



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRÉ RICARDO OLIVEIRA CONSON

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *LUEHEA*
DIVARICATA MART. (MALVACEAE)**



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônomo do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ANDRÉ RICARDO OLIVEIRA CONSON

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *LUEHEA*
DIVARICATA MART. (MALVACEAE)**

ANDRÉ RICARDO OLIVEIRA CONSON

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *LUEHEA*
DIVARICATA MART. (MALVACEAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**
Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C755e Conson, André Ricardo Oliveira.
Estrutura genética em populações de *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae)
André Ricardo Oliveira Conson. – Londrina, 2012.
58 f. : il.

Orientador: Paulo Maurício 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, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Genética de populações – Teses. 2. Genética florestal – Teses. 3. Florestas –
Conservação – Teses. 4. Marcadores biológicos – Teses. 5. Malvacea – Teses. I.
Ruas, Paulo Maurício. 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

ANDRÉ RICARDO OLIVEIRA CONSON

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *LUEHEA*
DIVARICATA MART. (MALVACEAE)**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Cristiano Medri
UENP – Bandeirantes – PR

Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza
UEL – Londrina – PR

Profª. Dra. Fernanda Simões de Almeida (suplente)
UEL – Londrina – PR

Profª. Dra. Claudicéia Risso Pascotto (suplente)
UNIPAR – Maringá – PR

Londrina, 27 de fevereiro de 2012.

"É difícil se convencer de que se é feliz, assim como é fácil achar que sempre falta algo". (Cecília Meireles)

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Paulo Maurício Ruas, pela orientação, convivência e amizade

Ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela base sólida disponibilizada durante todo o período ao qual fui discente.

A CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

A CNPq e a Fundação Araucária, pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

A professora Dr^a. Claudete de Fátima Ruas e ao Dr. Eduardo Augusto Ruas, pela coorientação, amizade e companheirismo.

Aos membros da banca, professor Dr. Rogério Fernandes de Souza e professor Dr. Cristiano Medri, por fazerem parte desse passo importante em minha vida.

A Luana pela grande ajuda durante a análise estatística e pelos ensinamentos.

Ao Instituto Florestal de São Paulo pela possibilidade de realizar coletas na Estação Ecológica dos Caetetus e Estação Ecológica do Paranapanema.

Aos grandes amigos do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética de Plantas fundamentais nessa conquista. A Ana Paula, Diana, Marcos, Bruna, Thiago, Jéssica, Natália e Guilherme pelos grandes momentos compartilhados e pela ajuda na execução deste trabalho.

Aos funcionários do inter-laboratório, Dário e Melissa, pelos constantes auxílios.

A todos os amigos, sempre tão interessados em ajudar e compartilhar experiências, em especial André, Bruno, Rafael, Rafaela e Vitor.

A Luciana, pelo incentivo, ajuda, amizade e amor, especialmente por ser tão presente em minha vida neste e em outros momentos e situações, sendo sempre muito companheira e dedicada.

A minha mãe, Rose, e meu pai Luiz Carlos, pelo companheirismo e por apostarem, acreditarem e me incentivarem a buscar novas conquistas.

A todos que me ajudaram, e de alguma maneira me mostraram que em uma longa caminhada pode haver muitos obstáculos, mas ao fim tudo se mostrará como a minha fonte de sabedoria e aprendizado.

CONSON, André Ricardo Oliveira. **Estrutura Genética em populações de *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae):** 2010-2012. 58 f. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A Mata Atlântica é conhecida como um dos biomas brasileiros mais importantes devido a seu nível de endemismo. Novas espécies continuam a ser descritas neste bioma o qual é caracterizado por diferentes tipos vegetacionais, como a floresta ombrófila mista e a floresta estacional semidecidual, que apresentam características ambientais únicas. *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini (Malvaceae), é comumente encontrada neste bioma em áreas ripárias e solos rochosos. Esta espécie é frequentemente utilizada em programas de reflorestamento. Devido a sua importância foi usado nove pares de locos microssatélites para estudar a estrutura genética de nove populações desta espécie amostrada ao longo de sua área de distribuição. Este estudo mostrou um total de 50 alelos, com valores de heterozigosidade média observada (0,53) e heterozigosidade média esperada (0,67), revelando um déficit de heterozigotos para sete das nove populações. A maior parte da diversidade genética foi encontrada distribuída dentro das populações, e níveis moderados de diferenciação genética entre populações foram observados. Diferentes níveis de fluxo gênico entre as populações foram detectados. Nenhuma correlação entre dados de F_{ST} par a par e distância geográfica foram observados. Valores positivos e significativos de F_{IS} foram encontrados para sete populações, provavelmente resultante da intensa fragmentação de habitat e corte seletivo. A presença de diversos pares de locos em desequilíbrio de ligação confirma que estas populações sofreram perda de diversidade por deriva genética e depressão endogâmica. O teste de sinal para excesso de heterozigosidade demonstrou que um recente gargalo genético ocorreu nas populações fragmentadas. O dendrograma construído usando o método de coalescência revelou a formação de seis clusters os quais foram confirmados pela análise Bayesiana. Dessa forma, os resultados mostraram que são necessários programas de conservação e manejo das populações de *L. divaricata*, uma vez que esta espécie apresenta fragilidade genética em longo tempo.

Palavras chave: Desequilíbrio de ligação. Endocruzamento. Estrutura Genética. Fragmentação Florestal. Gargalo Genético. *Luehea Divaricata*. Microssatélites. Malvaceae

Conson, André Ricardo Oliveira. **Genetic structure in populations of *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae)**: 2010-2012. 58 p. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The Brazilian Atlantic forest is one of the most important Brazilian biomes due its high endemism level. New species are still described in this biome which is characterized by relevant different types of vegetation as the mixed ombrophilous and the semideciduous seasonal forests which have an unique environmental conditions. *Luehea divaricata* Martius et Zuccari (Malvaceae) is commonly found in this biome in riparian and rocky soils. This species is frequently used in reforestation programs. Due to its importance we used nine pairs of microsatellite loci to study the genetic structure of nine population of this species sampled along its distribution area. This study showed a total of 50 alleles and a mean observed heterozygosity of 0.53 and a mean expected heterozygosity of 0.67, revealing a heterozygosity deficit for seven of nine populations studied. Most part of genetic diversity was within populations and moderate levels of genetic differentiation between the populations were observed. Different levels of gene flow between the populations were detected. No correlation between pairwise F_{ST} and geographic distances were observed. Positive and significant values of F_{IS} were found for seven populations probably resulting from intense habitat degradation and a selective logging process. The presence of several pairs of loci in linkage disequilibrium confirms that these populations suffered loss of diversity by genetic drift and inbreeding depression. The signal test for excess of heterozygosity demonstrated that a recent genetic bottleneck occurred in the fragmented populations. The dendrogram constructed by the coalescent method revealed the formation of six clusters which were confirmed by the Bayesian analysis. Then, the results showed that it is necessary a conservation and management program for all populations of *L. divaricata*, once this species shows a genetic vulnerability in a long-term time.

Key words: Linkage disequilibrium. Inbreeding. Genetic structure. Forest fragmentation. Genetic bottleneck. *Luehea divaricata*. Microsatellites. Malvaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Luehea divaricata</i> : a) Indivíduo adulto; b) Flor; c) Sementes aladas; d) Folhas alternas dísticas	15
Figura 2	Localização das populações de <i>Luehea divaricata</i> estudadas	32
Figura 3	Dendrograma do agrupamento de nove populações de <i>Luehea divaricata</i> , conforme distância genética de Nei (1978). Número nos ramos representam <i>bootstrap</i> baseado em 1000 replicações	38
Figura 4	Gráfico dos valores logarítmicos da probabilidade média posterior (LnP(D)) por agrupamentos (K), gerado pelo programa Structure 2.3.3.	40
Figura 5	Estrutura genética de populações de <i>Luehea divaricata</i> inferido pela abordagem Bayesiana. O eixo y indica a porcentagem de associação estimada em cada um dos k clusters inferidos	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Localização, área do fragmento e formação florestal das populações coletadas	28
Tabela 2 - Informações sobre nove pares de <i>primers</i> microssatélites utilizados na amplificação em <i>Luehea divaricata</i> . T_A corresponde à temperatura de anelamento.....	30
Tabela 3 - Medidas de diversidade genética de nove locos microssatélites em nove populações de <i>Luehea divaricata</i> . N: número de indivíduos por população; A: número de alelos por loco; A_e : número de alelos efetivos por loco; H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; F_{IS} : coeficiente de endogamia calculado para todos os locos; SD: desvio padrão para A, A_e , H_o e H_e	32
Tabela 4 - Presença de desequilíbrio de ligação para nove locos de microssatélites em nove populações de <i>Luehea divaricata</i> , realizada pelo <i>software</i> Genepop 3.4.....	33
Tabela 5 - Análise de variância molecular (AMOVA) de nove populações de <i>Luehea divaricata</i> ; SQ: soma dos quadrados; F_{ST} : diferenciação genética.....	33
Tabela 6 - Distância geográfica, em km, entre as populações estudadas, acima da diagonal. Valores de F_{ST} entre pares de populações de <i>Luehea divaricata</i> , abaixo da diagonal. Todos os valores de F_{ST} foram significativos ($P < 0,05$, significância dada com 1023 permutações)	34
Tabela 7 - Distância genética de Nei (1972) entre as populações de <i>Luehea divaricata</i>	36
Tabela 8 - Médias das distribuições a posteriori das proporções de indivíduos não-migrantes e migrantes para as nove populações de <i>Luehea divaricata</i> , baseado no método de atribuição Bayesiana de Wilson e Rannala (2003) em BayesAss. Os migrantes são indicados pela população de origem e pelas taxas de migração. Todos os valores são significativos com intervalo de confiança de 95%.	36
Tabela 9 - Probabilidades a partir do teste de sinal de Wilcoxon para excesso de heterozigosidade usando Bottleneck 1.2.02	47

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE	14
2.2 MATA ATLÂNTICA.....	16
2.3 FRAGMENTAÇÃO	19
2.4 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES.....	20
2.5 MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 ARTIGO	25
REFERÊNCIAS	50

INTRODUÇÃO

A imensa diversidade encontrada em florestas tropicais, que representa mais de 60% de todas as espécies conhecidas no mundo (BRADSHAW et al., 2009), tem sido foco de vários estudos de estrutura de populações (MORAES et al., 1999; DICK et al., 2008; JIMÉNEZ et al., 2010; SHEPHERD et al., 2011). Dentre os principais biomas, a Mata Atlântica apresenta-se em destaque, uma vez que este é caracterizado por elevado nível de diversidade e endemismo (MYERS et al., 2000). O estudo da estrutura de populações proporciona, principalmente, visões a respeito da conservação e restauração de paisagens fragmentadas, de forma a tentar minimizar os efeitos de um crescimento econômico acelerado, como que ocorre especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil.

A Mata Atlântica, que originalmente se estendia por toda a costa atlântica brasileira, cobrindo cerca de 150 milhões de hectares (RIBEIRO et al., 2009), apresenta um histórico de ocupação e desmatamento para o cultivo de lavouras e pastagens, bem como o comércio madeireiro e expansão urbana, que resultaram em redução da diversidade genética de diversas espécies (FONSECA, 1985). Estima-se que apenas 11,7% da vegetação original do bioma Mata Atlântica seja encontrada hoje (RIBEIRO et al., 2009), a maior parte, representada por pequenos fragmentos remanescentes de domínio privado, com menos de 100 hectares, e que são submetidos a diferentes tipos de pressões (RANTA et al., 1998).

A descontinuidade da vegetação resultante da fragmentação de habitats leva à ruptura do fluxo gênico entre populações, tornando-as parcial ou totalmente isoladas, com conseqüente perda da diversidade genética, por meio da depressão endogâmica e deriva genética, tornando-se uma limitação evolutiva (BARRETT; KOHN, 1991). Avaliar os efeitos que a fragmentação do habitat exerce sobre a diversidade e estrutura genética das espécies animais e vegetais é fundamental para que medidas efetivas de conservação sejam tomadas (FRANKHAM, 2008).

Luehea divaricata Martius et Zuccarini (Malvaceae), é uma espécie arbórea com ampla distribuição no bioma Mata Atlântica, comumente chamada de Açõita-cavalo. Esta é uma espécie heliófita, frequente ao longo de rios, terrenos rochosos e íngremes, onde a floresta é mais aberta, bem como nas formações secundárias (LORENZI, 2002). Ameaçada, esta espécie é frequentemente utilizada em programas de reflorestamento de áreas tropicais ciliares no Brasil, apresentando rápido crescimento e dispersão anemocórica. Sua casca é usada na medicina popular e sua madeira empregada na confecção de móveis (BIGHETTI et al., 2004). Apesar da sua grande importância social, econômica e ambiental, do intenso

processo de fragmentação de suas populações devido ao desmatamento, da expansão das fronteiras agrícolas e pecuárias, e do crescimento urbano no entorno da Mata Atlântica, nenhum estudo foi realizado até o momento com o objetivo de abordar, em que proporção a diversidade genética dessa espécie foi atingida.

Dentre as técnicas de biologia molecular mais difundidas nas pesquisas científicas, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se tornou consolidada para o acesso direto à diversidade genética, tanto dentro quanto entre populações, por meio de marcadores moleculares como os microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeat*), os quais são distribuídos por todo o genoma dos eucariotos, sendo bastante utilizados por serem altamente informativos (ELLEGREN, 2004).

Devido ao fato de populações naturais estarem sofrendo uma intensa perda de diversidade resultante do processo de fragmentação, se faz necessário avaliar o nível de diversidade genética entre e dentro de populações de *L. divaricata* situadas em toda a sua área de distribuição, bem como estimar se há a ocorrência de fluxo gênico recente entre populações. O conhecimento de informações referentes à diversidade e estrutura genética em populações pode ser útil para avaliar se o intenso desmatamento que ocorreu no Bioma Mata Atlântica afetou o nível de diversidade genética de *L. divaricata*, e assim, poder determinar medidas reparadoras para a conservação da espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

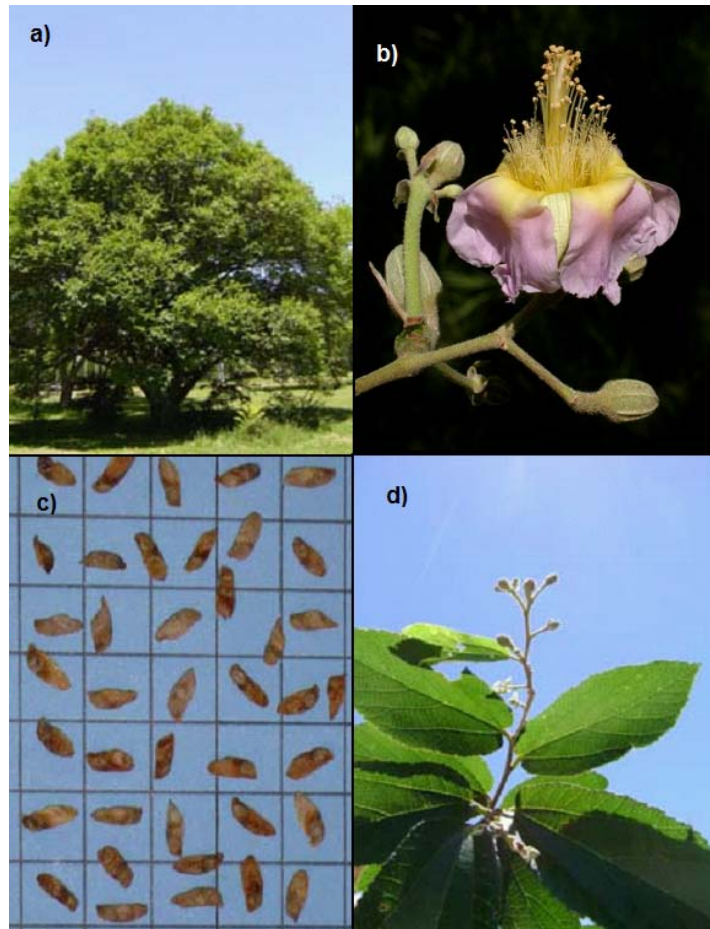
2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

Luehea divaricata Martius et Zuccarini (Figura 1), popularmente conhecida como Açoita-cavalo devido à flexibilidade dos galhos e do seu uso como chicote em animais, é uma espécie arbórea, com distribuição na Mata Atlântica, nas formações vegetacionais de floresta ombrófila mista, floresta estacional decidual, floresta estacional semidecidual, savana, savana estépica e nas áreas de tensão ecológica (FARIAS, 2006). Esta é encontrada principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo também observada em países como Argentina, Uruguai e Paraguai (CARVALHO, 2003).

