



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE DO PARANÁ

CAMPUS LUIZ MENEGHEL

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

BRUNA DELGADO GÓES

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS (ANACARDIACEAE) AO
LONGO DA BACIA DO RIO LARANJINHA.**

**BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2014**

BRUNA DELGADO GÓES

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS (ANACARDIACEAE) AO
LONGO DA BACIA DO RIO LARANJINHA.**

Dissertação apresentada ao Programa
de Mestrado em Agronomia, da
Universidade Estadual do Norte do
Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Medri
Coorientadora: Prof. Dra. Mayra Costa
da Cruz Gallo de Carvalho

**BANDEIRANTES, PR, BRASIL
2014**

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G598e Góes, Bruna Delgado.

Estrutura genética de populações de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) ao longo da Bacia do Rio Laranjinha / Bruna Delgado Góes. – Bandeirantes, 2014. 58 f. : il.

Orientador: Cristiano Medri.

Coorientador: Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Mestrado em Agronomia, 2014. Inclui bibliografia.

1. Anacardiaceae – Teses. 2. Marcadores biológicos – Teses. 3. Genética de populações – Teses. 4. Florestas – Conservação – Teses. I. Medri, Cristiano. II. Carvalho, Mayra Costa da Cruz Gallo de. III. Universidade Estadual do Norte do Paraná. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Mestrado em Agronomia. IV. Título.

CDU 582.765

BRUNA DELGADO GÓES

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS (ANACARDIACEAE) AO
LONGO DA BACIA DO RIO LARANJINHA.**

Dissertação apresentada ao Programa
de Mestrado em Agronomia, da
Universidade Estadual do Norte do
Paraná, *Campus* Luiz Meneghel.

Aprovada em: 01/08/2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Cristiano Medri	UENP
Prof. Dr. Sandremir de Carvalho	UENP
Dr. Eduardo Augusto Ruas	UEL
Prof. Dra. Teresinha Esteves da Silveira Reis	UENP
Prof. Dr. Paulo M. Ruas	UEL

Prof. Dr. Cristiano Medri
Orientador
Universidade Estadual do Norte do Paraná,
Campus Luiz Meneghel

Dedico esta dissertação a minha família
e a todos que contribuíram para a
realização da mesma.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Cristiano Medri pela orientação, amizade, dedicação e compreensão para a realização deste trabalho e também pela paciência nas coletas de campo.

À Prof. Dra. Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho pela coorientação e amizade.

À coordenadora do Programa de Mestrado em Agronomia, Prof. Dra. Teresinha Esteves da Silveira Reis, aos professores e à Soninha, pela competência, paciência e amizade.

Aos alunos da primeira turma do Programa de Mestrado em Agronomia da Universidade Estadual do Norte do Paraná – *Campus* Luiz Meneghel, pela amizade, respeito e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Sandremir de Carvalho pela ajuda inestimável nos testes com microssatélite, por disponibilizar seu laboratório e pela amizade.

A todos do Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas da Universidade Estadual de Londrina, por me receberem de forma tão gentil e por me permitirem desenvolver o trabalho, serei eternamente grata.

À todos os meus amigos, obrigada pelo apoio, por sempre acreditarem em mim e por partilharem minhas alegrias e tristezas.

À Mônica e a Rachel, pela amizade e grande ajuda na parte prática deste trabalho.

Aos meus pais, pelo incentivo e amor em todas as minhas escolhas, vocês são meu exemplo.

Aos meus irmãos Caio e Marcus, divido minhas conquistas com vocês.

À minha avó Maria e à minha tia Rossana, por todo apoio e amor em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado Ruan, por todo amor, compreensão, alegria e companheirismo.

E por fim à CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

Direi isso suspirando
Em algum lugar, daqui muito e muito
tempo...
Dois caminhos se separam em um
bosque, e eu...
Eu escolhi o menos percorrido
E isso fez toda a diferença.

Robert Lee Frost

GÓES, Bruna Delgado. **Estrutura genética de populações de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) ao longo da bacia do rio Laranjinha**. 2014. 58 f. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2014.

RESUMO

Schinus terebinthifolius é uma espécie arbórea neotropical de ampla ocorrência no Brasil, desde o estado de Pernambuco até o Rio Grande do Sul. Por ser uma espécie pioneira, agressiva, indiferente às condições físicas do solo e produzir grande quantidade de sementes, é considerada de grande importância na recuperação de áreas degradadas. Sua distribuição ocorre ao longo da Mata Atlântica que, em decorrência da intensa ocupação antrópica e modificação do bioma, encontram-se bastante fragmentada e desconectada. A fragmentação florestal provoca alterações da dinâmica das populações, o que pode levar à perda de diversidade genética. Estudos de genética de populações utilizando técnicas de marcadores moleculares permitem avaliar a estrutura e a variabilidade genética de espécies de árvores em áreas fragmentadas. Com o intuito de contribuir para estratégias de conservação e manejo de espécies arbóreas tropicais, este trabalho teve como objetivo estudar, por meio de marcadores AFLP, a diversidade e a estrutura genética de dez populações de *S. terebinthifolius* obtidas de áreas de planalto e da mata ciliar ao longo do rio Laranjinha – Pr. Três combinações de *primers* seletivos forneceram um total de 821 marcadores. Os valores médios para a porcentagem de locos polimórficos ($%P$) e para o índice de diversidade gênica de Nei (H_s) foram 61,11% e 0,1251, para áreas de planalto; 51,32% e 0,1073, para áreas ciliares; 67,59% e 0,1886 para populações do alto Laranjinha e 44,84% e 0,0773 para populações do baixo Laranjinha, respectivamente. A distribuição da variabilidade genética foi maior dentro das populações (55,08%) que entre as populações (44,92%). A análise da Coordenada Principal mostrou que a maioria das populações estudadas encontra-se estruturadas em dois grupos, populações do alto Laranjinha e populações do baixo Laranjinha, o que também foi confirmado pela análise Bayseana de agrupamentos K e pelo dendrograma, realizado pelo método UPGMA. Não houve diferença significativa de variabilidade genética entre duas diferentes regiões, planalto e rio, de forma que não é possível afirmar que o rio Laranjinha se constitui em um corredor ecológico e genético para as populações de *S. terebinthifolius*.

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

GÓES, Bruna Delgado. **Estrutura genética de populações de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) ao longo da bacia do rio Laranjinha.** 2014. 58 f. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual do Norte do Paraná, *Campus* Luiz Meneghel, Bandeirantes, 2014.

ABSTRACT

Schinus terebinthifolius is a neotropical tree species widely spread in Brazil, from Pernambuco to Rio Grande do Sul. As a pioneering, aggressive species, indifferent to physical conditions of the soil and produce large amounts of seeds, is considered of great importance in the recovery of degraded areas. Distributed along the Atlantic rain forest biome which, due to the intense human occupation and modification of the biome, it is very fragmented and disconnected. Forest fragmentation provokes changes in the population dynamics, which can lead to loss of genetic diversity. Population genetic studies using molecular markers allows the evaluation of plant species genetic structure and the genetic variability of tree species in fragmented areas. Aiming to contribute to strategies for conservation and management of tropical tree species, this paper aimed to study through AFLP markers, the genetic diversity and structure of ten populations of *S. terebinthifolius* from plateau areas and the riparian forest along the Laranjinha river – Pr. Three selective primers combinations made a total of 821 markers. Mean values for polymorphic loci percentage (%P) and the gene diversity index (H_s) were 61.11% and 0.1251, for plateau areas; 51.32% and 0.1073, for riparian areas; 67.59% and 0.1886 for populations of the upper Laranjinha river; 44.84% and 0.0773 for populations of the lower Laranjinha river, respectively. The genetic variability distribution was higher within populations (55.08%) than among populations (44.92%). The Principal Coordinate analysis showed that most of the studied populations were structured into two groups, the upper Laranjinha river populations and the lower Laranjinha river populations, which was also confirmed by Bayesian analysis for the number of K clusters and the dendrogram, constructed by the UPGMA method. There was no significant difference in genetic variability between two different regions, plateau and river, so it can not be said that the Laranjinha river constitutes an ecological and genetic aisle for *S. terebinthifolius* populations.

Keywords: AFLP. Genetic diversity. Neotropical tree species. Forest fragmentation. Conservation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - *Schinus terebinthifolius*: A – folhas; B – árvore adulta; C – flores; D – frutos.....3
- Figura 2** - Mapa comparativo da cobertura florestal do bioma Mata Atlântica....7
- Figura 3** - Região do baixo rio Laranjinha, município de Bandeirantes - Pr.....8
- Figura 4** - Região do alto rio Laranjinha, município de Ventania – Pr.....9
- Figura 5** - Área de coleta de material biológico.....24
- Figura 6** - Diagrama de dispersão entre as distâncias genéticas e geográficas das dez populações de *S. terebinthifolius* analisadas.....34
- Figura 7** - Análise da coordenada principal de dez populações de *S. terebinthifolius*.....35
- Figura 8** - Valores absolutos (ΔK) da distribuição likelihood (LnP (D)) de dez populações de *S. terebinthifolius*, interpretado pelo Structure Harvester.....35
- Figura 9** - Teste de atribuição para dez populações de *S. terebinthifolius* para $K=2$, onde o eixo x representa as populações, e o eixo y, as frequências de participação de cada população no grupo.....36
- Figura 10** - Dendrograma das dez populações de *S. terebinthifolius* mostrando os dois grupos formados e os valores de consistência dos nós.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Localização geográfica das populações de <i>S. terebinthifolius</i> coletadas.....	24
Tabela 2 - Tampão de Extração de DNA.....	25
Tabela 3 - Parâmetros de diversidade genética estimados para dez populações de <i>Schinus terebinthifolius</i> utilizando marcadores AFLP.....	30
Tabela 4 - Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para dez populações de <i>Schinus terebinthifolius</i>	30
Tabela 5 - Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para dez populações de <i>Schinus terebinthifolius</i> separadas em dois grupos por regiões, planalto e rio.....	31
Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para cinco populações de <i>Schinus terebinthifolius</i> em áreas de planalto.....	31
Tabela 7 - Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para cinco populações de <i>Schinus terebinthifolius</i> às margens do curso do rio Laranjinha.....	32
Tabela 8 - Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para cinco populações de <i>Schinus terebinthifolius</i> distribuídas na região do alto Laranjinha.....	32
Tabela 9 - Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para cinco populações de <i>Schinus terebinthifolius</i> distribuídas na região do baixo Laranjinha.....	33

Tabela 10 - Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para dez populações de *Schinus terebinthifolius* separadas em dois grupos por regiões, alto Laranjinha e baixo Laranjinha.....33

Tabela 11 - Valores de distância genética do *Fst* par-a-par, abaixo da diagonal central; e valores de distância geográfica (km), acima da diagonal central, em dez populações de *S. terebinthifolius*.....34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Características da espécie.....	3
2.2 Fragmentação do habitat.....	6
2.3 Consequências genético-evolutivas da fragmentação do habitat.....	11
2.4 Análise da variabilidade genética por marcadores moleculares.....	15
2.4.1 Marcadores AFLP.....	15
3 JUSTIFICATIVA.....	17
4 OBJETIVOS.....	17
4.1 Objetivos gerais.....	17
4.2 Objetivos específicos.....	17
5 ARTIGO.....	19
5.1 Resumo.....	20
5.2 Abstract.....	21
5.3 Introdução.....	22
5.4 Material e Métodos.....	23
5.4.1 Seleção das populações e coleta de material biológico.....	23
5.4.2 Extração e purificação de DNA.....	25
5.4.3 Amplificação de DNA.....	26
5.4.4 Preparo das amostras para eletroforese capilar em sistema automatizado.....	27
5.4.5 Análise dos dados de AFLP.....	27
6 RESULTADOS.....	28
6.1 Diversidade genética.....	28
6.2 Estrutura genética.....	30
7 DISCUSSÃO.....	36

7.1 Diversidade genética em populações de <i>S. terebinthifolius</i>	36
7.2 Estrutura genética das populações de <i>S. terebinthifolius</i>	40
8 CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

As florestas têm importância vital para o equilíbrio ambiental e ecológico do planeta, pois promovem a manutenção do equilíbrio climático, a conservação da biodiversidade e a reciclagem dos solos. Também apresentam enorme importância socioeconômica e cultural, fornecendo inúmeros produtos, desde madeiras, energia, alimentos e remédios, até valores edílicos e turísticos, tais como belas paisagens. Entre as mais importantes funções desempenhadas pelas florestas está a proteção e preservação dos mananciais hídricos. Apesar de sua importância, as florestas encontram-se ameaçadas. Estima-se que cerca de dois terços das áreas florestais de todo o planeta já não existam mais devido ao acelerado desmatamento, estando o Brasil, como o país que mais destrói suas matas (Dietzold e Wendel, 2004). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), responsável por monitorar a cobertura de florestas por países, entre 1999 e 2010, o Brasil ocupou o primeiro lugar no índice de perda de área verde no mundo (Global Forest Resources Assessments - FAO, 2013).

Esse processo de eliminação das florestas resultou num conjunto de problemas ambientais, como a fragmentação de habitats, a extinção de várias espécies da fauna e flora, mudanças climáticas locais, erosão dos solos, eutrofização e assoreamento dos cursos d'água (Ferreira e Dias, 2004).

A fragmentação de habitats é uma das ameaças mais sérias à diversidade biológica, sendo a principal responsável pela alta taxa de extinção atual de espécies, uma vez que causam danos irreversíveis, tais como isolamento, subdivisão e perda de populações, diminuição do fluxo gênico, diminuição da diversidade biológica, aumento e intensificação do efeito de borda no ecossistema, redução na taxa de heterozigose e a erosão genética das espécies (Metzger, 1999).

Diante desta situação, o conhecimento da estrutura genética dessas populações é importante para o fornecimento de subsídios que permitam o estabelecimento de estratégias de conservação das espécies, além de orientar programas de coleta de material para banco de germoplasma e produção de mudas para programas de restauração de ecossistemas degradados (Botrel, 2006).

As matas ciliares se constituem numa formação florestal típica de áreas situadas ao longo dos cursos d'água, sendo importantes para a contenção dos processos erosivos e servindo de refúgio e fonte de alimento para a fauna silvestre e aquática (Barbosa, 1999) além de possibilitar a interligação de fragmentos florestais isolados, facilitando o fluxo gênico vegetal e animal (Metzger, 2010).

