



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LAÍS BÉRGAMO DE SOUZA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
PARAPIPTADENIA RIGIDA (BENTH.) BRENAN
(LEGUMINOSAE-MIMOSOIDEAE) NA REGIÃO SUL DO
BRASIL POR MARCADORES AFLP**

LAÍS BÉRGAMO DE SOUZA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
PARAPIPTADENIA RIGIDA (BENTH.) BRENAN
(LEGUMINOSAE-MIMOSOIDEAE) NA REGIÃO SUL DO
BRASIL POR MARCADORES AFLP**

Londrina
2011

LAÍS BÉRGAMO DE SOUZA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
PARAPIPTADENIA RIGIDA (BENTH.) BRENAN
(LEGUMINOSAE-MIMOSOIDEAE) NA REGIÃO SUL DO
BRASIL POR MARCADORES AFLP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas

Londrina
2011

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729e Souza, Laís Bérqamo de.
Estrutura genética de populações de *Parapiptadenia rígida* (Benth.) Brenan
(Leguminosae-Mimosoideae) na região sul do Brasil por marcadores AFLP /
Laís Bérqamo de Souza. – Londrina, 2011.
56 f. : il.

Orientador: Paulo Mauricio Ruas.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Genética florestal – Teses. 2. Genética de populações – Teses. 4. Florestas
– Conservação – Teses. 5. Marcadores biológicos – Teses. 6. Diversidade biológica
– Teses. I. Ruas, Paulo Mauricio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 575.17:634.02

LAÍS BÉRGAMO DE SOUZA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
PARAPIPTADENIA RIGIDA (BENTH.) BRENAN
(LEGUMINOSAE-MIMOSOIDEAE) NA REGIÃO SUL DO
BRASIL POR MARCADORES AFLP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
UEL – Londrina - PR

Dr^a. Ana Paula Silva Campos Gaino
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Cristiano Medri
UENP – Bandeirantes - PR

Londrina, 30 de março de 2011.

*Aos meus pais Arlindo e Ana Lúcia
que, mesmo com todas as dificuldades,
sempre me apoiaram em minhas
escolhas, pela confiança, carinho,
paciência e compreensão*

DEDICO

SOUZA, Laís Bérghamo. **Estrutura genética de populações de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) na região Sul do Brasil por marcadores AFLP.** 56 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Parapiptadenia rigida é uma espécie arbórea tropical característica de florestas latifoliadas semidecíduais. Por ser uma espécie agressiva, indiferente às condições físicas do solo e produzir anualmente grande quantidade de sementes, é considerada de grande importância na recuperação de áreas degradadas. Sua distribuição ocorre ao longo da Mata Atlântica que, em decorrência da intensa ocupação humana e modificação do bioma, encontra-se bastante fragmentada e desconectada. A fragmentação florestal provoca alterações na dinâmica das populações, o que pode levar à perda de diversidade genética. Estudos de genética de populações utilizando técnicas de marcadores moleculares permitem avaliar a estrutura e a variabilidade genética de espécies de plantas em áreas fragmentadas. Visando contribuir para estratégias de conservação e manejo de espécies arbóreas tropicais este trabalho teve como objetivo estudar, por meio de marcadores AFLP, a diversidade e a estrutura genética de oito populações de *P. rigida* obtidas de fragmentos de mata nos estados do Paraná e Santa Catarina. Cinco combinações de *primers* seletivos renderam um total de 126 fragmentos, todos polimórficos. Os valores médios para porcentagem de locos polimórficos (Pp) e para o índice de diversidade gênica (Hs) foram de 60,45% e 0,217, respectivamente. A análise da Coordenada Principal mostrou que a maioria das populações estudadas apresenta-se estruturada. A distribuição da variabilidade genética foi maior dentro das populações (72,20%) que entre as populações (22,80%) de *P. rigida*. O padrão de distribuição da variabilidade e estrutura genética moderada na maioria das populações de *P. rigida* sugere que a fragmentação da maioria das populações seja um evento recente que, até o momento, não teve sérias implicações evidentes na redução da variabilidade genética.

Palavras-chave: AFLP. Diversidade genética. Espécie arbórea tropical. Fragmentação florestal. Conservação.

SOUZA, Laís Bérghamo. **Genetic structure of populations of *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) in Southern Brazil by AFLP markers.** 56 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

Parapiptadenia rigida is a tree species characteristic of tropical semideciduous forest. This aggressive species is indifferent to the physical conditions of the soil and produce annually large amounts of seeds. Distributed along the Atlantic rain forest biome, *P. rigida* is considered of great importance in the recovery of degraded areas. Because of the human occupation, this biome presents various degrees of fragmentation provoking alterations in the dynamic of the natural populations that may lead to loss of genetic diversity. Population genetic studies using molecular markers allow the evaluation of plant species genetic structure and variability in fragmented areas contributing for the development of conservation strategies and management of tropical tree species. On this study we investigated the diversity and genetic structure of eight populations of *P. rigida* collected from forest fragments of the Parana and Santa Catarina states using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Five selective primers combinations rendered a total of 126 polymorphic fragments. Mean values for percentage of polymorphic loci (Pp) and the gene diversity index (Hs) were 60.45% and 0.217, respectively. Principal Coordinate Analysis showed that the majority of the studied populations were structured and the genetic variability was higher within (72.20%) than among (22.80%) populations. The pattern of distribution of the genetic variability and the moderate genetic structure of most populations of *P. rigida* suggest that fragmentation is a recent event affecting these populations and up to this moment, no serious implications on the reduction of their genetic variability is evident.

Keywords: AFLP. Genetic diversity. Tropical tree. Forest fragmentation. Conservation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ilustração demonstrativa da área total original da Mata Atlântica e seus remanescentes florestais no ano de 2007. Fonte: INPE; SOS Mata Atlântica, 2008..... 11
- Figura 2** - *Parapiptadenia rigida*: A - árvore adulta; B - ramo com flores; C - flores; D – frutos. Fonte: Lorenzi, 2002 15
- Figura 3** - *Parapiptadenia rigida*: A - sementes; B - tronco; C – madeira. Fonte: Lorenzi, 2002..... 16

ARTIGO

- Figura 1** – Ilustração dos estados do Paraná e Santa Catarina com a localização geográfica das cidades de coleta do material vegetal das populações de *Parapiptadenia rigida* utilizadas no estudo..... 33
- Figura 2** - Padrão de marcadores amplificados por AFLP em alguns indivíduos de *Parapiptadenia rigida* com a combinação de *primers EcoRI-ACG/MseI-CAG*..... 36
- Figura 3** - Coeficiente de variação por número de marcadores moleculares amplificados em oito populações de *Parapiptadenia rigida*..... 38
- Figura 4** - Diagrama de dispersão entre as distâncias genéticas e geográficas das oito populações de *Parapiptadenia rigida* analisadas..... 38
- Figura 5** - Análise da Coordenada Principal obtida a partir da matriz de distância genética de Nei de oito populações de *Parapiptadenia rigida* provenientes da região Sul do Brasil. 39

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

- Tabela 1** - Municípios e informações geográficas dos locais de coleta do material vegetal de *Parapiptadenia rigida* para extração do DNA genômico 32
- Tabela 2** – Combinações de *primers* seletivos de AFLP, número de fragmentos amplificados e porcentagem de polimorfismo obtida por combinação para oito populações de *Parapiptadenia rigida* 36
- Tabela 3** - Porcentagem de locos polimórficos (Pp), diversidade gênica de Nei (1973) (H_S) e Índices de Shannon-Wiener (H') em oito populações de *Parapiptadenia rigida* da região Sul do Brasil, obtidos com base em marcadores AFLP..... 38
- Tabela 4** - Análise de variância para dados moleculares (AMOVA) em oito populações de *Parapiptadenia rigida* a partir de marcadores AFLP 38
- Tabela 5** - Valores de distância genética do F_{ST} par-a-par abaixo da diagonal e distância geográfica (Km) acima da diagonal em oito populações de *Parapiptadenia rigida* obtidos com base em marcadores AFLP..... 39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	ESPÉCIE ESTUDADA	13
2.2	FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS	16
2.3	A IMPORTÂNCIA DA MANUTENÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA	19
2.4	ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MARCADORES MOLECULARES	20
2.4.1	Marcadores AFLP	25
3	JUSTIFICATIVA	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	OBJETIVOS GERAIS	28
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5	ARTIGO - Estrutura genética de populações de <i>Parapiptadenia rigida</i> (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) na região Sul do Brasil por marcadores AFLP	29
	RESUMO	29
	ABSTRACT	30
	INTRODUÇÃO	30
	MATERIAL E MÉTODOS	32
	RESULTADOS	35
	DISCUSSÃO	40
	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

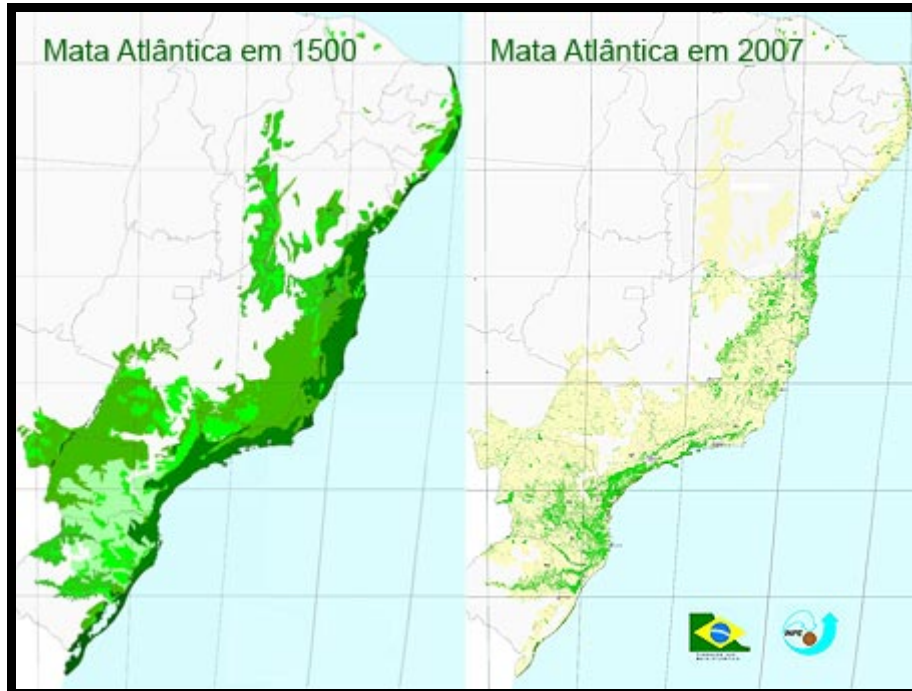
As florestas tropicais são os ecossistemas terrestres de maior diversidade biológica do mundo e, apesar disso, vem sendo destruídas a uma taxa de cerca de 30 hectares por minuto (DELAMÔNICA et al., 2001). Em decorrência da intensa ocupação humana e modificação do bioma, sobre o qual se sucederam várias atividades de exploração de riquezas naturais, sobretudo ao longo do processo de ocupação e formação econômica do Brasil, observa-se uma elevada redução da cobertura florestal da Mata Atlântica em relação a sua extensão inicial (RODRIGUES, 2008). A floresta, que antes cobria uma grande extensão da parte oriental do país, hoje está reduzida a 7% de sua cobertura original, pois sofreu e ainda vem sofrendo grande pressão antrópica por estar localizada na região do país que mais se desenvolveu (ALMEIDA, 2006) (Figura 1). Os primeiros núcleos urbanos no Brasil foram estabelecidos na Mata Atlântica, sendo que, posteriormente, foram formados os principais pólos industriais e relevantes metrópoles brasileiras também sobre seu domínio (RODRIGUES, 2008).

A floresta encontra-se fragmentada, onde a maioria dos fragmentos concentra-se em áreas íngremes e elevadas de difícil acesso e impossibilidade de implantação de atividades agropecuárias (SANTOS, 2003).

A fragmentação de habitats é uma das ameaças mais sérias à diversidade biológica, sendo a responsável pela crise de extinção atual, uma vez que causa danos irreversíveis, tais como: subdivisão de populações, diminuição do fluxo gênico (causada pelo impedimento da dispersão de animais, pólen, esporos e sementes), diminuição da diversidade biológica, isolamento de populações, redução da escala de recursos disponíveis, aumento e a intensificação do efeito de borda no ecossistema, riscos de consanguinidade com a redução na taxa de heterozigose e a erosão genética das espécies e menor resistência a distúrbios (GARDNER et al., 1987; NOSS, 1987; SIMBERLOFF; COX, 1987; O'NEILL et al., 1988a; O'NEILL et al., 1988b; TURNER, 1989; SIMBERLOFF et al., 1992; METZGER, 1999).

Diante desse contexto, o conhecimento da variabilidade genética dessas populações é importante para se estabelecerem estratégias de conservação das espécies e ecossistemas, além de orientar programas de coleta de material para banco de germoplasma e produção de mudas para programas de reflorestamento (BOTREL, 2006).

Figura 1 - Ilustração demonstrativa da área total original da Mata Atlântica e seus remanescentes florestais no ano de 2007.



Fonte: INPE; SOS Mata Atlântica, 2008.

Inúmeras técnicas que fazem uso de marcadores moleculares tem sido utilizadas para gerar conhecimentos sobre as características genéticas de espécies animais e vegetais dentro de uma população (RUAS, 2009), dentre elas destacam-se os marcadores AFLP.

