

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

**LUCIMARA CRUZ DE SOUZA**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM UMA POPULAÇÃO  
NATURAL DE *Plathymenia reticulata* Benth. NO SUL DO ESPÍRITO  
SANTO**

**ALEGRE, ES  
FEVEREIRO-2017**

LUCIMARA CRUZ DE SOUZA

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM UMA POPULAÇÃO  
NATURAL DE *Plathymenia reticulata* Benth. NO SUL DO ESPÍRITO  
SANTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como requisito do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento

Orientador: Dr. Fábio Demolinari de Miranda  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Sustanis Horn Kunz

ALEGRE, ES  
FEVEREIRO-2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

S729d Souza, Lucimara Cruz de, 1992-  
Diversidade e estrutura genética em uma população natural de  
Plathymenia reticulata Benth. no sul do Espírito Santo / Lucimara Cruz  
de Souza. – 2017.

82 f. : il.

Orientador: Fábio Demolinari de Miranda.

Coorientadora: Sustanis Horn Kunz.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e  
Engenharias.

1. Árvores matrizes. 2. Marcador molecular ISSR. 3. Variabilidade  
genética. 4. Vinhático. 5. Florestas – Conservação. I. Miranda, Fábio  
Demolinari de. II. Kunz, Sustanis Horn. III. Universidade Federal do  
Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 575:631

---

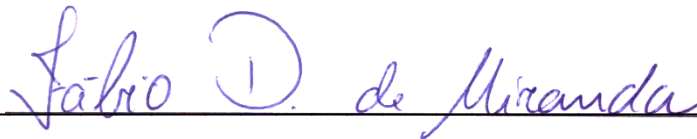
LUCIMARA CRUZ DE SOUZA

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM UMA POPULAÇÃO  
NATURAL DE *Plathymenia reticulata* Benth. NO SUL DO ESPÍRITO  
SANTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como requisito do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovado em 17 de fevereiro de 2017.

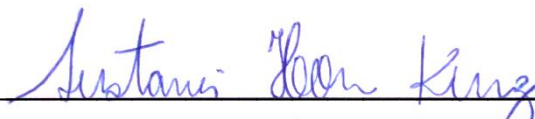
COMISSÃO EXAMINADORA



**Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda**

Universidade Federal do Espírito Santo

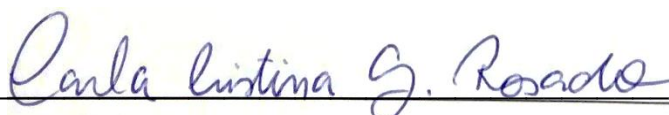
Orientador



**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sustanis Horn Kunz**

Universidade Federal do Espírito Santo

Coorientadora



**Dr<sup>a</sup>. Carla Cristina Gonçalves Rosado**

Universidade Federal do Espírito Santo

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

(Charles Chaplin)

## AGRADECIMENTOS

Quero começar meus agradecimentos com o provérbio deixado pelo grande Salomão: Peça a Deus que abençoe os seus planos, e eles darão certo (Pv. 16:3). Superação e gratidão são as palavras do meu mestrado. Superação, porque foram dois anos de intensas mudanças. Para quem nunca havia morado sozinha, eu fui uma bela dona de casa. Além disso, eu tive que lidar com alguns sentimentos e limitações todos misturados de uma só vez. Pois é, eu tive que aprender a controlar o medo e a ansiedade, embora eu tenha fracassado inúmeras vezes. E aí vem a Gratidão, porque eu não cheguei até aqui sozinha e por isso gostaria de agradecer...

Ao grande e bom Deus, meu refúgio, o protagonista das minhas vitórias. Sabe aquela força que te impulsiona a prosseguir? Então, a minha vem dEle. *“Ele me estendeu a mão e na minha fraqueza, me fez ser forte”*;

À minha família, meu pai Sebastião Lúcio, minha mãe Mariza e minha irmã Mariana, meus maiores exemplos. Agradeço também a minha vovó Cidinha e seu marido José. Obrigada pelo esforço, orações e dedicação para que eu pudesse chegar até aqui. Irei continuar precisando de todo esse apoio, porque essa é só uma das muitas vitórias que virão, eu tenho fé nisso. *“Ohana quer dizer família, família quer dizer nunca mais abandonar ou esquecer”*. Eu amo vocês!

Ao meu namorado Adelson, por ser o para-raios das minhas crises de ansiedade, pelo apoio nos momentos difíceis, por subir nas árvores para coletar, por me emprestar o ombro para eu chorar quando os meus géis insistiam em dar errado. *“Quando Deus te criou, acho que Ele estava pensando em mim”*, obrigada pelo companheirismo. Sou grata também a toda a sua família;

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (Família BqMol), Kelmer, Maressa, Bruno, Franciele, Rodrigo, Edílson, Liliana, Ronald, Cássio, Thammyres, Ramon, Davi, Thayllon e José Dias. Obrigada pela amizade, pelas dicas, gargalhadas, paciência. Deixo aquela antiga frase para vocês: *“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”*. Sou grata também à professora Taís Cristina Bastos Soares por conceder o espaço para o desenvolvimento desse projeto;