Os marcadores genéticos são uma das principais ferramentas para descrever os padrões de variabilidade genética de uma população natural e, com seu uso, é possível avaliar como esta variabilidade encontra-se distribuída dentro e entre as populações (Sebben, 2001). Dentre as técnicas de marcadores moleculares, o AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorfism*) destaca-se pelo grande número de marcadores gerados, grande poder de detecção de variabilidade genética e maior repetibilidade (Vos et al., 1995).

Schinus terebinthifolius (Anacardiaceae), conhecida popularmente por aroeirinha ou aroeira-pimenteira, é uma espécie arbórea, heliófila e pioneira. Ocorre naturalmente no Brasil, Paraguai e nordeste da Argentina (Lorenzi, 2002). É cultivada com fins ornamentais, mas demonstrou ser altamente invasiva. Normalmente, é encontrada em formações florestais secundárias, podendo se desenvolver em qualquer tipo de solo, de secos a úmidos, férteis ou pobres. A espécie é, ainda, tolerante à salinidade, capaz de resistir a inundações, incêndios, secas, com alta capacidade de rebrota (Lenzi e Orth, 2004).

No presente trabalho, foi utilizado o método AFLP a fim de estudar a estrutura genética de cinco populações de *S. terebinthifolius*, distribuídas ao longo das margens do rio Laranjinha, PR; e cinco populações de áreas de planalto, distantes da calha do rio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características da espécie

Schinus terebinthifolius Raddi, conhecida popularmente como aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira e pimenta brasileira, pertence à família Anacardiaceae. (Lenzi e Orth, 2004). A espécie é nativa da América tropical, tendo sido introduzida em vários países do mundo com fins ornamentais, onde atualmente, é considerada planta invasora. Sua dispersão é ampla, ocorrendo desde o estado de Pernambuco até Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, além do Paraguai e nordeste da Argentina (Lorenzi, 2002).

S. terebinthifolius atinge de 5 a 15 metros de altura e possui tronco de 30 a 60 cm de diâmetro, revestido com casca grossa. As folhas são compostas por 7 folíolos, possuem de 3 a 7 centímetros de comprimento e 2 a 3 centímetros de largura (Figura 1). Estudos demonstram a existência de um padrão diferenciado das flores, devido a redução ou aborto do gineceu e redução ou aborto do androceu. Isto torna as flores semelhantes, ou seja, apesar de consideradas diclinas, algumas podem ser monóclinas (Lenzi e Orth, 2004). Segundo Fleig (1987), as panículas masculinas são de maior tamanho, sendo assim, deduz-se à existência de dimorfismo reprodutivo na aroeira-vermelha, estando este fato relacionado a uma possível competição intra-sexual entre os indivíduos masculinos.

A dioicia da espécie torna obrigatória a polinização cruzada, feita por insetos como abelhas, moscas e vespas. A ocorrência de dioicia tem sido estudada por muitos autores, que a consideram um fator seletivo, com a função de evitar a endogamia, podendo essa força seletiva conduzir a uma especialização sexual ou competência sexual (Lenzi e Orth, 2004). Obeso e Retuerto (2002) tratam o dimorfismo sexual como um carácter sexual secundário, reflexo dessa competição entre indivíduos do mesmo sexo, que está diretamente ligado à seleção intra-sexual, à alocação de recursos e aos diferentes ambientes.

Os frutos de *S. terebinthifolius* são drupas globosas de coloração vermelho-brilhante, dispersos pela avifauna (Ibflorestas, 2012). É uma planta perenifólia, heliófila e pioneira, configurando-se como uma espécie de desenvolvimento rápido, com crescimento em pleno sol, alto poder de

regeneração, alta dispersão de sementes, ciclo de vida curto e forte poder de colonização. É comum em beira de rios, córregos, em várzeas úmidas e também em terrenos secos e pobres.

S. terebinthifolius possui inúmeras potencialidades medicinais e fitoquímicas. Alguns de seus metabólitos secundários têm auxiliado no tratamento e cura de males, como inflamações e reumatismos (Lenzi E Orth 2004).

Atualmente, a espécie vem se destacando pelo consumo de seus frutos (pimenta-rosa), cuja demanda tem aumentado muito, tanto no mercado nacional como no internacional, utilizados como condimento alimentar. No entanto, a exploração de seus frutos se restringe à coleta manual em populações naturais, presentes principalmente em áreas de restinga do litoral brasileiro (Lorenzi, 2002).

A espécie destaca-se ecologicamente em programas de restauração de áreas degradadas, tais como restauração de matas ciliares e estabilização de dunas (Kageyama e Gandara, 2000). Seu caráter de pioneirismo, grande plasticidade ambiental e agressividade competitiva, somados à sua tolerância a umidade e boa interação biótica, garantem o sucesso regenerativo em ambientes fortemente edáficos e, também, com influência antrópica, caracterizando-a como uma espécie típica dos estágios pioneiro e secundário inicial e, possivelmente, como uma bioindicadora do carácter edáfico dos ambientes naturais ou antropizados (Lenzi e Orth, 2004).

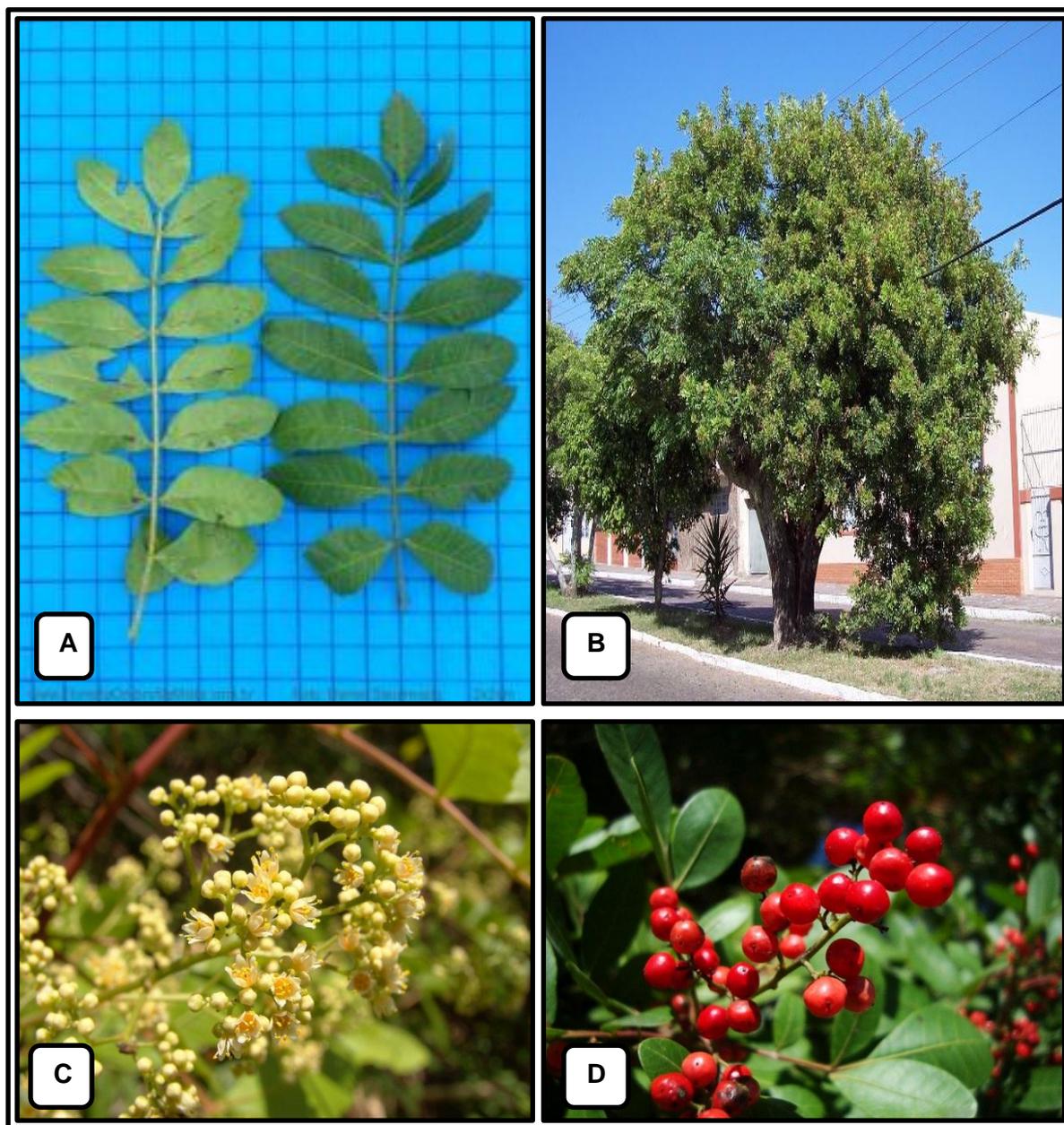


Figura 1. *Schinus terebinthifolius*: A – folhas; B – árvore adulta; C – flores; D – frutos. Fonte: Lorenzi, 2002.

2.2 Fragmentação do habitat

As florestas possuem papel fundamental no ciclo hídrico e do carbono, e também para manutenção da biodiversidade (Bonan, 2008). Recursos prestados pela floresta, como madeiras, resinas, entre outros, e a manutenção do solo e da água, são essenciais para a sociedade (Soja et al., 2007). Apesar de sua grande importância, os ecossistemas florestais enfrentam inúmeras ameaças impostas pela atividade antrópica. Essas ameaças incluem o desmatamento primário, extração predatória de madeira, mudanças climáticas, invasões biológicas e cultivo de espécies exóticas em áreas, originalmente, ocupadas por florestas nativas (Bacles e Jump, 2010).

Tais pressões antropogênicas criam perturbações sem precedentes em habitats florestais, com consequências variando, desde alterações climáticas, até a diminuição da biodiversidade e da diversidade genética (Lamb et al., 2005).

O bioma Mata Atlântica, localizado por toda a costa atlântica brasileira e em planaltos interiorizados, é considerado um dos locais de maior biodiversidade do mundo, estando também entre as mais ameaçadas florestas tropicais, devido aos altos níveis de degradação e de fragmentação de seus ambientes naturais (Pinto et al., 2009). É composto por um conjunto de formações florestais e ecossistemas associados que inclui a Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, também denominada de Mata das Araucárias, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, bem como os manguezais, as vegetações de restingas, os campos de altitude, os brejos interioranos e encraves florestais do Nordeste. (Brasil, Ministério do Meio Ambiente, 2007).

A destruição da Mata Atlântica foi ocasionada pela ocupação humana desordenada. Inicialmente, as florestas nativas foram destruídas pelo extrativismo vegetal e, posteriormente, a atividade agropecuária, a mineração, projetos industriais, hidroelétricas e a acelerada urbanização contribuíram para a devastação do bioma. Com isso, a Mata Atlântica cobre atualmente menos de 10% da área que ocupava antes da chegada dos portugueses em 1500 (Figura 2) (Dean, 1995). O impacto da ocupação humana e o ritmo de destruição desse bioma acentuaram-se durante todo o século 20, resultando

em severas alterações desses ecossistemas, causadas pela alta fragmentação dos habitats e perda de biodiversidade (Brasil, Ministério do Meio Ambiente, 2007). A substituição da vegetação nativa promoveu a perda da biodiversidade e alterações em todo o ecossistema, com alterações no regime climático local, aumento dos processos erosivos dos solos, alterações do ciclo hidrológico, aumento do escoamento superficial e resultante perda na fertilidade dos solos, assoreamento e eutrofização dos rios (Clay, 2004).



Figura 2. Mapa comparativo da cobertura florestal do bioma Mata Atlântica. Fonte: Ministério do Meio Ambiente, 2010.

O Estado do Paraná, pertencente ao domínio do bioma Mata Atlântica e com área total de 199.575 km², apresentava, até o início do século passado, cerca de 83,4% desta área recoberta por florestas. Atualmente, a cobertura florestal natural é inferior a 5% e grande parte desta pertence às florestas da Serra do Mar (Silva et al. apud Dias et al., 1998). No norte do estado, a expansão da fronteira agropecuária, principalmente a partir de 1920, ocasionou um rápido desmatamento de uma, outrora, contínua floresta, processo que fica evidenciado nas últimas décadas pela observação de imagens obtidas de satélites e fotografias aéreas (Barros, 1998). Atualmente, esta região é

composta por áreas agrícolas pontilhadas por milhares de pequenos fragmentos florestais relictuais.

O rio das Cinzas é o principal curso de água doce do norte pioneiro do estado do Paraná. Possui uma extensão de 240 Km e sua bacia abrange uma área de drenagem total de 9.645 Km². O rio Laranjinha faz parte da bacia do rio das Cinzas, sendo o principal afluente da margem esquerda, nascendo no município de Ventania e desaguando no próprio rio das Cinzas, no município de Bandeirantes (Águasparaná, 2012). A bacia do rio das Cinzas caracteriza-se por ter sofrido influência antrópica, apresentando um mosaico de culturas agrícolas, áreas de pecuária, povoamentos de exóticas arbóreas e reduzidos fragmentos remanescentes de vegetação nativa, alterados e em diversos estágios de desenvolvimento sucessional (Blum et al., 2003).

A região do baixo rio Laranjinha (Figura 3), que desagua no rio das Cinzas, caracteriza-se por ser umas das regiões mais devastadas do norte pioneiro; sua cobertura florestal nativa atual é referente a pequenos remanescentes altamente antropizados, onde as atividades agrícolas predominantes no entorno dos mesmos são o cultivo de cana-de-açúcar, soja, milho e trigo, e a, exploração da pecuária extensiva.



Figura 3. Região do baixo rio Laranjinha, município de Bandeirantes – Pr. Fonte: Google Earth, 2014.

A região do alto rio Laranjinha (Figura 4) está inserida na região dos Campos Gerais, paisagem de topografia suavemente ondulada, de solos, em sua maioria, pouco férteis, arenosos e rasos. Por essas particularidades do solo, a região apresenta menor aptidão para as atividades agrícolas, porém, apresenta grande atividade pecuária. A atividade econômica de destaque na região são as indústrias de papel que se desenvolveram a partir da extração das florestas e matas naturais, utilizando-se, atualmente, dos reflorestamentos de pinus, que ocupam grandes extensões de terras na região (IPARDES, 2004). A dinâmica da ocupação do território, nesta região, resultou numa maior presença de fragmentos florestais relictuais (Volpato e Barros, 2001), maiores e mais numerosos, em relação à paisagem do baixo rio Laranjinha.