A técnica *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) ou Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados se baseia em amplificações, via PCR, de fragmentos obtidos pela digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição, sendo, necessariamente, uma de corte raro e outra de corte frequente. É uma técnica que detecta um grande número de locos por gel, apresentando custos reduzidos por informação genética (LOPES et al., 2002)

Parapiptadenia rigida (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae), conhecida popularmente como guruaia ou angico-vermelho, é uma planta decídua, heliófila, secundária inicial, característica da mata latifoliada das bacias do Paraná, Uruguai e afluentes. Trata-se de uma planta indiferente quanto às condições físicas dos solos (BURKART, 1979). A madeira é utilizada na construção civil e naval, na fabricação de estacas, postes, dormentes, entre outros fins. No Brasil é a espécie de mais ampla distribuição nos estados sulinos, sendo mais frequente nas matas abertas e menos densas (LORENZI, 2002). Tais fatores fazem com

que esta espécie seja de extrema importância em programas que visem à recomposição de áreas fragmentadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESPÉCIE ESTUDADA

Parapiptadenia rigida (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae), vulgarmente conhecida como gurucaia, angico-vermelho, angico-cedro, angico-do-banhado e outros, é caracterizada como uma espécie tolerante ao frio e indiferente às condições físicas dos solos, ocorrendo em substratos úmidos e também nos mais secos, inclusive em solos pedregosos (BURKART, 1979). Possui madeira considerada altamente valiosa pela sua durabilidade, boa qualidade para lenha e produção de carvão (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 1986).

No Brasil, a espécie ocorre desde o estado de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo indo até o Rio Grande do Sul, porém é mais frequente na mata latifoliada semidecídua da bacia do Paraná (LORENZI, 2002). É encontrada também naturalmente no nordeste da Argentina (MARTINEZ-CROVETTO, 1963; GARTLAND et al., 1995), no leste do Paraguai (LOPEZ et al., 1987) e no norte do Uruguai (LOMBARDO, 1964).

P. rigida atinge de 20 a 30 m de altura, com DAP (Diâmetro na Altura do Peito) de 60 a 110 cm. Apresenta folhas bipinadas com 3 a 6 pares de pinas e folíolos de 1 cm de comprimento (LORENZI, 2002). Floresce de novembro a dezembro e tem a maturação dos frutos de maio a outubro (RIZZINI, 1971), sendo a maior parte entre junho e agosto (LORENZI, 2002). Caracteriza-se, principalmente, pelas inflorescências em forma de espiga amarelo-esverdeadas (LIMA; LIMA, 1984) que são melíferas, sendo polinizadas principalmente por abelhas pequenas (CAVALHEIRO; AMEIXEIRO, 1992), abelhas de porte médio dos gêneros *Melipona* e *Trigona* (KAGEYAMA, 1992) e também pelo vento (CÂNDIDO, 1974) (Figura 2). Ribas (1999) confirmou a existência de políades para esta espécie, o que, segundo Kenrich e Knox (1982), confere uma vantagem seletiva na reprodução por proporcionar um meio eficiente na dispersão de grãos de pólen por insetos e também assegurar que, com um único evento bem-sucedido de polinização, sejam produzidas várias sementes.

A espécie *P. rigida* é alógama, monóica e produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis. As primeiras sementes se libertam das vagens assim que estas amadurecem e secam, havendo espalhamento das mesmas por baixo e nas proximidades dos bordos das copas das árvores (autocoria) (CÂNDIDO, 1974). Essas sementes também podem ser dispersas pelo vento por serem aladas (Figura 3), no entanto, segundo Ribas

(1999), não se distanciam muito da árvore-mãe. Devido a sua ocorrência frequente junto aos cursos de água, sua dispersão também se dá por hidrocoria (BURKART, 1979). Encontrando um solo umedecido as sementes germinam prontamente (CÂNDIDO, 1974).

Apesar de ser uma espécie monóica, Ribas (1999) afirma que a espécie possui um mecanismo de auto-incompatibilidade, o que, segundo Arroyo (1981) ocorre na maioria das espécies da subfamília Mimosoideae, evitando assim a possibilidade de ocorrência de autofecundação.

A presença de várias flores em inflorescência seria uma estratégia para aumentar a atração dos polinizadores mais distantes, o que se tornaria ainda mais eficiente em virtude da cor creme ou amarelo-esverdeada das flores dessa espécie. Associando as políades e a potencial auto-incompatibilidade às inflorescências, tem-se uma eficiente estratégia para garantir a produção de satisfatório número de sementes a partir de uma única polinização bem-sucedida e, ao mesmo tempo, seleciona-se contra a produção de progênies endogâmicas (RIBAS, 1999).

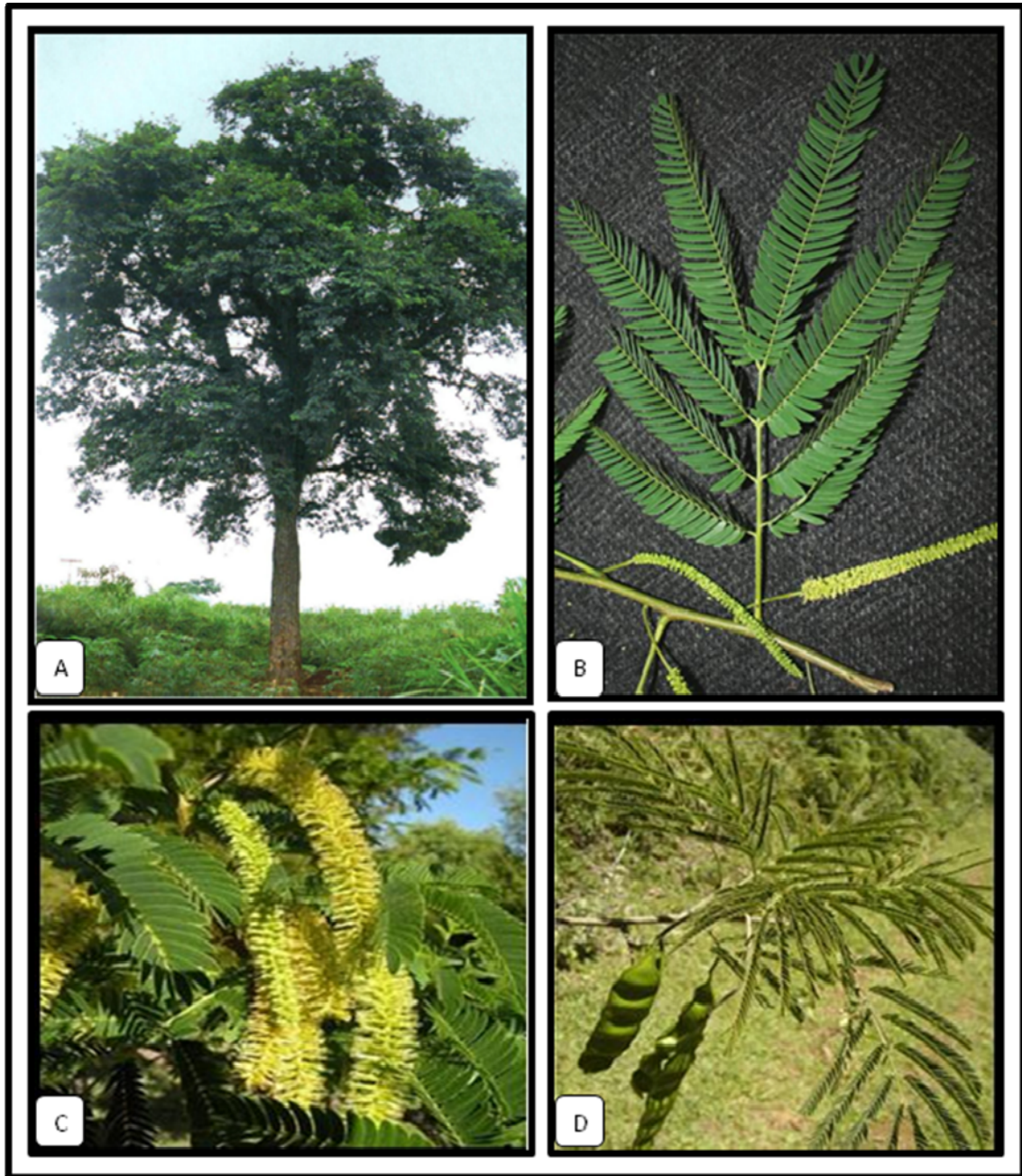
P. rigida possui madeira densa ($0,85\text{g/cm}^3$), bastante dura, pouco elástica, muito resistente e de grande durabilidade sob condições naturais (Figura 2), podendo ser empregada na construção civil e naval, na fabricação de carrocerias, postes, estacas, dormentes, como lenha para a obtenção de carvão e inclusive na carpintaria e marcenaria. Possui também características ornamentais que a recomendam para o paisagismo em geral (LORENZI, 2002).

A espécie apresenta ainda propriedades medicinais, sendo muito usada na medicina popular para tratamento da sinusite e da tosse (FRANCO; FONTANA, 1997), algumas infecções vaginais (KÖRBES, 1995), afecções bronco-pulmonares, na desobstrução das vias respiratórias e como calmante da tosse e da asma (REITZ, 1950).

De sua casca, é feita a extração de goma, resina e tanino, o qual também pode ser obtido a partir do fruto (CÂNDIDO, 1974; LORENZI, 2002).

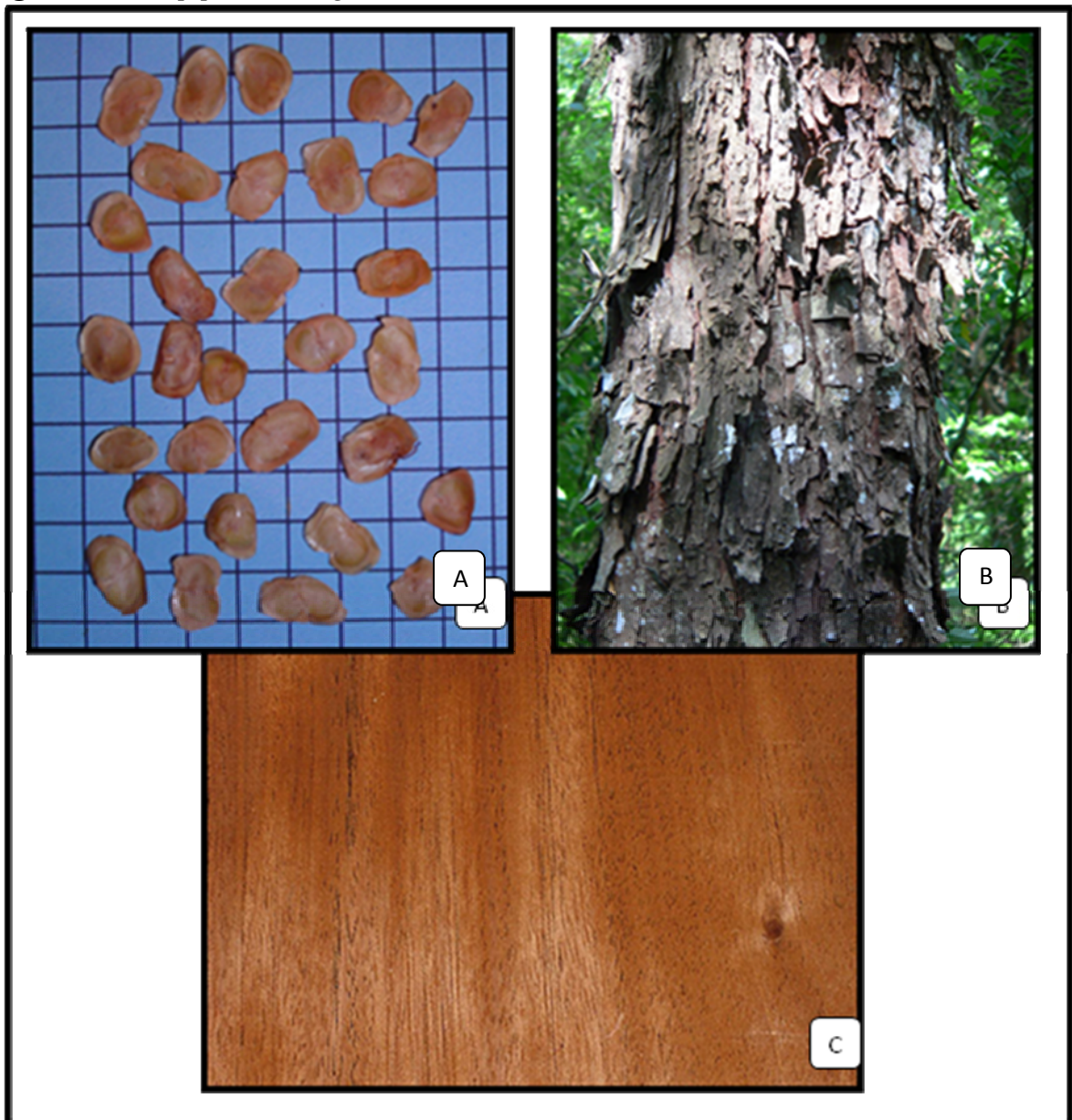
Devido ao fato de ser uma planta agressiva e possuir grande plasticidade ambiental, o angico-vermelho é comumente recomendado para a recuperação de áreas degradadas (SOUTO, 1984) e para a restauração florestal em áreas de preservação permanente (DURIGAN; NOGUEIRA, 1990).

Figura 2 - *Parapiptadenia rigida*: A - árvore adulta; B - ramo com flores; C - flores; D - frutos.



Fonte: Lorenzi, 2002.

Figura 3 – *Parapiptadenia rigida*: A - sementes; B - tronco; C - madeira.



Fonte: Lorenzi, 2002.

Segundo Siqueira e Nogueira (1992), *P. rigida* se encontra na lista de espécies que correm perigo de extinção, sendo a sua conservação genética feita por populações-bases *ex situ* no Estado de São Paulo, entretanto, o Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais (INPE) afirma que a espécie não está ameaçada.

2.2 FRAGMENTAÇÃO DE HABITATS

A fragmentação é decorrente do desmatamento de trechos de floresta contínua que isola pedaços de floresta de diferentes tamanhos em meio a áreas perturbadas

(DELAMÔNICA et al., 2001), sendo uma das mais importantes e difundidas consequências da atual dinâmica de uso da terra pelo homem. A taxa com que o homem está alterando as paisagens naturais é milhares de vezes maior do que a da dinâmica de perturbação natural dos ecossistemas (TABARELLI; GASCON, 2005), e o ritmo acelerado em que as perdas biológicas estão acontecendo tem assustado a comunidade científica, principalmente pelo fato de que, ao contrário de outras catástrofes ambientais, a perda da biodiversidade é irreversível (MITTERMEIER et al., 1998).