Pertencente a família Malvaceae (APG II, 2003), a espécie é descrita como decídua, heliófita, seletiva higrófito, característica das florestas aluviais (matas ciliares e de galeria). Apresenta dispersão irregular e descontínua, com ocorrência ao longo de rios, terrenos rochosos e íngremes, onde a floresta é mais aberta, bem como nas formações secundárias (LORENZI, 2002). *L. divaricata* é comumente encontrada nas matas semidevastadas, nas capoeiras e capoeirões (REITZ et al., 1988), com os maiores indivíduos atingindo 20 a 25 metros de altura e um diâmetro do caule de 50 a 80 cm à altura do peito (CECONI et al, 2006). Na literatura, *L. divaricata* é classificada por Lorenzi (2002) como uma espécie pioneira, entretanto, Carvalho (2008) cita que esta é uma espécie secundária inicial a secundária tardia, ou climática exigente de luz.

A espécie apresenta rápido crescimento com ramificação irregular e larga da copa (LORENZI, 2002), possui folhas simples, irregularmente serrilhadas, com três nervuras típicas quase glabras na face superior e densamente pubescentes e de cor esbranquiçadas na face inferior. Possui flores hermafroditas, com vistosas pétalas róseas, roxas ou raramente brancas, chegando a medir 2,5 cm de comprimento sendo polinizadas principalmente por abelhas, como *Apis mellifera*, e beija-flores (BACKES; IRGANG, 2002). Seu fruto é uma cápsula lobada de valvas lenhosas, oblonga, pentalocular, de coloração castanha, com densa pilosidade ferrugínea cobrindo inteiramente o tegumento e o pedicelo do fruto, abrindo-se em cinco fendas e com suas sementes dispersas pelo vento com auxílio de alas agudas. (CARVALHO, 2008).

Figura 1 - *Luehea divaricata*: a) Indivíduo adulto; b) Flor; c) Sementes aladas; d) Folhas alternas dísticas.



Fonte: a) Scipioni (2011); b) Bonifacino (2006); c) Lorenzi (2002); d) Scipioni (2011).

Estudos recentes indicam que populações ripárias de *L. divaricata* são bem adaptadas a ambientes que sofrem alagamento (CARVALHO et al., 2008). Devido a essas e outras características ecológicas, diversos programas de reflorestamento de florestas ciliares tropicais no Brasil que visam a conservação e restauração dos ecossistemas, utilizam *L. divaricata* (SALVADOR, 1986; CASTANHO, 2009).

A madeira é moderadamente pesada e extremamente flexível, propiciando bom acabamento. Assim, *L. divaricata* é bastante visada para fins comerciais como na confecção de móveis, construção civil, molduras, rodapés e guarnições (CARVALHO, 2008). Além disso, diversos constituintes químicos, tais como taninos e monoterpenos, são encontrados em *L. divaricata*, tanto em sua casca como no caule (LORENZI, 2002). Segundo a medicina popular, a partir da casca de *L. divaricata* se obtêm um extrato bruto que é usado como antirreumático e antiinflamatório (BIGHETTI et al., 2004), no tratamento contra bronquite e laringite (SOUZA et al., 2005), além de apresentar atividade antifúngica,

antibacteriana e antiproliferativa (TANAKA et al., 2005). Dessa forma, *L. divaricata* apresenta diversas características que a tornam importante tanto em um contexto ambiental como econômico e social.

2.2 MATA ATLÂNTICA

Atividades econômicas diversas implicaram em severa fragmentação de diversos biomas no mundo, dentre os mais ameaçados, encontra-se a Mata Atlântica (TEIXEIRA et al., 2009). Originalmente, este era distribuído ao longo de mais de 23° de latitude, abrangendo regiões tropicais e subtropicais (RODRIGUES et al., 2009) ao longo de 4 mil km da costa Atlântica do Brasil (RANTA et al., 1998).

Com uma área aproximada de 150 milhões de hectares (RIBEIRO et al., 2009), a Mata Atlântica é reconhecida como um dos ambientes com maior nível de endemismo no mundo (CARNAVAL et al., 2009), sendo que tamanha diversidade de espécies, aliado ao grau de endemismo elevado, que pode atingir 95% em alguns grupos (MORELLATO; HADDAD, 2000), levou Myers (2000) a classificar a Mata Atlântica como um *hotspot*, ou seja, local de alta prioridade de conservação.

Diversos fatores contribuem para a ocorrência de alta diversidade biológica na Mata Atlântica. Estudos apontam que tamanha diversidade e endemismo é resultado da grande heterogeneidade de habitats, proveniente de gradientes de altitude, gradientes de latitude, proximidade da costa, relevo, tipos de solo e regimes pluviométricos (IESB, 2007) aliado ao fato de populações terem migrado para a Mata Atlântica durante a última glaciação máxima no Quaternário (CARNAVAL et al., 2009).

Estima-se que a Mata Atlântica abrigue um número recorde de espécies arbóreas por hectare (cerca de 450 espécies no sul da Bahia), com cerca de 20 mil espécies vegetais, sendo oito mil endêmicas. A fauna é caracterizada por aproximadamente 250 espécies de mamíferos (55 endêmicas), 340 anfíbios (87 endêmicos), 197 répteis (60 endêmicos), 1023 aves (188 endêmicas) e 350 espécies de peixes (133 endêmicos), sem falar da extraordinária abundância e riqueza de invertebrados (VARJABEDIAN, 2010). Tamanha diversidade é evidenciada em diversos estudos que continuam a descrever novas espécies e mesmo gêneros de vertebrados, revelando o conhecimento incompleto da comunidade científica sobre a diversidade na Floresta Atlântica (PERCEQUILLO et al., 2011).

O bioma é composto por diversas fitofisionomias, estabelecidas pelo Mapa de Vegetação do Brasil (IBGE, 1988), que considera como parte do bioma, todas as

formações florestais e ecossistemas associados inseridos no domínio Mata Atlântica. Dessa forma, esse bioma é composto por floresta ombrófila densa, floresta ombrófila mista, ombrófila aberta, estacional semidecidual, estacional decidual, manguezais, restingas, campos de altitude, brejos interioranos, encaves de savana e savana estépica. Diversos nomes podem ser relacionados à Mata Atlântica (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000) tais como, Floresta de Araucária (BEHLING, 1997), Floresta Atlântica de Encosta (TABARELLI; MANTOVANI, 1999) e Floresta Pluvial Atlântica (OLIVEIRA et al., 2001).

A floresta ombrófila densa, representada por vegetação associada a um clima quente, e com elevados regimes pluviométrico, apresenta uma vegetação diversificada e exuberante, devido à constante umidade vinda do oceano (CÂMARA, 2005). Esta ocupa a maior área geográfica, quando comparada com a floresta ombrófila mista e a floresta ombrófila aberta, estando presente em toda a faixa litorânea, desde o Rio Grande do Norte até o Rio Grande do Sul. A floresta ombrófila mista, conhecida por apresentar chuvas regulares e estações climáticas bem definidas, foi extremamente devastada, restando poucos remanescentes nas serras do Mar e da Mantiqueira e no Planalto Meridional. A floresta ombrófila aberta representa uma área de transição da Floresta Atlântica, uma vez que possui menor fitomassa vegetal, em comparação com a floresta ombrófila densa. Esta apresenta distribuição mais restrita, com ocorrência na faixa litorânea da Paraíba, Pernambuco e Alagoas, no nordeste/leste de Minas Gerais e centro sul do Espírito Santo (IESB, 2007).

As florestas estacionais decíduas e semidecíduas estão localizadas no interior, a oeste das florestas ombrófilas densas ou mistas. Elas são compostas por árvores perenifólias e caducifólias com características bastante variáveis. As florestas estacionais que se distribuíam do Rio Grande do Sul a Minas Gerais foram quase completamente eliminadas, restando poucos fragmentos conservados, o que dificulta o entendimento da composição florística primitiva (CÂMARA, 2005).

As restingas, manguezais e formações herbáceas hidromórficas, ocorrem cobrindo litologias quaternárias ao longo de todo o litoral e nos vales fluviais de maior porte, representando as formações pioneiras. Os campos de altitude cobrem montanhas como a Serra de Itatiaia, Serra do Caparaó e Serra do Bocaina e, os encaves aparecem em toda a extensão do bioma (IESB, 2007)

A história de ocupação humana no planeta sempre esteve atrelada às regiões litorâneas, podendo ser observada ainda hoje, uma vez que cerca de 3,3 bilhões de pessoas vivem e trabalham em um raio de 193 km da costa litorânea, ocupando 10% da massa de terra no planeta (CHIRAS, 2010). A Mata Atlântica não tem história diferente, além do que esse

bioma está relacionado com as maiores extensões de solos férteis do país (RODRIGUES et al., 2009), sendo ocupada por 70% da população brasileira (VARJABEDIAN, 2010) em mais de 3 mil cidades (MORELLATO; HADDAD, 2000), sendo responsável por 70% do PIB nacional (RODRIGUES et al., 2009).

Antes mesmo da chegada dos colonizadores europeus, essa região já sofria com a ação antrópica, uma vez que os índios, especialmente os povos Tupi, realizavam o plantio de mandioca, milho, batata doce e outras lavouras por meio do corte e queima da floresta (ROCHA, 2005). Entretanto, o grande avanço na história de exploração da Mata Atlântica está relacionado com os ciclos econômicos ao qual o Brasil vivenciou a partir do período colonial, iniciando com a extração de Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*) no século XVI, sendo sucedida pela cana-de-açúcar no século XVIII e por pastagens, cultivo de café e monoculturas arbóreas, a partir do século XIX (TEIXEIRA et. al., 2009; BACHA; BARROS, 2004).

A expansão de monoculturas tem gerado debates entre empresários e ambientalistas onde, a perda de biodiversidade é justificada pelos empreendedores via benefícios econômicos e sociais obtidos (FONSECA et al., 2009). Por outro lado, é questionada por ambientalistas devido à ameaça ao patrimônio cultural e biológico resultante da expansão das monoculturas sobre ou ao redor dos parques remanescentes da Mata Atlântica (ROCHA, 2005).

Dessa forma, é natural, devido ao processo de perda de habitat, supor que muitas populações pequenas tenham sofrido perda de diversidade genética por meio da deriva genética (FUTUYMA, 2005) e que muitas outras tenham sido extintas antes mesmo de serem descritas (MORELLATO; HADDAD, 2000). Nesse sentido, mais investimentos em pesquisa necessitam ser realizados de forma a entender quais espécies existem, onde elas vivem e quais são os elementos críticos necessários para sua sobrevivência no ambiente natural (VARJABEDIAN, 2010 apud WILSON, 1994). Além disso, o desmatamento na região da Mata Atlântica pode levar à extinção de espécies endêmicas e, com isso, resultar na perda da história dos processos evolutivos que levaram a formação de tamanho endemismo, o que também limita o estabelecimento de medidas efetivas de conservação (CARNAVAL et al., 2009).

2.3 FRAGMENTAÇÃO

Em meio a poucas florestas tropicais intactas no mundo (RANTA et al., 1998), surge a necessidade de preservar unidades de paisagens, inicialmente contínuas, que sofreram algum tipo de ruptura. Mesmo os fragmentos pequenos têm sido analisados por diversos autores, que citam a importância da conexão entre eles para se assegurar o estabelecimento de “corredores” de vegetação, que permitam a fauna se movimentar de um fragmento para outro, e também uma maneira de se tentar minimizar problemas como o efeito de borda (MORELLATO; HADDAD, 2000).

Embora a fragmentação ocorra em todo o planeta, as florestas tropicais em especial, são as que mais têm sido atingidas (RANTA et al., 1998 apud SKOLE; TOCKER, 1993). Entre 1915 e 1960, o Brasil exportou mais de 18 milhões de m³ de madeira, a maior parte oriunda da Mata Atlântica (FONSECA et al., 2009 apud KOCH; CORRÊA, 2002). Dessa forma, a esplendorosa floresta observada por Charles Darwin em 1836 durante sua viagem a bordo do Beagle (POR, 1992) é resumida hoje em aproximadamente 245 mil fragmentos (RIBEIRO et al., 2009).

A fragmentação em florestas tropicais tem causado efeitos severos nas populações por meio de mudanças em diversos processos ecológicos, tais como a polinização (RANTA et al., 1998). Tais aspectos podem acarretar alterações nas comunidades biológicas, não apenas pela ação direta de cada um deles ou da sua interação, mas também por efeitos indiretos, também conhecidos como efeitos em cascata, através dos quais um grupo biológico afeta outro, gerando uma dinâmica diferente daquela prevista para sistemas florestais contínuos, sendo algumas espécies mais afetadas do que outras por meio da estocasticidade demográfica da deriva genética (DICK et al., 2008). Em último aspecto, essas alterações podem acarretar, como consequência mais grave, na extinção local de uma população (FRANKHAM, 2008).

Aspectos como tamanho do fragmento, e distância entre eles são fatores importantes nas análises de estrutura populacional, sendo que, a distância entre os fragmentos e a densidade da matriz estão relacionados com a possibilidade de colonização de espécies e, conseqüentemente, a troca de genes entre populações (RANTA et al., 1998). Esses fatores levariam a um aumento da diversidade genética em uma população isolada e a um aumento do valor adaptativo da mesma (FUTUYMA, 2005). Assim, estratégias de conservação como o estabelecimento de corredores ecológicos, visando garantir algum nível de conectividade entre os fragmentos têm sido frequentemente utilizadas. Exemplo disso é a implantação, por

parte do Ministério do Meio Ambiente, do corredor central da Mata Atlântica, que ocorre do estado do Espírito Santo até o sul da Bahia (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005).

