. S.; GANAL, M. W. Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. **Theor Appl Genet**, n. 107, p. 1021-1027, 2003.

LIMA, M. P. M.; LIMA, H. C. de. *Parapiptadenia Brenan* (Leguminosae - Mimosoideae): estudo taxonômico das espécies brasileiras. Rio de Janeiro, **Rodriguésia**, v. 36, n. 60, p. 23-30, 1984.

LIMA, R. B. **Rhamnaceae de Pernambuco; aspectos taxonômicos**. 1985. 206 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Curso de Mestrado em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1985.

LIU, Z. W.; BIYASHEV, R. M.; SAGHAI MAROOF, M. A. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. **Theor Appl Genet**, n. 93, p. 869-876, 1996.

LOMBARDO, A. **Flora arborea y arborescente del Uruguay**. Montevideo: Concejo Departamental de Montevideo, 1964. 151 p.

LOPES, A.; ROSA-OSMAN, S. M.; PIEDADE, M. T. F. Caracterização morfológica das plântulas de cinco espécies da floresta estacional semidecidual, Brasil. **Floresta**, Curitiba, v. 42, n. 1, jan-abr. 2012.

LOPES, G. de O.; LOPES, A. de O.; SCARIOT, A.; SALOMÃO, A.N. Resposta de sementes de *Euterpe edulis* Mart. (palmae) a diferentes condições de armazenamento em baixas temperaturas. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 51., 2.000, Brasília. **Resumos**. Brasília: Sociedade Botânica do Brasil, 2000.

LOPEZ, J.A.; LITTLE JUNIOR, E.L.; RITZ, G.F.; ROMBOLD, J.S.; HAHN, W.J. Arboles comunes dei Paraguay: fiande yvyra mata kuera. Washington: **Cuerpo de Paz**, 1987. 425p.

- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, vol. 1 – 3 ed – Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000. 352p.
- LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2 ed – Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 704p.
- LUCKOW, M.; MILLER, J. T.; MURPHY, D. J. M.; LIVSHULTZ, T. LUCKOW, M. A Phylogenetic analysis of the Mimosoideae (Leguminosae) based on chloroplast DNA sequence Data. **Advances in Legume Systematics**. Oxford. Part 10, Higher Level Systematics, p. 197-220, 2003.
- LUIKART, G.; ALLENDORF, F.W.; CORNUET, J.M.; WILLIAM, B.S. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottleneck. **Journal of Heredity**, n. 89, p. 238-247, 1998.
- LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Empirical Evaluation of a Test for Identifying Recently Bottleneck Populations from Allele Frequency Data. **Conservation Biology**, n. 12, p. 228-237, 1998.
- MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Floral Traits and Pollination Systems in the Caatinga, a Brazilian Tropical Dry Forest. **Annals of Botany**, London, v. 94, n.3, p. 365-376, Sept. 2004.
- MACIEL, C. G., MUNIZ, M. F. B. SANTOS, A. F. LAZAROTTO, M. Detecção, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes de *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho). **Summa Phytopathologica**, N. 38, V. 4, P. 323-328, 2012.
- MARQUES, E. K. Métodos de diagnóstico genético-molecular em plantas. In: CAVALLI, Suzana S. **Diagnóstico Genético-Molecular**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. 372p.
- MARTINEZ-CROVETTO, R. Esquema fito geográfico de La provincia de Misiones (República Argentina). **Bonplandia: Corrientes**, v.1, n.3, p.171-223, 1963.
- MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.; PIMENTA, J. A. **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina: Ed. UEL, 2002. 595 p.
- MILLER, M. **Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data**. Department of Fisheries and Wildlife, 1997. Disponível em: <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm>. Acesso em: 19 jan. 2014.
- MONTAGNINI, F.; JORDAN, C. F. Classification at the community level. In: _____. **Tropical Forest Ecology: the basis for conservation and management**. Netherlands: Hardcover, 2005. p. 83.
- MORAES, P. L. R.; MONTEIRO, R.; VENCOSKY. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. **Rev. bras. Bot.**, v.22, 1999.