A fragmentação de habitats é a ameaça mais séria à diversidade biológica, sendo a responsável pela crise de extinção atual, acarretando prejuízos sérios como a diminuição do fluxo de animais, pólen e/ou sementes, a diminuição da diversidade biológica, o isolamento de populações, a redução da escala de recursos disponíveis, o aumento e a intensificação do efeito de borda no ecossistema, a perda do patrimônio genético das espécies, entre outros (NOSS, 1987; DÁRIO, 1999; METZGER, 1999).

Dessa forma, a destruição de habitats e a consequente fragmentação de populações naturais podem acarretar uma limitação evolutiva para as espécies que os compõem, devido à perda de variabilidade genética e à redução na capacidade de adaptação às mudanças ambientais (YOUNG et al., 1996). Tais alterações se refletem nos processos de deriva genética, fluxo gênico, seleção e no sistema de cruzamentos (COUVET, 2002). Sendo esses processos determinantes do grau de diversidade genética na espécie, bem como sua distribuição entre indivíduos e populações, os principais efeitos genéticos da fragmentação florestal são a diminuição da diversidade genética nas populações e espécies (DAYANANDAN et al., 1999; WHITE et al., 1999) devido ao aumento da endogamia (FUCHS et al., 2003) e a mudança na estrutura genética populacional, que acarretam fortes prejuízos às populações de espécies florestais (YOUNG et al., 1996).

Entretanto, as respostas das espécies vegetais ao processo de fragmentação são altamente variáveis, dependendo de suas características e das alterações ambientais ocorridas (LOWE et al., 2005). Em algumas espécies de plantas, por exemplo, foi observado que a fragmentação não levou ao aumento da divergência entre as populações, nem à redução na variação genética e heterozigosidade dentro de populações e nos níveis de fluxo gênico entre os fragmentos (YOUNG et al., 1993; SUN, 1996; GONZÁLEZ-ASTORGA; NÚÑES-FARFÁN, 2001; WHITE et al., 2002; DICK et al., 2003). No entanto, a diversidade genética e a estrutura podem ser alteradas se a fragmentação florestal modificar os padrões de dispersão de pólen e sementes (FORÉ et al., 1992).

A depressão endogâmica é considerada um dos mais importantes processos resultantes da perda de habitat (NOSS, 1987; SIMBERLOFF; COX, 1987). Simberloff et al. (1992) definem depressão endogâmica como sendo a ocorrência de cruzamentos consanguíneos em taxas muito altas, e a erosão genética como a consequente perda de variabilidade genética.

A deriva genética é uma flutuação aleatória das frequências alélicas que tem como consequência a perda e/ou a fixação de alelos (FUTUYMA, 1997). A deriva pode promover a perda de alelos da população e, em longo prazo, gerar um aumento da endogamia em função da maior probabilidade de autofecundação e cruzamento entre indivíduos aparentados (KAGEYAMA et al., 2003).

O grau de prejuízos causados pela fragmentação irá depender de uma série de fatores, ou seja, dos atributos espaciais e ecológicos. Entre estes atributos, temos o efeito de borda, que é específico para cada caso e pode acarretar uma série de distúrbios ecológicos como aumento da temperatura e diminuição da umidade. Outros atributos importantes seriam a área, a forma e a relação perímetro/área do fragmento, onde estes três fatores estariam fortemente relacionados com o grau de perturbação causado pelo efeito de borda. A conectividade entre os fragmentos, a heterogeneidade de habitats e o contexto ao qual o fragmento está inserido também interferem e determinam se os danos serão amenos ou irreversíveis (COLLINGE, 1996).

A importância do tamanho dos fragmentos e de sua proximidade na restauração e recolonização de uma população foi analisada por Schultz e Crone (2005) para a espécie de borboleta *Icaricia icarioides fenderi* Macy (Lycaenidae), natural das pradarias norte americanas. Através de regras simples baseadas no comportamento de dispersão e demografia da espécie e de dois modelos complexos, o modelo de incidência funcional e o modelo de dispersão randômica, este último uma simulação espacial de comportamento individual de dispersão e demografia, os autores obtiveram respostas fortemente concordantes. De acordo com os resultados obtidos nos três modelos, são os fragmentos maiores e mais conectados que apresentam melhores condições para a viabilidade populacional dessa espécie de borboleta.

A conectividade da paisagem também está intimamente relacionada com a existência dos corredores, outro elemento oriundo da fragmentação. Além da capacidade de conectar fragmentos, facilitando a sobrevivência dos organismos durante seu fluxo entre as manchas, eles podem apresentar as condições necessárias de habitat temporário ou permanente para algumas populações. Entretanto, a efetividade dos corredores para a

restauração e manutenção dos atributos necessário em uma paisagem preservada é polêmica, pois eles também podem apresentar o inconveniente de facilitar a propagação de algumas perturbações, como fogo ou doenças (METZGER, 2003). Segundo Haddad (2000), desde o surgimento da proposta dos corredores como importante elemento na conectividade da paisagem, muitos estudos têm mostrado seus efeitos positivos no movimento das espécies, porém, um fator importante que deve ser levado em conta é a qualidade do corredor ecológico, que irá depender do tamanho, da largura e do grau de cobertura que possui. Henein e Merriam (1990) avaliaram a importância da qualidade de corredores através de modelagem de populações e revisão da literatura. Desta avaliação verificou-se que um corredor com alta qualidade (bastante largo e com cobertura vegetal em fases sucessionais adiantadas) é ideal para o fluxo de espécies. Os autores também concluíram que a existência de um corredor de baixa qualidade (estreito ou com cobertura vegetal perturbada) é melhor que a ausência de conexão entre os fragmentos.

Apesar das muitas utilidades dos corredores, não existe respaldo científico para afirmar que os corredores podem evitar a extinção ou até mesmo preveni-la, embora alguns trabalhos já tenham conseguido demonstrar que em muitos casos os corredores são utilizados como canal de fluxo para algumas espécies (MACHTANS et al., 1996; TISCHENDORF et al., 1998).

2.3 A Importância da Manutenção da Variabilidade Genética

Nas últimas décadas, a extinção das variadas formas de vida tem aumentado consideravelmente. Acredita-se que 25% das espécies de plantas vasculares existentes serão extintas nos próximos 50 anos (KALA, 2000). Muitos fatores estão envolvidos com a extinção de espécies, como a destruição de habitats e a consequente fragmentação de populações (MATOCQ; VILLABLANCA, 2001).

A variabilidade genética é de importância fundamental para o potencial evolutivo de uma espécie e determina suas chances de sobrevivência em longo prazo (FLEISHMAN et al., 2001; JONES et al., 2001). Trata-se da “matéria-prima” que possibilita as mudanças evolutivas de uma espécie (MAMURIS et al., 2001; PITHER et al., 2003). Populações com pouca variabilidade genética podem ser incapazes de responder às mudanças ambientais (SHARMA et al., 2000; TANSLEY; BROWN, 2000; JONES et al., 2001; MATOCQ; VILLABLANCA, 2001; SHARMA, 2001). A perda da variabilidade genética resulta em baixo potencial evolutivo (HOLSINGER; GOTTLIEB, 1991) e provoca a redução

do *fitness* (adaptabilidade) da espécie (KOPPITZ, 1999; BOUZAT, 2001; MATOCQ; VILLABLANCA, 2001). A redução da variabilidade genética pode conduzir uma espécie à extinção (SHARMA et al., 2000; BOUZAT, 2001; SHARMA, 2001) sendo, portanto, uma das principais ameaças à existência de uma espécie (JAGGI et al., 2000; TANSLEY; BROWN, 2000).

Porém, a condição de pequena variabilidade genética não necessariamente implica em risco de extinção, e tal condição pode não ter sido causada por ação antrópica. Muitos endemismos, por exemplo, podem ser explicados por refúgios de glaciações (FUTUYMA, 1997). Muitas espécies parecem “conviver” com a baixa variabilidade genética ou com populações reduzidas de distribuição muito restrita (COATES; ATKINS, 2001; FLEISHMAN et al., 2001), desde que as condições do ambiente se mantenham constantes.

Amos e Balmford (2001) afirmam que perdas de variabilidade genética em populações florestais de até 25% não afetam a capacidade destas em manter o processo evolutivo e, conseqüentemente, a capacidade de adaptação às alterações ambientais.

Independente do padrão de diversidade genética de cada espécie, a manutenção da variabilidade genética é considerada essencial para a preservação do potencial evolutivo das espécies (FLEISHMAN et al., 2001), para sua sobrevivência em longo prazo (TANSLEY; BROWN, 2000), assim como para a aplicação de técnicas de manejo nas florestas e estabelecimento de ações de conservação *in situ* (KAGEYAMA; GANDARA, 1993).

2.4 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores permitem o estudo comparativo de genótipos, e esse termo tem sido utilizado para designar fatores morfológicos, bioquímicos ou genéticos passíveis de serem identificados (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Inicialmente, os estudos genéticos eram realizados utilizando-se marcadores morfológicos (fenotípicos) de fácil identificação no organismo e, geralmente, regidos por um único gene (GUIMARÃES; MOREIRA, 1999). O nanismo, a deficiência de clorofila, a cor das pétalas e a morfologia foliar foram caracteres bastante utilizados como marcadores (RICK; YODER, 1988; COE; NEUFFER; HOISINGTON, 1998). Apesar dos marcadores morfológicos terem contribuído significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica, o fato de existir um número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis limita sua utilização (GUIMARÃES;

MOREIRA, 1999). Além disso, esses marcadores frequentemente são afetados pela ação gênica de dominância, efeito ambiental, pleiotropia e epistasia (PATERSON et al., 1991).

O primeiro grande passo para resolver estes problemas foi o desenvolvimento de marcadores isoenzimáticos, que são baseados na análise do produto da expressão de genes (MOSS, 1982). Eles revelaram-se como uma nova fonte de marcadores genéticos com inúmeras vantagens sobre os marcadores morfológicos como codominância, insensibilidade a pleiotropia e a epistasia (PATERSON et al., 1991). Desde a sua resolução pelos métodos histoquímicos, as isoenzimas tem sido extremamente importantes para as investigações sobre variação intra-específica, genética de populações, evolução e mapeamento genético. Em plantas, as isoenzimas tem sido utilizadas principalmente em genética de populações, evolução e caracterização de germoplasma (GOTTLIEB, 1981; TANKSLEY; ORTON, 1983; SOLTIS; PASTEUR et al., 1988; SOLTIS, 1989; HILLIS et al., 1996).

Apesar de ser amplamente utilizada, de baixo custo e fácil execução, a técnica de análise de isoenzimas apresenta algumas limitações. Os genes que codificam as isoenzimas representam uma pequena fração do genoma, limitando a análise de polimorfismos, pois somente as substituições nucleotídicas que modifiquem a mobilidade eletroforética da enzima podem ser identificadas e muitas variações alélicas não são detectadas em função da redundância do código genético e de migração similar ao longo do gel (JASIENIUK; MAXWELL, 2001). Segundo os mesmo autores, os marcadores isoenzimáticos são inadequados para resolver diferenças genéticas muito pequenas. Outras limitações das isoenzimas como marcadores dizem respeito à especificidade de formas isoenzimáticas em alguns tecidos vegetais, o que pode ser uma limitação para análise, pois o polimorfismo isoenzimático ocorre em resposta a condições ambientais e as diferenças na atividade isoenzimática estão associadas a estádios diferentes de desenvolvimento.

No entanto, as isoenzimas ainda tem sido amplamente utilizadas em estudos de diversidade genética pela facilidade de análise e rápida interpretação de dados, mas ainda se trata de um modo indireto de se estudar os genes.

Com a descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick (1953) e do código genético por Nirenberg e Matthaei (1961), várias descobertas subsequentes permitiram o desenvolvimento de metodologias para se conhecer a sequência de bases de uma determinada região do DNA (SANGER, 1975), a visualização de fragmentos específicos gerados por restrição enzimática (SOUTHERN, 1975) e, posteriormente, a amplificação de fragmentos específicos da molécula (MULLIS; FALOONA, 1987), todas através dos chamados marcadores moleculares.

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA expresso ou não. A sequência de nucleotídeos e a função de um marcador molecular podem ou não ser conhecidas, sendo em geral desconhecidas. Verificando-se o seu comportamento de acordo com as leis de Mendel, um marcador molecular é definido como marcador genético. Portanto é importante enfatizar que o simples fato do marcador ser uma sequência de DNA ou produto da transcrição e tradução de uma sequência de DNA não implica que se constitua em um marcador genético, como geralmente é suposto (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Podem ser utilizados com vários objetivos, como na identificação de paternidades, construção de mapas genéticos, diagnóstico de doenças, identificação de locos responsáveis por características quantitativas (QTLs), genética populacional e melhoramento genético. Eles tem se mostrado uma ferramenta eficaz na quantificação da diversidade genética em diferentes populações (SAITBEKOVA et al., 1999; BARKER et al., 2001).

Marcadores baseados no DNA apresentam várias vantagens: encontram-se em número elevado, apresentam alto grau de polimorfismo, exibem neutralidade fenotípica, geralmente são codominantes, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas e podem ser detectados tanto em tecidos jovens como adultos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Uma das maiores vantagens de dados moleculares está na forma objetiva com que podem ser analisados. Os marcadores moleculares não são susceptíveis a efeitos ambientais, portanto são mais seguros para diversas análises, incluindo as filogenéticas (AMORIM, 2002).