2.4 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

A diversidade genética pode ser representada por sequências de nucleotídeos ligeiramente diferentes nos locos de uma molécula de DNA. Por sua vez, variantes da sequência do DNA podem ser expressas em diferenças na sequência de aminoácidos da proteína codificada pelos locos. Tal variação na proteína pode ocasionar diferenças em funções bioquímicas, morfológicas ou comportamentais que causam diferenças nas taxas reprodutivas, de sobrevivência ou no comportamento dos indivíduos (FRANKHAM, 2008).

Uma das formas de se caracterizar a diversidade foi proposta por Nei (1973), o qual descreve que a diversidade está relacionada com o nível de heteroziguidade de uma população, obtido a partir das frequências alélicas desta, e que equivale ao valor de heterozigotos esperados em uma população grande e naturalmente exogâmica.

O estudo da diversidade genética em populações visa descrever a variação genética existente dentro e entre populações. O conhecimento da diversidade genética inerente a determinada espécie e de sua distribuição dentro e entre populações é imprescindível aos estudos que apresentam como objetivo a manutenção, recuperação e manejo de populações vegetais, pois esta determina o potencial adaptativo das populações e espécies, o que representa um componente essencial à estabilidade dos ecossistemas (HAMRICK, 1983).

A distribuição da diversidade genética entre e dentro de populações naturais é descrita como estrutura genética (BROWN, 1978), e é resultado da ação de forças evolutivas como mutação, seleção natural, deriva genética e migração, podendo ser estimada pelas estatísticas F de Wright. Segundo Hamrick (1983), fatores importantes para o desenvolvimento e manutenção da estrutura genética são: tamanho efetivo da população, distribuição geográfica e ciclo de vida.

Um importante mecanismo que afeta a distribuição da diversidade genética é o fluxo gênico, ou dispersão de pólen e sementes, o qual está intimamente relacionado com o sistema reprodutivo da espécie. Este pode ser inferido a partir das frequências alélicas ou medidas de diferenças genéticas intra e interpopulacionais (SILVERTOWN; DOUST, 1993). O fluxo gênico é um dos mecanismos responsáveis pela introdução de variação genética na população receptora (WRIGHT, 1931). Este permite a homogeneização das frequências alélicas em contraste aos efeitos da deriva genética.

A deriva genética é, por definição, um evento estocástico, que ocorre devido ao fato de apenas uma fração de todos os possíveis zigotos que poderiam ser formados durante o processo de fecundação, se tornarem adultos sexualmente maduros. A deriva genética, dessa forma, pode levar à substituição de alelos independente de seus valores adaptativos. As populações estão sujeitas a maiores efeitos da deriva genética quanto menor o tamanho efetivo da população, ou seja, quanto menor o número de indivíduos da espécie que contribuirão para a composição genotípica da próxima geração (FUTUYMA, 1992).

Em populações com tamanho efetivo pequeno, a reprodução entre indivíduos aparentados (endogamia) é inevitável e, com o tempo, todos os indivíduos tornam-se relacionados de tal maneira que, cruzamentos entre indivíduos não relacionados tornam-se impossíveis (FRANKHAM, 2008). Os cruzamentos sob estas condições produzem uma tendência à fixação de certos alelos, pois apenas uma amostra da população estará trocando alelos ao acaso, o que leva ao aumento na frequência de homozigotos e redução da proporção total de heterozigotos na população (WRIGHT, 1931). Alterações nas frequências alélicas e nos valores de heterozigosidade são possíveis em populações de baixa diversidade genética e elevados níveis de endogamia, devido ao fenômeno conhecido por depressão endogâmica (FUTUYMA, 1992).

Outro fator de grande importância, que afeta a variação genética e sua distribuição entre e dentro de populações é o sistema de acasalamento da espécie. O sistema de acasalamento determina o modo de transmissão dos genes de uma geração para outra, o qual pode ser por autofecundação, fecundação cruzada ou misto. Dois processos ecológicos que afetam diretamente o sistema reprodutivo em plantas são a dispersão de pólen e sementes (CORLETT; TURNER, 1997), sendo que em espécies que realizam a fecundação cruzada (alogamia), a reprodução sexual possui maior potencial de rearranjo da diversidade genética, gerando, assim, infinitas combinações (KARASAWA 2005 apud RICHARDS, 1997). Estas servem de substrato para os fatores evolutivos (KARASAWA 2005 apud BROWN, 1990), determinando a capacidade de sobrevivência das espécies ao longo das gerações (KARASAWA 2005 apud CROW; KIMURA, 1965).

A fragmentação de áreas florestais causa uma diminuição nos tamanhos populacionais, podendo resultar na perda imediata de alelos (YOUNG et al., 1996). A sobrevivência e manutenção de populações fragmentadas de espécies arbóreas dependerão da definição de estratégias adequadas de manejo dos remanescentes florestais. Para que essas estratégias sejam efetivas, é fundamental, primeiramente, entender e quantificar os principais efeitos populacionais e genéticos da fragmentação (MARTINS, 2008).

2.5 MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES

Até a década de 1980, estudos sobre estrutura genética de populações eram conduzidos utilizando-se apenas marcadores isoenzimáticos, o qual já trazia grandes vantagens sobre marcadores morfológicos como, por exemplo, o maior nível de polimorfismo encontrado. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos, altamente polimórficos, envolvendo a molécula de DNA, para a realização de estudos genéticos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Dentre a vasta quantidade de técnicas moleculares, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se tornou consolidada, sendo que a determinação de qual tipo de marcador é o mais adequado aos estudos que visam a conservação genética representa um ponto crucial no estudo em populações naturais. Dentre os marcadores moleculares mais populares que envolvem a PCR, destacam-se o RAPD, (*Random-amplified Polymorphic DNA*), que se utiliza de um único *primer* de sequência arbitrária que amplifica fragmentos de DNA ao acaso; o AFLP, (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), que se utiliza de enzimas de restrição, como *EcoRI* e *MseI*, e da ligação de adaptadores para gerar fragmentos de diferentes tamanhos; e os Microssatélites, ou SSR (*Single Sequence Repeats*), que são pequenas sequências repetidas de nucleotídeos espalhadas por todo o genoma (JONES et al., 1997).

As regiões contendo os SSR são amplificadas individualmente via PCR utilizando-se um par de *primers* específicos complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. O marcador microssatélite possui expressão codominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Os microssatélites são poderosos marcadores moleculares, neutros em relação a efeitos fenotípicos, e apresentando comportamento mendeliano. Os microssatélites consistem de trechos de DNA de unidades mono, di, tri, tetra ou pentanucleotídica repetidas em *tandem*, dispersos por todo o genoma eucarioto (MOREIRA, 2006 apud HAMADA et al., 1982). As variações destas sequências repetidas formam locos genéticos altamente polimórficos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Há inúmeros relatos sugerindo a utilidade de marcadores microssatélites para a medição da diversidade genética (ARIF. et al., 2010 apud RYBERG et al., 2002; LI et al., 2007; KAWKA et al., 2007; CHAN et al., 2008; BANHOS et al., 2008).

A alta taxa de mutações encontrada nas regiões de microssatélites ocorre devido à alta incidência do “deslizamento” (*slippage*) da enzima DNA polimerase durante a replicação e também é originado a partir do *crossing-over* desigual, como foi demonstrado *in vitro* (MOREIRA, 2006 apud SCHLOTTERER; TAUTZ, 1992), resultando em locos multialélicos devido ao número variável de repetições. Para tentar explicar a evolução dos marcadores microssatélites, modelos mutacionais foram criados, dentre os quais o *Stepwise Mutation Model* (SMM), que assume que a evolução dos microssatélites ocorre por eventos simples “passo a passo”, o *Infinite-Allele Model* (IAM), que assume a evolução dos marcadores sempre de forma a gerar perfis moleculares distintos dos existentes, e o *Two-Phase Model* (TPM), que se trata de um modelo intermediário entre os dois primeiros (SAINUDIIN, et al., 2004)

O conteúdo informático de um loco SSR é bastante alto, justamente por se tratar de sequências de alta taxa evolutiva. Quanto à acessibilidade, apresentam limitações no que se refere ao custo final de obtenção de *primers* informativos que serão utilizados na reação da PCR para amplificar alelos de cada loco. No entanto, uma vez obtidos para uma espécie, os custos e a demanda de mão-de-obra são reduzidos drasticamente e, os ensaios laboratoriais são rápidos, aumentando a acessibilidade da técnica (MOREIRA, 2006 apud BUSO, 1998). Outra vantagem da técnica se refere à conservação de sítios de microssatélites entre espécies relacionadas. É possível, portanto, aproveitar *primers*, denominados heterólogos, que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los nas demais espécies do gênero (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar, por meio dos marcadores microssatélites, o nível de diversidade genética dentro e entre nove populações de *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) de forma a investigar os efeitos da fragmentação ocorrida na área de distribuição da espécie.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a diversidade de alelos presentes em nove locos de microssatélites em *L. divaricata* (Malvaceae) nas diferentes populações amostradas;
- Verificar se há ocorrência de fluxo gênico entre indivíduos de diferentes fragmentos;
- Identificar a existência de equilíbrio de ligação dentro de cada população e se há indícios de ocorrência de efeito de gargalo genético;
- Verificar se ocorre correlação entre as distâncias genéticas e geográficas;
- Verificar se um efeito de gargalo genético com ocorrência recente foi evidenciado por um excesso de heterozigosidade nas diferentes populações estudadas;

4 ARTIGO

Estrutura Genética de populações de *Luehea divaricata* (Malvaceae)

* Este artigo será submetido à revista American Journal of Botany

Conson et al. – Estrutura Genética em *Luehea divaricata*

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Luehea divaricata*
(MALVACEAE)¹**

ANDRÉ R. O. CONSON², BRUNA G. VIEIRA², LUANA A. RODRIGUES³, EDUARDO A. RUAS², BRUNO F. COSTA³, CLAUDETE DE F. RUAS², EDMILSON BIANCHINI⁴, JOSÉ A. PIMENTA⁴, PAULO M. RUAS^{2,3}

¹Manuscrito a ser enviado para a revista American Journal of Botany ²Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-980 Londrina, Paraná, Brazil; ³Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, 86051-980 Londrina, Paraná, Brazil; ⁴Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, 86051-980 Londrina, Paraná, Brazil.

Autor para correspondência: pmruas@uel.br

ABSTRACT

Premise of the study : The genetic structure analysis of tropical species lead to identify populations that suffered loss of genetic diversity due to anthropogenic actions. We evaluated a possible loss of diversity, originated from the fragmentation and selective logging, in the endemic tree species *Luehea divaricata* in Atlantic Rainforest fragments.

Methods: Nine microsatellite loci were used in nine populations of *Luehea divaricata* in the distribution area of the specie.

Results: For seven of the nine populations analyzed, the mean observed heterozygosity were lower than the mean expected heterozygosity, with the inbreeding coefficient positive and significant. It were verified that many pairs of loci were in linkage disequilibrium in all populations. The analysis of molecular variance (AMOVA) shown that most part of the genetic diversity is within populations. There was no correlation between the pairwise F_{ST} values and the geographical distance. Recent genetic bottlenecks were observed for all populations studied, and we verified the presence of migrants between all populations.

Conclusions: Although it is possible to observe a high genetic diversity in the studied populations, the maintenance in long-term of the diversity is committed due to the effects of the inbreeding and genetic bottleneck, confirmed by the occurrence of many loci in linkage disequilibrium. Thus, conservation strategies should be adopted.

Key words: linkage disequilibrium, inbreeding, genetic structure, forest fragmentation, genetic bottleneck, *Luehea divaricata*, microsatellite, Malvaceae.

INTRODUÇÃO

A diversidade encontrada em florestas tropicais, que representa mais de 60% de todas as espécies conhecidas do planeta (BRADSHAW et al., 2009), tem sido foco de vários estudos de estrutura de populações (MORAES et al., 1999; DICK et al., 2008; JIMÉNEZ et al., 2010; SHEPHERD et al., 2011), os quais visam principalmente a conservação e restauração de paisagens fragmentadas, de forma a tentar minimizar os efeitos de um crescimento econômico acelerado, especialmente em países em desenvolvimento como o Brasil.

A Mata Atlântica, que originalmente se estendia por toda a costa brasileira, cobrindo cerca de 150 milhões de hectares (RIBEIRO et al., 2009), é caracterizada por possuir elevado nível de endemismo. Entretanto, apresenta um histórico de ocupação e desmatamento para o cultivo de lavouras e pastagens, bem como o comércio madeireiro, que resultaram em redução da diversidade genética de diversas espécies (FONSECA, 1985). Estima-se que apenas 11,7% da vegetação original do bioma Mata Atlântica seja encontrada hoje (RIBEIRO et al., 2009), a maior parte, representado por pequenos fragmentos remanescentes de domínio privado, com menos de 100 hectares, e que são submetidos a diferentes tipos de pressões (RANTA et al., 1998).

A descontinuidade da vegetação resultante da fragmentação de habitats leva à ruptura do fluxo gênico entre populações, tornando-as parcial ou totalmente isoladas, com consequente perda da diversidade genética, por meio da endogamia e da deriva genética, tornando-se uma limitação evolutiva (BARRETT; KOHN, 1991). Dessa forma, avaliar os efeitos que a fragmentação de habitat exerce sobre a diversidade e estrutura genética das espécies animais e vegetais é fundamental para que medidas efetivas de conservação sejam tomadas (FRANKHAM, 2008).

Luehea divaricata Martius et Zuccarini (Malvaceae), é uma espécie arbórea, secundária inicial a tardia (CARVALHO, 2008), heliófita, com ampla distribuição no bioma Mata Atlântica, sendo frequente ao longo de rios, terrenos rochosos e íngremes, onde a

floresta é mais aberta, bem como nas formações secundárias (LORENZI, 2002). Esta é encontrada principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo também observada em países como Argentina, Uruguai e Paraguai (CARVALHO, 2003). *L. divaricata* é bastante comum em matas semidevastadas, nas capoeiras e capoeirões (REITZ et al., 1988), podendo os maiores indivíduos atingir 20 a 25 metros de altura e um diâmetro do caule de 50 a 80 centímetros à altura do peito (CECONI et al., 2006).

Com flores hermafroditas, sendo polinizadas principalmente por abelhas como *Apis mellifera* e beija-flores (BACKES; IRGANG, 2002), *L. divaricata* apresenta fruto do tipo cápsula lobada de valvas lenhosas, com sementes dispersas pelo vento com auxílio de alas agudas (CARVALHO, 2008).

Sua casca é usada na medicina popular devido as suas propriedades antifúngicas e antiproliferativas (TANAKA et al., 2005), enquanto sua madeira é empregada na confecção de móveis (BIGHETTI et al., 2004), sendo por isso, bastante requisitada e, dessa maneira, extraída seletivamente dos fragmentos remanescentes. Ameaçada, esta espécie é frequentemente utilizada em programas de reflorestamento de áreas ciliares no Brasil. Apesar da sua grande importância social, econômica e ambiental, do intenso processo de fragmentação de suas populações devido ao desmatamento, da expansão das fronteiras agrícolas e pecuárias, e do crescimento urbano no entorno da Mata Atlântica, nenhum estudo foi realizado até o momento com o objetivo de abordar, em que proporção a diversidade genética dessa espécie foi atingida, uma vez que, esta espécie atualmente é encontrada somente em fragmentos florestais.