MORGANTE, M.; PFEIFFER, A.; COSTACURTA, A.; OLIVIERI, A. M. Molecular tolls for population and ecological genetics in Coniferous trees. **Phyton**, v. 36, n. 3, p. 129-138, 1996.

MORIN, P.; LUIKART, G.; WAYNE, R. **SNPs in ecology, evolution and conservation**. Abr. 2004. Disponível em: <<http://www.d.umn.edu/~jetterso/Ecological%20Genetics/documents/Morinetal.2004SNPs.pdf>> Acesso em: 29 jul. 2013.

NASS, L. L.. Estimativa da Diversidade Genética em Arbóreas Nativas Tropicais Utilizando Microsatélites. In: CIAMPI, Ana Yamaguishi; VINSON, Christina Cleo; GAIOTTO, Fernanda Amato. **Recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. p. 423-433.

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

NEGRELLE, R.R.B.; SILVA, F.C. da. Fitossociologia de um trecho de floresta com *Araucaria angustifolia* (Bert.) o.Ktze. no Município de Caçador-SC. **Boletim de Pesquisa Forestal**, Colombo, n.24/25, p.37-54, 1992.

NUNOME, T.; NEGORO, S.; MIYATAKE, K.; YAMAGUCHI, H.; FUKUOKA, H. A Protocol for the Construction of Microsatellite Enriched Genomic Library. **Plant Molecular Biology Reporter**, Canada, v. 24, set/dez. 2006. Disponível em: <http://download.springer.com/static/pdf/97/art%253A10.1007%252FBF02913457.pdf?auth66=1390316782_b1805b7e3c307a81169ac3aefc14abfa&ext=.pdf>. Acesso em: 19 jan. 2014.

OLIVEIRA, C.A.M.de.; SILVA, E.F.da.; MOLICA, S.G.; FERREIRA, R.L.C.; LIRA, D.A.S.de.; BARROS, J.A.B. Júnior de. Diversidade e estrutura genética em populações de *Caesalpinia echinata* (Lam.) na Estação Ecológica do Tapacurá, PE. **SCIENTIA FORESTALIS**, Piracicaba, n. 70, p. 77-83, 2006.

OLIVEIRA, P. E.; GIBBS, P. E. Reproductive biology of woody plants in a cerrado community of Central Brazil. **Flora**, Jena, v. 195, n. 4, p. 311-329, Dec. 2000.

PÍFIA-RODRIGUES, F.C.M.; LOPES, L.; BLOOMFIELD, V.K. Análise do desenvolvimento de espécies arbóreas da mata atlântica em sistema de plantio adensado para a revegetação de áreas degradadas em encosta, no entorno do Parque Estadual do Desengano (RJ). In: SIMPÓSIO NACIONAL DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 3., 1997, Ouro Preto. **Do substrato ao solo: trabalhos voluntários**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. p.283-291

PILLEN, K.; BINDER, A.; KREUZKAM, B.; RAMSAY, L. WAUGH, R.; FORSTER, J.; LEON, J. Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars. **Theor Appl Genet**, n 101, p. 652-660, 2000.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Bottleneck: a program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data. **Journal of Heredity** n. 90, p. 502-503, 1999.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Sci**, n. 1, p. 215-222, 1996.

PRIMACK, R. B; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina, PR: E. Rodrigues, 2001. 328.

RAMSAY, L.; RUSSELL, J.; MACAULAY, M.; BOOTH, A.; THOMAS, W.T. B.; WAUGH, R. Variation shown by molecular markers in barley: genomic and genetic constraints. **Aspects Appl Biol**, n. 72, p. 147-154, 2004.

RAYMOND, M., ROUSSET, F. Genepop (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J Hered**, n. 86, v. 3, p. 248–249, 1995.

RIBAS, L. A. **Variabilidade isoenzimática e sistema de cruzamento de *Parapiptadenia rigida* em um pomar de sementes**. 1999. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência Florestal), Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, 1999.