Na década de 1970 surgiu o primeiro marcador que detecta o polimorfismo genético diretamente no DNA, eliminando a influência do ambiente (MILACH, 1998), denominado RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de Restrição de DNA). Na técnica, o polimorfismo observado ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na sequência de nucleotídeos ao longo da fita de DNA (GRANT; SHOEMAKER, 1998). A presença ou ausência de sequências específicas entre 4 e 8 pares de bases, reconhecidas e clivadas por enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismos. Diferenças nas sequências de DNA dos indivíduos podem também ser resultado de inserções, deleções ou outros rearranjos (ex.: translocações, inversões) que alterem a distância entre sítios de restrição (GRANT; SHOEMAKER, 1998). As diferenças são detectadas pela hibridização de um fragmento

(sonda) com o DNA genômico digerido com enzimas de restrição. A similaridade entre a sequência de nucleotídeos da sonda e a sequência complementar de nucleotídeos de um fragmento revela o polimorfismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). A grande vantagem dos marcadores RFLPs é a sua ampla distribuição no genoma, permitindo uma cobertura adequada, além de ter expressão codominante (NODARI et al., 1993). Entretanto, o elevado custo e o tempo necessário na geração destes marcadores restringem drasticamente seu uso de forma frequente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Com a descoberta da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia pela Polimerase) por Mullis e Faloona (1987), utilizando uma molécula de DNA polimerase termoestável (*Taq* Polimerase) e termocicladores programáveis com elevada capacidade de processamento, houve uma grande automatização na síntese enzimática *in vitro* de DNA. A partir daí surgiu uma ampla gama de marcadores moleculares com base em PCR, sendo o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), o primeiro deles (WILLIAMS et al., 1990).

Ao contrário do PCR convencional, o RAPD utiliza apenas um *primer* curto (cerca de dez nucleotídeos) que, devido ao seu pequeno tamanho, pode parear em diversos pontos do genoma. Caso duas cópias desse *primer* se liguem às fitas opostas do DNA a uma distância entre 200 e cerca de 2.000 pares de nucleotídeos pela reação de PCR, a região flanqueada pelos *primers* pode ser amplificada. Portanto, é uma técnica que não exige o conhecimento prévio da sequência que está sendo amplificada, ao contrário do PCR convencional. Logo, um mesmo conjunto de *primers* pode ser usado para amplificar o DNA dos mais diversos tipos de organismos (ALZATE-MARIN et al., 2005).

O polimorfismo evidenciado pelo RAPD é detectado em função de mutações no(s) sítio(s) de ligação do *primer*, que impedem o seu pareamento e a consequente amplificação, ou devido à ocorrência de deleções ou inserções na região compreendida entre os dois sítios, que alteram o tamanho do segmento amplificado. Como, na maioria das vezes, essas mutações impedem a amplificação do segmento de interesse, diz-se que a herança do RAPD é dominante, pois apenas duas classes fenotípicas serão detectadas, presença ou ausência da banda de DNA (ALZATE-MARIN et al., 2005).

As principais vantagens desse marcador estão na simplicidade e na rapidez na obtenção dos resultados, além da mínima quantidade de DNA necessária para a análise genotípica de um indivíduo. Sendo o RAPD um marcador com característica dominante, sua principal limitação está justamente no baixo conteúdo informativo por loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), dificultando assim estimar as frequências genotípicas, taxas de

endogamia e diversidade genotípicas, limitando a análise da estrutura e diversidade genética de populações (MOURA, 2003). Apesar de demonstrar problemas como baixa reprodutibilidade, a técnica se popularizou, pois permite gerar informação sobre a estrutura genética de populações nunca estudadas, uma vez que não é necessário o conhecimento da sequência alvo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Os marcadores RAPD já foram bastante usados para estimar a variabilidade genética em espécies arbóreas tropicais (ABEYSINGHE et al., 2000; DEGEN et al., 2001; RAINA et al., 2001; MOSSI et al., 2009).

Os marcadores microssatélites vieram em seguida. Os SSRs (*Simple Sequence Repeat* – Sequências Simples Repetidas) ou STRs (*Short Sequence Tandem Repeat* – Sequências Curtas Repetidas em *Tandem*) são sequências moderadamente repetitivas dispersas pelo genoma e formadas por repetições em *tandem* de 1 a 6 pares de bases. Estas sequências formam conjuntos de cinco até centenas de repetições por loco, podendo variar em tamanho e possuindo um caráter altamente polimórfico (TAUZ, 1989). Eles tem sido preferidos a outros tipos de marcadores, pois utilizam a agilidade da técnica de PCR, são codominantes e estão espalhados ao acaso no genoma com uma frequência relativamente alta (AKKAYA et al., 1992).

Em 1995, Vos e colaboradores desenvolveram e divulgaram outro marcador molecular denominado AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado). Segundo o autor, o AFLP é uma classe de marcadores que alia a especificidade dos sítios de restrição do RFLP à praticidade de amplificação da PCR.

Essa técnica mostra boa reprodutibilidade dos resultados. Como vantagem, tem-se: a exploração de regiões genômicas arbitrárias sem conhecimento prévio da sequência de DNA, a especificidade da PCR e a grande quantidade de informação gerada em um único gel de poliacrilamida, uma vez que são explorados polimorfismos de restrição e amplificação seletiva. Entretanto, são marcadores dominantes, apresentando baixo conteúdo informativo por loco e exigem um DNA de alta qualidade (OLIVEIRA, 2006).

Mais recentemente, surgiu uma nova classe de marcadores moleculares, os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismos de Base Única), que se caracterizam por mutações pontuais.

A priori, os SNPs podem ser bi, tri ou tetra alélicos, ou seja, possuírem duas, três ou quatro formas diferentes, porém, os dois últimos tipos são extremamente raros: as variações mais frequentes são substituições entre bases nitrogenadas de mesma característica

estrutural (A/G ou G/A e C/T ou T/C), que são chamadas de transições. As outras substituições são conhecidas com transversões (GALVES, 2006).

Ainda segundo Galves (2006), um SNP pode ser sinônimo ou não: no primeiro caso, o aminoácido codificado pelo códon contendo SNP é o mesmo que aquele codificado pelo códon sem SNP, no segundo caso, o códon modificado gera um aminoácido diferente, podendo modificar a estrutura e função da proteína codificada.

A partir do momento que as sequências de DNA de uma dada região são conhecidas, *primers* podem ser sintetizados para amplificar os alelos de interesse revelando polimorfismos existentes. Esses marcadores possuem a vantagem de serem altamente abundantes no genoma, de serem codominantes e de possuírem efeito predominantemente neutro (OLIVEIRA, 2006).

2.4.1 Marcadores AFLP

A técnica de AFLP combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Os marcadores AFLP destacam-se pela sensibilidade, simplicidade, rapidez e pela capacidade de revelar locos dispersos pelo genoma sem exigência de conhecimento prévio das sequências-alvo ou de uso de sondas para hibridização (LOPES et al., 2002), entretanto, a principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por locus, pois, assim como os marcadores RAPD, são de natureza dominante (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ZHIVOTOVSKY, 1999; COSTA et al., 2000). Outras desvantagens são necessidade de um DNA puro e íntegro para que não ocorra nenhuma alteração nos padrões de banda e, comparado ao RAPD, exige uma infra-estrutura maior e é mais trabalhoso, pois requer um número maior de etapas até obter-se o resultado final (VOS et al., 1995; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

A técnica de AFLP consiste essencialmente de quatro etapas. Na primeira etapa o DNA genômico é digerido com duas enzimas de restrição simultaneamente, uma de corte frequente, isto é, com sítio de restrição de quatro pares de base, e outra de corte raro, ou seja, com sítio de restrição formado por seis pares de base. A segunda etapa consiste na ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa é realizada uma amplificação pré-seletiva dos fragmentos usando

primers complementares aos adaptadores com mais um nucleotídeo seletivo adicional na extremidade 3', que pareia com o primeiro nucleotídeo localizado logo após o sítio original de restrição para uma seleção branda. Esta fase é seguida por uma amplificação seletiva usando *primers* com sequências contendo um, dois ou três nucleotídeos a mais na extremidade 3', além do já constante nos *primers* da reação de pré-amplificação. O procedimento de amplificação seletiva é necessário para que o número de fragmentos gerados não seja muito grande, o que impossibilitaria a análise dos resultados. Finalmente, os fragmentos amplificados são separados em eletroforese de gel de poliacrilamida para análise.

Diversas enzimas de restrição e *primers* para seleção estão disponíveis comercialmente, conferindo alto grau de flexibilidade, possibilitando a manipulação para diferentes aplicações e uma busca eficiente no genoma por polimorfismos (ABRAHÃO, 2008). A enzima de corte frequente mais comumente empregada é a *MseI*, e entre as enzimas de corte raro, as mais usuais são *EcoRI*, *PstI* e *HindIII* (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores AFLP são muito utilizados para estudos de detecção de variedades vegetais (MANUBENS et al., 1999), diversidade genética intrapopulacional e interpopulacional (KEIPER; MCCONCHIE, 2000), análises de parentesco (GERBER *et al.*, 2000), filogeografia (MUELLNER et al., 2005) e construção de mapas genéticos (CHAGNE et al., 2002).

3 JUSTIFICATIVA

As florestas tropicais são os ecossistemas terrestres de maior diversidade biológica do mundo e, em decorrência da intensa ocupação humana e modificação do bioma, observa-se um alto grau de degradação ambiental, principalmente pela expansão de campos de cultivo e pastagens e pelo desenvolvimento urbano e industrial. A redução da floresta a pequenos fragmentos pode ter modificado a estrutura genética e a dinâmica das populações vegetais ali existentes. O crescente interesse nesta área gerou estudos da estrutura e variabilidade genética de populações naturais ou de ambientes fragmentados, oferecendo subsídios para se planejar o seu manejo e conservação. Há, contudo, um número reduzido de estudos científicos com espécies arbóreas tropicais. O presente estudo com *Parapiptadenia rigida* procura contribuir com informações relevantes à conservação desta espécie nativa arbórea mostrando como a variabilidade genética desta espécie tropical de sucessão secundária inicial está distribuída em diferentes populações da região Sul do Brasil.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

✓ Investigar a estrutura genética de populações de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) utilizando marcadores AFLP a fim de verificar se a mesma encontra-se em perigo de extinção e analisar se há relação com a paisagem fragmentada da região onde a espécie se encontra.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Quantificar a variabilidade genética intra e interpopulacional de oito populações de *P. rigida* distribuídas nos Estados do Paraná e Santa Catarina;

✓ Estimar a divergência genética entre as populações em estudo comparando com as distâncias geográficas dos diferentes fragmentos amostrados;

✓ 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

**Estrutura genética de populações de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan
(Leguminosae-Mimosoideae) na região Sul do Brasil por marcadores AFLP**

* Este artigo será submetido à revista **Plant Species Biology**.

**Estrutura genética de populações de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan
(Leguminosae-Mimosoideae) na região Sul do Brasil por marcadores AFLP**

Laís Bérnago de Souza¹, Luana A. Rodrigues¹, Eduardo A. Ruas¹, André R. O. Conson¹,
Bruno F. Costa¹, Carina C. F. Lucio¹, Claudete F. Ruas¹, Paulo M. Ruas¹

Autor para correspondência: Paulo Maurício Ruas. Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, s/n, Caixa Postal 6001, 86051-980, Londrina, PR, Brasil. E-mail: ruas@sercomtel.com.br. Telefone: 55-43-3371-4417/Fax: 55-43-3328-4440

RESUMO

Parapiptadenia rigida é uma espécie tropical, secundária inicial, característica de florestas semidecíduais. Esta espécie é considerada de grande importância ecológica por seu uso na recuperação de áreas degradadas. Este estudo teve como objetivo investigar a variabilidade e a estrutura genética de oito populações de *P. rigida* obtidas de fragmentos de mata nos estados do Paraná e Santa Catarina. Cinco combinações de *primers* seletivos de AFLP foram usadas em uma amostra de 159 indivíduos representantes das oito populações, fornecendo um total de 126 fragmentos, todos polimórficos. Os valores médios para porcentagem de locos polimórficos (Pp) e para o índice de diversidade gênica (Hs) foram de 60,45% e 0,217, respectivamente. A análise da Coordenada Principal mostrou que a maioria das populações estudadas apresenta-se estruturada. A distribuição da variabilidade genética foi maior dentro das populações (72,20%) que entre as populações (22,80%) de *P. rigida*. A partir do padrão da distribuição da variabilidade genética e a moderada estruturação observada na maioria das populações de *P. rigida* pode-se inferir que a fragmentação de algumas populações seja um evento recente que, entretanto, não teve sérias implicações na redução da variabilidade genética.

Palavras-chave: Espécie arbórea tropical. Diversidade genética. Genética de populações. Conservação. AFLP.

¹ Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, PR, Brasil.

ABSTRACT

Parapiptadenia rigida is a tropical plant species of initial secondary succession, characteristic of semi-deciduous forests. This species is of great ecological importance for its use in the recovery of degraded areas. The aims of this study were to investigate the genetic variability and population genetic structure of eight populations of *P. rigida* from forest fragments of the Parana and Santa Catarina States. Five AFLP primers combinations were used in a sample of 159 individuals representing the eight populations, rendering a total of 126 polymorphic fragments. The averages on percentage of polymorphic loci (Pp) and gene diversity index (Hs) were 60.45% and 0.217, respectively. The principal coordinate analysis showed that the majority of the studied population are genetically structured. The distribution of the genetic variability was higher within (72.20%) than between (22.80%) populations of *P. rigida*. The pattern on distribution of genetic variability and the moderate genetic structure of most populations of *P. rigida* suggest that fragmentation is a recent event affecting populations. However there were still no serious implications on the reduction of genetic variation.

Keywords: Tropical tree. Genetic diversity. Population genetics. Conservation, AFLP.

INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica é um dos biomas mais ricos em diversidade biológica e mais ameaçados do planeta, considerado um dos cinco mais importantes *hotspots* de biodiversidade (MYERS et al., 2000). Durante séculos foi alvo de intensas perturbações antrópicas intensificadas nas últimas sete décadas através da extração madeireira, caça ou da substituição de suas florestas por áreas agrícolas e pelo processo de urbanização desordenado (DEAN, 1996).

A paisagem atual desta região encontra-se bastante fragmentada e desconectada, representada em sua quase totalidade por pequenas manchas florestais, isoladas e impactadas, circundadas por extensas matrizes antrópicas como pastos, monoculturas e áreas de desenvolvimento urbano (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2002).