Figura 4. Região do alto rio Laranjinha, município de Ventania – Pr. Fonte: Google Earth, 2014.

Em todo o norte pioneiro do estado do Paraná, as matas ciliares não escaparam da destruição e foram alvo de todo tipo de degradação. Basta considerar que muitas cidades foram formadas às margens dos rios e o avanço da fronteira agropecuária não respeitou a integridade ecológica destas áreas, levando à eliminação de todo o tipo de vegetação ciliar (Ferreira e Dias, 2004). Ainda, de acordo com Martins (2001), além do processo de urbanização, as matas ciliares sofrem com a pressão antrópica, principalmente pela construção

de hidrelétricas, abertura de estradas e implantação de culturas agrícolas e de pastagens.

Do ponto de vista biológico, estes impactos mostram-se extremamente severos, já que as matas ciliares se constituem em preciosos reservatórios de biodiversidade e têm se mostrado corredores ecológicos extremamente importantes, pois favorecem o fluxo gênico ao longo do rio, devido à intensa circulação de animais e dispersão vegetal nesses locais (Storfer, 2007). Assim, torna-se fundamental o desenvolvimento imediato de estudos genéticos populacionais das espécies que compõem tais áreas, para melhor compreensão da real efetividade do rio e de suas matas ciliares como corredores ecológicos que propiciam o fluxo gênico e para fins de conservação genética (Sebben et al., 2003). Além da capacidade de conectividade entre fragmentos, os corredores ecológicos facilitam a sobrevivência dos organismos durante o fluxo entre as manchas e podem apresentar condições necessárias de habitat temporário ou permanente para algumas populações (Metzger, 2003).

De acordo com Young (1996) uma das principais consequências da fragmentação do habitat é a redução da troca de alelos entre populações, com consequente redução da diversidade genética e aumento da endogamia.

A fragmentação florestal provoca a diminuição do número de indivíduos de uma população, favorecendo a perda de variação genética. A população remanescente passa a ter um tamanho menor que o mínimo adequado para que a mesma possa ter sua normal continuidade e evolução. Nessa população pequena pode ocorrer, em curto prazo, deriva genética, o que significa ter as frequências de seus genes afastadas daquelas da população original, inclusive com perda de alelos. Em longo prazo, pode haver aumento da endogamia, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e acasalamento entre indivíduos aparentados (Kageyama et al., 1998). Segundo Eldridge e Griffin (1983), a redução do tamanho das populações ocasiona efeitos deletérios sobre a sobrevivência e vigor das espécies florestais arbóreas.

A excessiva fragmentação das populações submete-as a um acentuado efeito de borda e à redução do seu tamanho efetivo (Viana et al., 1992). Quando ocorre diminuição no tamanho da população, apenas uma amostra original dos indivíduos e seus genes irão sobreviver. A gravidade da perda

genética associada com uma redução súbita do tamanho da população, denominado “gargalo”, depende de quão severa é a redução do tamanho populacional (Barret e Kohn,1991). O pequeno tamanho efetivo das populações nos fragmentos torna as futuras gerações cada vez mais frágeis, devido ao aumento da endogamia, à perda de alelos pelo efeito da deriva genética (SHIMIZU et al., 2000) e devido ao aumento da diferenciação genética entre as populações (Ellstrand e Elam, 1993). Apesar de alelos raros serem perdidos em primeiro lugar, a deriva continua atuando por muitas gerações, resultando na perda de alelos mais comuns, e isso pode causar uma grave depleção da diversidade genética (Lande, 1988). Ainda, segundo Fucks e Hamrick (2010), estudos realizados em populações fragmentadas, de espécies de árvores ecologicamente importantes, mostraram que a fragmentação provoca diminuição ou interrupção do fluxo gênico, pela diminuição das taxas de visita de insetos polinizadores e animais dispersores de sementes, o que, em último caso, altera a estrutura genética populacional.

Espécies arbóreas neotropicais, frequentemente, apresentam fecundação cruzada, com extenso fluxo gênico e altos níveis de variabilidade genética populacional. Tais espécies, comumente, apresentam baixa densidade populacional, o que pode se dar como uma característica intrínseca da espécie ou como consequência da fragmentação do habitat. Deste modo, são altamente dependentes da polinização animal e apresentam sistema de acasalamento misto, de modo que possuem maior diversidade genética entre populações do que as espécies temperadas (Dick et al.,2008).

2.3 Consequências genético-evolutivas da fragmentação do habitat

Espécies ameaçadas de extinção são, frequentemente, caracterizadas por pequenos tamanhos populacionais, distribuição geográfica limitada, e/ou encontradas em habitats específicos (Soulé, 1986). Muitas espécies ameaçadas sofrem redução no tamanho populacional devido à exploração, fragmentação e redução do habitat. Tais alterações podem ter consequências, tanto demográficas quanto genéticas. A perda da variabilidade genética em populações ameaçadas pode afetar a capacidade das mesmas de se adaptar a novas condições ambientais (Huennek, 1991), diminuir a viabilidade e limitar as

oportunidades de evolução. Tal perda pode se dar por processos genético-evolutivos, como a depressão endogâmica, a deriva genética e o gargalo genético.

A depressão endogâmica é considerada um dos mais importantes processos resultantes da perda de habitat, pois ocorre um aumento de cruzamentos endogâmicos e conseqüente perda de variabilidade genética (Simberloff et al., 1992). O cruzamento entre indivíduos aparentados é denominado endocruzamento. Uma população é chamada de endogâmica se a probabilidade da progênie herdar duas cópias gênicas que são idênticas por descendência for maior do que seria esperado por acasalamento puramente aleatório (Futuyma, 1997). Essa probabilidade pode ser maior, não apenas se há cruzamentos consanguíneos preferenciais, mas também pela redução no tamanho populacional, pois em populações pequenas aumenta a probabilidade de cruzamentos entre indivíduos aparentados (Beiguelman, 1995).

A deriva genética é o processo de flutuações aleatórias na frequência alélica de uma população finita. É medida pela frequência de variação alélica por geração ou pela taxa de perda de heterozigosidade (Lande & Barrowclough, 1987).

Segundo Beiguelman (1995), há uma diferença importante entre a perda de variabilidade genética provocada por endocruzamento e deriva genética. No primeiro, não há perda de alelos, são alteradas apenas as frequências genotípicas, com o aumento da frequência de indivíduos homozigotos na população e redução dos heterozigotos. No segundo, há uma flutuação aleatória na frequência dos alelos, devido a redução do tamanho populacional, e isso pode acarretar em fixação ou perda de alelos através das gerações.

O tamanho das populações varia no decorrer do tempo de forma aleatória. Esta aleatoriedade demográfica pode gerar reduções populacionais importantes, quando consideradas as características genéticas das populações. O processo que leva a perda de diversidade gênica decorrente de baixas populacionais é chamado de gargalo genético. A perda de variabilidade genética pelo processo de gargalo genético ocorre pela diminuição da variação alélica, porém a heterozigosidade continua relativamente a mesma (Ellstrand e Elam, 1993).

Por outro lado, dependendo do modo de colonização, desde a sua origem, uma população pode apresentar baixa variabilidade genética. Quando poucos indivíduos colonizam um novo ambiente, a variabilidade genética, em termos de diversidade alélica, na população formada, será determinada pela variabilidade existente nos fundadores. O efeito fundador, portanto, refere-se à baixa variabilidade presente em populações que foram originadas de um restrito número de migrantes e, conseqüentemente, com uma restrita variabilidade genética. Este princípio também pode ser aplicado a qualquer população que passe por um acentuado gargalo genético (Futuyma, 1992).

A variabilidade genética é de importância fundamental para o potencial evolutivo de uma espécie e determina suas chances de sobrevivência em longo prazo (Jones et al., 2001). Populações com baixa variabilidade genética podem ser incapazes de responder às mudanças ambientais (Sharma et al., 2000), de maneira que a baixa variabilidade genética pode conferir grande ameaça à existência das espécies (Jaggi et al., 2000).

Populações com níveis elevados de diversidade genética podem servir como fontes potenciais de propágulos e reservatório de variabilidade genética e assim, são importantes alvos de conservação. Inversamente, populações contendo pouca variabilidade genética podem ser candidatos a introdução de uma nova variação genética (Lande e Barrowclough, 1987).

Por outro lado, a condição de pequena variabilidade genética não necessariamente implica em risco de extinção, e tal condição pode não ter sido causada pela ação antrópica. Muitos endemismos, por exemplo, podem ser explicados por refúgios de glaciações ou outros processos naturais (Futuyma, 1997). Muitas espécies apresentam, naturalmente, baixa variabilidade genética ou populações reduzidas e com distribuição muito restrita, desde que as condições ambientais mantenham-se constantes (Coates, 2001).

Independente do padrão de diversidade genética de cada espécie, a manutenção da variabilidade genética é essencial para a preservação do potencial evolutivo das espécies, para sua sobrevivência em longo prazo, assim como para a aplicação de técnicas de manejo florestal e estabelecimento de ações de conservação (Kageyama, 1993).

Algumas características podem favorecer o funcionamento das matas ciliares como corredores ecológicos e genéticos. Estas formações são

protegidas por lei na forma de APPs (áreas de preservação permanente), o que as torna, comumente, melhor conservadas e menos fragmentadas do que florestas não protegidas legalmente, distantes das margens de corpos d'água. Esta proteção se dá ao longo de todo o rio, o que, em tese, deveria proporcionar um corredor contínuo de vegetação, desde a nascente, até a foz. Ainda, as características fisiográficas da bacia, geralmente, resultam em maiores barreiras, como montanhas e outros acidentes geográficos, distantes do rio.

Por outro lado, o vale do mesmo, em teoria, pode formar um corredor sem maiores barreiras físicas, o que pode facilitar o trânsito de animais polinizadores e dispersores de sementes ao longo de todo o rio. Além disto, o rio também pode servir como um agente dispersor hidrocórico. Segundo Storfer et al. (2007), a distribuição e a sobrevivência de plantas ribeirinhas é fortemente afetada pela dinâmica natural dos rios, como fluxo de água unidirecional e perturbação por cheias intermitentes. Por exemplo, frequentemente, populações vegetais localizadas à jusante possuem maior variabilidade genética do que aquelas localizadas à montante. Isto seria o resultado da migração unidirecional das sementes da fonte à montante para jusante (Gornall et al., 1998).

Por outro lado, populações localizadas fora da mata ciliar, distantes do rio, em regiões mais altas, planálticas e/ou montanhosas, podem experimentar maior isolamento geográfico e menor fluxo gênico. Isto pode ocorrer: 1) pela maior possibilidade de ocorrência de barreiras geográficas; 2) pela maior fragmentação e isolamento das populações, já que a maior parte destas áreas é agrícola e não se configura como APPs; e 3) pela ausência de um agente dispersor hidrocórico. Espera-se, deste modo, que as populações localizadas em áreas interflúvicas, em regiões planálticas apresentem maior nível de isolamento e diferenciação genética do que aquelas localizadas ao longo do sistema fluvial (Mitsui et al., 2010). Segundo Kikamoto et al. (2005), a diferenciação de populações localizadas entre diferentes rios é mais extensa do que a observada naquelas localizadas ao longo de um mesmo sistema fluvial.

2.4 Análise da variabilidade genética por marcadores moleculares

Com a introdução de técnicas de genética molecular, no início da década de 80, os estudos de identificação, caracterização e mapeamento genético passaram a ser realizados com maior segurança, rapidez e eficiência. A utilização de marcadores moleculares possibilita a avaliação da variabilidade genética existente entre e dentro populações (Bered et al., 1997).

A primeira técnica descrita para obtenção de marcadores genéticos de DNA baseia-se na ação de enzimas de restrição após o reconhecimento de uma sequência de DNA, no qual o marcador *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) é fundamentado. Os marcadores RFLP tornaram-se uma ferramenta útil e importante, porém, em estudos de genética de populações este marcador não foi muito utilizado devido ao grau de dificuldade e o alto custo da técnica, quando aplicada a um grande número de indivíduos (Grodzicker et al., 1974).

O surgimento da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) , na década de 80, permitiu a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, ocasionando uma revolução nas técnicas de biologia molecular. O uso da PCR em análises genéticas permite uma melhor compreensão de processos de especiação, padrões de biogeografia ao nível da espécie, bem como a estrutura genética de populações. Os marcadores de DNA mais utilizados em estudos genéticos de plantas são o *Random Fragment Polymorphic* (RAPD), o *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), o *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e os *Simple Sequence Repeat* (SSR) ou microssatélites (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

2.4.1 Marcadores AFLP

O AFLP é uma técnica na qual fragmentos de DNA, entre 80 e 500 pares de bases, são obtidos a partir da digestão do DNA com enzimas de restrição, normalmente, uma de corte raro e uma de corte frequente. As amplificações ocorrem via reação em cadeia da polimerase (PCR). Os fragmentos amplificados (em torno de 50-100 fragmentos por reação) são, então, separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (Vos et al., 1995).

Os marcadores AFLP destacam-se pela sensibilidade, simplicidade, rapidez e pela capacidade de revelar locos dispersos pelo genoma sem exigência de conhecimento prévio das sequências-alvo ou de uso de sondas para hibridização (Lopes et al., 2002), entretanto, a principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por locos, pois, são de natureza dominante (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Outra desvantagem é a necessidade de um DNA puro e íntegro para que não ocorra nenhuma alteração dos padrões de bandas. Exige-se uma infraestrutura maior e é mais trabalhoso, pois requer um número maior de etapas até obter-se o resultado final (Vos et al., 1995).

A técnica de AFLP consiste basicamente em quatro etapas. Na primeira etapa, o DNA genômico é digerido com duas enzimas de restrição, uma de corte frequente, isto é, com sítio de restrição de quatro pares de base (enzima *MseI*), e outra de corte raro, ou seja, com sítio de restrição formado por seis pares de base (enzima *EcoRI*). A segunda etapa consiste na ligação de adaptadores específicos aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem.