Dentre as técnicas de biologia molecular mais difundidas nas pesquisas científicas, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) se tornou consolidada para o acesso direto à diversidade genética, tanto dentro quanto entre populações, por meio de marcadores moleculares como os microssatélites ou SSR (*Single Sequence Repeat*), os quais são distribuídos por todo o genoma dos eucariotos, sendo bastante utilizados por serem altamente informativos (ELLEGREN, 2004).

Devido ao fato de populações naturais de *L. divaricata* estarem sofrendo um intenso processo de fragmentação e corte seletivo, como consequência da ação antrópica em sua área de distribuição, foi avaliado o nível de diversidade genética entre e dentro de populações situadas na área de distribuição da espécie. Informações referentes à diversidade e estrutura genética em populações, podem ser úteis para avaliar se, o intenso desmatamento que ocorreu no Bioma Mata Atlântica, afetou o nível de diversidade genética dessa espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

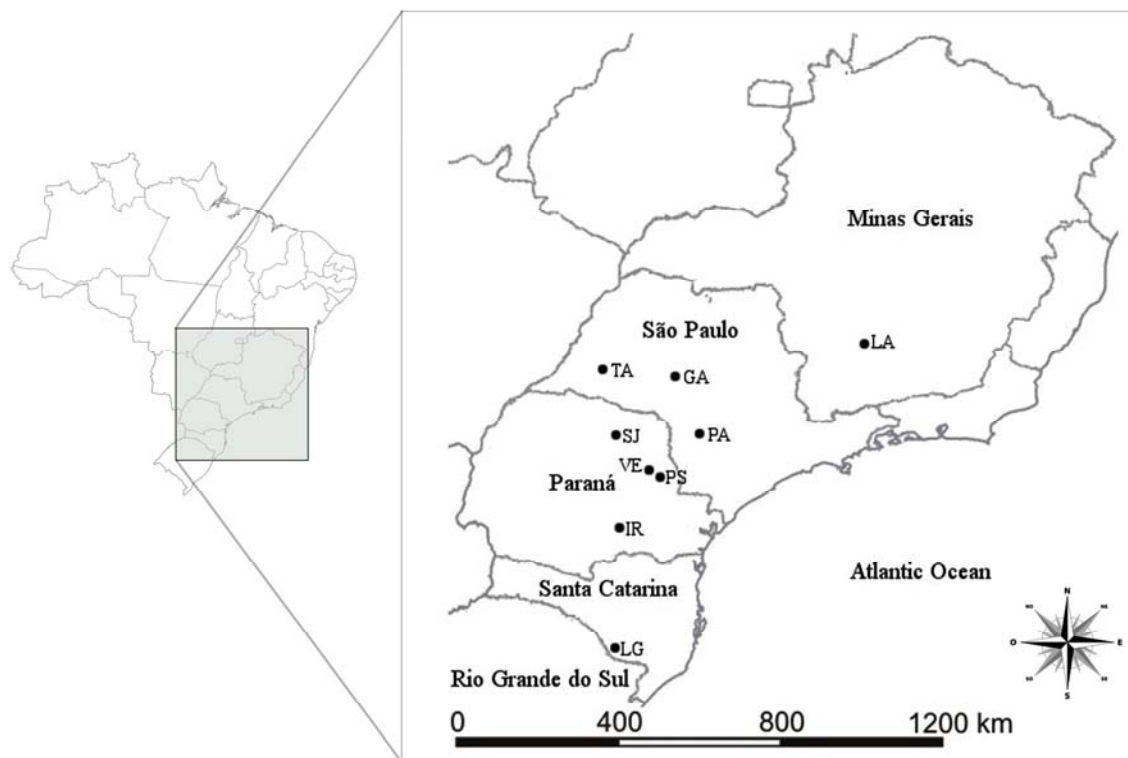
Amostragem

Folhas jovens de indivíduos adultos de *L. divaricata* foram coletadas de nove remanescentes de Mata Atlântica (Figura 2; Tabela 1), localizados nos municípios de Lages (Santa Catarina), Irati (Paraná), Piraí do Sul (Paraná), Ventania (Paraná), São Jerônimo da Serra (Paraná), Garça (São Paulo), Taciba (São Paulo), Paranapanema (São Paulo) e Lavras (Minas Gerais), sendo as populações de Garça e Paranapanema, originárias da Estação Ecológica de Caetetus e Estação Ecológica de Paranapanema, respectivamente. As populações de Irati e Lavras foram coletadas dos campos universitários da Universidade do Centro-Oeste, campus Irati, e Universidade Federal de Lavras, respectivamente. O número de amostras coletadas para cada população encontra-se na tabela 3, tendo sido respeitado uma distância mínima de 15 metros entre cada árvore a fim de minimizar ao máximo a coleta de materiais de indivíduos aparentados. Também, a coleta foi realizada de modo a serem amostrados representantes em toda a área de distribuição do fragmento. As amostras foram coletadas em gelo e posteriormente mantidas em freezer -20°C até a extração do DNA.

Tabela 1 - Localização, área do fragmento e formação florestal das populações coletadas.

Siglas	Município – Estado (Coordenadas Geográficas)	Área do Fragmento (hectares)	Formação Florestal
LG	Lages – Santa Catarina (28°11'52" S 50°43'46" W)	2,0	Floresta Ombrófila Mista
IR	Irati – Paraná (25°32'06" S 50°39'11" W)	1,3	Floresta Ombrófila Mista
PS	Piraí do Sul – Paraná (24°25'46" S 50°02'30" W)	30	Floresta Ombrófila Mista
VE	Ventania – Paraná (24°17'00" S 50°14'12" W)	14	Campos/Floresta Ombrófila Mista
SJ	São Jerônimo da Serra – Paraná (23°43'13" S 50°42'34" W)	2,5	Floresta Estacional Semidecidual
GA	Garça – São Paulo (22° 24'11" S 49° 42' 05" W)	2178,8	Floresta Estacional Semidecidual
TA	Taciba – São Paulo (22°23'34" S 51°16'25" W)	6,2	Floresta Estacional Semidecidual
PA	Paranapanema – São Paulo (23°31'01" S 48°44'10" W)	635,2	Floresta Estacional Semidecidual
LA	Lavras – Minas Gerais (21°13'27" S 44°58'29" W)	7,5	Floresta Estacional Semidecidual

Figura 2 - Localização das populações de *L. divaricata* estudadas.



Extração de DNA

Foi realizada a extração de DNA das amostras de folhas utilizando o protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1996) com modificações, sendo macerado em torno de 50 mg de tecido foliar com auxílio de nitrogênio líquido. O tecido vegetal foi então, tratado com 700µL do tampão de lise (CTAB 2%, 100mM Tris-HCl pH 7,5, 20mM de EDTA pH 8,0, 1,4M NaCl, 1% de PVP-40), com adição de 2% do volume de β-mercaptoetanol seguido de incubação a 65°C por 30 minutos.

O *pellet* formado na extração foi por fim, tratado com uma solução de eluição de Tris-EDTA 0,1mM. Posteriormente, o DNA genômico produzido na extração foi analisado em gel de agarose 1%, para verificar sua integridade e sua concentração estimada, por comparação ao padrão de DNA lambda (Ludwig Biotecnologia), nas concentrações de 30, 50 e 100 ng/µL.

Amplificação de Regiões Microssatélites

Para a amplificação das regiões microssatélites foram utilizados nove pares de iniciadores (*primers*), desenvolvidos por Ruas et al. (2009) (Tabela 2). A amplificação das regiões de microssatélites foi realizada por meio da técnica de PCR, sendo utilizada uma mistura para reação de 4,0 µL de água, 3,5 µL da enzima Go *Taq* Green Master Mix (2X, Promega), 0,25 µL do *primer* direto e 0,25 µL do *primer* reverso à uma concentração de 5 pM, sendo que para cada

mistura da reação foi adicionado 10 ng de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc.,USA), utilizando um programa de ciclos de temperatura “*touchdown*”, o qual consiste de 1 ciclo de 94°C por 4 minutos, seguido por 16 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, com um decréscimo de 1° C por ciclo de anelamento até a temperatura de 50°C, e 72°C por 30 segundos, seguido de 20 ciclos adicionais de 94° C por 30 segundos, 50° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos, e uma extensão final de 7 minutos em temperatura de 72°C.

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de poliacrilamida (acrilamida/bis-acrilamida 29:1) com concentração de 7% e corados por nitrato de prata (20%). Para a análise dos alelos no gel de poliacrilamida foi adicionado 3 µL do marcador de peso molecular (*ladder*) de 50 pares de base (Ludwig Biotecnologia).

Análise Estatística

Tabela 2: Informações sobre nove pares de *primers* microsatélites utilizados na amplificação em *L. divaricata*. T_A corresponde à temperatura de anelamento.

Loco	Sequência do <i>primer</i>	Repetição	T_A (°C)	Tamanho da repetição (pb)
Ldiv48A	F: GCCCTTCAGAATGCAAACCTC R: AAAATTTAAACACAGGCCACCA	(AG) ₁₀	59.6	205-230
Ldiv53	F: TTCCTCGCGGATAAATTGAC R: CGCGGACACAACCTCATATCTT	(GT) ₁₀	60.1	240-260
Ldiv55	F: ATTCACCAGCACAGCATCAA R: ATAAGTGGGGGAAGGGCTAA	(AC) ₉ ...(TC) ₃	60.0	155-170
Ldiv31	F: ACCTCACATGGATGCCAGTA R: GAGGTTTCACACGTGGCTTT	(TG) ₃ ...(GT) ₆	59.6	230-255
Ldiv42	F: CAACCCTCAGGCCTTACAGA R: GTTGAAGCAAGGCATGTTGA	(CAG) ₅	60.1	180-200
Ldiv40	F: GCTTCTTGCCAAAATGGTC R: ATGTTTAATGCCGCGTTTTTC	(ACC) ₄ ...(CT) ₃ ...(CA) ₃	59.9	250-260
Ldiv52	F: TGAAACAACCACTCAGTCAACC R: TTTCTCCCAGGTTTGGTTTTT	(AT) ₃ ...(ATT) ₃ ...(TCT) ₃	60.0	180-210
Ldiv58	F: GACGCATGATGGAAGGAAAT R: TGATGGTCTGAGCAGTCAGG	(AC) ₁₅ ...(ATC) ₃	60.0	150-175
Ldiv62	F: CACGGTTCGCTTTTTCTTTC R: CGGCAAATCTCAGGGACTAA	(GGT) ₃ ...(AT) ₄ (AC) ₉	60.0	210-260

O número de alelos por loco (A), número de alelos efetivos por loco (A_e) e heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) e distância genética de Nei (1972) foram obtidos com o *software* Popgene v. 1.31 (YEH et al., 1999). Os locos foram também testados para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg por meio do teste exato (GUO; THOMPSON,

1992) e equilíbrio de ligação com o *software* Genepop versão 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995). O coeficiente de endocruzamento F_{IS} para cada localidade foi calculada pelo programa FSTAT versão 2.9.3 (GOUDET, 2001) com permutações de 5000 vezes. A análise da estrutura genética das populações foi realizada baseando-se na estatística F (WRIGHT, 1951) sendo utilizado o *software* Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER et al, 2006). Este mesmo programa também foi utilizado para analisar resultados quanto à variação genética dentro e entre populações por meio da análise de variância molecular (AMOVA). A análise de correlação linear de Pearson para verificar se há correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, foi realizada pelo *software* Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007). Um dendrograma foi gerado a partir das distâncias genéticas de Nei (1978), utilizando o método de agrupamento UPGMA (SOKAL; MICHENER, 1958), com o *software* TFPGA 1.3 (MILLER, 1997).

Para estimar a taxa de migração entre as populações foi aplicado o método de estimativa bayesiano com o uso do *software* BAYESASS 1.3 (WILSON; RANNALA, 2003). O programa STRUCTURE versão 2.3.3 (HUBISZ et al., 2009) foi usado para identificar o número de agrupamentos (K) de populações geneticamente similares. A análise do número de agrupamentos foi realizada seguindo o modelo de mistura, com *burn-in* e *runs length* de 10000 e 100000 interações, respectivamente. O número de agrupamentos foi determinado segundo as indicações de Pritchard e Wen (2004) e, também das recomendações de Evano et al. (2005). Para investigar se as populações sofreram recentes reduções no tamanho efetivo populacional foi utilizado o programa BOTTLENECK 1.2.02 (PIRY et al., 1999), sendo o teste de sinal de Wilcoxon utilizado para identificar excesso de heterozigidade.

RESULTADOS

Para os nove locos testados em *L. divaricata*, verificou-se um total de 50 alelos em 268 indivíduos estudados, com o número de alelos variando de 2 para o loco Ldiv40, a 8 para os locos Ldiv31 e Ldiv53, sendo sua média igual a 5,5 alelos por loco. O número de alelos efetivos por sua vez variou de 1,06 para o loco Ldiv52, a 6,88 para o loco Ldiv53, com média igual a 3,65. O valor médio de heterozigidade observada ($H_o= 0,53$) foi menor do que a heterozigidade média esperada ($H_e= 0,67$), mostrando uma deficiência de heterozigotos. A heterozigidade observada foi menor para todas as populações, com exceção das populações de Lages e Irati que apresentaram um valor de heterozigidade observada e esperada semelhantes (Tabela 3). Porém, o teste exato mostrou que somente a população de Lages

encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com as demais populações (exceção da população de Irati) apresentando um déficit de heterozigotos.

Tabela 3 - Medidas de diversidade genética de nove locos microssatélites em nove populações de *L. divaricata*. N: número de indivíduos por população; A: número de alelos por loco; A_e: número de alelos efetivos por loco; H_o: heterozigosidade observada; H_e: heterozigosidade esperada; F_{IS}: coeficiente de endogamia; SD: desvio padrão para A, A_e, H_o e H_e.

Populações [#]	N	A(SD)	A _e (SD)	H _o (SD)	H _e (SD)	F _{IS}
LG	32	4,89(2,02)	3,58(1,78)	0,64(0,35)	0,64(0,25)	-0,01
IR	30 ^x	5,22(2,22)	3,74(1,73)	0,65(0,34)	0,67(0,19)	0,03
PS	29 ^x	5,22(2,11)	3,92(1,80)	0,45(0,21)	0,70(0,14)	0,36*
VE	29 ^x	4,78(2,11)	3,50(1,71)	0,56(0,33)	0,66(0,16)	0,15*
SJ	30 ^x	5,00(1,80)	3,23(1,32)	0,54(0,33)	0,63(0,22)	0,13*
GA	30 ^x	4,78(1,79)	3,65(1,31)	0,55(0,24)	0,70(0,13)	0,22*
TA	28 ^x	5,11(1,83)	3,63(1,33)	0,49(0,30)	0,70(0,11)	0,31*
PA	30 ^x	4,89(2,03)	3,08(1,39)	0,50(0,29)	0,61(0,20)	0,18*
LA	30 ^x	5,11(1,96)	3,77(1,25)	0,43(0,23)	0,71(0,13)	0,40*
Média		5,00(1,99)	3,57(1,51)	0,53(0,29)	0,67(0,17)	

^x Significativo a 5% para o teste exato para equilíbrio de Hardy-Weinberg.