SAGHAI MAROOF, M. A.; BIYASHEV, R. M.; YANG, G. P.; ZHANG, Q.; ALLARD, R. W. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. **Proc Natl Acad Sci, USA**, n. 91, p. 5466-5470, 1994.

SALVADOR, J.L.G. Considerações sobre as matas ciliares e a implantação de reflorestamentos mistos nas margens de rios e reservatórios. São Paulo: **CESP**, 1987. 29p.

SANTOS, F. R.; LACERDA, D. R.; REDONDO, R. A. F. Tecnologias genômicas na conservação da biodiversidade. **Bioscience Journal**, Uberlândia, especial, p. 79-92. 2004.

SAUERESSIG, D. **Levantamento dendrológico na Floresta Ombrófila Mista e implementação de um sistema de identificação “online”**. 2012. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SCHEER, M. B.; BLUM, C. T. **Arboreal Diversity of the Atlantic Forest of Southern Brazil: From the Beach Ridges to the Paraná River**. Dez. 2011. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/download/get/type/pdfs/id/24412>>. Acesso em: 31 dez. 2013.

SCHRODER, T.; FLEIG, F. D.; SPADETTO, V. Liana community ecology and interaction with *Parapiptadenia rigida* (Bentham) Brenan in a fragment of secondary forest. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 307, p.84-89, 2013.

SEBBENN, A.M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.14, n.2, p.115-132, 2002.

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 level of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small,

isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, London, v. 106, p.1-12, 2010.

SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M. S.; BAWA, K.; SEBBEM, A. M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Rev. Inst. Flor**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 25-43, jun 2005.

SCHNELL, R. J.; PRIYADASHAN, P. M. Genomics of tress crops. In: KRUTOVSKY, K. V.; BURCZYK, J.; CHYBICKI, I.; FINKELDEY, R.; PYHÄJÄRVI, T.; ROBLEDO-ARNUNCIO, J. J. **Gene Flow, Spatial Structure, Local Adaptation, and Assisted Migration in Trees**. London: Springer Science+Business Media, 2012. p. 71-113.

SILVA, A. F.; LEITÃO FILHO, H. F. Composição florística e estrutura de um trecho da Mata Atlântica no Município de Ubatuba (São Paulo, Brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, Brasília, v.5, n.1 12, p.43-51, 1982.

SILVA, D. C. G. S.; CARVALHO, M. C. C. G.; MEDRI, C.; MEDRI, M. E.; RUAS, C. F.; RUAS, E. A.; RUAS, P. M. **Genetic Structure and Diversity of Brazilian Tree Species from Forest Fragments and Riparian Woods**. Mar. 2012. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/genetic-diversity-in-plants/genetic-structure-and-diversity-of-brazilian-treespecies-from-forest-fragments-and-riparian-woods>>. Acesso em: 03 mar. 2013.

SILVA, N. R. S.; MARTINS, S. V.; MEIRA NETO, J. A. A.; SOUZA, L. S. Composição florística e estrutura de uma floresta estacional semidecidual montana em Viçosa, MG. **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 28, n. 3, p. 397-405, jun 2004.

SOARES-SILVA, L.H.; KITA, K.K.; SILVA, F. das C e. Fitossociologia de um trecho de floresta de galeria no Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, PR, Brasil. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, Brasília, v.3, pA6-62, 1998.

SOKAL, R. R.; MICHENNER, C. D. A statistical method for evaluation systematic relationships. **Univ Kans Sci Bull**, n. 38, v. 22, p. 1409–1438, 1958.

SOUTO, J. J. P. DESERTO, uma ameaça? Estudos dos núcleos de desertificação na fronteira sudoeste do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura - **Departamento de Recursos Naturais Renováveis**, 1984.169p.

SOUZA, L. B.; RUAS, E. A.; RODRIGUES, L. A.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M. AFLP marker analysis revealing genetic structure of the tree *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) in the southern Brazilian Tropical Rainforest. **Genet Mol Biol**. v. 36, n. 4, p. 533-539, 2013.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* A. St. Hil. (Bombaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 1, p. 113-121, 2003.