Uma vez que a sequência dos adaptadores e a do sítio de restrição é conhecida, pode-se construir iniciadores específicos a essas sequências para pré-amplificação dos fragmentos de restrição. Na terceira etapa é realizada uma amplificação pré-seletiva dos fragmentos usando *primers* complementares aos adaptadores com mais um nucleotídeo seletivo adicional na extremidade 3', que pareia com o primeiro nucleotídeo localizado logo após o sítio original de restrição para uma seleção branda. A quarta etapa é constituída por uma amplificação seletiva usando *primers* com sequências contendo um, dois ou três nucleotídeos a mais na extremidade 3', além do já constante dos *primers* da reação de pré-amplificação. O procedimento de amplificação seletiva é necessário para que o número de fragmentos gerados não seja muito grande, o que impossibilitaria a análise dos resultados. (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

3. JUSTIFICATIVA

O estudo de populações arbóreas nativas é importante para elucidar de que modo fatores naturais e antrópicos, como a fragmentação do habitat e o isolamento geográfico podem afetar a estrutura genética de populações de espécies arbóreas neotropicais.

Este conhecimento poderá reforçar a importância do papel da mata ciliar como um corredor ecológico e genético, fornecendo ainda mais subsídios que reforçam a importância da restauração e conservação das matas ciliares. Ainda, a manutenção da variabilidade genética em áreas fragmentadas é um fator de extrema importância para a conservação das populações vegetais em médio e longo prazo. Deste modo, é importante conhecer a estrutura genética de *Schinus terebinthifolius*, a fim de saber se a espécie encontra-se geneticamente ameaçada.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Estudar, através da aplicação de marcadores moleculares AFLP, a estrutura e a diversidade genética de populações de *Schinus terebinthifolius*.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Conduzir estudo sobre a estrutura genética de dez populações de *Schinus terebinthifolius* localizadas em matas ciliares ao longo do rio Laranjinha, PR, e em áreas planálticas distantes da calha do rio;
- 2) Inferir a variabilidade genética e a distribuição da diversidade entre e dentro de populações;
- 3) Verificar se há diferenciação genética entre todas as populações; entre as populações das regiões do alto e baixo Laranjinha e entre as populações das regiões planálticas e ciliares;
- 4) Verificar se ocorre correlação entre distâncias genéticas e geográficas;

5) Verificar se as condições ambientais naturais e antrópicas presentes nas regiões do alto e baixo rio Laranjinha afetam diferencialmente a estrutura genética das populações;

6) Verificar se as condições ambientais naturais e antrópicas presentes nas áreas planálticas afetam diferencialmente a estrutura genética das populações planálticas;

7) Verificar a influência do rio e sua mata ciliar na estrutura genética das populações ciliares.

5. ARTIGO: ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* (ANACARDIACEAE) AO LONGO DA BACIA DO RIO LARANJINHA.

5.1 RESUMO

Schinus terebinthifolius é uma espécie arbórea neotropical de ampla ocorrência no Brasil, desde o estado de Pernambuco até o Rio Grande do Sul. Por ser uma espécie pioneira, agressiva, indiferente às condições físicas do solo e produzir grande quantidade de sementes, é considerada de grande importância na recuperação de áreas degradadas. Sua distribuição ocorre ao longo da Mata Atlântica que, em decorrência da intensa ocupação antrópica e modificação do bioma, encontram-se bastante fragmentada e desconectada. A fragmentação florestal provoca alterações da dinâmica das populações, o que pode levar à perda de diversidade genética. Estudos de genética de populações utilizando técnicas de marcadores moleculares permitem avaliar a estrutura e a variabilidade genética de espécies de árvores em áreas fragmentadas. Com o intuito de contribuir para estratégias de conservação e manejo de espécies arbóreas tropicais, este trabalho teve como objetivo estudar, por meio de marcadores AFLP, a diversidade e a estrutura genética de dez populações de *S. terebinthifolius* obtidas de áreas de planalto e da mata ciliar ao longo do rio Laranjinha – Pr. Três combinações de *primers* seletivos forneceram um total de 821 marcadores. Os valores médios para a porcentagem de locos polimórficos (%*P*) e para o índice de diversidade gênica de Nei (*H_s*) foram 61,11% e 0,1251, para áreas de planalto; 51,32% e 0,1073, para áreas ciliares; 67,59% e 0,1886 para populações do alto Laranjinha e 44,84% e 0,0773 para populações do baixo Laranjinha, respectivamente. A distribuição da variabilidade genética foi maior dentro das populações (55,08%) que entre as populações (44,92%). A análise da Coordenada Principal mostrou que a maioria das populações estudadas encontra-se estruturadas em dois grupos, populações do alto Laranjinha e populações do baixo Laranjinha, o que também foi confirmado pela análise Bayseana de agrupamentos K e pelo dendrograma, realizado pelo método UPGMA. Não houve diferença significativa de variabilidade genética entre duas diferentes regiões, planalto e rio, de forma que não é possível afirmar que o rio Laranjinha se constitui em um corredor ecológico e genético para as populações de *S. terebinthifolius*.

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

5.2 ABSTRACT

Schinus terebinthifolius is a neotropical tree species widely spread in Brazil, from Pernambuco to Rio Grande do Sul. As a pioneering, aggressive species, indifferent to physical conditions of the soil and produce large amounts of seeds, is considered of great importance in the recovery of degraded areas. Distributed along the Atlantic rain forest biome which, due to the intense human occupation and modification of the biome, it is very fragmented and disconnected. Forest fragmentation provokes changes in the population dynamics, which can lead to loss of genetic diversity. Population genetic studies using molecular markers allows the evaluation of plant species genetic structure and the genetic variability of tree species in fragmented areas. Aiming to contribute to strategies for conservation and management of tropical tree species, this paper aimed to study through AFLP markers, the genetic diversity and structure of ten populations of *S. terebinthifolius* from plateau areas and the riparian forest along the Laranjinha river – Pr. Three selective primers combinations made a total of 821 markers. Mean values for polymorphic loci percentage (%P) and the gene diversity index (*H_s*) were 61.11% and 0.1251, for plateau areas; 51.32% and 0.1073, for riparian areas; 67.59% and 0.1886 for populations of the upper Laranjinha river; 44.84% and 0.0773 for populations of the lower Laranjinha river, respectively. The genetic variability distribution was higher within populations (55.08%) than among populations (44.92%). The Principal Coordinate analysis showed that most of the studied populations were structured into two groups, the upper Laranjinha river populations and the lower Laranjinha river populations, which was also confirmed by Bayesian analysis for the number of K clusters and the dendrogram, constructed by the UPGMA method. There was no significant difference in genetic variability between two different regions, plateau and river, so it can not be said that the Laranjinha river constitutes an ecological and genetic aisle for *S. terebinthifolius* populations.

Keywords: AFLP. Genetic diversity. Neotropical tree species. Forest fragmentation. Conservation.

5.3 INTRODUÇÃO

A floresta Atlântica é um dos biomas mais ricos em biodiversidade e também um dos mais ameaçados do planeta (Myers et al., 2000). Durante séculos, foi alvo de perturbações antrópicas, intensificadas no último século por meio da extração madeireira e, principalmente pela substituição de suas florestas por áreas agrícolas e pelo processo de urbanização desordenado (Dean, 1996).

A presente paisagem desta região encontra-se altamente fragmentada e desconectada, representada, em sua quase totalidade, por pequenas manchas florestais, isoladas e impactadas, circundadas por áreas de pastos, monoculturas e desenvolvimento urbano (Fundação Mata Atlântica, 2002).

As matas ciliares mesmo sendo importantes para a contenção dos processos erosivos e servindo de refúgio e fonte de alimento para a fauna silvestre e aquática (Barbosa, 1999) além de possibilitar a interligação de fragmentos florestais isolados, facilitando o fluxo gênico vegetal e animal (Metzger, 2010), também sofreram com a fragmentação da paisagem e pressão antrópica, principalmente pela construção de hidrelétricas, abertura de estradas e implantação de culturas agrícolas e de pastagens.

A intensa fragmentação expõe as populações florestais a problemas ecológicos e genéticos, causados pela diminuição do tamanho e/ou extinção de populações, isolamento, redução da taxa de heterozigose e erosão genética (Metzger, 1999). Diante desta situação, o conhecimento da estrutura genética das populações é importante para que sejam estabelecidas estratégias de conservação e manejo das espécies ameaçadas (Botrel, 2006).

Dentre as diversas técnicas que fazem uso de marcadores moleculares para gerar conhecimento sobre as características genéticas populacionais, os marcadores *Amplified Fragments Length Polymorphism* (AFLP) vêm se destacando pelo grande número de marcadores gerados por ensaio, grande poder de detecção de variabilidade genética e grande repetibilidade (Vos et al., 1995).

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae), conhecida popularmente como aroeira-vermelha, aroeira-pimenteira e pimenta brasileira, é uma árvore que atinge de 5 a 15 metros de altura e possui tronco de 30 a 60 cm de

diâmetro (Lorenzi, 2002). É uma espécie alógama, dióica e de caráter pioneiro (Lenzi e Orth, 2004). Sua dispersão é ampla, ocorrendo desde o estado de Pernambuco até Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (Lorenzi, 2002) em um largo espectro de condições ambientais. Seu caráter de pioneirismo, grande plasticidade ambiental e agressividade competitiva a tornam uma espécie importante em programas de restauração de áreas degradadas, tais como restauração de matas ciliares e estabilização de dunas (Kageyama e Gandara, 2000).

Este trabalho tem como objetivo estudar, por meio da aplicação de marcadores moleculares AFLP, a estrutura e a diversidade genética de populações de *Schinus terebinthifolius*.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1 Seleção das populações e coleta de material biológico

Foram selecionadas 10 populações (Tabela 1), sendo cinco distribuídas ao longo de matas ciliares do rio Laranjinha, PR, desde a nascente até a foz; e cinco localizadas em áreas planálticas, distantes do rio (Figura 5). Foram coletadas 3 a 4 folhas jovens e íntegras de, aproximadamente, 30 indivíduos de *S. terebinthifolius* de cada população. No campo, as folhas foram acondicionadas em sacos plásticos e colocadas em uma caixa de isopor com gelo. Posteriormente, em laboratório, o material biológico foi conservado em freezer -20°C.

Tabela 1: Localização geográfica das populações de *S. terebinthifolius* coletadas.

População	Localização	Coordenadas geográficas
P5	Santa Mariana (PR),	23°08'48" S, 50°31'01" O
P4	Bairro Pedregulho, município de Cornélio Procópio (PR),	23°15'01" S, 50°41'69" O
P3	Distrito Terra Nova, município de São Jerônimo da Serra (PR).	23°41'06" S, 50°47'33" O
P2	Sapopema (PR)	23°54'81" S, 50°33'04" O
P1	Ventania (PR)	24°16'99" S, 50°11'62" O
L5	Bandeirantes (PR)	23°02'82" S, 50°25'81" O
L4	Distrito Triolândia, município de Ribeirão do Pinhal (PR).	23°32'26" S, 50°47'33" O
L3	Figueira (PR)	23° 50'67" S, 50°22'75" O
L2	Ibaiti (PR)	23°56'16" S, 50°05'28" O
L1	Nascente do Rio Laranjinha, município de Ventania (PR).	24°14'40" S, 50°14'36" O



Figura 5. Área de coleta de material biológico. **Legenda:** B (baixo Laranjinha) - Foz do rio Laranjinha, no rio das Cinzas, localizada no município de Bandeirantes, PR; A (alto Laranjinha) - Nascente do rio Laranjinha, localizada no município de Ventania, PR; L5 – População foz do rio Laranjinha, L4 – População margem do rio Laranjinha; L3 – População margem do rio Laranjinha; L2 – População margem do rio Laranjinha; L2 – População nascente do rio Laranjinha; P5 – População planalto; P4 – População planalto; P3 – População planalto; P2 – População planalto; P1 – População planalto. Fonte: Google Earth, 2013.

5.4.2 Extração e purificação de DNA

O DNA foi extraído segundo o protocolo CTAB (Doyle; Doyle, 1987). De cada folíolo, foi retirado um pedaço de folha em forma de disco. Foi adicionado o tampão de extração (Tabela 2) e o material foliar foi macerado no próprio tubo. Posteriormente, o tubo foi aquecido em banho-maria por 30 minutos a 65° C. Após isto, foi adicionado 5 µl de proteinase K por amostra, com agitação manual por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria por 50 minutos a 65° C, agitando levemente a cada 15 minutos. Após a retirada do banho-maria, as amostras foram deixadas para resfriar em temperatura ambiente e, em seguida, foi adicionado 650 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e sutilmente agitadas até formar uma mistura homogênea. Em sequência, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos. Esta etapa formou um sobrenadante, o qual foi transferido 500 µl para um novo tubo. Neste, foi acrescentado clorofórmio (álcool isoamílico), na mesma proporção anterior (500 µl). Nova centrifugação foi realizada a 12000 rpm por 5 minutos. Após isto, o material foi transferido para novo tubo, ao qual, foi adicionado um volume de aproximadamente 300 µl de isopropanol gelado. O tubo foi invertido repetidamente, de modo suave e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com álcool 70% (1ml). Posteriormente, uma nova centrifugação a 7500 rpm foi realizada por 3 minutos. Após a mesma, o álcool 70% foi descartado e o DNA foi deixado para secar. Por fim, o mesmo foi eluído em 30 µl de TE (98 µl TE + 0,2 µl RNase a uma concentração de 110 U/ µl) e incubado a 37 ° C por 45 a 60 minutos.

Tabela 2: Tampão de Extração de DNA.

Componentes	Concentração Final	Volume Final (10 ml)
CTAB 5%	1 %	2,0 ml
NaCl 5M	1,4 M	2,8 ml
Tris – HCl 1M pH 8,0	100 Mm	1,0 ml
EDTA 0,5 M	20 mM	0,4 ml
Mercaptoetanol	0,1 %	0,01 ml
Água		3,7 ml

5.4.3 Amplificação de DNA

As amostras de DNA foram quantificadas no Scandrop (Analytikjena) para a verificação da concentração e pureza das mesmas. A reação de AFLP foi efetuada conforme Vos et al. (1995) com algumas modificações. Amostras com cerca de 800 a 1000 ng de DNA foram submetidas à restrição com 5U de *EcoRI* e 5U de *MseI* em tampão de digestão com um volume total de 20 μ L. As amostras foram incubadas em estufa a 37 °C por 18 h. Os fragmentos gerados foram ligados a adaptadores específicos.