[#]Os nomes dos municípios correspondentes as siglas estão especificados na tabela 1.

* F_{IS} significativo a 5% de probabilidade por população em todos os locos.

O teste de equilíbrio de ligação evidenciou que diversos locos estavam associados em desequilíbrio de ligação. A população de Ventania apresentou o maior desequilíbrio de ligação com nove locos associados, seguida pela população da Estação Ecológica de Paranapanema, que mostrou sete pares de locos em desequilíbrio de ligação. As demais populações apresentaram um índice menor de desequilíbrio de ligação, sendo a população de Lages e São Jerônimo da Serra com seis locos associados, Irati, com cinco, Piraí do Sul e Lavras com quatro, Estação Ecológica de Caetetus, com três e Taciba, com dois pares de locos associados entre si (Tabela 4)

Tabela 4 - Presença de desequilíbrio de ligação para nove locos de microssatélites em nove populações de *L. divaricata*, realizada pelo *software* Genepop 3.4 (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

Locos	Populações [#]								
	LG	IR	PS	VE	SJ	GA	TA	PA	LA
Ldiv31/Ldiv40	+			+					
Ldiv31/Ldiv55									+
Ldiv31/Ldiv58				+					
Ldiv31/Ldiv62				+	+			+	
Ldiv40/Ldiv48A	+			+				+	
Ldiv40/Ldiv52		+		+					
Ldiv40/Ldiv53		+							
Ldiv40/Ldiv55				+	+				
Ldiv40/Ldiv58		+			+				
Ldiv40/Ldiv62	+							+	
Ldiv42/Ldiv48A		+							
Ldiv42/Ldiv52			+						
Ldiv42/Ldiv53							+		
Ldiv42/Ldiv55			+			+			+
Ldiv42/Ldiv58						+		+	
Ldiv42/Ldiv62			+	+					
Ldiv48A/Ldiv52						+			
Ldiv48A/Ldiv58		+						+	
Ldiv48A/Ldiv62					+		+	+	
Ldiv52/Ldiv55				+					
Ldiv52/Ldiv58				+					
Ldiv52/Ldiv62			+						+
Ldiv53/Ldiv55	+								
Ldiv53/Ldiv62	+				+				
Ldiv55/Ldiv58					+				+
Ldiv55/Ldiv62	+								
Ldiv58/Ldiv62								+	

P>0,05 (significância utilizando o teste exato de Fisher)

[#]Os nomes dos municípios correspondentes as siglas estão especificados na tabela 1.

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que 93,16% da variação genética se encontra dentro de populações, com índice de diferenciação genética de 6,84% (Tabela 5).

Tabela 5: Análise de variância molecular (AMOVA) de nove populações de *L. divaricata*; SQ: soma dos quadrados; F_{ST}: diferenciação genética.

Fonte de variação	SQ	Componentes de Variância	% de Variação
Entre Populações	126,49	0,22	6,84**
Dentro Populações	1540,10	3,01	93,16
Total	1666,59	3,23	

Índice de Fixação (F_{ST}) = 0,0684

**P < 0,01 (significância dada pelo teste com 1023 permutações).

A tabela 6 mostra, abaixo da diagonal, os dados de diferenciação genética entre pares de populações, enquanto a distância geográfica é observada acima da diagonal. Pôde-se observar através dos dados de F_{ST} par a par, que as populações apresentam nível de diferenciação genética de baixo a moderado, sendo a menor diferença observada entre as populações de Lages e Irati e a maior diferenciação genética encontrada entre as populações de Ventania e Paranapanema. A correlação genética de Pearson mostrou que não existe uma relação entre o F_{ST} par a par e as distâncias geográficas ($P=0,0924$ à 5% de significância).

Tabela 6: Distância geográfica, em km, entre as populações estudadas, acima da diagonal. Valores de F_{ST} entre pares de populações de *L. divaricata*, abaixo da diagonal. Todos os valores de F_{ST} foram significativos ($P < 0,05$, significância dada com 1023 permutações).

	LG [#]	IR	PS	VE	SJ	GA	TA	PA	LA
LG	*	295 km	423 km	436 km	496 km	650 km	645 km	555 km	967 km
IR	0,0193	*	137 km	145 km	201 km	360 km	353 km	296 km	751 km
PS	0,1198	0,1000	*	25 km	104 km	227 km	258 km	167 km	630 km
VE	0,0770	0,0541	0,1147	*	79 km	215 km	234 km	175 km	637 km
SJ	0,0503	0,0601	0,0763	0,1204	*	178 km	158 km	203 km	652 km
GA	0,0661	0,0670	0,0448	0,0808	0,0342	*	162 km	158 km	506 km
TA	0,0630	0,0591	0,0437	0,0572	0,0563	0,0241	*	289 km	664 km
PA	0,0832	0,0969	0,0827	0,1402	0,0657	0,0546	0,0863	*	463 km
LA	0,0797	0,0784	0,0459	0,0980	0,0576	0,0296	0,0419	0,0599	*

[#]Os nomes dos municípios correspondentes as siglas estão especificados na tabela 1.

As distâncias genéticas de Nei (1972) entre populações variaram de 0,3840 (Ventania e Pirai do Sul) a 0,0574 (Lages e Irati) (Tabela 7) sendo esses dados semelhantes quanto as relações entre populações mostradas pelo F_{ST} par a par, e suas respectivas distâncias geográficas.

Tabela 7: Distância genética de Nei (1972) entre as populações de *L. divaricata*.

	LG [#]	IR	PS	VE	SJ	GA	TA	PA	LA
LG	-----								
IR	0,0574	-----							
OS	0,3141	0,2938	-----						
VE	0,1907	0,1526	0,3840	-----					
SJ	0,1085	0,1378	0,2000	0,2952	-----				
GA	0,1607	0,1881	0,1841	0,2498	0,0892	-----			
TA	0,1660	0,1807	0,1563	0,2034	0,1413	0,1162	-----		
PA	0,1782	0,2204	0,2376	0,3651	0,1539	0,1575	0,2591	-----	
LA	0,2075	0,2267	0,1802	0,2823	0,1609	0,1526	0,1666	0,1847	-----

[#]Os nomes dos municípios correspondentes as siglas estão especificados na tabela 1.

O dendrograma construído usando o método de coalescência evidenciou a formação de diferentes grupos (Figura 3), com as populações da Estação Ecológica de Paranapanema, Pirai do Sul e Ventania isoladas das demais.

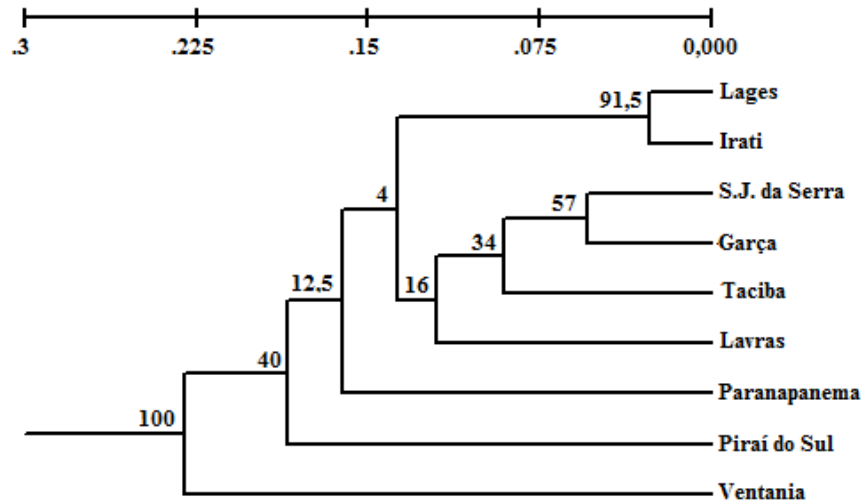


Figura 3: Dendrograma do agrupamento de nove populações de *L. divaricata*, conforme distância genética de Nei (1978). Número nos ramos representam *bootstrap* baseado em 1000 replicações.

As análises da taxa de migração estimada pelo *software* BayesAss 1.3 (WILSON; RANNALA, 2003) revelaram a presença de fluxo gênico recente entre as populações. Na tabela 8 pode-se verificar que as maiores taxas de migração são observadas nas populações de Lages (28,7%), Irati (32,2%) e Garça (23,5), e as menores nas populações de Ventania (3,2%) e Paranapanema (4,1%). As populações que contribuíram com maior número de migrantes para as demais populações foram Lages (25,2%), e Irati (24,2%), enquanto as populações de Pirai do Sul (6,6%) e Garça (4,9%) foram as populações com menor número de migrantes.

O teste para investigar se as populações sofreram recentes reduções no tamanho populacional mostrou que para os modelos TPM (*Two-Phase Model*) e IAM (*Infinite-Allele Model*) as nove populações apresentaram um excesso de heterozigiosidade em comparação a uma população em equilíbrio de mutação e deriva (Tabela 9). Já, para o modelo de mutação SMM (*Stepwise Mutation Model*), foi observado um excesso de heterozigiosidade para as populações de Pirai do Sul, Ventania, Garça, Taciba e Lavras.

Tabela 8: Médias das distribuições a *posteriori* das proporções de indivíduos não-migrantes e migrantes para as nove populações de *L. divaricata* baseado no método de atribuição Bayesiana de Wilson e Rannala (2003) em BayesAss. Os migrantes são indicados pela população de origem e pelas taxas de migração. Todos os valores são significativos com intervalo de confiança de 95%.

Populações	Não-migrantes	Migrantes
Lages [#]	0,713	Irati 0,204; Piraí do Sul 0,006; Ventania 0,013; São Jerônimo da Serra 0,009; Garça 0,011; Taciba 0,026; Paranapanema 0,006; Lavras 0,011
Irati	0,678	Lages 0,209; Piraí do Sul 0,014; Ventania 0,047; São Jerônimo da Serra 0,007; Garça 0,006; Taciba 0,019; Paranapanema 0,011; Lavras 0,010
Piraí do Sul	0,903	Lages 0,004; Irati 0,010; Ventania 0,004; São Jerônimo da Serra 0,011; Garça 0,005; Taciba 0,025; Paranapanema 0,011; Lavras 0,027
Ventania	0,968	Lages 0,003; Irati 0,003; Piraí do Sul 0,004; São Jerônimo da Serra 0,007; Garça 0,003; Taciba 0,007; Paranapanema 0,002; Lavras 0,004
São Jerônimo da Serra	0,945	Lages 0,005; Irati 0,004; Piraí do Sul 0,008; Ventania 0,011; Garça 0,007; Taciba 0,007; Paranapanema 0,006; Lavras 0,006
Garça	0,765	Lages 0,017; Irati 0,007; Piraí do Sul 0,010; Ventania 0,011; São Jerônimo da Serra 0,112; Taciba 0,034; Paranapanema 0,035; Lavras 0,009
Taciba	0,944	Lages 0,003; Irati 0,005; Piraí do Sul 0,010; Ventania 0,004; São Jerônimo da Serra 0,007; Garça 0,006; Paranapanema 0,016; Lavras 0,005
Paranapanema	0,959	Lages 0,003; Irati 0,005; Piraí do Sul 0,008; Ventania 0,003; São Jerônimo da Serra 0,007; Garça 0,005; Taciba 0,009; Lavras 0,003
Lavras	0,852	Lages 0,008; Irati 0,004; Piraí do Sul 0,006; Ventania 0,005; São Jerônimo da Serra 0,035; Garça 0,006; Taciba 0,021; Paranapanema 0,063

[#]Os nomes dos municípios correspondentes as siglas estão especificados na tabela 1.

Tabela 9: Probabilidades a partir do teste de sinal de Wilcoxon para excesso de heterozigidade usando Bottleneck 1.2.02 (PIRY et al., 1999).

Populações [#]	Teste de Mutação-Deriva		
	IAM ^a	TPM ^b	SMM ^c
LG	0.1266*	0.1740*	0.2208
IR	0.1231*	0.1637*	0.2156
PS	0.1142*	0.1620*	0.2179*
VE	0.1228*	0.1894*	0.2573*
SJ	0.2018*	0.2674*	0.3923
GA	0.0923*	0.1477*	0.1689*
TA	0.1050*	0.1687*	0.2616*
PA	0.2336*	0.3212*	0.3218
LA	0.0808*	0.1391*	0.2049*

*Significância de *Infinite-Allele* Model; ^a *Infinite-Allele* Model; ^b *Two-Phase Model*; ^c *Stepwise Mutation Model*; [#]Os nomes dos municípios correspondentes as siglas estão especificados na tabela 1.

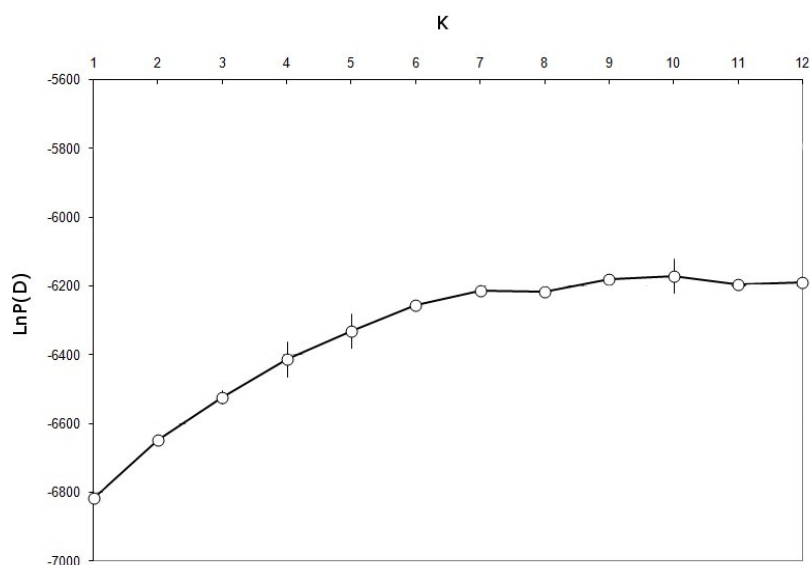
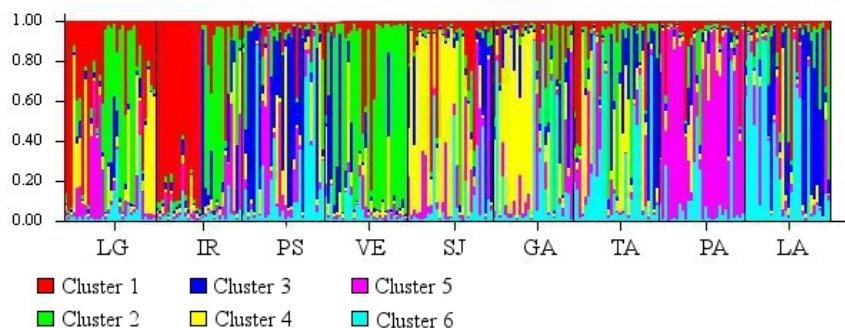


Figura 4: Gráfico dos valores logarítmicos da probabilidade média posterior (LnP(D)) por agrupamentos (K), gerado pelo programa Structure 2.3.3 (HUBISZ et al., 2009).