A fragmentação de contínuos florestais expõe as populações a problemas ecológicos e genéticos causados pela endogamia e perda de variação por deriva genética. As reduções na variabilidade genética das populações de espécies arbóreas podem causar a perda da capacidade reprodutiva, da resistência a doenças e da plasticidade das populações em se adaptarem às mudanças ambientais tornando-as suscetíveis à extinção (HEYWOOD; STUART, 1994).

Logo após a formação dos fragmentos florestais, a maioria das espécies permanece nos fragmentos por algum tempo. Contudo, os problemas causados pelo

desequilíbrio do ecossistema atuam de modo a favorecer o predomínio de poucas ou de uma única espécie sobre as demais. Não obstante, pequenos fragmentos florestais ainda possuem importante valor para a manutenção da biodiversidade, embora sejam influenciados pelo tamanho, pela forma e pelo grau de isolamento entre eles (TURNER; CORLETT, 1996).

Neste contexto, estudos sobre populações de animais e vegetais em fragmentos florestais tornam-se cada vez mais necessários. Perdas de biodiversidade podem causar grandes prejuízos para o futuro da humanidade (WILSON; FRANCES, 1997).

A sobrevivência em longo prazo da maioria da biota vai depender da habilidade das espécies em persistir nestes ambientes e da nossa capacidade de manejar e conservar estas paisagens degradadas (LAURANCE; BIERREGAARD, 1997; FAHRIG, 2002, 2003).

Para que se estabeleçam estratégias de conservação das espécies e ecossistemas, o conhecimento da variabilidade genética dessas populações se faz necessário (BOTREL, 2006).

Dentre as inúmeras técnicas que fazem uso de marcadores moleculares para gerar conhecimento sobre as características genéticas de espécies animais e vegetais dentro de uma população, os marcadores AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism* - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado) vem se destacando pelo grande número de marcadores gerados por ensaio, grande poder de detecção de variabilidade genética e maior repetibilidade (VOS et al., 1995). Apesar de pouco informativo por se tratar de um marcador dominante, estudos de simulação mostram que o grande número de marcadores AFLP compensa o baixo conteúdo de informação genética por locus (MARIETTE et al., 2002).

Parapiptadenia rigida (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae), conhecida popularmente como guruaia ou angico-vermelho, é uma planta alógama, monóica, caracterizada como secundária inicial (DURIGAN; NOGUEIRA, 1990; VACCARO et al., 1999), característica da mata latifoliada das bacias do Paraná, Uruguai e afluentes. Trata-se de uma planta indiferente quanto às condições físicas dos solos (BURKART, 1979), possui madeira considerada altamente valiosa pela sua durabilidade, boa qualidade para lenha e produção de carvão (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 1986). No Brasil é a espécie de mais ampla distribuição nos estados sulinos, sendo mais frequente nas matas abertas e menos densas (LORENZI, 2002). Tais fatores fazem com que esta espécie seja de extrema importância em programas que visem à recomposição de áreas fragmentadas.

O estudo do comportamento genético de oito populações de *P. rigida* com ocorrência natural em fragmentos de distintos tamanhos utilizando marcadores AFLP objetivou quantificar a variabilidade genética intra e interpopulacional da espécie e determinar possíveis efeitos da fragmentação sobre a estrutura genética da mesma visando fornecer subsídios para adoção de diretrizes de manejo e conservação.

MATERIAL E MÉTODOS

LOCAIS DE COLETAS DO MATERIAL BIOLÓGICO

As coletas de material vegetal para os estudos de estrutura das populações foram realizadas nos estados do Paraná e Santa Catarina. A ocorrência da espécie foi constatada através de consultas bibliográficas (LORENZI, 2002), consultas em meio eletrônico (CENTRO DE REFERÊNCIA EM INFORMAÇÃO AMBIENTAL, 2010) e visitas aos locais.

A identificação detalhada das origens do material vegetal é apresentada na Tabela 1 e as localizações geográficas das cidades onde foram coletadas as populações de *P. rigida* estão ilustradas na Figura 1.

Tabela 1 - Municípios e informações geográficas dos locais de coleta do material vegetal de *Parapiptadenia rigida* para extração do DNA genômico.

Município/ Estado	Latitude	Longitude	Área Total do Fragmento*	Altitude média	Mesorregião
Ortigueira – PR	24° 09'S	50°52'O	15000 m ²	750 m	Centro-Oriental Paranaense
Curiúva – PR	24°01'S	50°26'O	8000 m ²	780 m	Norte Pioneiro Paranaense
Londrina – PR	26°26'S	51°14'O	10000 m ²	610 m	Norte Central Paranaense
Lupionópolis - PR	22°45'S	51°39'O	10000 m ²	600 m	Norte Central Paranaense
Cornélio Procópio – PR	23°15'S	50°44'O	9000 m ²	660 m	Norte Pioneiro Paranaense

Irati – PR	25°32'S	50°39'O	13000 m ²	810 m	Sudeste Paranaense
Vargem – SC	27°31'S	50°53'O	5000 m ²	780 m	Região Serrana Catarinense
Lages – SC	28°11'S	50°43'O	15000 m ²	920 m	Região Serrana Catarinense

*Área total aproximada do fragmento.

Figura 1 – Ilustração dos estados do Paraná e Santa Catarina com a localização geográfica das cidades de coleta do material vegetal das populações de *Parapiptadenia rigida* utilizadas no estudo.



AMOSTRAGEM

Cerca de 30 amostras de tecidos foliares foram coletadas aleatoriamente em cada uma das populações, mantendo uma distância mínima de 10 m entre as árvores a fim de evitar a coleta de indivíduos aparentados. As amostras foram coletadas 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 coletadas e mantidas em sílica.

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES AFLP

Extração e quantificação do DNA genômico total de *P. rigida*

A extração do DNA de cada indivíduo foi realizada segundo protocolo CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987). A concentração de DNA de cada amostra foi estimada utilizando um fluorímetro (DyNA Quant 200, Höfer-Pharmacia) segundo as instruções do fabricante e posteriormente congeladas em *freezer* até a utilização com marcadores AFLP.

Reações de AFLP

Cerca de 800 a 1000 ng do DNA genômico foram digeridos com duas enzimas de restrição simultaneamente, 5 U de *MseI* e 5 U de *EcoRI*, em tampão de digestão com um volume total de 20 µl. A reação foi incubada a 37°C por 18 horas para que a reação ocorresse e, em seguida, os fragmentos gerados foram ligados a adaptadores específicos, conforme descrito por Vos et al. (1995) com algumas modificações. Para a ligação dos adaptadores foi acrescentado ao material digerido um mix contendo tampão da T4 DNA ligase 1X, NaCl 0,05 M, BSA 0,5 ng, DTT 5 mM, adaptadores *MseI* 50 mM, adaptadores *EcoRI* 5 mM, T4 DNA ligase 1U e água ultra pura para completar o volume de 10 µL. A reação foi incubada a 37°C por 3 h, 17°C por 30 min, 70°C por 10 min. A seguir 25 µl da reação de restrição-ligação foi diluída em 100 µl de água ultra pura. A amplificação pré-seletiva foi realizada utilizando o kit GoTaq® *Green Master Mix* (Promega), *primer* pré-seletivo 4,75 Mm, 3,0 µL da diluição da reação de restrição-ligação e água ultra pura para completar o volume de 10 µL. O programa da amplificação pré-seletiva foi realizada em 1 ciclo de 72°C por 2 min, 20 ciclos de 90°C por 1 seg, 56°C por 30 seg e 72°C por 2 min seguido de 1 ciclo final de 60°C por 30 min. Em seguida, um volume de 5 µl da reação pré-seletiva foi diluído em 45µl de água ultrapura. Para a amplificação seletiva foram testadas 24 combinações de *primers* com 2 ou 3 nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. Destas, foram selecionadas cinco combinações (Tabela 2). As reações de amplificação seletiva foram compostas dos *primers* seletivos *MseI* 5 µM e *EcoRI* 5 µM, GoTaq® *Green Master Mix*, 3 µL da reação da pré-amplificação diluída e água ultra pura para completar o volume de 10 µL. O programa para amplificação foi composto por 1 ciclo de 94°C por 2 min, 65°C por 30 seg e 72°C por 2 min; 8 ciclos de 94°C por 1 seg, 64°C por 30 seg e 72°C por 2 min; 23 ciclos de 94°C por 1 seg, 56°C por 30 seg e 72°C por 2 min e 1 ciclo final de 60°C por 30 min. Os

produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilaminada (29 acrilamida : 1 bis-acrilamida) a 7% a 200 volts por um período de aproximadamente três horas e dez minutos, corados com nitrato de prata a 2%, fotografados com uma câmera digital e posteriormente analisados com a ajuda do *software* Canvas X.

ANÁLISE BIOMÉTRICA DOS DADOS DE AFLP

Os géis de eletroforese foram analisados visualmente e os marcadores com tamanhos entre 100 e 700 pb obtidos foram acessados para presença (1) ou ausência (0), no qual gerou-se uma matriz binária de dados, que foi utilizada nas análises estatísticas. Para o cálculo do coeficiente de variação foi utilizado o programa DBOOT versão 1.1 (COELHO, 2001) a fim de verificar a confiabilidade dos dados. A porcentagem de locos polimórficos (Pp), a diversidade gênica de Nei (1973) (H_S), o Índice de Shannon-Wiener (H') e o Coeficiente de Diferenciação Genética (G_{ST}) foram calculadas para as oito populações utilizando o programa POPGENE versão 1.32 (YEH et al., 2000). Para verificar a variação da variabilidade genética entre e dentro das populações, bem como o Índice de Fixação Alélica (F_{ST}), utilizou-se a Análise de Variância Molecular (AMOVA) conduzida no programa Arlequin versão 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005). Para verificar a existência de correlação entre a distância genética e geográfica foi utilizado o Coeficiente de Correlação Linear de Pearson, realizado pelo programa BioEstat versão 5.0 (AYRES, 2007), onde foram comparadas as matrizes. A análise da Coordenada Principal foi utilizada para avaliar a distribuição da distância genética através do programa FAMD (*Fingerprint Analysis with Missing Data*) (SCHLUTER, 2006).

RESULTADOS

DIVERSIDADE GENÉTICA

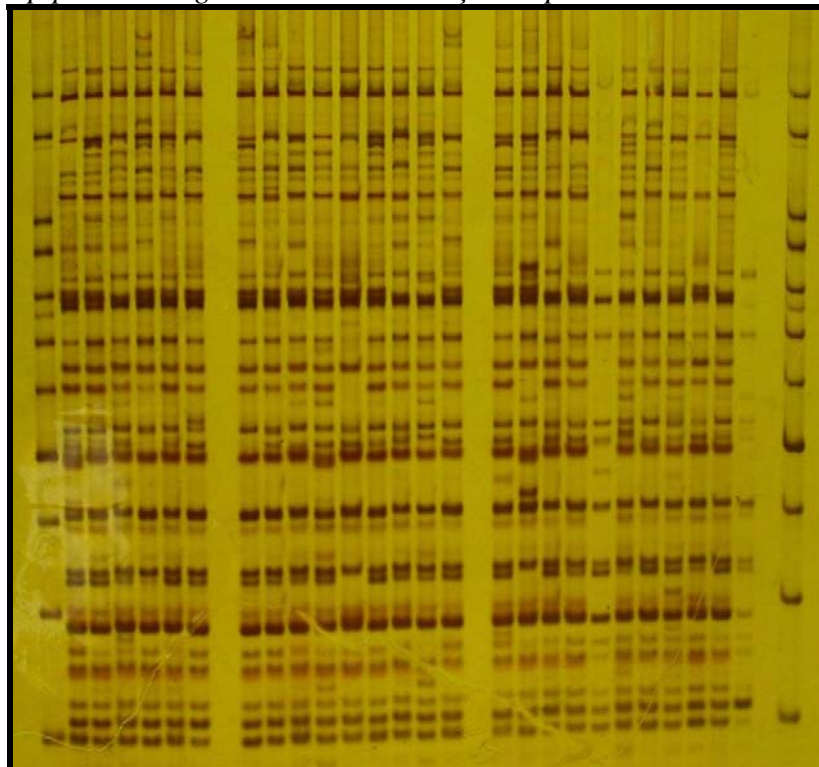
Entre as 24 combinações de *primers* seletivos de AFLP testadas, cinco foram selecionadas com base na qualidade dos produtos de amplificação e na quantidade de polimorfismo gerado e aplicadas em oito populações de *P. rigida* para avaliar a estrutura e diversidade genética desta espécie. De um total de 126 fragmentos produzidos, 100% foram polimórficos (Tabela 2).

A Figura 2 ilustra o padrão de marcadores AFLP obtido com a combinação de *primers* *EcoRI-ACG/MseI-CAG* em alguns dos indivíduos de *P. rigida*.

Tabela 2 - Combinações de *primers* seletivos de AFLP, número de fragmentos amplificados e porcentagem de polimorfismo obtida por combinação para oito populações de *Parapiptadenia rigida*.

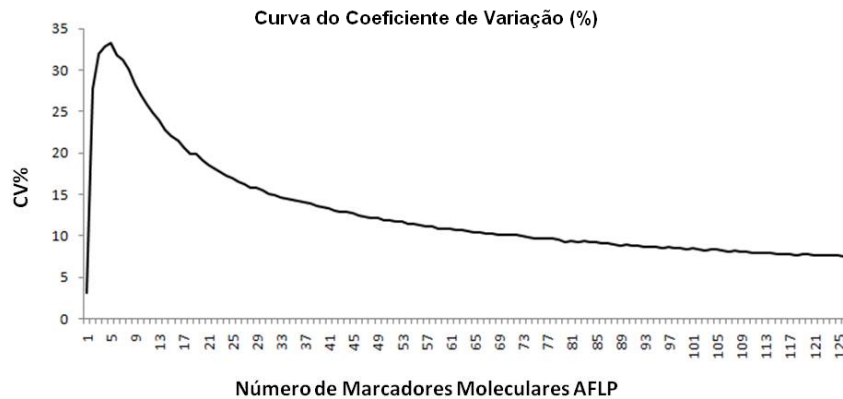
Combinações de <i>primers</i>	Número de fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos (%)
<i>EcoRI-ACG/MseI-CAG</i>	28	100
<i>EcoRI-ACG/MseI-CTA</i>	20	100
<i>EcoRI-ACG/MseI-CAC</i>	24	100
<i>EcoRI-ACG/MseI-CAT</i>	28	100
<i>EcoRI-AGC/MseI-CAT</i>	26	100
Média	25,2	100

Figura 2 – Padrão de marcadores amplificados por AFLP em alguns indivíduos de *Parapiptadenia rigida* com a combinação de *primers* *EcoRI-ACG/MseI-CAG*.