A reação de ligação foi feita em um volume de 10 μ L contendo tampão da T_4 DNA Ligase 1X, NaCl 0,05M, BSA 0,05 μ g/ μ L, DTT 0,25 mM, adaptadores *MseI* 5 μ M, adaptadores *EcoRI* 0,5 μ M, T_4 DNA Ligase 1U, na qual foi adicionada 20 μ L da pré-digestão, totalizando 30 μ L. Esta reação foi incubada a 37 °C por 3 h, 17 °C por 30 min, 70 °C por 10 min. A seguir 25 μ L da reação restrição-ligação foi diluída em 100 μ L de água ultrapura.

A amplificação pré-seletiva foi realizada em duas etapas para maior especificidade dos fragmentos utilizando o kit GoTaq® *Green Master mix* (Promega, USA) mais 0,58 μ L de *primer* pré-seletivo 4,75 μ M e 3,0 μ L da diluição da reação de restrição-ligação. O programa de amplificação pré-seletiva foi realizada em: 1 ciclo 72 °C por 2 min, 20 ciclos de 90 °C por 1 seg, 56 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min seguido de 1 ciclo final de 60 °C por 30 min. Em seguida, um volume de 5 μ L da reação pré-seletiva foi diluído em 20 μ L de água ultrapura.

Para amplificação seletiva foram testadas em gel de poliacrilamida (7%) 8 combinações de *primers* com 2 ou 3 nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. Destas foram selecionadas as seguintes 3 combinações: *EcoRI*-ACG/*MseI*-CAG, *EcoRI*-AGC/*MseI*-CAG, *EcoRI*-AGC/*MseI*-CTA para serem submetidas a eletroforese capilar em sistema automatizado. Para tal, utilizou-se os *primers* seletivos de *EcoRI* marcadas com fluoróforos FAM, HEX e NED, respectivamente azul, verde e amarelo. A reação seletiva foi realizada utilizando 3,5 μ L do kit GoTaq® *Green Master mix* (Promega, USA), acrescentando 0,54 μ L de cada *primer* seletivo *MseI* 5 μ M e *EcoRI* 1 μ M e 2,5 μ L da reação pré-seletiva. O programa utilizado para amplificação seletiva foi o seguinte: 1 ciclo 94°C por 2 min, 65 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min; 8 ciclos

de 94°C por 1 seg, 64°C por 30 seg e 72°C por 2 min e 1 ciclo final de 60°C por 30 min.

Todas as reações de ampliações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

5.4.4 Preparo das amostras para eletroforese capilar em sistema automatizado

Para resolução dos produtos de PCR obtidos da reação seletiva os conjuntos de amostras amplificadas com *primers* distintamente marcados com os fluoróforos foram combinados na seguinte proporção: 1µL de FAM : 2µL de HEX : 2µL de NED com 5,0 µL de água ultrapura. Desta mistura 1,0 µL foi adicionado a 0,2 µL de *size standard* 600-LIZ (GeneScan v2.0) e 8,8 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems). Em seguida foram desnaturados a 95°C por 3 minutos, imediatamente colocados em gelo e por fim submetidos à eletroforese capilar em sistema automatizado (Applied Biosystems, 3500xL). O resultado da eletroforese dos fragmentos foram combinados em uma matriz binária pelo software GeneMapper® v.4.1 (Applied Biosystems), Após eletroforese os fragmentos foram analisados usando *softwares* apropriados para genotipagem.

5.4.5 Análise dos dados de AFLP

Os produtos de amplificação foram analisados por meio do programa *GeneMapper*, para construção de uma matriz binária, levando em conta a presença (1) ou ausência (0) de um determinado fragmento.

Para as estimativas de diversidade genética, foram utilizados número de loci polimórficos (*P*), porcentagem de loci polimórficos (*%P*), e diversidade gênica média (*Hs*) de Nei (1978), que infere a probabilidade de dois locos homólogos escolhidos aleatoriamente serem diferentes. A diversidade é calculada através do número médio de diferenças (*pairwise differences*) entre todos os pares diploides da amostra. Para tais análises, utilizou-se o programa Arlequin v. 3.11 (Excoffier et al., 2005).

A caracterização da estrutura genética foi estimada pela Análise de Variância Molecular (AMOVA) dentro de populações, entre populações, entre

grupos (grupo 1: P5, P4, P3, P2, P1; grupo 2: L5, L4, L3, L2, L1), dentro de grupos, entre alto Laranjinha (L1, L2, L3, P1 e P2) e baixo Laranjinha (P3, P4, P5, L4 e L5). O Índice de Fixação (F_{st}) foi inferido para o total das populações, para as populações de Planalto (grupo 1) e populações ciliares (grupo 2), calculados pelo programa Arlequin v. 3.11 (Excoffier et al., 2005).

A análise da coordenada principal foi utilizada para avaliar a distribuição da distância genética através do programa FAMD (*Fingerprint Analysis with Missing Data*) (Schluter, 2006). O programa Structure versão 2.3.4, (Pritchard et al., 2002) foi utilizado para análise de possíveis agrupamentos (*clusters*) que as diferentes populações podem vir a formar. Através deste programa, o número K de populações foi testado, assumindo que não há informação prévia da origem destes indivíduos.

Por meio da distância genética de Reynolds (1983) foi construído um dendrograma, pelo critério UPGMA (*Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Mean*), utilizando o programa TFPGA (*Tools For Population Genetics Analyses*) versão 1.3 (Miller, 1997). O *bootstrap* foi gerado com 1000 permutações para determinar a consistência dos nós.

A matriz de distância genética foi comparada com a matriz de distância geográfica através do teste de correlação de Pearson, utilizando o programa *Bioestat* versão 5.3 (Miller, 1997).

6. RESULTADOS

6.1. Diversidade genética

Entre as oito combinações de *primers* seletivos de AFLP testadas, três foram selecionadas de acordo com a qualidade dos produtos de amplificação e a quantidade de polimorfismo gerado e aplicados nas 10 populações de *S. terebinthifolius*.

Para as populações de *S. terebinthifolius*, a porcentagem de locos polimórficos foi maior que 50% para seis das dez populações analisadas, variando entre 18,27%, para a população do alto Laranjinha (L3); e 95,12%, para a população P1, também do alto Laranjinha. Para o cálculo da diversidade genética total (H_t), obteve-se um valor de 0,1162 e a média da diversidade

gênica de Nei (*Hs*) variou de 0,0186, para a população L3; a 0,2494, para a população P1(Tabela 3).

Na região de planalto, a porcentagem de polimorfismo foi de 37,02% (P3) a 95,12% (P1), com uma média de locos polimórficos de 61,11%. Ainda nesta região a diversidade gênica de Nei (*Hs*) variou de 0,0700 (P4) a 0,2494 (P1) (Tabela 3). A população P3, embora tenha a menor porcentagem de locos polimórficos, não apresentou necessariamente os menores valores de diversidade, quando comparada com a população P4, que obteve 58,83% de polimorfismo.

Na região ciliar, a porcentagem de polimorfismo variou de 18,27% (L3) a 80,99% (L2), sendo a média de locos polimórficos de 51,32%, com a diversidade gênica de Nei (*Hs*) variando de 0,0186 (L3) a 0,1993 (L2) (Tabela 3).

Na região do alto rio Laranjinha, onde estão inseridas as populações L1, L2, L3, P1 e P2, a porcentagem de polimorfismo variou de 18,27% (L3) a 95,12% (P1); e a diversidade gênica de Nei (*Hs*) variou de 0,0186 (L3) a 0,2494 (P1) (Tabela 3).

Na região do baixo rio Laranjinha, da qual fazem parte as populações P3, P4, P5, L4 e L5, a porcentagem de polimorfismo variou de 32,15% (L5) a 58,83% (P4); e a diversidade gênica de Nei (*Hs*) variou de 0,0403 (L5) a 0,1162 (L4) (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros de diversidade genética estimados para dez populações de *Schinus terebinthifolius* utilizando marcadores AFLP.

Populações	¹ N	² P%	³ Hs
P1	30	95,12%	0,2494
P2	30	63,70%	0,1464
P3	30	37,02%	0,0949
P4	30	58,83%	0,0700
P5	30	50,91%	0,0652
Média	—	61,11%	0,1251
L1	30	79,90%	0,1621
L2	30	80,99%	0,1993
L3	30	18,27%	0,0186
L4	30	45,31%	0,1162
L5	30	32,15%	0,0403
Média	—	51,32%	0,1073
⁴ Ht			0,1162
Alto Laranjinha (média)	—	67,59%	0,1886
Baixo Laranjinha (média)	—	44,84%	0,0773

¹N: número de indivíduos; ²P%: porcentagem de locos polimórficos; ³Hs: diversidade gênica dentro das populações, ⁴Ht: diversidade gênica total, L: populações de regiões ciliares, P: populações de regiões planálticas.

6.2 Estrutura genética

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou uma elevada variação intrapopulacional, com a maior parte da variação genética (55,08%) localizada dentro de populações e um *Fst* igual a 0,4492 (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para dez populações de *Schinus terebinthifolius*.

Fontes de variação	g.l	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre populações	9	10944,853	38,944	44,92**
Dentro de populações	290	13848,400	47,753	55,08
Total	299		86,697	
Índice de fixação <i>Fst</i>	0,4492			

g.l = grau de liberdade. ** P<0.01 (teste de significância para 1023 permutações).

Na AMOVA aplicada para duas diferentes regiões, planalto e margem do rio, observou-se uma maior variação genética dentro de populações (55,78%), e variação entre grupos negativa (-2,86) com um índice de fixação F_{st} de 0,4420 (Tabela 5).

Tabela 5. Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para dez populações de *Schinus terebinthifolius* separadas em dois grupos por regiões, planalto e rio.

Fontes de variação	g.l	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	1	899,720	- 2,447	- 2,86**
Entre populações de grupos	8	10055,133	40,304	47,08
Dentro de populações	290	13848,400	47,753	55,78
Total	299	24793,253	85,609	
Índice de fixação F_{st}	0,4422			

g.l = graus de liberdade. **P<0,01 (teste de significância para 2024 permutações).

Para as cinco populações localizadas em áreas de planalto, a análise da variância molecular (AMOVA) apresentou elevada variação, com um F_{st} de 0,4037, e a maior parte da variação genética dentro de populações (59,62%) (Tabela 6). Já para as cinco populações localizadas na margem do rio Laranjinha, obteve-se um F_{st} de 0,5095, com 49,05% da variação genética dentro de populações e 50,95% da variação genética entre populações (Tabela 7).

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para cinco populações de *Schinus terebinthifolius* em áreas de planalto.

Fontes de variação	g.l	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre populações	4	4388,040	34,851	40,38**
Dentro de populações	145	7461,800	51,460	59,62
Total	149	11849,840	86,312	
Índice de fixação F_{st}	0,4037			

g.l = graus de liberdade. **P<0,01 (teste de significância para 2024 permutações).

Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para cinco populações de *Schinus terebinthifolius* às margens do curso do rio Laranjinha.

Fontes de variação	g.l	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre populações	4	5667,093	45,757	50,95**
Dentro de populações	145	6386,600	44,045	49,05
Total	149	12053,693	89,803	
Índice de fixação F_{st}	0,5095			

g.l = graus de liberdade. ** $P < 0,01$ (teste de significância para 2024 permutações).

A AMOVA para a região do alto Laranjinha, para cinco populações de *S. terebinthifolius*, indicou uma alta variação, com um F_{st} de 0,4371, com 43,71% da variação genética entre populações e 56,29% da variação genética dentro de populações (Tabela 8). Por outro lado, para as populações do baixo Laranjinha, a AMOVA mostrou valores de 43,09% da variação genética entre populações e 56,91% da variação genética dentro de populações, com um F_{st} de 0,4309 (Tabela 9).

Tabela 8. Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para cinco populações de *Schinus terebinthifolius* distribuídas na região do alto Laranjinha.

Fontes de variação	g.l	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre populações	4	6192,720	49,482	43,71**
Dentro de populações	145	9238,233	63,711	56,29
Total	149	15430,953	113,194	
Índice de fixação F_{st}	0,4371			

g.l = graus de liberdade. ** $P < 0,01$ (teste de significância para 2024 permutações).

Tabela 9. Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para cinco populações de *Schinus terebinthifolius* distribuídas na região do baixo Laranjinha.

Fontes de variação	g.l	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre populações	4	3015,560	24,069	43,09**
Dentro de populações	145	4610,167	31,794	56,91
Total	149	7625,727		
Índice de fixação F_{st}	0,4309			

g.l = graus de liberdade. ** $P < 0,01$ (teste de significância para 2024 permutações).

Na AMOVA aplicada para duas diferentes regiões, alto Laranjinha e baixo Laranjinha, observou-se uma maior variação genética dentro de populações (54,00%), uma baixa variação entre grupos (4,41%) com um índice de fixação F_{st} de 0,4600 (Tabela 10).

Tabela 10. Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para dez populações de *Schinus terebinthifolius* separadas em dois grupos por regiões, alto Laranjinha e baixo Laranjinha.

Fontes de variação	g.l	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	1	1736,573	3,903	4,41**
Entre populações de grupos	8	9208,280	36,776	41,59
Dentro de populações	290	13848,400	47,753	54,00
Total	299	24793,253	88,432	
Índice de fixação F_{st}	0,4600			

g.l = graus de liberdade. ** $P < 0,01$ (teste de significância para 2024 permutações).

O F_{st} par a par compara as distâncias genéticas entre as populações. A menor distância genética observada foi de 9,30% entre as populações de P5 (Santa Mariana – PR) e P4 (Cornélio Procópio – PR) e a maior distância

genética (59,1%) foi verificada entre as populações de L3 (Figueira – PR) e L4 (Ribeirão do Pinhal – PR). Ainda com o auxílio do Google Earth, foram calculadas as distâncias geográficas entre as populações (Tabela 11).