O número de agrupamentos populacionais (K) gerados a partir da análise Bayesiana mostrou a formação de seis grupos (Figura 4), uma vez que para selecionar o mesmo, Pritchard e Wen (2004) indicam que o resultado mais provável é o de menor valor de K após a formação de um platô dos valores logarítmicos da probabilidade (LnP(D)). Já a figura 5 mostrou uma grande mistura entre os indivíduos.

Figura 5: Estrutura genética de populações de *L. divaricata* inferido pela abordagem Bayesiana. O eixo y indica a porcentagem de associação estimada em cada um dos k clusters inferidos. Os nomes dos municípios correspondentes as siglas (eixo x) estão especificados na tabela 1.



DISCUSSÃO

Diversidade genética

Historicamente, a drástica redução da Floresta Atlântica, ocorreu em diferentes períodos nas regiões abrangidas pelo bioma. Na região do planalto catarinense, esta ocorreu a partir da segunda metade do século XX (VIBRANS et al., 2008) (população de Lages). A partir da década de 1910 iniciou-se a fragmentação da floresta localizada no estado do Paraná (populações de Irati, Piraí do Sul, Ventania e São Jerônimo da Serra), a qual foi intensificada na década de 1950 (MEDEIROS et al., 2005), fato que também ocorreu na floresta estacional semidecidual localizada no estado de Minas Gerais (população de Lavras, Silva et al., 2003). Já, a destruição florestal no estado de São Paulo (populações de Taciba, Estação Ecológica de Paranapanema e Estação Ecológica de Caetetus), atingiu seu ápice na década de 1930 (VICTOR et al., 2005).

O estudo dos nove locos de microssatélites nas nove populações de *L. divaricata* mostrou, níveis moderados de diversidade genética, com o valor de heterozigosidade média observada (0,53) próximo do encontrado em outras espécies arbóreas tropicais, e que sofreram perda de diversidade devido a processos intensos de fragmentação florestal, como *Distemonanthus benthamianus*, $H_o=0,51$ (DEBOUT, et al., 2011), *Sorocea bonplandii*, $H_o=0,55$ (RUSCHEL, et al., 2009) e *Tabebuia ochracea*, $H_o=0,34$ (MOREIRA et. al. 2009).

Embora a heterozigosidade média observada (H_o) nas populações de *L. divaricata* tenha sido próximo ao encontrado nessas espécies, uma comparação dos valores de heterozigosidade média observada (0,53) e esperada (0,67) em *L. divaricata*, mostram uma deficiência de heterozigotos em sete das nove populações estudadas. Em todas essas populações nas quais se observou uma deficiência de heterozigosidade, mostrou-se que as

mesmas apresentam um valor de F_{IS} positivo e significativo, apontando que estas, vêm sofrendo um intenso processo de endogamia, com exceção das populações de Lages e Irati. Assim, os valores do coeficiente de endogamia associados à menor heterozigosidade observada, indica uma possível perda da diversidade genética por meio de depressão endogâmica em sete das populações estudadas. Desse modo, as observações feitas por Lowe et al. (2005), os quais verificaram que o aumento do endocruzamento é um dos principais fatores deletérios decorrente da degradação do habitat, está de acordo com nosso estudo, já que este mostra que o processo de fragmentação do bioma Mata Atlântica, oriundo do corte e queimadas recorrentes, podem ser considerados como os agentes que levaram a diminuição do nível de heterozigosidade em *L. divaricata*.

Em todas as populações estudadas verificou-se um efeito recente de gargalo genético, o qual em cinco populações foi mostrado tanto pelos modelos IAM, TPM e SMM (Piraí do Sul, Ventania, Garça, Taciba e Lavras). Embora nas populações de Paranapanema, São Jerônimo da Serra, Irati e Lages o efeito de gargalo genético não tenha sido mostrado pelo modelo de SMM o mesmo foi verificado pelos modelos IAM e TPM. Dessa forma, o processo de fragmentação que ocorreu nas populações de Piraí do Sul, Ventania, Garça, Taciba e Lavras, levou as populações a uma perda de alelo de forma mais intensa do que as populações de Paranapanema, São Jerônimo da Serra, Irati e Lages. O efeito de gargalo genético que foi observado, não só é confirmado para as populações estudadas por meio da presença de diversos pares de locos em desequilíbrio de ligação (FUTUYMA, 2005), como também, é evidenciado para as populações que apresentaram um F_{IS} positivo e significativo, uma vez que a endogamia mantém o desequilíbrio de ligação nas populações (FUTUYMA, 2005).

De acordo com Young et al. (1996) e Lowe et al. (2005), mudanças populacionais associadas com degradação de habitat levam a uma erosão da diversidade e aumento da divergência genética entre populações, devido ao aumento da deriva genética e taxa de endocruzamento, fato claramente demonstrado nas populações estudadas de *L. divaricata*, uma vez que a espécie sofreu redução de seu habitat, e segundo Farias (2009), corte seletivo das árvores nos diversos fragmentos com fins comerciais. Assim, considerando que a diversidade genética é um dos fatores chave na evolução, adaptação e sobrevivência das populações e indivíduos de espécies arbóreas, a redução na diversidade genética pode predispor a espécie e populações a doenças e reduzir a produtividade e limitar a sua reprodução (RAJORA; PLUHAR, 2003).

Collevatti et al. (2001) utilizando microssatélites na espécie arbórea tropical *Caryocar brasiliense* comparou florestas contínuas e fragmentadas, mostrando um alto nível de variação em todas as populações, porém nenhuma diferença foi encontrada em relação à heterozigosidade e taxa de endocruzamento entre as populações contínuas e fragmentadas. Isso se deve, segundo Lowe et al. (2005) ao fato da fragmentação ter ocorrido em um tempo menor que o tempo de vida da árvore. Porém, *L. divaricata* apresenta um tempo de vida de aproximadamente 60 anos (SILVA et al., 2012), assim, em grande parte dos fragmentos analisados neste estudo não devemos ter mais as árvores originais, e sim a próxima geração das populações que foram perturbadas.

Apesar de termos verificados valores de F_{IS} significativos para sete das populações estudadas e deriva genética recente ter ocorrido em todas elas, as populações apresentam valores médios do número de alelos por locos (A) e número alelos efetivos por locos (A_e), isto é, estas populações ainda apresentam uma diversidade genética razoável. De acordo com Lowe et al. (2005) o efeito do endocruzamento é observado imediatamente após a devastação, entretanto a queda da diversidade genética (A , A_e) ocorre de maneira lenta nas próximas gerações. Como já descrito, *L. divaricata* tem um tempo de vida de cerca de sessenta anos. Assim, somente daqui a centenas de anos caso nenhuma providência seja tomada no sentido de recuperar estas populações um decréscimo na variabilidade genética será observado. Todavia, segundo Lowe et al. (2005) mesmo quando estudos de marcadores moleculares neutros, como microssatélites, indicam a presença substancial de variabilidade genética, a diversidade genética para locos importantes para sobrevivência da espécie ao longo do tempo podem estar em declínio.

Estrutura genética

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que 93,16% da variabilidade genética está distribuída dentro de populações, e 6,84% entre as mesmas. O valor de F_{ST} (6,84%) indica diferenciação genética moderada entre populações como descrito por Hartl e Clark (1997), o que é característico de uma espécie arbórea alógama que apresenta variabilidade genética maior dentro de populações (HAMRICK; GODT, 1989). Isso é confirmado, pelo fato de *L. divaricata* apresentar como polinizadores pequenos insetos, como *Apis mellifera* e beija-flores (BACKES; IRGANG, 2002), e dispersão anemocórica (CARVALHO, 2008). Dessa forma, é possível que pequenos fragmentos florestais remanescentes próximos aos estudados, estejam agindo como “corredores” de vegetação, permitindo que polinizadores possam se deslocar e realizar o fluxo gênico, impedindo assim

que a distância genética entre as populações possa aumentar, e assim ocorrer isolamento entre elas.

Os valores de F_{ST} entre pares de populações e as distâncias genéticas de Nei foram numericamente similares em proporção, tendo os dados de F_{ST} par a par e distâncias geográficas, mostrando que não há correlação entre as distâncias genética e geográfica. Populações com grande distâncias geográficas (Lages e Lavras), não apresentaram uma grande distância genética entre elas. Por sua vez, a menor distância genética se encontra entre as populações de Lages e Irati, que se situam a 295 km de distância. Esta distância genética é confirmada pelos valores de fluxo gênico recente entre essas populações, visto que estas apresentam grande quantidade de migrantes entre elas. A menor distância geográfica entre populações (Ventania e Piraí do Sul) mostrou uma das maiores distâncias genéticas, visto que estas populações apresentaram baixa quantidade de migrantes, em especial a população de Ventania. Essas duas populações encontram-se isoladas entre si por campos agrícolas.

A população de Ventania se mostrou isolada das demais, apresentando os maiores valores de distância genética em relação a outras populações. Os valores de F_{ST} par a par, e distâncias genéticas de Nei, indicam que esta população, devido à fragmentação de habitat e corte seletivo tem sofrido efeitos de deriva genética e depressão endogâmica. De acordo com Lowe et al, (2005) a fragmentação de habitat e o corte diferencial das árvores aumenta o isolamento entre os fragmentos e reduz o fluxo gênico. Redução na proporção de genes imigrantes combinado com deriva genética e perda alélica em populações pequenas aumenta a diferenciação genética entre os fragmentos perturbados, como é claramente observado entre os fragmentos de Ventania e Piraí do Sul, onde os distúrbios que ocorreram no passado levaram a um isolamento genético das populações com uma taxa acentuada de endogamia e deriva genética.

Os dados de F_{ST} par a par foram usados para construir o dendrograma gerado a partir do método de coalescência, o qual separou as populações em seis diferentes grupos. Dentre eles pode-se destacar a proximidade entre as populações de Lages e Irati, e também o isolamento das populações de Paranapanema, Piraí do Sul e Ventania, como discutido anteriormente.

Contribuindo com o entendimento a respeito do grau de isolamento genético entre as populações, a análise Bayesiana indicou a presença de diferentes taxas de migrantes entre as populações, o que confirma que as populações estudadas, não estão totalmente isoladas geneticamente, pois de acordo com Lowe et al. 2005, quando entre os fragmentos são deixadas algumas árvores isoladas, as mesmas servem como ponte para o fluxo gênico entre

os fragmentos. Além disto, *L. divaricata* tem suas sementes disseminadas pelo vento sendo que mesmo pode dispersar as sementes a longas distancias (HORN et al. 2001), sendo que este tipo de dispersão pode ser favorecido pela fragmentação e corte seletivo (GHAZOUL, 2005). Além disto, *L. divaricata* como verificado acima é polinizada por *Apis mellifera* e beija-flores. *Apis-melifera* percorre em relação ao seu ninho uma distância de aproximadamente 1 km, mas beija-flores são capazes de percorrer até 20 km e segundo Anjos (2001) a fragmentação aumenta a abundancia de beija-flores. Assim, estes pássaros podem estar contribuindo para a manutenção da diversidade genética principalmente daquelas populações situadas nos estados de Santa Catarina e Paraná onde existe uma boa quantidade de pequenos fragmentos compostos de poucas árvores, entre os fragmentos maiores.

As populações que apresentaram o maior isolamento genético foram as populações de Ventania, Estação Ecológica de Paranapanema, Taciba, São Jerônimo da Serra e Pirai do Sul, pois apresentaram maior quantidade de não migrantes. Segundo Young et al. (1996) as mudanças populacionais associadas com a degradação do habitat levam a uma erosão da diversidade genética, como o observado em *L. divaricata*, com divergência interpopulacional, devido ao aumento da deriva genética, taxa elevada de endocruzamento e redução do fluxo gênico. Essas mudanças afetam a viabilidade das populações a curto e em longo prazo. A curto prazo nas populações, pode ocorrer o aumento da suscetibilidade a doenças e pestes (BARRET; KOHN, 1991) e fixação de alelos deletérios (HUENNEKE, 1991). Em longo prazo a perda da diversidade genética deve reduzir a capacidade das populações a responderem as mudanças das pressões seletivas (FUTUYMA, 2005).

A análise de agrupamento populacional mostrou a formação de seis grupos (K=6), corroborando para a interpretação da estruturação das populações de *L. divaricata*. A análise Bayesiana mostrou que as populações de Irati e Lages se encontram agrupadas, com boa parte de seus indivíduos atribuídos ao mesmo cluster, fato confirmado quando analisamos o dendrograma gerado a partir das distâncias genéticas de Nei (1978), e que confirma que essas populações são mais semelhantes geneticamente, apesar da distância geográfica entre as mesmas. As populações de São Jerônimo da Serra, Garça e Taciba, apresentaram-se agrupadas, sendo acompanhadas por outro grupo representado pela população de Lavras, como pode ser observado pelo dendrograma, sendo observada uma grande mistura quando analisado através da análise Bayesiana para essas populações. Os demais grupos são representados pelas populações de Paranapanema, Pirai do Sul e Ventania, com seus indivíduos agrupados entre si após a intensa fragmentação do bioma, que resultou em severa diferenciação dessas populações para com as demais.

CONCLUSÕES

A fragmentação e corte seletivo causaram um impacto significativo nas populações de *L. divaricata* nos últimos setenta anos, uma vez que as populações apresentaram valores médios de heterozigosidade observada menor que o esperado, bem como efeitos de gargalo genético recente e desequilíbrio de ligação acentuados. Está claro que ainda existe uma reserva de diversidade genética nessas populações, sendo importante considerar as implicações que o efeito do gargalo genético e endocruzamento causarão nas populações de *L. divaricata* ao longo do tempo, sendo importante que medidas conservacionistas sejam tomadas. Tais medidas incluem abolir o corte seletivo de indivíduos adultos, que contribuem reprodutivamente para a manutenção da diversidade genética, e também manter intactos os fragmentos florestais, de forma que não se tenha perda do habitat da espécie.

As únicas populações que sofreram um menor impacto da fragmentação e corte seletivo foram as populações de Lages e Irati, pois apesar das mesmas estarem em áreas menores que as outras, as regiões do planalto catarinense (população de Lages) e do sul do Paraná (população de Irati) foram devastadas mais tarde, por sua terras não mostrarem um alto grau de fertilidade como as regiões ocupadas pelas outras populações.

AGRADECIMENTOS: Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo nº 478179/06-5) e, Fundação Araucária pelo suporte financeiro. Queremos também agradecer ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo pela licença para as coletas na Estação Ecológica dos Caetetus e Estação Ecológica Paranapanema.

LITERATURA CITADA

ANJOS, L. 2001. Bird communities in five atlantic forest fragments in southern Brazil. *Ornitologia Neotropical*, 12: 11-27.

AYRES, M., M. AYRES JR, D. L. AYRES, AND A. A. S. SANTOS. 2007. BioEstat. Versão 5.0, aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, Belém: Pará, Brasil.

BACKES, P., AND B. IRGANG. 2002. Árvores do sul, guia de identificação & interesse ecológico. As principais espécies nativas sul-brasileiras. Santa Cruz do Sul, Instituto Souza Cruz.