SOUZA, M. H.; MAGLIANO, M. M.; CAMARGOS, J. A. A. Madeiras tropicais brasileiras. Brasília: IBAMA, **Laboratório de Produtos Florestais**, 1997. 152p.

- STRUSS, P.; PLIESKE, J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. **Theor Appl Genet**, n. p7, p. 308-315, 1998.
- TECHEN, N.; ARIAS, R. S.; GLYNN, N. C.; PAN, Z.; KHAN, I. A.; SCHEFFLER, B. E. Optimized construction of microsatellite-enriched libraries. **Molecular Ecology Resources**, USA, v. 10, 2010 Disponível em: <<http://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1902&context=usdaarsfacpub>>. Acesso em: 19 jan. 2014.
- THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R. K.; GRANER, A. Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theor Appl Genet**, n. 106, p. 411-422, 2003.
- TONG, J.; WANG, D.; CHENG, L. **Development of Microsatellite Markers by Data Mining from DNA Sequences**. Data Mining and Knowledge Discovery in Real Life Applications, Vienna, Austria, fev. 2009. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/data_mining_and_knowledge_discovery_in_real_life_applications/development_of_microsatellite_markers_by_data_mining_from_dna_sequences>. Acesso em: 19 jan. 2014.
- UBESSI-MACARINI, C.; NEGRELLE, R. R. B.; SOUZA, M. C. Produtos florestais não-madeiráveis e respectivo potencial de exploração sustentável, associados à remanescente florestal ripário do alto rio Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 33, n. 4, p. 451-462, 2011.
- VACARRO, S.; LONGHI, S. J.; BRENA, D. A. Aspectos da composição florística e categorias sucessionais do estrato arbóreo de três subseres de uma Floresta Estacional Decidual, no município de Santa Tereza (RS). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, 1999.
- VAN-OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, n. 4, p. 535–538, 2004
- VARSHNEY, R. K.; GROSSE, I.; HAHNEL, U.; SIEFKEN, R.; PRASAD, M.; STEIN, N.; LANGRIDGE, P.; ALTSCHMIED, L.; GRANER, A. Genetic mapping and BAC assignment of EST-derived SSR markers proves non-uniform distribution of genes in the barley genome. **Theor Appl Genet**, n. 113, p. 239-250, 2006.
- VIANA, V. M.; TABANEZ, A. A. J.; MARTINEZ, J. L. A. Restauração e manejo de fragmentos florestais. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Instituto Florestal de São Paulo, 1992. p. 400-407.
- VIENNE, D. Molecular marker in plants genetics and biotechnology. In: VIENNE, D.; SANTONI, S.; FALQUE, M. **Principal sources of molecular markers**. Enfielf: Science Publishers, 2003. p. 3-41.
- VIENNE, D. Molecular marker in plants genetics and biotechnology. In: KREMER, A.; MARIETTE, S. **Molecular marker in populations genetics**. Enfielf: Science Publishers, 2003. p. 125-149.

- WANG, J. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. **Genet Resources**, n. 89, p. 135–153, 2007.
- WANG, X. R.; SZMIDT, A. E. Molecular markers in population genetic of forest trees. London, **Scandinavian Journal of Forest Research**, n. 16, p. 199-220, 2001.
- WARD, M.; DICK, C. W.; GRIBEL, R.; LEMES, M.; CARON, H., LOWE, A. J. To self, or not to selfy... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. **Heredity**, London, v. 95, n. 4, p. 246-254, Oct. 2005.
- WILSON, G.A.; RANNALA, B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. **Genetics**, n. 163, p.1177-1191, 2003.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann Eugen**, n. 15, p. 323–354, 1951.
- ZABAROSKI. E. Genomic DNA Libraries, Construction and Applications. **Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine**, Stockholm, Sweden, set. 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com>>. Acesso em: 19 jan. 2014.