Tabela 11. Valores de distância genética do *Fst* par-a-par, abaixo da diagonal central; e valores de distância geográfica (km), acima da diagonal central, em dez populações de *S. terebinthifolius*.

Populações	P1	P2	P3	P4	P5	L2	L4	L1	L3	L5
P1	****	53,65	81	123	129,8	37,4	83	18,2	51,4	138,3
P2	0,364	****	27,9	74,7	86,7	47,3	45,7	50,4	22	96,6
P3	0,381	0,439	****	59,6	78,8	74,4	50,5	79,8	44,3	90,5
P4	0,386	0,483	0,456	****	23,4	97,7	44,5	113,2	71,1	35,5
P5	0,385	0,463	0,451	0,093	****	99,4	47,7	117,6	79,2	12,7
L2	0,333	0,413	0,482	0,491	0,486	****	52,4	21,2	31	104,6
L4	0,381	0,442	0,414	0,510	0,501	0,457	****	69,7	31,7	54,8
L1	0,363	0,434	0,480	0,520	0,511	0,420	0,462	****	42,3	124,8
L3	0,450	0,566	0,562	0,183	0,146	0,562	0,599	0,595	****	87
L5	0,417	0,511	0,503	0,169	0,143	0,527	0,541	0,553	0,153	****

Para verificar se há correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, foi realizado um teste de correlação. O Coeficiente de Correlação Linear de Pearson ($r = 0,1511$, $p=0,3218$) foi não significativo, portanto, não há uma correlação entre as distâncias genéticas do *Fst* par-a-par e distâncias geográficas (Figura 6).

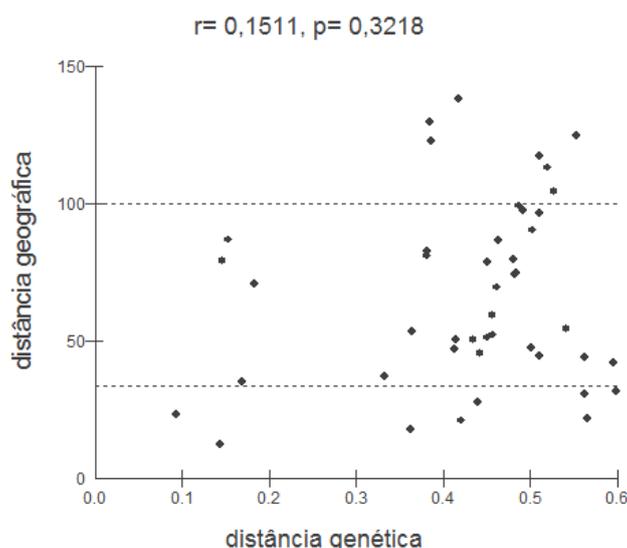


Figura 6. Diagrama de dispersão entre as distâncias genéticas e geográficas das dez populações de *S. terebinthifolius* analisadas.

A análise da Coordenada Principal agrupou as populações em dois grupos. O primeiro grupo é composto das populações L4, P3, L3, L5, P5 e P4; o segundo grupo é composto das populações L1, P1, L2 e P2 (Figura 7).

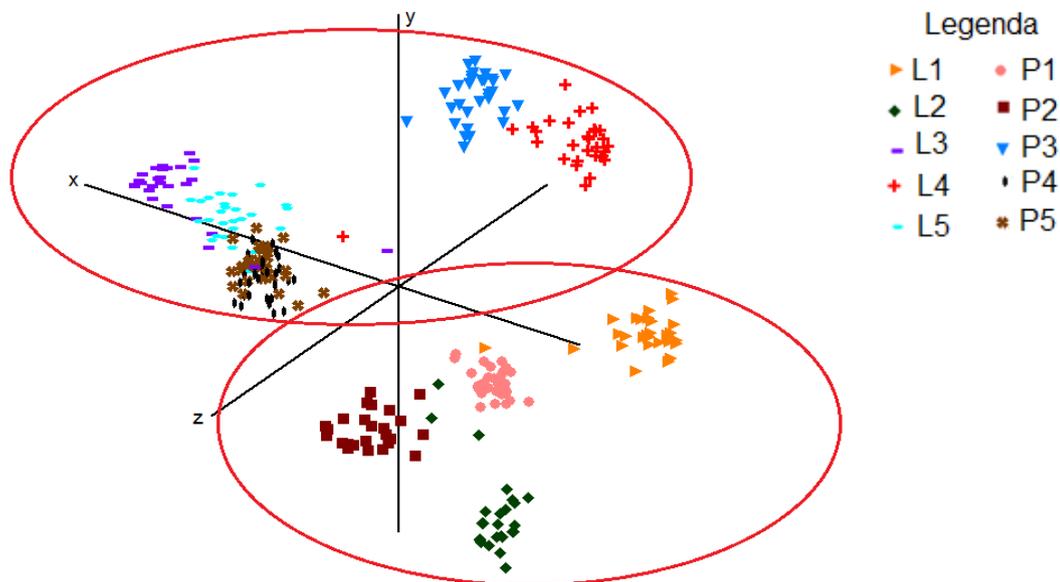


Figura 7. Análise da coordenada principal de dez populações de *Schinus terebinthifolius*, sendo $x = 10,75\%$, $y = 6,68\%$ e $z = 4,63\%$.

Na estimativa de possíveis agrupamentos populacionais, de acordo com sua similaridade, pela análise bayesiana, o maior valor de k foi igual a 2, ou seja, as populações formaram dois grupos (Figura 8), o qual é mostrado na figura 9.

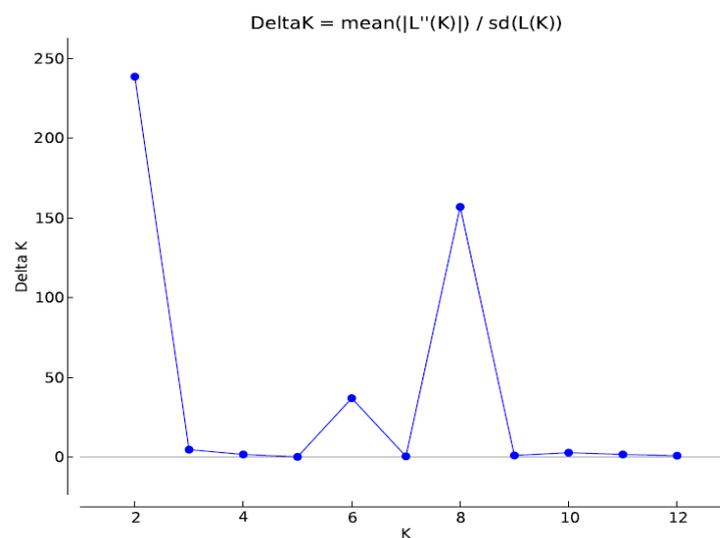


Figura 8. Valores absolutos (ΔK) da distribuição likelihood (LnP (D)) de dez populações de *S. terebinthifolius*, interpretado pelo Structure Harvester (Evanno et al., 2006).

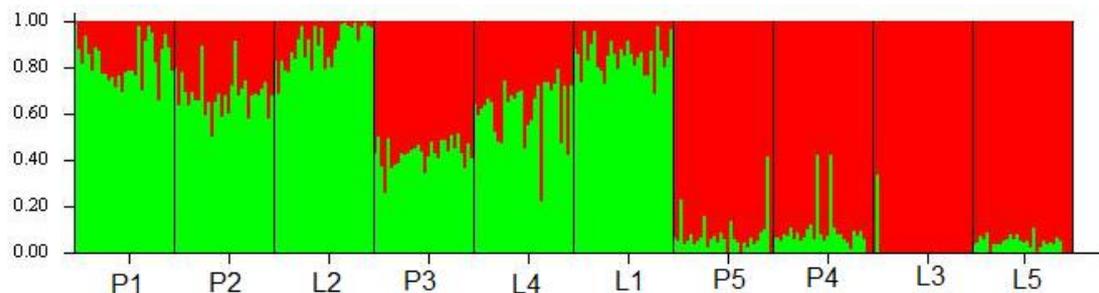


Figura 9. Teste de atribuição para dez populações de *S. terebinthifolius* para $K=2$, onde o eixo x representa as populações, e o eixo y, as frequências de participação de cada população no grupo.

No dendrograma, com base na distância genética de Reynolds (1983), observou-se a formação de dois grupos (Figura 10).

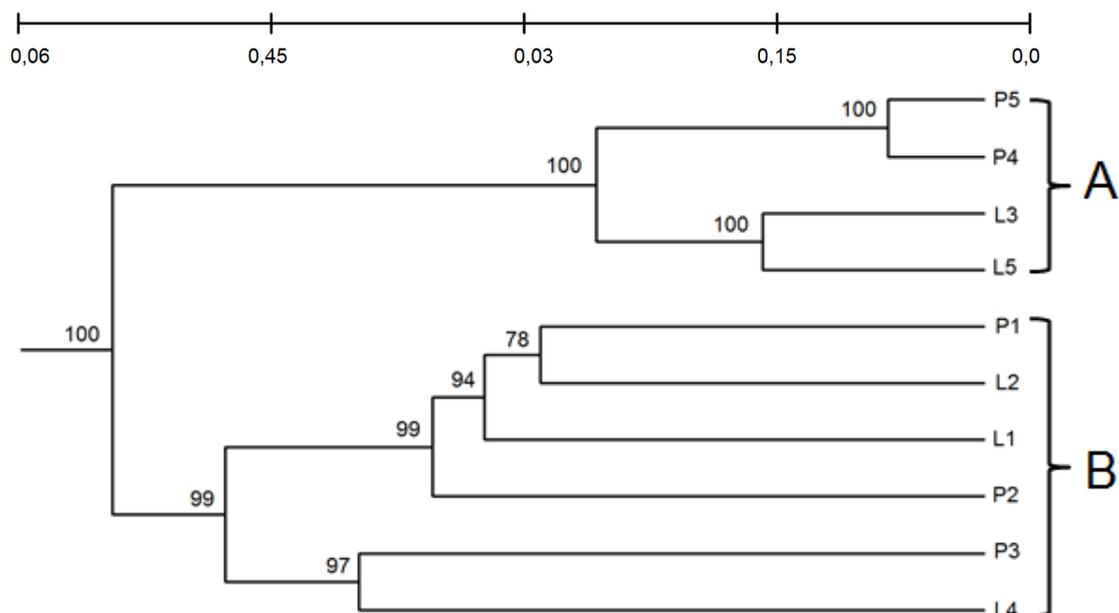


Figura 10. Dendrograma das dez populações de *S. terebinthifolius* mostrando os dois grupos formados e os valores de consistência dos nós.

7. DISCUSSÃO

7.1. Diversidade genética em populações de *S.terebinthifolius*.

A diversidade genotípica para marcadores dominantes pode ser analisada por meio da porcentagem de locos polimórficos, que estima a frequência dos alelos nas populações e pela diversidade gênica. Segundo Piry et al. (1999), este critério pode ser influenciado pelo tamanho das populações

amostradas, cuja redução poderia reduzir também o índice de diversidade gênica.

No presente estudo, realizado a partir de 300 indivíduos pertencentes a 10 populações de *S. terebinthifolius*, três combinações de *primers* seletivos de AFLP, geraram, 821 marcadores.

Os resultados demonstraram, para as dez populações de *S. terebinthifolius*, um valor de 0,1162 para a diversidade gênica total (*Ht*). Medri et al. (2011), em um estudo com *Aegiphila sellowiana*, uma espécie arbórea neotropical pioneira, obtiveram um valor de diversidade gênica total (*Ht*) de 0,189; Souza et al. (2013), em um estudo com *Paraptadenia rigida* (também uma árvore pioneira neotropical) encontraram um valor de diversidade gênica total (*Ht*) de 0,278; e Moraes et al. (2003), utilizando isoenzimas na espécie pioneira neotropical *Cryptocarya aschersoniana*, encontraram um valor de diversidade gênica total (*Ht*) de 0,552. Todos esses estudos mostram que o valor de *Ht* encontrado no presente trabalho para *S. terebinthifolius* pode ser considerado baixo.

As populações de planalto mostraram um valor médio moderado para a diversidade gênica de Nei ($H_s = 0,1251$), enquanto que para as populações localizadas nas áreas ciliares esse valor foi de 0,1073 (Tabela 3). Ao se comparar a diversidade gênica de Nei entre as populações do alto Laranjinha e baixo Laranjinha, observou-se uma média de 0,1886 (H_s) para as populações do alto Laranjinha e uma média de 0,0773 (H_s), para as populações do baixo Laranjinha (Tabela 3). Outros estudos sobre diversidade gênica em espécies arbóreas neotropicais demonstraram, tanto valores mais altos, quanto mais baixos. Freire et al. (2007), estudando *Schizolobium parayba*, obtiveram uma média de diversidade gênica (H_s) de 0,36; Moraes et al. (2003) encontraram um valor de 0,365 em um estudo com *Cryptocarya aschersoniana*; Souza et al. (2013) obtiveram um valor de 0,217 para *Parapiptadenia rigida*. Em uma revisão de estudos de diversidade gênica de Nei (H_s) englobando 449 espécies de plantas, Hamrick e Godt (1990) encontraram uma diversidade gênica média de 0,149 para espécies arbóreas e 0,159 para espécies de ampla distribuição.

As populações do planalto mostraram uma maior diversidade do que as localizadas em áreas ciliares. Uma hipótese que poderia explicar este resultado é baseada no fato de que as populações ciliares, mesmo sendo protegidas

legalmente, foram seriamente afetadas pelo processo de desmatamento, fragmentação e conseqüente diminuição de seus indivíduos, afetando assim sua diversidade gênica. Algumas das áreas ciliares estudadas possuem aptidão agrícola mais alta do que áreas planálticas, o que pode ter contribuído para uma alta taxa de desmatamento ilegal, em áreas protegidas pela legislação ambiental.

As diferenças nos níveis de diversidade gênica encontrada entre as populações do alto e baixo Laranjinha podem ser resultado do atual estado de conservação de cada uma destas áreas. As populações do baixo Laranjinha sofreram uma maior perturbação antrópica, devido ao processo de expansão da fronteira agrícola, principalmente para a implantação de monoculturas, o que levou a um maior isolamento destas populações, por conseguinte, afetando a diversidade gênica das mesmas. O uso agrícola intenso no baixo Laranjinha confere a esta região uma das menores coberturas florestais do estado. Apesar de existirem unidades de conservação, a área total legalmente protegida é muito pequena (IPARDES, 2004) e os fragmentos que ainda restaram também são pequenos e isolados.