BARRET, S. C. H., AND J. R. KOHN. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small populations size in plants: implications for conservation. In D. A. Falk and K. E. Holsinger [eds.], Genetic and conservation of rare plants, 3-30. Oxford University Press, New York, USA.

BIGHETTI, A. E., J. E. CARVALHO, M. A. ANTÔNIO, M. A. FOGLIO, AND A. POSSENTI. 2004. Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini, *Lecta Brasil*, 22: 53-58.

BRADSHAW, C. J. A., N. S. S. SODHI, AND B. W. BROOK. 2009. Tropical turmoil: a biodiversity crisis in progress, *Front. Ecol. Environmental*, 7: 79-87.

CARVALHO, M. C. C. G. DE, D. C. G. DA SILVA, P. M. RUAS, M. E. MEDRI, E. A. RUAS AND C. DE F. RUAS. 2008. Flooding tolerance and genetic diversity in populations of *Luehea divaricata*, *Biologia Plantarum*, 52: 774-778.

CARVALHO, P. E. R. 2003. Espécies arbóreas brasileiras, ed. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, Brazil.

CECONI, D. E., I. POLETO, E. J. BRUN, AND T. LOVATO. 2006. Crescimento de mudas de Açoitacavallo (*Luehea divaricata* Mart.) sob influência da adubação fosfatada, *Cerne*, 12: 292-299.

COLLEVATTI, R. G., D. GRATTAPAGLIA, AND J. D. HAY. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 349-356.

DEBOUT, G. D. G., J. L. DOUCET, AND O. J. HARDY. 2011. Population history and gene dispersal inferred from spatial genetic structure of a central african timber tree, *Distemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae), *Heredity*, 106: 88-99.

DICK, C.W., O. J. HARDY, F. A. JONES, AND R. J. PETIT. 2008. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees, *Tropical Plant Biology*, 1: 20-33.

- ELLEGREN, H. 2004. Microsatellite: single sequences with complex evolution. *Nature*, 5: 435-445.
- EVANO, G., S. REGNAUT, AND J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- EXCOFFIER, L., G. LAVAL, AND S. SCHNEIDER. 2006. Arlequin (Version 3.1): An integrated software package for population genetics data analysis, *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- FARIAS, J. A. DE, 2009. Contribuição para a silvicultura de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini (Açoita-cavalo). *Caderno de Pesquisa, série Biologia*, 21: 6-19.
- FERREIRA, M. E., AND D. GRATTAPAGLIA. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética, ed. Embrapa – CENARGEM, Brasília, Brazil.
- FONSECA, G. A. B. 1985. The vanishing Brazilian Atlantic Forest, *Biological Conservation*, 33: 1-18.
- FRANKHAM, R., J. D. BALLOU, AND D. A. BRISCOE. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação, ed. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.
- FUTUYMA, D. J. 2005. *Evolution*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- GHAZOUL, J. 2005. Pollen and seed dispersal among dispersed plants, *Biological Review*, 80: 413-443.
- GOUDET, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversity and fixation indices, version 2.9.3.2 [online]. Website: <http://www2.unil.ch/popgene/softwares/fstat.htm>. [accessed 1 November 2011].
- GUO, S. W., AND E. A. THOMPSON. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.

HAMRICK, J. L., AND M. J. W. GODT. 1989. Allozyme diversity in plant species. *In* A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir [eds.], *Plant population genetics, breeding and genetic resources*, 43-63. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.

HARTL, D. L., AND A. G. CLARK. 1997. *Principles of population genetics*, 3th ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.

HORN, H. S., R. NATHAN, AND S. R. KAPLAN. 2001. Long-distance dispersal of tree seeds by wind. *Ecological Resource*, 16: 877-885.

HUBISZ, J. M., D. FALUSH, M. STEPHENS, AND J. K. PRITCHARD. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1322-1332.

HUENNEKE, L.F. 1991. Ecological implication of genetic variation in plant population. *In* D. A. Falk, and K. E. Holsinger [eds.], *Genetics and conservation of rare plants*, Oxford University press, New York, USA.

JIMÉNEZ, A., R. HOLDEREGGER, D. CSENCICS, AND L. G. QUINTALILLA. 2010. Microsatellites reveal substantial among-population genetic differentiation and strong inbreeding in the relict fern *Dryopteris aemula*. *Annals of Botany*, 106: 149-155.

LORENZI, H. 2002. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil*, 2nd ed. Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, Brazil.

LOWE, A.J., D. BOSHIER, M. WARD, C. F. E. BACLES, AND C. NAVARRO. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, 95: 255-273.

MEDEIROS, J. D., M. SAVI, AND B. F. A. DE BRITO. 2005. Seleção de áreas para criação de unidades de conservação na floresta ombrófila mista. *Biotemas*, 18: 33-50.

MILLER, M. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data [online]. Website:<http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm>. [accessed 1 November 2011].

MORAES, P. L. R., R. MONTEIRO, AND R. VENCovsky. 1999. Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo, *Revista brasileira de Botânica*, 22: 237-248.

MOREIRA, P. A., G. W. FERNANDES, AND R. G. COLLEVATTI. 2009. Fragmentation and spatial structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry Neotropical tree. *Forest Ecology and Management*, 258: 2690-2695.

NEI, M. 1972. Genetic distance between populations, *American Naturalist*, 106: 283-292.

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

PIRY, S., G. LUIKART, AND J. M. CORNUET. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data, *Journal of Heredity*, 90: 502-503.

PRITCHARD, J. K., AND W. WEN. 2004. Documentation for the STRUCTURE software version 2 [online], Website: http://www.pritch.bsd.uchicago.edu/software/structure2_1.html. [accessed 1 November 2011].

RAJORA, O. P., AND S. A. PLUHAR. 2003. Genetic diversity impacts of Forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in black spruce. *International Journal of Plant Science*, 163: 151-158.

RANTA, P., T. BLOM, J. NIEMELÄ, E. JOENSUU, AND M. SIITONEN. 1998. The fragmented Atlantic Rainforest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments, *Biodiversity and conservation*, 7: 385-403.

- RAYMOND, M., AND F. ROUSSET. 1995. Genepop (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity*, 86: 248-249.
- REITZ, R., R. M. KLEIN, A. REIS. 1988. Projeto madeira do Rio Grande do Sul. Herbário Barbosa Rodrigues, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
- RIBEIRO, M. C., J. P. METZGER, A. C. MARTESSEN, F. J. PONZONI, AND M. M. HIROTA. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation, *Biological conservation*, 142: 1141-1153.
- RUAS, E. A., CONSON, A. R. O., COSTA, B. F., DAMASCENO, J. O., RODRIGUES, L. A., RECK, M., VIEIRA, A. O. S., et al. 2009. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart.(Malvaceae) and intergeneric transferability: *Conservation Genetics Resources*, 1: 245-248.
- RUSCHEL, A. R., F. BERNARD, R. O. NODARI, AND B. M. MOERSCHBACHER. 2009. Estado genético de *Sorocea bonplandii* na fragmentada floresta no sul do Brasil, *Scientia Forestalis*, 37: 151-161.
- SHEPHERD, L. D., AND L. R. PERRIE. 2011. Microsatellite DNA analyses of a highly disjunct New Zealand tree reveal strong differentiation and imply a formerly more continuous distribution. *Molecular Ecology*, 20: 1389-1400.
- SILVA, A. F. DA, R. V. DE OLIVEIRA, N. R. L. SANTOS, AND A. DE PAULA. 2003. Composição florística e grupos ecológicos das espécies de um trecho de floresta semidecídua submontana da fazenda São Geraldo, Viçosa-MG, *Revista Árvore*, 27: 311-319.
- SILVA, D. C. G. DA, M. C. DE CARVALHO, C. MEDRI, M. E. MEDRI, C. DE F. RUAS, E. A. RUAS, AND P. M. RUAS. 2012. Genetic Structure and diversity of brazilian tree species from fragments and riparian woods; In press.
- SOKAL, R. R., AND C. D. MICHENER. 1958. A statistical method for evaluation systematic relationships. *University Kansas Science Bulletin*, 38: 1409-1438.

TANAKA, J. C. A., C. C. SILVA, B. P. D. FILHO, C. V. NAKAMURA, J. E. CARVALHO, AND M. A. FOGLIO. 2005. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* MART. (Tiliaceae), *Quimica Nova*, 28: 834-837.

VIBRANS, A. C., A. UHLMANN, L. SEVEGNANI, M. MARCOLIN, N. NAKAGIMA, C. R. GRIPPA, E. BROGNI, AND M. B. GODOY. 2008. Ordenação dos dados de estrutura da floresta ombrófila mista partindo de informações do inventário florístico-florestal de Santa Catarina: resultados de estudo-piloto. *Ciência Florestal*, 18: 511-523.

VICTOR, M. A. M., A. C. CAVALLI, J. R. GUILLAUMON, AND R. S. FILHO. 2005. Cem anos de devastação: revisitada 30 anos depois, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Brazil.

WILSON, G. A., AND B. RANNALA. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, 163: 1177-1191.

WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.

YEH, F. C., R. C. YANG, AND T. BOYLE. 1999. Popgene: version 1.31. microsoft window-based freeware for population genetics analysis [online]. Website:<http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf>. [accessed 1 November 2011].

YOUNG, A., T. BOYLE, AND A. H. D. BROWN. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11: 413-418.

REFERÊNCIAS

- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP; **Botany Journal Linnean Society**, v.141, p.399-436, 2003.
- ANJOS, L.; Bird communities in five atlantic forest fragments in southern Brazil. **Ornitologia Neotropical**, v.12, p.11-27, 2001.
- ARIF, I.A.; KHAN, H.A.; SHOBRAK, M.; AL HOMAIDAN, A.A.; AL SADOON, M.; AL FARHAN, A.H.; BAHKALI, A.H.; Interpretation of electrophoretograms of seven microsatellite loci to determine the genetic diversity of the *Arabian Oryx*. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.1, p.259-265, 2010
- AYRES, M.; AYRES, Jr.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S.; BioEstat. Versão 5.0, **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, Belém: Pará, Brasi, 2007.
- BACHA, C.J.C.; BARROS, A.L.M.B.; Reflorestamento no Brasil: evolução recente e perspectivas para o futuro. **Scientia Forestalis**, v.66, p.191-203, 2004.
- BACKES, P.; IRGANG, B.; **Árvores do Sul. Guia de identificação & interesse Ecológico. As principais espécies nativas sul-brasileiras**. Santa Cruz do Sul, Instituto Souza Cruz, p.326, 2002
- BANHOS, A.; HRBECK, T.; GRAVENA, W.; SANAIOTTI, T.; FARIAS, I.P.; Genomic resources for the conservation and management of the harpy eagle (*Harpia harpyja*, Falconiformes, Accipitridae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.146-154, 2008.
- BARRET, S.C.H.; KOHN, J.R.; Genetic and evolutionary consequences of small populations size in plants: implications for conservation. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E.(Ed.); **Genetic and conservation of rare plants**, New York: Oxford University Press, p.3-30, 1991.
- BEHLING, H.; Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the *Araucaria* forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil), **Palaeobotany and Palynology**, v.97, p.109-121, 1997.
- BIGHETTI, A.E.; CARVALHO, J.E.; ANTÔNIO, M.A.; FOGLIO, M.A.; POSSENTI, A.; Efeitos da administração aguda e subcrônica da *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini, **Lecta Brasil**, v.22, p.53-58, 2004.
- BONIFACINO, M.; **Grewiaceae: *Luehea divaricata***, 2006, Disponível em: <http://www.naturekind.org/imgs/mbonifa/r/Grewiaceae_Luehea_divaricata_22969.html>.
- BRADSHAW, C.J.A.; SODHI, N.S.S.; BROOK, B.W. Tropical turmoil: a biodiversity crisis in progress, **Front. Ecol. Environmental**, v.7, p.79-87, 2009.
- BROWN, A.H.D.; Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation, **Theoretical and Applied Genetics**, v. 52, p.145-157, 1978.

BROWN, A.H.D.; Genetic characterization of plant mating systems. In: BROWN, A.H.D., CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S.(Ed.); **Plant population genetics, breeding, and genetic resources**, Sunderland: Sinauer Associates, p.145-162, 1990.

BUSO, G.S.C. **Análise genética de espécies silvestres de arroz (*Oryza spp*) nativas do Brasil: estrutura de populações, diversidade genética e relações filogenéticas utilizando marcadores moleculares**. Tese (Doutorado, Biologia Molecular), p.324, 1998.

CÂMARA, I. DE G.; Breve história da conservação da Mata Atlântica. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. DE G.(Ed.); **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**, 1ª Ed., Belo Horizonte, Fundação SOS Mata Atlântica, p.31-42, 2005.

CARNAVAL, A.C.; KICKERSON, M.J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C.; Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot, **Science**, v.323, p.785-789, 2009.

CARVALHO, M.C.C.G. de; SILVA D.C.G. da; RUAS, P.M.; MEDRI, M.E.; RUAS, E.A.; RUAS, C.F.; Flooding tolerance and genetic diversity in populations of *Luehea divaricata*, **Biologia Plantarum**, v.52, p.774-778, 2008.

CARVALHO, P.E.R.; **Espécies Arbóreas Brasileiras**, Ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.1, p.1039, 2003.

CASTANHO, G.G.; **Avaliação de dois trechos de uma floresta estacional semidecidual restaurada por meio de plantio, com 18 e 20 anos, no sudeste do Brasil**, (Dissertação), Piracicaba, p.111, 2009.

CECONI, D.E.; POLETTI, I.; BRUN, E.J.; LOVATO, T.; Crescimento de mudas de Açotacavallo (*Luehea divaricata* Mart.) sob influência da adubação fosfatada, **Cerne**, v.12, n.3, p.292-299, 2006.

CHAN, C.H.; ZHAO, Y.; CHEUNG, M.Y.; CHAMBERS, G.K.; Isolation and characterization of microsatellites in the kakorori (*Pomarea dimidiata*) using feathers as source of DNA. **Conservation Genetics**, v.9, p.1067-1070, 2008.

CHIRAS, D. D.; **Environmental sciences**, 8ª edição, Jones and Bartlett Publishers, p.632, 2010.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D.; Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci, **Molecular Ecology**, v.10, p.349-356, 2001.

CORLETT, R.T.; TURNER, I.M.; Long term survival in tropical forest remnants in Singapore and Hong Kong. In: LAURENCE, W.F.; BIERREGAARD, R.O. Jr.; (Eds). **Tropical forest remnants-ecology, management, and conservation of fragmented communities**. Chicago University of Chicago Press, p.333-345, 1997.

CROW, J.F.; KIMURA, M.; Evolution in sexual and asexual populations. **American Naturalist**, v.99, p.439-450, 1965.

DEBOUT, G.D.G.; DOUCET, J-L.; HARDY, O.J.; Population history and gene dispersal inferred from spatial genetic structure of a Central African timber tree, *Distemonanthus benthamianus* (Caesalpinioideae), **Heredity**, v.106, p.88-99, 2011.

DICK, C.W.; HARDY, O.J.; JONES, F.A.; PETIT, R.J. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees, **Tropical Plant Biology**, v.1, p.20-33, 2008.

ELLEGREN, H.; Microsatellite: single sequences with complex evolution. **Nature**, v.5, p.435-445, 2004.