O Coeficiente de Variação calculado para o número total de marcadores foi de 7,47%, indicando que o número de marcadores foi suficiente para realização das análises de diversidade e estrutura genética (Figura 3).

Figura 3 - Coeficiente de variação por número de marcadores moleculares amplificados em oito populações de *Parapiptadenia rigida*.



A porcentagem de locos polimórficos permite estimar a frequência dos alelos na população e é um dos parâmetros utilizados para estimar a diversidade genética intrapopulacional. A porcentagem de locos polimórficos em *P. rigida* apresentou uma variação de 48,44%, na população do município de Curiúva – PR, a 82,81%, na população coletada em Ortigueira - PR, com uma média de 60,45% entre as populações (Tabela 3).

Os índices de diversidade gênica apontam para a diversidade contida dentro de cada população. Segundo Cornuet e Luikart (1996) e Piry et al. (1999), esse parâmetro pode ser influenciado pelo tamanho efetivo das populações, cuja redução poderia igualmente reduzir o índice de diversidade gênica. Para determinação da diversidade genética, foram utilizados o Índice de Shannon-Wiener (H'), Índice de Diversidade Gênica (H_S) (Nei, 1973) e a Heterozigosidade Total (H_T) (Tabela 3).

A estimativa de diversidade gênica em *P. rigida* a partir de Nei (1973) (H_S) indicou a existência de elevados níveis de diversidade na espécie, variando de 0,171, na população de Vargem – SC, a 0,301, na população de Ortigueira – PR. Já os Índices de Shannon-Wiener (H') determinaram valores de diversidade gênica maiores comparados aos de Nei (variação de 0,257 a 0,444), contudo, as populações com maior e menor índices de diversidade permaneceram as mesmas para as duas estimativas.

Tabela 3 - Porcentagem de locos polimórficos (Pp), diversidade gênica de Nei (1973) (H_S), Índices de Shannon-Wiener (H') e heterozigosidade total (H_T) em oito populações de *Parapiptadenia rigida* da região Sul do Brasil, obtidos com base em marcadores AFLP.

População	Pp	H_S	H'
Ortigueira – PR	82,81	0,301	0,444
Curiúva – PR	48,44	0,176	0,261
Cornélio Procópio – PR	57,81	0,212	0,314
Londrina – PR	50,78	0,180	0,268
Lupionópolis – PR	50,00	0,182	0,270
Irati - PR	79,69	0,287	0,423
Lages – SC	64,84	0,226	0,338
Vargem – SC	49,22	0,171	0,257
Média	60,45	0,217	0,322
H_T		0,278	

Para o cálculo da heterozigosidade total (H_T) nas oito populações amostradas foram utilizadas as cinco combinações analisadas em conjunto, o que resultou em um valor de 0,278.

ESTRUTURA GENÉTICA

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou uma elevada variação interpopulacional, com um valor de F_{ST} igual a 0,22799 para *P. rigida*, sendo a maior parte da variância genética (77,20%) encontrada dentro das populações (Tabela 4). Resultado semelhante foi obtido a partir do coeficiente de diferenciação genética (G_{ST}), onde se obteve um valor de 0,2196.

Tabela 4 - Análise de variância para dados moleculares (AMOVA) em oito populações de *Parapiptadenia rigida* a partir de marcadores AFLP.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre populações	7	562,104	3,46054	22,80**
Dentro de populações	151	1769,393	11,71783	77,20
Total	158	2331,497	15,17837	
Índice de fixação	F_{ST}	0,22799		

** $P < 0.01$; (teste de significância realizado através de 1023 permutações).

Comparando a variabilidade entre as populações obtida a partir das comparações par-a-par de F_{ST} , a menor distância genética observada foi de 7,43% entre as populações de Lages – SC e Vargem – SC, e a maior distância genética (32,62%) foi verificada entre as populações de Vargem - SC e Lupionópolis - PR (Tabela 5).

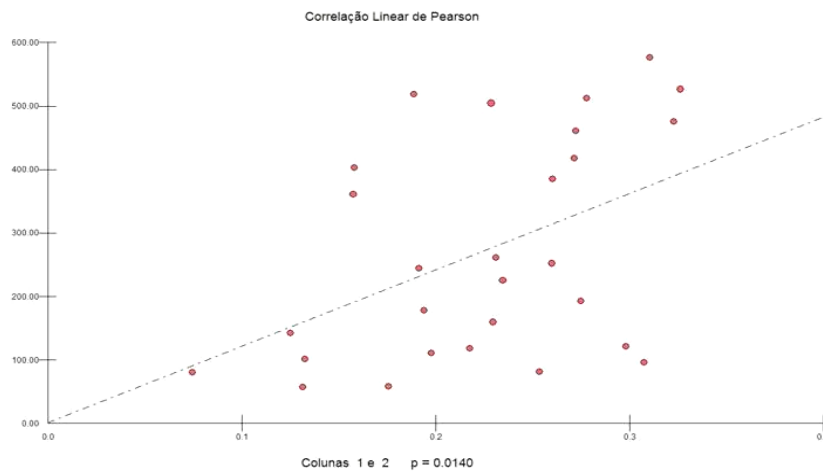
Tabela 5 - Valores de distância genética do F_{ST} par-a-par abaixo da diagonal e distância geográfica (Km) acima da diagonal em oito populações de *Parapiptadenia rigida* obtidos com base em marcadores AFLP.

Populações	O	C	CP	LO	LA	V	LU	I
O	****	57	118	101	403	361	178	142
C	0.13149	****	96	111	417	385	193	160
CP	0.21740	0.30743	****	58	512	476	121	252
LO	0.13244	0.19758	0.17554	****	504	460	81	244
LA	0.15784	0.27165	0.27783	0.22862	****	80	576	261
V	0.15740	0.26014	0.32275	0.27221	0.07435	****	526	226
LU	0.19388	0.27479	0.29822	0.25363	0.31035	0.32621	****	318
I	0.12501	0.22969	0.25978	0.19122	0.23089	0.23457	0.18876	****

Abreviações das populações: O – Ortigueira/PR; C – Curiúva/PR; CP – Cornélio Procópio/PR; LO – Londrina/PR; LA – Lages/SC; V – Vargem/SC; LU – Lupionópolis/PR; I – Irati/PR.

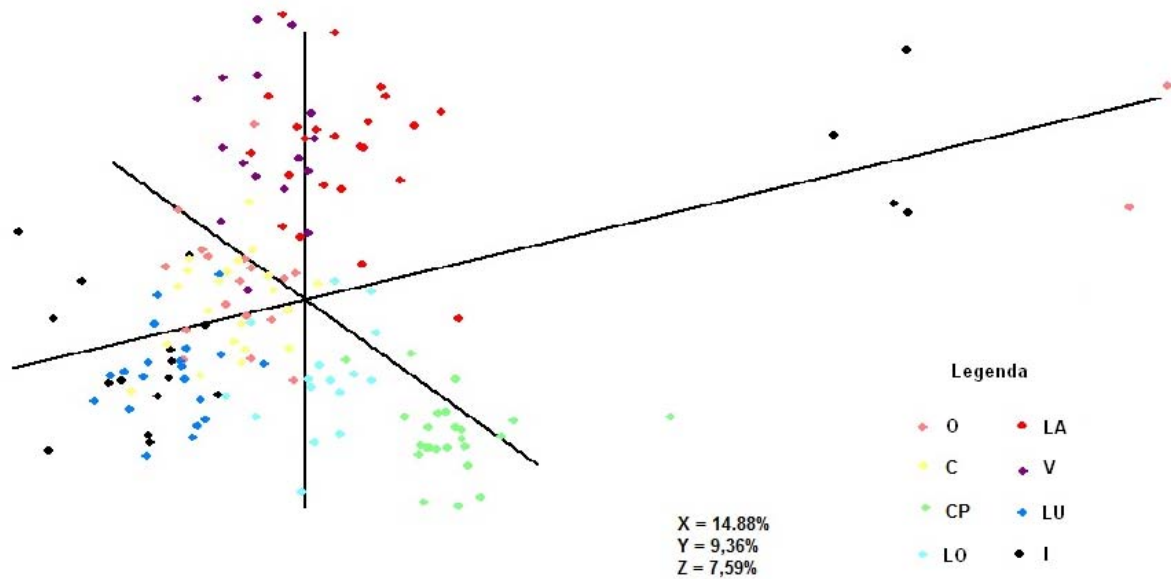
O Coeficiente de Correlação Linear de Pearson ($r = 0,459$) demonstrou uma correlação positiva moderada entre as distâncias genéticas do F_{ST} par-a-par e distâncias geográficas, sendo 21,07% das variações das distâncias genéticas correlacionadas à variação da distância geográfica, ficando 78,93% sem analogia (Figura 4).

Figura 4 – Diagrama de dispersão entre as distâncias genéticas e geográficas das oito populações de *Parapiptadenia rigida* analisadas.



A análise da Coordenada Principal demonstrou que a maioria das populações estudadas apresenta-se estruturada, enquanto algumas populações não apresentam estruturação genética clara (Figura 5).

Figura 5 - Análise da Coordenada Principal obtida a partir da matriz de distância genética de Nei de oito populações de *Parapiptadenia rigida* provenientes da região Sul do Brasil. Abreviações das populações: O – Ortigueira/PR; C – Curiúva/PR; CP – Cornélio Procópio/PR; LO – Londrina/PR; LA – Lages/SC; V – Vargem/SC; LU – Lupionópolis/PR; I – Irati/PR.



DISCUSSÃO

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *P. RIGIDA*

No presente estudo, cinco combinações de *primers* seletivos de AFLP geraram, em 159 indivíduos, 126 marcadores distribuídos em oito populações de *P. rigida* provenientes dos Estados de Santa Catarina e Paraná. O número médio de marcadores por combinação de *primers* seletivos de AFLP foi de 25,2, sendo que o coeficiente de variação para o número total de marcadores AFLP analisados foi de 7,47%, mostrando uma boa consistência dos dados.

Os resultados demonstraram uma alta diversidade genética intrapopulacional, sendo as médias de diversidade gênica 0,217, de locos polimórficos 60,45, e Índice de Shannon 0,322 (Tabela 3). Estudos sobre diversidade gênica em outras árvores tropicais demonstraram tanto valores mais altos, quanto mais baixos. Feyissa et al. (2007)

obtiveram uma média de diversidade genética (H_s) de 0,30 utilizando marcadores ISSR em *Hagenia abyssinica* (Rosaceae), Nybom (2004) encontrou um valor de 0,22 em um estudo de quatro espécies tropicais, e Torre et al. (2008) obteve um valor de 0,17 em estudos com a espécie *Cedrela odorata* utilizando marcadores AFLP. Esses estudos mostram que a diversidade gênica de *P. rigida* não foi seriamente afetada pelo processo de fragmentação que ocorreu no habitat da mesma, porém, este estudo mostra que em algumas populações de *P. rigida* encontrou-se valores de diversidade gênica mais baixos (0,171), como na população de Vargem – SC. Essa menor diversidade gênica encontrada deve-se ao fato dessa população apresentar uma quantidade de indivíduos bem menor do que outras populações amostradas, fato que fica claro ao observarmos o tamanho do fragmento na Tabela 1. Medri (2008), estudando uma espécie tropical (*Aegiphila sellowiana*), encontrou uma diversidade média de 0,10 em um estudo com nove populações ao longo da bacia do rio Tibagi. Esses resultados podem ser explicados pelo fato dos locais em que as populações de *A. sellowiana* foram coletadas terem sofrido maior perturbação antrópica devido ao processo de expansão da fronteira agrícola, afetando assim a diversidade gênica das populações ali existentes, e também devido à planta apresentar reprodução por propagação vegetativa, sendo mais um fator que contribui para a diminuição da variabilidade nessa espécie. *P. rigida*, apesar de ser uma planta monóica, apresenta auto-incompatibilidade (RIBAS, 1999) e propagação por sementes dispersas pelo vento, pela água ou por barocoria, sendo os grãos de pólen disseminados por abelhas de pequeno a médio porte (KAGEYAMA, 1992). Assim, o nível da diversidade genética em *P. rigida* pode ser considerado razoável quando comparamos com outras espécies tropicais. Também verificou-se que as populações contidas em fragmentos maiores, tais como as populações de Irati, Ortigueira e Lages, mostraram níveis de variabilidade genética semelhantes ou até maiores que o mostrado na literatura para outras espécies de árvores tropicais.

Torezan et al. (2005) utilizando marcadores RAPD para analisar a variação genética em amostras de *Aspidosperma polyneuron* de seis fragmentos florestais, encontraram um valor médio do Índice de Shannon de 0,39, e Damasceno et al. (2011), em um estudo com *Aspidosperma polyneuron*, obteve uma média de 0,51, sendo os valores superiores ao valor encontrado no presente estudo (0,32).

A porcentagem de locos polimórficos (média de 60,45%) foi menor que a encontrada por Tambarussi et al. (2008) estudando *Piptadenia gonoacantha* (74,74%), porém superior às das espécies *Aspidosperma polyneuron* (50%) (MALTEZ, 1997) e *Genipa americana* (50%) (SEBBENN, 1997).

Embora a espécie *P. rigida* tenha sofrido exploração e redução de sua área de distribuição devido à devastação de seu habitat e consequente fragmentação do mesmo, ela ainda mantém altas taxas de polimorfismo e diversidade gênica na maioria das populações analisadas, sugerindo que a perturbação seja devido a um processo recente de fragmentação, não havendo, portanto, diminuição significativa da diversidade gênica nas populações.