A diversidade gênica das populações do alto Laranjinha é maior. Como a fragmentação desta área foi menos intensa do que na região do baixo Laranjinha, isto pode ter levado a um menor nível de diminuição populacional, extinção de populações e isolamento. Ruas et al. (2011), estudando duas populações de *S. terebinthifolius* ao longo da bacia do rio Tibagi, encontraram uma diversidade genética de 0,1678 para a população do baixo Tibagi e 0,1996 para a população do médio Tibagi. A bacia do rio Tibagi está localizada próxima à bacia do rio das Cinzas, o que torna as características ambientais do médio Tibagi parecidas com as do alto Laranjinha; e as condições ambientais do baixo Tibagi semelhantes com as do baixo Laranjinha. O processo de ocupação antrópica também se desenvolveu de maneira parecida entre estas regiões pertencentes a diferentes bacias hidrográficas.

Na região do baixo Laranjinha, predominam solos de Terra Roxa Estruturada e Latossolo Roxo, condições edáficas muito mais favoráveis ao desenvolvimento de culturas agrícolas anuais e perenes, devido a sua natural fertilidade. Já os solos da região do alto Laranjinha são mais pobres e rasos, impedindo assim um maior aproveitamento agrícola na região. Ainda, as

populações do alto Laranjinha estão inseridas em uma zona de relevo mais acentuado, de solo pobre, onde a utilização antrópica se caracteriza pela presença de áreas de reflorestamento e pastagem. *In loco*, observa-se que, nesta região, *S. terebinthifolius* ocorre em maior densidade e com distribuição mais ampla, tanto no planalto como em áreas ciliares, do que na região do baixo Laranjinha (Ruas et al.; relato pessoal). Infere-se que isso possa ocorrer devido a uma possível preferência ecológica da espécie pelas características ambientais naturais do alto Laranjinha.

Ao contrário da paisagem mais bem conservada do alto Laranjinha, a região do baixo Laranjinha é fortemente influenciada pelo processo de antropização, cercado por culturas agrícolas, pecuária e pequenos fragmentos. Segundo Young (1996), a fragmentação de populações naturais pode acarretar limitações evolutivas às espécies que as compõem, devido à perda de variabilidade genética. De acordo com Couvet (2002), tais alterações se refletem nos processos de deriva genética, fluxo gênico, isolamento genético, efeito fundador, os quais são processos determinantes do grau de diversidade genética da espécie. Esses processos são observados nas populações estudadas de *S. terebinthifolius*, onde populações situadas nas áreas mais antropizadas apresentaram um grau de diversidade gênica menor e populações que ocupam áreas mais bem conservadas obtiveram um grau de diversidade maior.

A porcentagem de locos polimórficos para populações de planalto (média de 61,11%) foi menor que a encontrada por Souza et al. (2004), estudando *Chorisia speciosa* (75%), porém, superior às das espécies *Piper hispidinervum* (60%) (Wadt e Kageyama, 2004) e *Aspidosperma polyneuron* (50%) (Maltez, 1997). Já a porcentagem de locos polimórficos para populações ciliares (média de 51,32%) foi menor que a de *Parapiptadenia rigida* (60,45%) (Souza et al, 2013) e superior a de *Calophyllum brasiliense* (37,5%) (Botrel et al, 2006), sendo assim, o grau de polimorfismo para *S. terebinthifolius* é considerado razoável.

Ao se observar as médias de polimorfismo (Tabela 3), verificou-se que as populações de planalto mostraram um polimorfismo maior, quando comparadas com as populações ciliares, devido a maior exploração dessas áreas ciliares. Embora o número de indivíduos por população tenha sido o

mesmo em todas as populações, verificou-se uma variação entre os sítios polimórficos. Na região do alto Laranjinha, há uma diversidade maior, tanto para região de planalto como para região de rio, decrescendo em direção oposta a estas; fato que também foi observado no estudo da diversidade gênica de Nei, conforme demonstrado acima (Tabela 3). Embora *S. terebinthifolius* tenha sofrido exploração e restrição de sua área de distribuição, tanto no planalto como na mata ciliar, devido à devastação do seu habitat, ela ainda mantém taxas razoáveis de diversidade genética.

Ao analisar isoladamente as populações P3, L3 e L5, estas apresentaram uma porcentagem de locos polimórficos inferiores às outras populações. Cornuet e Luikart (1996) e Piry et al. (1999) sugerem que populações que experimentaram uma recente redução de seu tamanho efetivo exibem um número reduzido na porcentagem de locos polimórficos e diversidade gênica. No entanto, o efeito fundador pode ter atuado nessas populações, pois a devastação resultou numa grande quantidade de áreas que foram, após o desmatamento, abandonadas, se constituindo em habitats adequados para o estabelecimento de populações de *S. terebinthifolius*. Estas populações provavelmente se formaram a partir de poucos indivíduos, o que explicaria a baixa diversidade genética encontrada em algumas populações tais como, P3 (%P: 37,02 e H_s : 0,0949), L3(%P: 18,27 e H_s : 0,0186) e L5 (%P: 32,15 e H_s : 0,0403).

7.2 Estrutura genética das populações de *S. terebinthifolius*

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) para dez populações de *S. terebinthifolius* mostrou que 55,08% da variabilidade genética está distribuída dentro das populações e 44,92% entre as mesmas. O valor de F_{st} (0,4492), obtido, segundo Hartl e Clark (1988), indica alta diferenciação genética entre as populações. *S. terebinthifolius* é espécie pioneira dióica (Lenzi e Orth, 2002) e espécies com este sistema sexual não costumam apresentar alto valor de F_{st} . Assim, essa grande diferença genética entre as populações, evidenciada por um alto F_{st} , mostra, possivelmente, que a ação antrópica limitou a dispersão de sementes, devido à devastação dessas áreas, e que apenas poucos indivíduos

puderam se restabelecer, indicando um processo de efeito fundador nessas populações.

A AMOVA para duas diferentes regiões, rio e planalto, apresentou uma variação de 55,78% dentro de populações, 47,08% entre populações de grupos e - 2,86% entre grupos, indicando que não há diferenças entre os dois grupos de populações, as de planalto e rio. Segundo Kikamoto et al. (2005), populações localizadas em áreas de planalto, ou entre rios, teriam uma maior diferenciação do que aquelas localizadas ao longo de um mesmo sistema fluvial, fato este que não é observado no presente estudo. As áreas ciliares, teoricamente, seriam mais conservadas e formariam um corredor de conectividade entre as populações, por serem áreas de preservação permanente, entretanto, as mesmas sofreram alterações antrópicas com uma intensidade, muitas vezes, até maior do que as populações localizadas nas áreas de planalto. Muitas dessas áreas ciliares possuem uma aptidão agrícola maior do que as áreas planálticas, o que incentiva o desmatamento ilegal das mesmas. As populações do rio Laranjinha obtiveram uma alta variação genética entre as populações, com um F_{st} de 0,5095, resultado que não era esperado para as populações ciliares, visto que estas áreas ciliares, em tese, serviriam como um corredor contínuo de vegetação que possibilitariam um maior fluxo gênico entre as populações, assim, infere-se que, apesar de protegidas legalmente, estas áreas também sofreram alta fragmentação, rompendo a conectividade entre as populações.

Ao se comparar somente as populações ciliares do alto (L1,L2 e L3) e baixo (L4 e L5) Laranjinha, nota-se que as populações ciliares do alto Laranjinha possuem variabilidade maior do que populações ciliares do baixo Laranjinha, de modo que não foi possível inferir, por métodos genéticos indiretos, que possa haver fluxo gênico unidirecional causado por hidrocoria. Segundo Storfer (2007) populações localizadas a jusante possuem maior variabilidade do que aquelas localizadas a montante, no entanto, no presente estudo, o resultado foi inverso. Pelo padrão de diversidade genética encontrado nas populações ciliares ao longo de todo o rio, não é possível inferir que o mesmo se constitua num agente de dispersão hidrocórica, o que provocaria um fluxo gênico unidirecional, resultando numa tendência de maior diversidade genética nas populações à jusante.

No presente estudo, comparando-se, dois grupos, as populações do alto e baixo Laranjinha, obteve-se uma variação entre grupos de 4,41, considerado baixo, ou seja, há uma pequena diferença genética entre as populações do alto e baixo Laranjinha. Isso pode ser explicado pela diferente intensidade da ação antrópica nas duas regiões, sendo a região do baixo Laranjinha mais antropizada que o alto Laranjinha, o que pode ter provocado fragmentação, isolamento e extinção de populações nesta região; e pela eventual preferência ecológica da espécie na região do alto Laranjinha, como já foi discutido anteriormente.

Conforme descrito por Paiva (1998), estudos de variabilidade genética com espécies neotropicais tem demonstrado que estas preservam grande variabilidade dentro das populações. Ruas et al. (2011), realizando estudos com *S. terebinthifolius* por meio de marcadores *RAPD*, obteve um *Fst* de 0,1372 a partir de duas populações distantes em 180 km; Santos et al. (2008) obteve um valor *Fst* de 0,3138 em um estudo com *Spondias tuberosa*, de 15 ecorregiões, utilizando marcadores *AFLP*; Mariot (2000), ao estudar a estrutura genética de populações naturais de *Piper cernnum*, observou que a diferenciação genética, entre quatro populações da Mata Atlântica, foi elevada (*Fst* = 0,29), com forte estruturação espacial. O autor atribuiu a diferenciação encontrada ao efeito fundador das populações, visto que esta é uma espécie pioneira, que coloniza clareiras isoladas dentro da floresta.

Além dos efeitos da fragmentação da paisagem por ação antrópica, infere-se que, a alta diferenciação entre as populações de *S. terebinthifolius* também seja devido ao seu comportamento pioneiro, pois a espécie coloniza áreas abandonadas que ocorrem em mosaicos na paisagem, favorecendo o efeito fundador nestas populações. Por esta característica fragmentada e menos conservada destas áreas, infere-se que o fluxo gênico entre as populações seja muito baixo, por isso a divergência genética entre as mesmas.

A partir da análise da coordenada principal (Figura 5), é possível inferir que as populações de *S. terebinthifolius* estão bem estruturadas, ocorrendo maior similaridade genética entre os dois grupos: 1) populações agrupadas acima do eixo z (P3,P4,P5,L3,L4,L5); e 2) populações agrupadas abaixo do eixo z (P1,P2,L1 E L2). Os resultados mostram que as populações que possuem uma menor variabilidade genética (*Hs*) foram agrupadas entre si,

assim como aquelas que possuem uma maior variabilidade genética (H_s) também se agruparam, fato que coincidiu com a distribuição geográfica das mesmas: 1) agrupamentos acima do eixo z (região do baixo rio Laranjinha); e 2) agrupamentos abaixo do eixo z (região do alto rio Laranjinha). Essas observações foram confirmadas pela análise Bayseana (Figura 7) e pelo dendrograma (Figura 8), que também mostram a formação de dois grupos formados por populações com maior similaridade genética.

O dendrograma corroborou com as outras duas análises realizadas, tanto a Coordenada Principal quanto o Structure, indicando a formação de dois grupos, populações do alto Laranjinha e baixo Laranjinha.

O agrupamento entre alto e baixo Laranjinha se deu pelo fato de que esses dois grupos passaram por processos diferentes de perturbação, sendo que, as populações do alto Laranjinha sofreram menos com a interferência antrópica do que as do baixo Laranjinha.

A análise da correlação entre a distância genética (F_{st} par-a-par) e distância geográfica (figura 4) mostrou que não existe correlação significativa entre estas distâncias ($r = 0,1511$ $p > 0,05$). Por meio deste resultado, pode-se inferir que o fluxo gênico entre as populações seja bastante limitado. Esta limitação pode se dar pela natural distribuição fragmentada da espécie, causada pelo seu comportamento heliófilo e pioneiro, o que resulta na colonização de habitats específicos, naturalmente, presentes em mosaicos mais ou menos isolados na paisagem, a qual era originalmente, florestada e sombreada; e pela intensa ocupação humana, que fragmentou e isolou ainda mais estes habitats adequados à espécie, diminuindo ou mesmo interrompendo o fluxo gênico entre as populações.

8. CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados obtidos permitem concluir que as 10 populações de *S. terebinthifolius* estudadas apresentam, como um todo e individualmente, níveis de diversidade genética situados entre baixos e moderados. A intensa modificação antrópica da paisagem pode ter contribuído

para a diminuição dos níveis de diversidade genética encontrados nas populações das regiões estudadas.

A alta divergência genética detectada entre todas as populações pode ser explicada: 1) pela ocorrência de efeito fundador, o que gera populações geneticamente distintas, e mais ou menos isoladas, formadas por poucos indivíduos fundadores; 2) pelo natural comportamento pioneiro da espécie, com capacidade de colonização de manchas de habitats específicos e naturalmente fragmentados; e 3) pela intensa ocupação antrópica ocorrida em todas as regiões estudadas, o que levou à fragmentação, isolamento e extinção de populações.

Os resultados mostraram que as populações do baixo Laranjinha apresentaram menor diversidade genética e formaram um grupo de maior similaridade genética. Por outro lado, as do alto Laranjinha apresentaram maior diversidade genética e também formaram grupo geneticamente mais similar. Infere-se que a maior similaridade genética dentro de cada um destes grupos pode ser devido: 1) a um diferente grau de interferência antrópica ocorrido, sendo muito mais severo no baixo Laranjinha, contribuindo para a ocorrência de populações com menor variabilidade genética nesta região e, geneticamente, mais semelhantes; e 2) a uma possível preferência ecológica de *S. terebinthifolius* pelas características ambientais encontradas no alto Laranjinha, o que torna as populações naturalmente mais presentes e bem distribuídas na paisagem, o que pode contribuir para um fluxo gênico ligeiramente maior, diminuindo a distância genética entre estas populações.