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

EXCOFFIER L.; LAVAL G.; SCHNEIDER S.; Arlequin (Version 3.1): An integrated software package for population genetics data analysis, **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

FARIAS, J. A. de; **Contribuição para a silvicultura de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini (Açoita-cavalo)**, Santa Maria, RS (dissertação), p.70, 2006.

FARIAS, J.A. de; Contribuição para a silvicultura de *Luehea divaricata* Martius et Zuccarini (Açoita-cavalo). **Caderno de Pesquisa, série Biologia**. v.21, n.2, p.6-19, 2009.

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D.; **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA – CENARGEM, p.220, 1996.

FONSECA, C.R.; GANADE, G.; BALDISSERA, R.; BECKER, C.G.; BOELTER, C.R.; BRESCOVIT, A.D.; CAMPOS, L.M.; FLECK, T.; FONSECA, V.S.; HARTZ, S.M.; JONER, F.; KÄFFER, M.I.; LEAL-ZANCHET, A.M.; MARCELLI, M.P.; MESQUITA, A.S.; MONDIN, C.A.; PAZ, C.P.; PETRY, M.V.; PIOVENSAN, F.N.; PUTZKE, J.; STRANZ, A.; VERGARA, M.; VIEIRA, E.M.; Towards an ecologically-sustainable forestry in the Atlantic Forest, **Biological Conservation**, v.142, p.1209-1219, 2009.

FONSECA, G.A.B.da; The vanishing Brazilian Atlantic Forest, **Biological Conservation**, v.33, p.1-18, 1985.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A.; **Fundamentos de Genética da Conservação**, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

FUTUYMA, D.J.; **Biologia evolutiva**, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p.631, 1992.

FUTUYMA, D.J.; **Evolution**, Sinauer Associates, Inc, Sunderland, p.603, 2005.

GALINDO-LEAL C.; CÂMARA, I. DE G.; Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. DE G. (Editores); **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**, 1ª Ed., Belo Horizonte, Fundação SOS Mata Atlântica, p.3-11, 2005.

GHAZOUL, J. Pollen and seed dispersal amongdispersed plants. **Biological Review**, 80:413-443., 2005

GOUDET, J.; 2001. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversity and fixation indices, version 2.9.3.2**. Disponível em: <<http://www2.unil.ch/popgene/softwares/fstat.htm>>.

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

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T.A.; A novel repeat element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionary diverse eucariotic genomes. **Proceedings National Academy Science United States America**, Washington, v.79, p.6465-6469, 1982.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHNEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRIDE, B.; THOMAS, L.(Ed.); **Genetics and conservation**, Menlo Park: The Benjamin/Cummings Publishing Company, p.335-348, 1983.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; Allozyme diversity in plant species. In: BROWN A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S.; (Editors). **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Ed. Sinauer Associates, Sunderland, p.43-63, 1989.

HARTL, D.L; CLARK, A.G.; **Principles of population genetics**. Sunderland Massachussets: Sinauer Associates, 3^aed., p.682,1997.

HORN, H. S., NATHAN, R., KAPLAN, S. R. Long-distance dispersal of tree seeds by wind. **Ecological Resource**, .16, p.877-885, 2001

HUBISZ, J.M.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K.; **Inferring weak population structure with the assistance of sample group information**. *Molecular Ecology Resources*, v.9, p.1322-1332, 2009.

HUENNEKE, L.F.; Ecological implication of genetic variation in plant population. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E.; (Editors). **Genetics and conservation of rare plants**. Oxford University press, Oxford. p.31-44, 1991.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatístico). Mapa de vegetação do Brasil. 1988.

Instituto de Estudos Sócioambientais do Sul da Bahia (IESB), Instituto de Geociências da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IGEO/UFRJ), Departamento de Geografia da Universidade Federal Fluminense (UFF), **Levantamento da Cobertura Vegetal Nativa do Bioma Mata Atlântica**, Relatório Final, Brasília, p.84, 2007.

JIMÉNEZ, A.; HOLDEREGGER, R.; CSENCSICS, D.; QUINTALILLA, L.G.; Microsatellites reveal substantial among-population genetic differentiation and strong inbreeding in the relict fern *Dryopteris aemula*, **Annals of Botany**, v. 106, p.149-155, 2010.

JONES, C. J.; EDWARDS, K. J.; CASTAGLIONE, S.; WINFIELD, M. O.; SALA, F.; WIEL, C. VAN DE, BREDEMEIJER, G.; VOSMAN, B.; MATTHES, M.; DALY, A.; BRETTSCHEIDER, R.; BETTINI, P.; BUIATTI, M.; MAESTRI, E.; MALCEVSCHI, A.; MARMIROLI, N.; AERT, R.; VOLCKAERT, G.; RUEDA, J.; LINACERO, R.; VAZQUEZ, A.; and KARP, A.; Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories; **Molecular Breeding**, v.3, p.381-390, 1997.

KARASAWA, M. M. G.; **Análise da estrutura genética de populações e sistema reprodutivo de *Oryza glumaepatula* por meio de microssatélites**. Tese (Doutorado, Agronomia); Piracicaba, p.91, 2005.

KAWKA, M.; HORBANCZUK, J. O.; SACHARCZUK, M.; ZIEBA, G.; Genetic characteristics of the Ostrich population using molecular methods. **Poultry Science**. v.86, p.277-281, 2007.

KOCH, Z.; CORRÊA, M.C.; **Araucária: A floresta do Brasil Meridional**, Olhar Brasileiro Editora, Curitiba, 2002.

LI, Y.; WONGPRASERT, K.; SHEKHAR, M.; RYAN, J.; Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. **Aquaculture**. v.266, p.279-288, 2007.

LORENZI, H.; **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, 2ª ed. Plantarum, Nova Odessa, 2002.

LOWE, A.J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C.F.E.; NAVARRO, C.; Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, v.95, p.255-273, 2005.

MARTINS, K.; DOS SANTOS, J.D.; GAIOTTO, F.A.; MORENO, M.A.; KAGEYAMA, P.Y.; Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae – Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica** v.31, n.1, p.61-69, 2008.

MEDEIROS, J.de D.; SAVI, M.; de BRITO, B.F.A.; Seleção de áreas para criação de unidades de conservação na floresta ombrófila mista. **Biotemas**, v.18, n.2, p.33-50, 2005.

MILLER, M.; 1997. Toos for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Department of Fisheries and Wildlife, Utah State University, Logan, UT, USA. Disponível em:<<http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm>>.

MORAES, P.L.R.; MONTEIRO, R.; VENCOSKY, R.; Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo, **Revista brasileira de Botânica**, v.22, n.2, p.237-248, 1999.

MOREIRA, P.A., FERNANDES, G.W., COLLEVATTI, R.G. Fragmentation and spatial structure in *Tabebuia ochracea* (Bignoniaceae) a seasonally dry Neotropical tree. **Forest Ecology and Management**, v.258, n.258, p.2690-2695, 2009.

- MOREIRA, R.F.C.; **Estrutura genética de populações de *Crinipellis erniciosa* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR.** Tese (Doutorado, Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, p.117, 2006.
- MORELLATO, L.P.C.; HADDAD, C.F.B.; Introduction: The Brazilian Atlantic Forest, **Biotropica**, v. 32, n.4b, p.786-792, 2000.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J.; Biodiversity hotspots for conservation priorities, **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.
- NEI, M.; Genetic distance between populations, **Am. Nat.**, v.106, p.283-292, 1972.
- NEI, M.; Analysis of gene diversity in subdivided populations, **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.70, n.12, p.3321-3323, 1973.
- NEI, M.; Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, p.583-590, 1978.
- OLIVEIRA-FILHO, A.R.; FONTES, M.A.L.; Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate, **Biotropica**, v.32, n.4b, p.793-810, 2000.
- OLIVEIRA, R.J.; MANTOVANI, W.; MELO, M.M.R.F.; Estrutura do Componente Arbustivo-Arbóreo da Floresta Atlântica de Encosta, Peruíbe, SP, **Acta Botanica Brasilica**, v.15, n.3, p.391-412, 2001.
- PERCEQUILLO, A.R.; WEKSLER, M.; COSTA, L.P.; A new genus and species of rodent from the Brazilian Atlantic Forest (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae: Oryzomyini), with comments on oryzomyine biogeography, **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.161, p.357-390, 2011.
- PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J.M.; BOTTLENECK: 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.
- POR, F.D.; Sooretama the Atlântic Rain Forest of Brazil, **SBP Academic Publishing bv**, p.130., 1992.
- PRITCHARD, J.K.; WEN, W.; Documentation for the STRUCTURE software version 2. Chicago, 2004. Disponível em:
<http://www.pritch.bsd.uchicago.edu/software/structure2_1.html>
- RAJORA, O.P., PLUHAR, S.A. Genetic diversity impacts of Forest fire, forest harvesting, and alternative reforestation practices in Black spruce. **International Journal of Plant Science**, v.163, p.151-158, 2003.
- RANTA, P.; BLOM, T.; NIEMELÄ, J.; JOENSUU, E.; SIITONEN, M.; The fragmented atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments, **Biodiversity and conservation**, v.7, p.385-403, 1998.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F.; Genepop (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of heredity**, v.86, n.3, p.248-249, 1995.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A.; **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Herbário Barbosa Rodrigues; Secretaria da Agricultura e Abastecimento-DRNR, p.525, 1988.

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

RICHARDS, A. J. **Plant breeding systems** 2ª edição, Londres: Chapman & Hall, p.529, 1997.

ROCHA, R.B.; Evolução e perspectivas dos usos da terra na Mata Atlântica In: FRANKE, C.R.; da ROCHA, P.L.B.; KLEIN, W.; GOMES, S.L. (Editores); **Mata Atlântica e biodiversidade**, 1ª Ed., Salvador, Edufba, p.223-241, 2005

RODRIGUES, R.R.; BRANCALION, P.H.S.; ISERNHAGEN, I.; **Pacto pela restauração da mata atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal**, Instituto Bioatlântica, p.256, 2009.

RUAS, E.A.; CONSON, A.R.O.; COSTA, B.F.; DAMASCENO, J.O.; RODRIGUES, L.A.; RECK, M.; VIEIRA, A.O.S.; RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart.(Malvaceae) and intergeneric transferability: **Conservation Genetics Resources**, p.245-248, 2009.

RUSCHEL, A.R.; BERNARD, F.; NODARI, R.O.; MOERSCHBACHER, B.M.; Estado genético de *Sorocea bonplandii* na fragmentada floresta no sul do Brasil, **Scientia Forestalis**, v.37, n.32, p.151-161, 2009.

RYBERG, W. A.; FITZGERALD, L. A.; HONEYCUTT, R. L.; CATHEY, J. C.; Genetic relationships of American alligator populations distributed across different ecological and geographic scales. **Journal of Experimental Zoology**. v.294, p.325-333, 2002.

SAINUDIIN R.; DURRETT, R.; AQUADRO, C.F.; NIELSEN, R.; Microsatellite Mutation Models: Insights From an Comparison of Humans and Chimpanzees, **Genetics**, v.168, p.383-395, 2004.

SALVADOR, J.do L.G.; Comportamento de espécies florestais nativas em áreas de depleção de reservatórios, **IPEF**, v.33, p.73-78, 1986.

SCHLOTTERER, C.; TAUTZ, D.; Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, Eynsham, v.20, p.211-215, 1992.

SCIPIONI, C.M.; **Açoita-cavalo**, 2011, Disponível em:

<http://w3.ufsm.br/herbarioflorestal/especie_detalhes.php?nome_filtrado=acoita_cavalo&PH PSESSID=d37c5219af8b2956ce486f77486ac3f0>

SHEPHERD, L.D.; PERRIE, L.R.; Microsatellite DNA analyses of a highly disjunct New Zealand tree reveal strong differentiation and imply a formerly more continuous distribution. **Molecular Ecology**, v.20, p.1389-1400, 2011.

SILVA, A.F. da; OLIVEIRA, R.V. de; SANTOS, N.R.L.; PAULA, A. de; Composição florística e grupos ecológicos das espécies de um trecho de floresta semidecídua submontana da fazenda São Geraldo, Viçosa-MG, **Revista Árvore**, v.27, n.3, p.311-319, 2003.

SILVA, D.C.G. da; CARVALHO M.C.C.G. de; MEDRI C.; MEDRI, M.E. RUAS, C.F.; RUAS, E.A.; RUAS, P.M.; Genetic Structure and diversity of brazilian tree species from fragments and riparian woods; In press, 2012

SILVERTOWN, J.W.; DOUST, J.L. **Introduction to plant population biology**, Oxford: Blackwell Science, p.210, 1993.

SKOLE, C.L.; TUCKER, C.; Tropical deforestation and habitat fragmentation in the Amazon: satellite data from 1978 to 1988, **Science**, v.260, p.1905-1910, 1993.

SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D.; A statistical method for evaluation systematic relationships. **University Kansas Science Bulletin**, v.38, n.22, p.1409-1438, 1958.

SOUZA, S.A.M.; CATTELAN, L.V.; VARGAS, D.P.; PIANA, C.F. DE B.; BOBROWSKI, V.L.; ROCHA, B.H.G.; Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul sobre a germinação de sementes de alface, **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v.11, p.29-38, 2005.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W.; A riqueza de espécies arbóreas na floresta atlântica de encosta no estado de São Paulo (Brasil), **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n.2, p.217-223, 1999.

TANAKA, J.C.A; SILVA, C.C; FILHO, B.P.D; NAKAMURA, C.V.; CARVALHO, J.E.; FOGGIO, M.A.; Constituintes químicos de *Luehea divaricata* MART. (Tiliaceae), **Química Nova**, v.28, n.5, p.834-837, 2005.

TEIXEIRA, A.M.G.; SOARES-FILHO, B.S.; FREITAS, S.R.; METZGER, J.P.; Modeling landscape dynamics in an Atlantic Rainforest region: Implications for conservation, **Forest Ecology and Management**, v.257, p.1219-1230, 2009.

VARJABEDIAN, R.; Atlântic Rainforest Law: Environmental Regression, **Estudos Avançados** v.24, n.68, p.147-160, 2010.

VIBRANS, A.C.; UHLMANN, A.; SEVEGNANI, L.; MARCOLIN, M.; NAKAGIMA, N.; GRIPPA, C.R.; BROGNI, E.; GODOY, M.B.; Ordenação dos dados de estrutura da floresta ombrófila mista partindo de informações do inventário florístico-florestal de Santa Catarina: resultados de estudo-piloto. **Ciência Florestal**, v.18, n.4, p.511-523, 2008.

VICTOR, M.A.M.; CAVALLI, A.C.; GUILLAUMON, J.R.; FILHO, R.S.; **Cem anos de devastação: revisitada 30 anos depois**, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, p.72, 2005.

WILSON, E.O. Diversidade da vida, São Paulo, **Cia das Letras**, p.447, 1994.

WILSON, G.A.; RANNALA, B.; Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. **Genetics**. v.163. p.1177-1191, 2003.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian population. **Genetics**, v.16, p.97-159, 1931.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v.15, p.323-354, 1951.

YEH, F.C., YANG, R.C., BOYLE, T. 1999. **Popgene: version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for population genetics analysis**. Disponível em: <<http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf>>.

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