Em uma análise mais detalhada da Tabela 3 podemos verificar que as populações de Irati - PR e Ortigueira - PR mostraram valores superiores de locos polimórficos, diversidade gênica e Índice de Shannon-Wiener, o que pode ser devido ao fato dessas populações estarem distribuídas em uma área bem maior que as demais (Tabela 1). Já as populações de Curiúva - PR e Vargem - SC mostraram os menores valores em relação aos mesmos parâmetros, sendo que estas populações estão distribuídas em áreas bem mais restritas. Segundo Young (1996) a fragmentação de populações naturais pode acarretar limitações evolutivas às espécies que as compõem devido à perda da variabilidade genética. De acordo com Couvet (2002), tais alterações se refletem nos processos de deriva genética, fluxo gênico e seleção, os quais são processos determinantes do grau de diversidade genética da espécie. Estes fatos são claramente observados nas populações estudadas de *P. rigida*, onde as populações situadas em fragmentos menores mostraram um grau de variabilidade genética menor em relação àquelas que ocupam uma área bem maior, conforme observado nas Tabelas 1 e 3.

ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *P. RIGIDA*

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou que 72,20% da variabilidade genética está distribuída dentro das populações e 22,80% entre as mesmas. O valor de F_{ST} (0,22799) indica diferenciação genética moderada a alta entre as populações segundo Wright (1969), o que é característico de uma espécie arbórea alógama (HAMRICK et al., 1992). De acordo com Paiva (1998), estudos da variabilidade genética em populações naturais de plantas em regiões tropicais tem demonstrado que estas preservam grande variabilidade dentro das populações. Silva et al. (2010), realizando estudos com a mesma espécie utilizando marcadores RAPD, obteve um valor de F_{ST} de 0,0627 a partir de duas populações localizadas em áreas próximas, e Carvalho et al. (2008) obteve um valor de F_{ST} de 0,1039 em um estudo com duas populações de *Luehea divaricata* utilizando marcadores RAPD. O alto valor de variabilidade dentro de população em *P. rigida* pode ser atribuído ao fato da mesma ser uma espécie de sucessão secundária inicial, fato que concorda com os

estudos de Mariot (2000), que obteve um elevado valor de F_{st} (0,29) analisando quatro populações de *Piper cernuum*, cuja espécie possui um comportamento biológico semelhante ao de *Parapiptadenia rigida*.

Pode-se inferir que a fragmentação de algumas populações seja um evento recente, a qual ocasionou certa estruturação das populações, mas que ainda não resultou em perda de diversidade genética. A única exceção é a baixa diferenciação encontrada entre as populações de Lages e Vargem, ambas localizadas em SC, as quais apresentam um valor de F_{ST} de 0.07435. Embora esta análise tenha indicado uma menor divergência genética entre essas populações, os dados da análise da Coordenada Principal (Figura 5) revelam um pequeno número de indivíduos de Lages “presente” na população de Vargem e vice-versa. As populações fragmentadas divergiram e diferenciaram-se. Em virtude desta fragmentação, é provável que essas duas populações tenham divergido a menos tempo das demais, podendo indicar um sinal de, no passado, ter havido um fluxo gênico entre elas.

A correlação entre o F_{ST} par-a-par e distâncias geográficas mostrou que parte da variabilidade genética está correlacionada com as distâncias geográficas, isto é, no geral, as populações mais distantes apresentam uma maior diferença genética entre si do que as populações mais próximas.

A partir da análise da Coordenada Principal podemos inferir que as populações de *P. rigida* estão moderadamente estruturadas, com exceção das populações de Irati - PR e Ortigueira - PR, que não apresentam qualquer estruturação aparente. Também podemos inferir que população de Cornélio Procópio - PR é a que apresenta melhor estruturação e maior dissimilaridade em relação às demais, sugerindo que a fragmentação dessa população deve ter ocorrido há mais tempo, comparando com as demais.

CONCLUSÃO

A maioria das populações de *P. rigida* analisadas se encontra bem conservada conforme demonstram os elevados valores de porcentagem de locos polimórficos, diversidade genética intrapopulacional e heterozigosidade. As populações mais comprometidas em sua variabilidade genética são as populações de Vargem - SC e Curiúva - PR.

O nível de divergência entre as populações pode ser considerado alto, porém comum em espécies arbóreas de sucessão secundária primária, comprovando que o processo

de fragmentação que houve nas regiões de coleta da espécie é recente para que haja significativa diminuição da diversidade dessas populações.

Os resultados sugerem que as populações bem conservadas tem alto potencial para compor programas de conservação genética e, devido ao fato de apresentarem uma alta diversidade interpopulacional, há possibilidades de se realizar coletas de diferentes materiais genéticos nas diferentes populações.

REFERÊNCIAS

- AYRES, M. et. al. **BioEstat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, 2007. 324 p.
- BOTREL, M. C. G. et al. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, v. 30, n. 5, p. 821-827, 2006.
- BURKART, A. **Leguminosas mimosoideas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1979. 299 p.
- CARVALHO, M. C. C. G. et al. Flooding tolerance and genetic diversity in populations of *Luehea divaricata*. **Biologia Plantarum**, v. 4, p. 771-774, 2008.
- COELHO, A. S. G. **DBOOT**: Avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores, versão 1.1. Goiânia: Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2001.
- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 4, p. 2001-2014, 1996.
- COUVET, D. Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations. **Conservation Biology**, v. 16, n. 2, p. 369-376, 2002.
- DAMASCENO, J. O. et al. Genetic differentiation in *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae) over a short geographic distance as assessed by AFLP markers. **Genetics and Molecular Research**. No prelo 2011.
- DEAN, W. **A ferro e fogo**: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira. São Paulo: Companhia das Letras, 1996. 484 p.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Photochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J. C. B. **Recomposição de matas ciliares**. São Paulo: Instituto Florestal, 1990. 14 p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado do Paraná**. Brasília: EMBRAPA, 1986. 89 p.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 1, p. 47–50, 2005.

FAHRIG, L. Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. **Annual Review on Ecology and Systematics**, n. 34, p. 487-515, 2003.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on the extinction threshold: a synthesis. **Ecological Application**, n. 12, p. 346–353, 2002.

FEYISSA, T.; NYBOM, H.; BARTISH, I. V.; WELANDER, M. Analysis of genetic diversity in the endangered tropical tree species *Hagenia abyssinica* using ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p. 947–958, 2007.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1995-2000**. São Paulo: SOS Mata Atlântica/INPE/ISA, 2002. 156 p.

HAMRICK, J. L. et al. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New forests**, v. 6, n. 1-4. p. 95-124, 1992.

HEYWOOD, V. H.; STUART, S. N. Species extinctions in tropical forests. In: WHITMORE, T. C.; SAYER, J. A. (Eds.). **Tropical deforestation and species extinction**. New York: Chapman & Hall, p. 91-114, 1994.

KAGEYAMA, P. Y. Recomposição da vegetação com espécies arbóreas nativas em reservatórios de usinas hidrelétricas da CESP. **Série técnica IPEF**, v. 8, n. 25, p. 1-43, 1992.

LAURANCE, W. F. et al. Tropical forest fragmentation: synthesis of a diverse and dynamic discipline. In: LAURANCE, W. F.; BIERREGAARD, R. O. (Ed.). **Tropical forest remnants: Ecology, Management and Conservation of Fragmented Communities**. Chicago: University Press, 1997, p. 502-514.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002. 384 p.

MALTEZ, H. M. **Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. - Apocynaceae (peroba rosa) em uma floresta estacional semidecídua no estado de São Paulo**. 1997. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

MARIETTE, S. et al. Comparison of levels of genetic diversity detected with AFLP and microsatellite markers within and among mixed *Q. petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L. stands. **Silvae Genetica**, v. 51, p. 72-78, 2002.

MARIOT, A. **Distribuição da diversidade genética e aspecto da fenologia e dispersão de sementes de pariparoba (*Piper cernuum* Vell. - Piperaceae)**. 2000. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

- MEDRI, C. **Tolerância à Hipoxia: Aspectos morfoanatômicos de raiz, hipocótilo, caule e folha, ecofisiologia e variabilidade genética de *Aegiphila sellowiana* Cham. (Verbenaceae).** 2008. Tese (Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) – Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, 2008.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 845-853, 2000.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, p. 3321-3323, 1973.
- NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143–1155, 2004.
- PAIVA, J. R. **Melhoramento genético de espécies agroindustriais na Amazônia: estratégias e novas abordagens.** Brasília: Embrapa-SPI; Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 1998. 135 p.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 502-503, 1999.
- 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 Viçosa, Viçosa, 1999.
- SCHLUTER, P. M.; HARRIS, S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 569-572, 2006.
- SEBBENN, A. M. **Estrutura genética de subpopulações de *Genipa americana* L. (Rubiaceae) a partir de isoenzimas.** 1997. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- SILVA, D. C. G. et al. Evidence of ecotypic differentiation between populations of the tree species *Parapiptadenia rigida* due to flooding. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, p. 797-810, 2010.
- TAMBARUSSI, E. V. et al. Estrutura genética de populações de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. por meio de marcadores moleculares RAPD. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, n. 12, 2008.
- TOREZAN, J. M. D. et al. Genetic variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2, p. 171-180, 2005.
- TORRE, A.; LÓPEZ, C.; YGLESÍAS, E.; CORNELIUS, J. P. Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian Amazon. **Forest Ecology and Management**, v. 255, p. 334–339, 2008.

TURNER, I. M.; CORLETT, R. T. The conservaton value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. **Trees**, v. 11, n. 8, p. 330-333, 1996.

VACCARO, 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**, v. 9, n. 1, p. 1-18, 1999.

VOS, P. et al. A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WILSON, E. O. (Org.); FRANCES, M. P. **Biodiversidade**, 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997. 657 p.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations**. The Theory of Gene Frequencies. Chicago: University of Chicago Press. 1969. v. 2. 520 p.

YEH, F.; RONGCAI, Y.; BOYLE, T. **POPGENE 1.32**: A free program for the analysis of genetic variation among and within populations using co-dominant and dominant markers. Alberta: Department of Renewable Resources at the University of Alberta, 2000. 28 p.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYSINGHE, P. D.; TRIEST, L.; DE GREEF, B.; KOEDAMA, N.; HETTIARACHI, S. Genetic and geographic variation of the mangrove tree *Bruguiera* in Sri Lanka. **Aquatic Botany**, v. 67, p. 131-141, 2000.

ABRAHÃO, O. S. **Rastreabilidade de soja Roundup Ready[®] em produtos agrícolas e derivados**: produção de materiais de referência e uso de marcadores AFLP. 2008. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v. 132, p. 1131-1139, 1992.

ALMEIDA, C. M. A. **Diversidade genética em populações de *Aechmea fulgens* Brongn. (Bromeliaceae) em fragmentos de Mata Atlântica em Pernambuco**. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético de Plantas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 333-342, 2005.

AMORIM, D. S. **Fundamentos de sistemática filogenética**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2002. 154 p.

AMOS, W.; BALMFORD, A. When does conservation genetics matter? **Heredity**, v. 87, n. 3, p. 257-265, 2001.

ARROYO, M. T. K. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. In: POLHILL, R. M., RAVEN, P. H. (Eds.). **Advances in Legume Systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p. 723-769.

BARKER, J. S. F.; TAN, S. G.; MOORE, S. S.; MUKHERJEE, T. K.; MATHESON, J. J.; SELVARAJ, O. S. Genetic variation within and relationships among populations of Asian goats (*Capra hircus*). **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 118, p. 213-234, 2001.

BOTREL, M. C. G.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D.; PINTO, S. I. C.; MOURA, M. C. O.; ESTOPA, R. A. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, v. 30, n. 5, p. 821-827, 2006.

BOUZAT, J. L. The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. **Biological Conservation**, v. 99, p. 277-284, 2001.

BRACH, J.; PLOMION, C. A high density genetic map of maritime pine based on AFLP's. **Annals of Forest Science**, v. 5-6, p. 627-636, 2002.

BURKART, A. Leguminosas Mimosoideas. In: REITZ, P. R. (Ed.) **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1979. 299 p.

CÂNDIDO, J. F. Angico-vermelho. **Folha Florestal**, p. 1-5, 1974.

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

CENTRO DE REFERÊNCIA EM INFORMAÇÃO AMBIENTAL – CRIA. **Sistema de Informação Distribuído para Coleções Biológicas**. Disponível em: <<http://splink.cria.org.br/>>. Acesso em: mar 2010.

CHAGNE, D.; LALANNE, C.; MADUR, D.; KUMAR, S.; FRIGERIO, J. M.; KRIER, C.; DECROOCQ, S.; SAVOURE, A.; BOU-DAGHER-KHARRAT, M.; BERTOCCHI, E., et al. A high density genetic map of maritime pine based on AFLPs. **Annals of Forest Science**, v. 59, p. 627-636, 2002.

COATES, D. J.; ATKINS, K. A. Priority setting and the conservation of Western Australia's diverse and highly endemic flora. **Biological Conservation**, v. 97, p. 251-253, 2001.

COE, H. E.; NEUFFER, M. G.; HOISINGTON, D. A. The genetics of corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J. W. (Ed.). **Corn and corn improvement**. 3 ed. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, p. 81-237, 1998.

COLLINGE, S. K. Ecological consequences of habitat fragmentation: implications for landscape architecture and planning. **Landscape and Urban Planning**, v. 36, n. 1, p. 59-77, 1996.