As populações de *S. terebinthifolius* de regiões planálticas e ciliares não apresentaram diferenciação genética significativa, de modo que não é possível afirmar que o rio Laranjinha se constitui em um corredor ecológico e genético para as populações da espécie. Infere-se que, apesar das matas ciliares serem legalmente protegidas, o que, em tese, conservaria um corredor florestal ao longo de todo o rio, na prática, estas matas não têm sido conservadas, tendo experimentado, devido à alta aptidão agrícola de muitas áreas ciliares, uma devastação que pode ser até mais alta do que em muitas áreas planálticas, resultando em fragmentação, isolamento e extinção de populações.

REFERÊNCIAS

Águas Paraná – Instituto das águas do Paraná. Disponível em: <http://www.aguasparana.pr.gov.br/>. Acesso em: 6 de junho de 2012.

AB' SABER, A.N. O suporte geológico das florestas beiradeiras (ciliares). In: RODRIGUES, R.R.; LEITÃO FILHO, H.F. (Ed.). **Matas ciliares: conservação e recuperação**. São Paulo: editora EDUSP, 2000.

ARIMA, E.; BARRETO, P.; BRITO, M. **Pecuária na Amazônia: tendências e implicações para a conservação ambiental**. Belém: Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia, 2005.

BACLES, C.F.E.; JUMP, A.S. Taking a tree's perspective on forest fragmentation genetics. **Trends in Plant Science**, 16:1, 2010.

BARBOSA, L.M. Implantação de mata ciliar. In: SIMPÓSIO MATAS CILIARES: CIÊNCIA E TECNOLOGIA, Belo Horizonte, 1999. **Anais...** Belo Horizonte: CEMIG/UFLA, 1999, P. 111 – 135.

BARROS, M. V. F. **Análise ambiental urbana: estudo aplicado à cidade de Londrina – PR**. Universidade Estadual de São Paulo, 1998. 188p. Tese (Doutorado em Geografia Física).

BARRET, S.C.H.; KOHN, J.R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: Implications for conservation. In GENETICS AND CONSERVATION OF RARE PLANTS, 1991, Oxford. **Proceedings...** Oxford University Press, 1991. p. 31-44.

BEIGUELMAN, B. **Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J.R.; CARVALHO, F.I.R. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, 27: 513-520, 1997.

BLUM, C. T. **Caracterização florística e ecológica de remanescentes florestais no Rio das Cinzas**. Universidade Federal do Paraná, 2005. 110p. Dissertação (Mestrado em Ecologia).

BONAN, G.B. Forests and climate change: forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. **Science**, 320: 1444-1449, 2008.

BOTREL, M. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D.; PINTO, S. I. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, 30:821-827, 2006.

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

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

COUVET, D. Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations. **Conservation Biology**, 16:369-376, 2002.

CLAY, J. W. World agriculture and the environment: a commodity-by-commodity guide to impacts and practices. **ISBN**,1: 570, 2004.

DEAN, W. **With broadax and firebrand: the destruction of the Brazilian Atlantic Forest**. Berkeley:University of California Press, 1995. p. 285.

DIAS, M. C.; VIEIRA, A. O. S.; NAKAJIMA, J. N.; PIMENTA, J. A.; LOBO, P. C. Composição florística e fitossociologia do componente arbóreo das florestas ciliares do rio Iapó, na bacia do rio Tibagi, Tibagi, PR. **Revista Brasileira Botânica**, 21: 33-43, 1998.

DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. **Molecular Ecology**, 3:167-169, 2002.

DIETZOLD, S. S.; WENDEL, N. L. **Água sem florestas?** Disponível em: <http://www.arvore.com.br>. Acesso em: 25, maio, 2012.

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**. 1:20-33,2008.

DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**,12:13-15, 1987.

ELDRIDGE, K.G.; GRIFFIN, A.R. Selfing effects in *Eucalyptus regnans*. **Silvae Genetica**, Frankfurt, 31:216-221, 1983.

ELLSTRAND, N.C.; ELAM, D.R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 24:217-242, 1993.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **ARLEQUIN version 3.01**: an integrated software package for population genetics data analysis. Bern: University of Bern, Zoological Institute, 2005.

FAO – **Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura**. Disponível em: <https://www.fao.org.br/>. Acesso em: 20 de janeiro de 2014.

FALKENBERG, D.B. Aspectos da flora e da vegetação secundária da restinga de Santa Catarina, sul do Brasil. **Insula**, 28:1-30, 1999.

FERREIRA, D. A. C.; DIAS, H. C. T. Situação atual da mata ciliar do ribeirão São Bartolomeu em Viçosa, MG. **Revista Árvore**, 28:617-623, 2004.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 220 p.

FERREIRA, L.V.; VENTICINQUE, E.; ALMEIDA, S. O desmatamento na Amazônia e a importância das áreas protegidas. **Estudos Avançados**, 19:53, 2005.

FUCHS, E.J.; HAMRICK, J.L. Genetic Diversity in the Endangered Tropical Tree, *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). **Journal of Heredity**, 3:284–291, 2010.

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

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos da Genética da Conservação**. Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280 p.

FREIRE, J. M.; RODRIGUES, F. C. M. P.; LIMA, E. R.; SODRÉ, S. R. C.; CORRÊA, R. X. Estrutura genética de populações de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Guapuruvu) por meio de marcadores RAPD. **Scientia Florestalis**, 74:27-35, 2007.

FLEIG, M. Anacardiaceae. **Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul**, 42:77, 1987.

GOOGLE EARTH, Disponível em <http://www.google.com.br/intl/pt-BR/earth/index.html>. Acesso em: 05, junho, 2012.

GOUDET, J. **FSTAT**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, v. 11, n. 12, p. 271-276, 2002.

GORNALL, R.J.; HOLLINGSWORTH, P.M.; PRESTON, C.D. Evidence for spatial structure and directional gene flow in a population of an aquatic plant, *Potamogeton colaratus*. **Journal of Heredity**, 80: 414 – 421, 1998.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: Eucaliptus como modelo. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (eds). **Recursos Genéticos e Melhoramento: Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 967-994.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**, 39:439-446, 1974.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.

HUENNEK, L. Ecological implications of genetic variation in plant populations. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (eds.). **Genetics and conservation of rare plants**. Oxford: Oxford University Press, 1991. p. 31–33.

IBFLORESTAS – **Instituto Brasileiro de Florestas**. Disponível em: <http://www.ibflorestas.org.br/>. Acesso em: 06 de junho de 2012.

IPARDES – **Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social**, Secretaria de Estado do Planejamento e Coordenação Geral. Disponível em: http://www.ipardes.gov.br/webisis.docs/leituras_reg_meso_centro_oriental.pdf. Acesso em: 14 de abril de 2014.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin Societe' Vandoise des sciences naturelles**, 37: 547-549, 1901.

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

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

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

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; SOUZA, L.M.I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **IPEF**, 12: 65-70, 1998.

KAGEYAMA, P.; GANDARA, F. B. Revegetação de áreas ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILHO, H. de F. (eds). **Matas ciliares: conservação e recuperação**. Londrina: Editora Universidade de São Paulo-USP, 2000. p. 1-40.

KITAMOTO, N.; HONJO, M.; UENO, S.; TAKENAKA, A.; TISUMURA, Y. Spatial genetic structure among and within populations of *Primula sieboldii* growing beside separate streams. **Molecular Ecology**,32:149–157, 2007.

LAMB, D. Restoration of degraded tropical forest landscapes. **Science** 310:1628–1632, 2005.

LANDE, R.; BARROWCLOUGH, G.F. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In: SOULÉ, M.E.(ed). **Viable populations for conservation**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. p. 87–123.

LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. **Science**, 241: 1455–1460, 1988.

LENZI, M.; ORTH, A. I. Caracterização funcional do sistema reprodutivo da aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius raddi*), em Florianópolis-SC, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 26:198-201, 2004.

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

LORENZI, H. Árvores brasileiras. **Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

MALTEZ, H.M. **Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg -Apocynaceae (peroba rosa) em uma floresta estacional semidecidual no Estado de São Paulo**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 1997. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal).

MANLY, B.F.J. Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology. London, 1997.

MARIOT, A. **Distribuição da diversidade genética e aspecto da fenologia e dispersão de sementes da pariparoba (*Piper cernun*)**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2000. 110p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências).

MARTINS, S. V. **Recuperação de matas ciliares**. Viçosa: Aprenda fácil, 2001. 143 p.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. 2007. **Áreas prioritárias para a conservação, uso sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira: Atualização – Portaria MMA nº 09, de 23 de janeiro de 2007**. Brasília, MMA.

MEDRI, C.; RUAS, E.A.; RUAS, C.F.; MEDRI, P.S.; MEDRI, M.E.; RUAS, P.M. Population genetic structure of the tropical tree species *Aegiphila sellowiana* (Lamiaceae). **Genetics and Molecular Research**, 10:3186-3198, 2011.

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

METZGER, J. P. O Código Florestal tem Base Científica? **Natureza & Conservação**, V. 8:92-99, 2010.

MORAES, P.L.R.; DERBYSHIRE, M.T.V.C. Diferenciação genética e diversidade em populações naturais de *Cryptocaria aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Biota Neotropica**, 3: 85-98, 2003.

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

OBESO, J. R.; RETUERTO, R. Dimorfismo sexual en el acebo, *Ilex aquifolium*: coste de la reproducción, selección sexual o diferenciación fisiológica? . **Revista chilena de historia natural**, 75: 67-77, 2002.

PINTO, I.S., LOSS, A.C.C., FALQUETO, A. & LEITE, Y.L.R. Pequenos mamíferos não voadores em fragmentos de Mata Atlântica e áreas agrícolas em Viana, Espírito Santo, Brasil. **Biota Neotropica**, 9: 68-76, 2009.

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**, 90: 502-503, 1999.

PRITCHARD, D.E.; ANDERSON, K.L.; MYERS, Z.H. Seasonal patterns of bulk tank milk somatic cell counts. **Molecular Ecology**, 21:543-550, 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. **Journal of Heredity**, 86:248-249, 1995.

REIS, A.; TRES, D.R.; SCARIOT, E.C. Restauração na floresta ombrófila mista através da sucessão natural. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, 19:67-73, 2007.

RUAS, E.A.; RUAS, C.F.; MEDRI, P.S.; MEDRI, C.; MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J.A.; RODRIGUES, L.A.; RUAS, P.M. Anatomy and genetic diversity of two populations of *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) from the Tibagi River basin in Paraná, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 10: 526-536, 2011.

SANTANA, G.C.; MANN, R.S.; FERREIRA, R.A.; GOIS, I.B.; OLIVEIRA, A.S.; BOARI, A.J.; CARVALHO, S.V.A. Diversidade Genética de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morog. no baixo rio São Francisco, por meio de marcadores RAPD. **Revista Árvore**, 32:427-433, 2008.

SEBBEN, A.M. **Distribuição da variação genética de populações de jequitibá-rosa [*Cariniana legalis* (Mart.) O. ktze.] por caracteres quantitativos e isoenzimas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001. Tese.

SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Conservação genética *in situ* e número de matrizes para a coleta de sementes em população de *Genipa americana* L. **Scientia Forestalis**, 30:13-22, 2003.

SILVA, N. L. S. da; ZONIN, W. J.; MALAVASI, U. C.; RICHTER, L. M.; BACKES, C.; CASIMIRO, E. L. N.; GARTENER, M.; FREIER, M.; JOHANNNS, O.; PORTZ, R. L.; PEREIRA, V. H. Diagnóstico da situação atual da mata ciliar na microbacia do arroio Gavirá no município de Marechal Cândido Rondon (PR). In: 1º SIMPÓSIO PARANAENSE DE MATA CILIAR. Maringá, 2000. **Resumos Expandidos...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2000, p. 105-106.

SIMBERLOFF, D.; FARR, J.A.; COX, J.; MEHLMAN, D.W. Movement Corridors: Conservation bargains or poor investments?. **Conservation Biology**. 6:493-504, 1992.

SOJA, A.J. Climate-induced boreal forest change: predictions versus current observations. **Global Planet. Change** , 56:274–296, 2007.

SOULÉ, M.E. **Conservation biology. The science of scarcity and diversity**. Sunderland: Sinauer Associates, 1986. 584 p.

SOUZA, L.B.; RUAS, E.A.; RODRIGUES, L.A.; RUAS, C.F.; RUAS, P.M. AFLP marker analysis revealing genetic structure of the tree *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) in the southern Brazilian Tropical Rainforest. **Genetics and Molecular Biology**, 4:533–539 , 2013.

SOUZA, L.M.F.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBEN, A.M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hill (Bombacaceae). **Scientia Forestalis**, 65:70-79, 2004.

SHARMA, I.K.; CLEMENTS, M.A.; JONES, D.L. Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 29:681-695, 2001.

SCHLUTER, P.M.; HARRIS, S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology Notes**. 6:569-572.

STORFER, V.L.; MURPHY, M.A.; EVANS, J.S.; GOLDBERG, C.S.; ROBINSON, S. et al. Putting the 'landscape' in landscape genetics. **Journal of Heredity**, 17:128-142, 2007.

SHIMIZU, J.Y.; JAEGER, P.; SOPCHAKI, S.A. Variabilidade genética em uma população remanescente de araucária no Parque do Iguaçu, Brasil. **Boletim de pesquisa florestal**, 31:18-36, 2000.

VERÍSSIMO, A.; BARRETO, P.; MATTOS, M.; TARIFA, R.; UHL, Christopher. In. ALMEIDA, Oriana. (Org). Impactos da atividade madeireira e perspectivas para o manejo sustentável da floresta numa velha fronteira da Amazônia: o caso Paragominas. Belém. **Imazon**, 41:9-37, 1996.

VIANA, V.M.; TABANEZ, A.J.A.; MARTINEZ, J.L.A. Restauração e manejo de fragmentos florestais. **Revista do Instituto Florestal**, 4:400-406, 1992.

VOLPATO, G.H.; BARROS, M.V.F. Análise dos remanescentes florestais da Bacia Hidrográfica do rio Tibagi – Paraná, utilizando Sistemas de Informação Geográfica. **Geografia**, 10: 231-243, 2001.

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

WADT, L.H.O.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética e sistema de acasalamento de *Piper hispidinervum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39:151-157, 2004.

WILSON, G.A.; RANNALA, B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus Genotypes. **Genetics**, 30:1177-1191, 2003.

YOUNG, A. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, 11: 413–418, 1996.