- COSTA, P.; POT, D.; DUBOS, C.; FRIGERIO, J. M.; PIONNEAU, C.; BODENES, C.; BERTOCCHI, E.; CERVERA, M. T.; RMINGTON, D. L.; PLOMION, C. A genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 39-48, 2000.
- COUVET, D. Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations. **Conservation Biology**, v. 16, n. 2, p. 369-376, 2002.
- DÁRIO, F. R. **Influência de corredor florestal entre fragmentos da Mata Atlântica utilizando-se a avifauna como indicador ecológico**. 1999. 172 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1999.
- DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, v. 8, n. 10, p. 1585-1592, 1999.
- DEGEN, B.; CARON, H.; BANDO, E.; MAGGIA, L.; CHEVALLIER, M. H.; LEVEAU, A.; KREMER, A. Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analyzed by RAPDs. **Heredity**, v. 87, p. 497-507, 2001.
- DELAMÔNICA, P.; LAURENCE, W. F.; LAURANCE, S. G. A fragmentação da paisagem. In: OSWALD, G. M. **Florestas do Rio Negro**. São Paulo: Companhia das Letras, 2001. p. 283-301,
- DICK, C. W.; ETCHELECU, G.; AUSTERLITZ, F. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 3, p. 753-764, 2003.
- DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J. C. B. **Recomposição de matas ciliares**: orientações básicas. São Paulo: Instituto Florestal, 1990. 14 p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Zoneamento ecológico para plantios florestais no Estado do Paraná**. Brasília: EMBRAPA, 1986. 89 p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1996. 220 p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1998, 220 p.
- FLEISHMAN, E.; LAUNER, A. E.; SWITKY, K. R. et al. Rules and exceptions in conservation genetics: genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications of management planning. **Biological Conservation**, v. 98, p. 45-53, 2001.
- FORÉ, S. A.; HICKEY, R. J.; VANKAT, J. L.; GUTTMAN, S. J.; SCHAEFER, R. L. Genetic structure after forest fragmentation: a landscape ecology perspective on *Acer saccharum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, n. 8, p.1659-1668, 1992.
- FRANCO, I. J.; FONTANA, V. L. **Ervas & plantas**: a medicina dos simples. Erechim: Imprimax, 1997. 177 p.

FUCHS, E. J.; LOBO, J. A.; QUESADA, M. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology**, v. 17, n. 1, p. 149-157, 2003.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética e CNPq, 1997. 631 p.

GALVES, M. **Uma abordagem computacional para a determinação de polimorfismo de base única**. 2006, 189 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) – Instituto de Computação - UNICAMP, Campinas, 2006.

GARDNER, R. H.; MILNE, B. T.; TURNER, M. G.; O'NEILL, R. V. Neutral models for the analysis of broad-scale landscape pattern. **Landscape Ecology**, v. 1, n. 1, p. 19- 28, 1987.

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

GERBER, S.; MARIETTE, S.; STREIFF, R.; BODENES, C.; KREMER, A. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1037-1048, 2000.

GONZÁLEZ-ASTORGA, J.; NÚÑES-FARFÁN, J. Effect of habitat fragmentation on the genetic structure of the narrow endemic *Brongniartia vazquezii*. **Evolution Ecology Research**, v. 3, n. 7, p. 961-872, 2001.

GOTTLIEB, L. D. Electrophoretic evidence and plant populations. **Progress in Phytochemistry**, v. 7, p. 1-46, 1981.

GRANT, D.; SHOEMAKER, R. Molecular Hybridization. In: CAETANO-ANOLLÉS G.; GRESSHOFF, P. M. **DNA Markers: Protocols, applications and overviews**. New York: Wiley-Vch, p. 15-26, 1998.

GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M. A. Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, p. 715-740, 1999.

HADDAD, N. Corridor length and patch colonization by a butterfly, *Junonia coenia*. **Conservation Biology**, v. 14, n. 3, p. 738-754, 2000.

HENEIN, K.; MERRIAM, G. The elements of connectivity where corridors quality is variable. **Landscape Ecology**, v. 4, n. 2-3, p. 157-170, 1990.

HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular Systematics**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 665 p.

HOLSINGER, K. E.; GOTTLIEB, L. D. Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. (Eds). **Genetics and Conservation of Rare Plants**. Oxford: Oxford University Press, p. 195-223, 1991.

INSTITUTO DE PESQUISAS E ESTUDOS FLORESTAIS – INPE. **Identificação de Espécies Florestais**. Disponível em:

<<http://www.ipef.br/identificacao/nativas/detalhes.asp?codigo=13>>. Acesso em: 01 out. 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS; SOS MATA ATLANTICA. 2008. Disponível em: < <http://www.inpe.br/>>. Acesso em: 01 out. 2010.

JAGGI, C.; WIRTH, T.; BAUR, B. Genetic variability in subpopulations of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura Mountains: implications for a conservation strategy. **Biological Conservation**, v. 94, p. 69-77, 2000.

JASIENIUK, M.; MAXWELL, B. D. Plant diversity: new insights from molecular and genomics technologies. **Weed Science**, v. 49, p. 257-265, 2001.

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

KAGEYAMA, P. Y. Recomposição da vegetação com espécies arbóreas nativas em reservatórios de usinas hidrelétricas da CESP. **Série técnica IPEF**, v. 8, n. 25, p. 1-43, 1992.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: SIMPÓSIO DE ECOSSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3., 1993, Serra Negra. **Anais...** São Paulo: Academia de Ciências do Estado de São Paulo, 1993. p. 115-125.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBEN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, n. 64, p. 93-107, 2003.

KALA, C. P. Status and conservation of rare and endangered medicinal plants in the Indian trans-Himalaya. **Biological Conservation**, v. 93, p. 371-379, 2000.

KEIPER, F. J.; MCCONCHIE, R. An analysis of genetic variation in natural populations of *Sticherus flabellatus* [R. Br. (St. John)] usin amplified length fragment polymorfism (AFLP) markers. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 571-581, 2000.

KENRICH, J.; KNOX, R. B. Function of the polyad in reproduction of *Acacia*. **Annals of Botany**, v. 50, n. 5, p. 721-727, 1982.

KOPPITZ, H. Analisis of genetic diversity among selected populations of *Phragmites australis* world-wide. **Aquatic Botany**, v. 64, p. 209-221, 1999.

KÖRBES, C. V. **Manual de plantas medicinais**. 48. ed. Francisco Beltrão: Grafite, 1995. 188 p.

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

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

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. I. C. Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p. 56-60, 2002.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002. 384 p.

LOWE, A. J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C. F. E.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, v. 4, p. 255-273, 2005.

MACHTANS, C. S.; VILLARD, M. A.; HANNON, S. J. Use of riparian buffer strips as movements corridors by forest birds. **Conservation Biology**, v. 10, n. 5, p. 1366-1379, 1996.

MAMURIS, Z.; SFOUGARIS, A. I.; STAMATIS, C. Genetic structure Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. **Biological Conservation**, v. 101, p. 187-196, 2001.

MANUBENS, A.; LOBOS, S.; JADUE, Y.; TORO, M.; MESSINA, R.; LLADSER, M.; SEELLENFREUND, D. DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties (*Prunus persica*). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 3, p. 255-267, 1999.

MARTINEZ-CROVETTO, R. Esquema fitogeográfico de la provincia de Misiones (República Argentina). **Bonplandia**, v. 1, n. 3, p. 171-223, 1963.

MATOCQ, M. D.; VILLABLANCA, F. X. Low genetic diversity in endangered species: recent or historical pattern? **Biological Conservation**, v. 98, p. 61-68, 2001.

METZGER, J. P. Estrutura da paisagem e fragmentação: análise bibliográfica. **Anual da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 3-I, p. 445-463, 1999.

METZGER, J. P. Como restaurar a conectividade de paisagens fragmentadas? In: KAGEYAMA, P. Y.; OLIVEIRA, R. E.; MORAES, L. F. D.; ENGEL, V. L.; GANDARA, F. B. **Restauração ecológica de ecossistemas naturais**. Botucatu: FEPAF, 2003. p. 51-76.

MILACH, S. C. H. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 5, p. 14-17, 1998.

MITTERMEIER, R. A.; MYERS, N.; THOMSEN, J. B.; FONSECA, G. A. B.; OLIVIERI, S. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. **Conservation Biology**, v. 12, n. 3, p. 516-520, 1998.

MOSSI, A. J.; CANSIAN, R. L.; LEONTIEV-ORLOV, O.; CECHET, J. L.; CARVALHO, A. Z.; TONIAZZO, G.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic diversity and conservation of native populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 2, p. 447-453, 2009.

MOURA, E. F. **Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)**. 2003. 75 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

- MUELLNER, A. N.; TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.; BAEZA, C. M. Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochoeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). **Molecular Ecology**, v. 14, p. 203–212, 2005.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific Synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 115, p. 335-350, 1987.
- NIRENBERG, M.; MATTHAEI, J. H. Dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 47, p. 1588-1602, 1961.
- NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GILBERTSON, R. L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 85, p. 513-520, 1993.
- NOSS, R. F. Corridors in real landscape: a reply to Simberloff and Cox. **Conservation Biology**, v. 1, n. 2, p. 159-164, 1987.
- O'NEILL, R. V.; KRUMEL, J. R.; GARDNER, R. H.; SUGIHARA, G.; JACKSON, B.; DEANGELIS, D. L.; MILNE, B. T.; TURNER, M. G.; ZYGMUNT, B.; CHRISTENSEN, S. W.; DALE, V. H.; GRAHAM, R. L. Indices of landscape pattern. **Landscape Ecology**, v. 1, n. 3, p. 153-162, 1988a.
- O'NEILL, R. V.; MILNE, B. T.; TURNER, M. G.; GARDNER, R. H. Resource utilization scales and landscape pattern. **Landscape Ecology**, v. 2, n. 1, p. 63-69, 1988b.
- OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2006. 152 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP, Piracicaba, 2006.
- PASTEUR, N.; PASTEUR, G.; BONHOMME, F; CATALAN, J.; BRITTON-DAVIDIAN, J. **Practical isozyme genetics**. Chichster: Ellis Horwood, 1988. 215 p.
- PATERSON, A. H.; TANKSLEY, S. D.; SORRELS, M. E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, v. 46, p. 39-90, 1991.
- PITHER, R.; SHORE, J. S.; KELLMAN, M. Genetic diversity of tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. **Heredity**, v. 91, p. 307-313, 2003.
- RAINA, S. N.; RANI, V.; KOJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K. P.; DEVARUMATH, R. M. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. **Genome**, v. 44, p. 763-772, 2001.
- REITZ, R. Plantas medicinais de Santa Catarina. **Anais Botânico do Herbário Barbosa Rodrigues**, v. 2, n. 2, p. 71-116, 1950.
- 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 Viçosa, Viçosa, 1999.

RICK, C. M.; YODER, J. I. Classical and molecular genetics of tomato highlights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 281-300, 1988.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**: manual de dendrologia brasileira. São Paulo: Edgard Blucher, 1971.

RODRIGUES, R. J. **Da exploração à (co)operação internacional (alemã) para a Mata Atlântica**: o Subprograma PDA Mata Atlântica. 2008. 183p. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

RUAS, E. A. **Análise genética de espécies arbóreas de um remanescente da Mata Atlântica “Parque Estadual Mata dos Godoy” em Londrina-PR, por marcadores moleculares de AFLP e microssatélites**. 2009. 71 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

SAITBEKOVA, N.; GAILLARD, C.; OBEXER-RUFF, G.; DOLF, G. Genetic diversity in Swiss goats breeds based on microsatellite analysis. **Animal Genetics**, v. 30, p. 36-41, 1999.

SANGER, F. Croonian lecture, nucleotide-sequences in DNA. **Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 191, p. 317-333, 1975.

SANTOS, J. S. M. **Análise da paisagem de um corredor ecológico na Serra da Mantiqueira**. 2003. 174 f. Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) – INPE, São José dos Campos, 2003.

SCHULTZ, C. B.; CRONE, E. E. Patch size and connectivity threshold for butterfly habitat restoration. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 887-896, 2005.

SHARMA, I. K. Understanding clonal diversity patterns through allozyme polymorphism in and endangered and geographically restricted Australian shrub, *Zieria baeuerlenii*, and its implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 681-695, 2001.

SHARMA, I. K.; CLEMENTS, M. A.; JONES, D. L. Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 651-663, 2000.

SIMBERLOFF, D.; COX, J. Consequences and costs of conservation corridors. **Conservation Biology**, v. 1, n. 1, p. 63-71, 1987.

SIMBERLOFF, D.; FARR, J.; COX, J.; MEHLMAN, D. W. Movement corridors: conservation bargains or poor investments? **Conservation Biology**, v. 6, n. 4, p. 493-504, 1992.

SIQUEIRA, A. C. M. F.; NOGUEIRA, J. C. B. Essências brasileiras e sua conservação genética no Instituto Florestal de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, v. 4, n. 4, p. 1187, 1992.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS P. S. **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides, 1989. 268 p.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, p. 503-517, 1975.

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. 169 p.

SUN, M. Effects of population size, mating system, and evolutionary origin on genetic diversity in *Spiranthes sinensis* and *S. hongkongensis*. **Conservation Biology**, v. 10, n. 3, p. 785-795, 1996.

TABARELLI, M.; GASCON, C. Lições da pesquisa sobre fragmentação: aperfeiçoando políticas e diretrizes de manejo para a conservação da biodiversidade. **Megadiversidade**, v. 1, p. 181-188, 2005.

TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. **Isozymes in plant genetics and breeding**. New York: Part A Elsevier, 1983. 516 p.

TANSLEY, S. A.; BROWN, C. R. RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae): implications for their conservation. **Biological Conservation**, v. 95, p. 39-48, 2000.

TAUZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TISCHENDORF, L.; IRMLER, U.; HINGST, R. A simulation experiment on the potential of hedgerows as movement corridors for forest carabids. **Ecological Modelling**, v. 106, n. 2-3, p. 107-118, 1998.

TURNER, M. G. Landscape ecology: the effect of pattern on process. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, p. 171-197, 1989.

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

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids – a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.

WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 11, p. 1899-1909, 1999.

WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POWELL, W. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. **Proceedings of the National Academy Science of the United State of America**, v. 99, n. 4, p. 2038-2042, 2002.

WILLAMS, J. G. K.; KUBELICK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V.; DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful s genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

YOUNG, A. G.; MERRIAN, H. G.; WARWICK, S. I. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. **Heredity**, v. 71, n. 4, p. 277-289, 1993.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends Ecology Evolutionary**, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

ZHIVOTOVSKY, L. A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 907, 1999.