À todos os amigos que conquistei durante a Pós-Graduação, em especial: Abigail (“tô moída”), Anderson (MasterChef), Rômulo (*teacher*), Luis (com sua estrondosa risada), Ludimila (exemplo de superação), Lidiane (ninguém segura

quando começa a rir), Luziane (a menina da Bahia), Natália (da Galileia, musa), José Henrique (Zé, o cara da estatística) e Roberta (a sortuda da evolução);

Um agradecimento especial aos amigos Clever, Aléxia, Alessandra e Izabela. Vocês foram a confirmação de que nenhum encontro é por acaso. Nós conseguimos, Clever! Se eu pudesse eu colocaria aqui a sua foto enterrado na areia da praia, mas não dava né (rsrsrs). Aléxia, Alessandra e Izabela (lindas e finas), não tenho palavras para agradecer todo o apoio, mas tenho convicção de que vocês foram presentes enviados por Deus. *“Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir. Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende. Amigo a gente sente”*;

Ao meu orientador Fábio Demolinari de Miranda, pelo exemplo de profissionalismo, pela orientação, ensinamentos, a confiança depositada, dedicação e paciência durante todo o mestrado;

À minha coorientadora Sustanis Horn Kunz, pelas ricas contribuições, dedicação e disponibilidade em sempre me ajudar;

À Carla Cristina Gonçalves Rosado por aceitar participar da comissão avaliadora, pelo seu apoio, auxílio e por também ter sido especial durante essa jornada;

À Universidade Federal do Espírito Santo, ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade concedida para realização do curso e a todos os professores pelo conhecimento transmitido;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

À Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) pelos recursos disponibilizados para o desenvolvimento do projeto;

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Sabrina Furtado, por sua dedicação, amizade e profissionalismo;

Ao Sr. Paulo pelas contribuições durante as coletas, pelas histórias que sempre contava, pela gangorra de cipó (rsrsrs), pelo conhecimento transmitido. Meu muito obrigada;

A todos que contribuíram de alguma forma para esse momento, meus sinceros agradecimentos.

Lucimara Cruz de Souza

## **BIOGRAFIA**

Lucimara Cruz de Souza, filha de Sebastião Lúcio de Souza e Mariza de Souza Cruz, natural de Leopoldina-MG, nascida em 11 de março de 1992.

Em fevereiro de 2010, ingressou como aluna de graduação no curso de Licenciatura plena em Ciências Biológicas, na Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), campus Ubá-MG. Concluiu o curso em dezembro de 2013, colando grau em janeiro de 2014 onde obteve o título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Em março de 2015, iniciou o curso de mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre-ES, na linha de pesquisa Biotecnologia, sob orientação do professor Fábio Demolinari de Miranda. Atuou em atividades de pesquisa com ênfase em diversidade genética e genética molecular de espécies vegetais, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2017.



## RESUMO

A fragmentação florestal e a exploração na forma de corte seletivo de determinadas espécies são responsáveis pela redução de extensas áreas contínuas, ocasionando a redução da diversidade genética. Assim, torna-se necessário definir estratégias de conservação e manejo dos remanescentes florestais para garantir a sobrevivência e a manutenção de populações reduzidas. Os marcadores moleculares destacam-se como ferramentas interessantes para esses estudos. A espécie *Plathymania reticulata* Benth., conhecida popularmente como vinhático, pertence à família Fabaceae. Essa espécie se destaca por sua importância econômica e ecológica, devido a madeira de alta qualidade e o potencial para uso em recuperação e restauração de áreas degradadas. Este estudo teve como objetivo caracterizar a diversidade e a estrutura genética em uma população natural de *P. reticulata*, ocorrente em um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual Montana no sul do estado do Espírito Santo, por meio de marcadores moleculares *Inter Single Sequence Repeats* (ISSR). Amostras de DNA de 149 indivíduos foram analisadas por meio de dez *primers* ISSR, gerando 156 fragmentos, dos quais, 101 foram polimórficos (64,74%). Os indivíduos amostrados foram classificados em três unidades amostrais: árvores adultas saudáveis e em idade reprodutiva (A), plântulas originadas de sementes coletadas no interior do fragmento – mistura de progênies (B) e indivíduos jovens em áreas de regeneração natural no entorno do fragmento (C). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) para os marcadores, revelou média de 0,38, caracterizando-os como mediamente informativos. O número de locos utilizados ( $n = 101$ ), foi maior do que o estabelecido como número ótimo ( $n = 88$ ), indicando precisão nas análises. Constatou-se alta diversidade genética na espécie, fundamentada nos valores do índice de diversidade de Nei ( $H' = 0,407$ ), índice de Shannon ( $I = 0,594$ ) e pela formação de grupos distintos pelo método UPGMA. Além disso, por meio dos parâmetros de diversidade avaliados foi possível confirmar que nas áreas de regeneração natural e na mistura de progênies existe diversidade genética equivalente ao que é encontrado nos adultos. A análise de variância molecular indicou que a maior parte da variação genética é encontrada dentro dos grupos (96,53%) e revelou moderada diferenciação entre adultos e regenerantes e adultos e mistura de progênies. A diferenciação genética entre as árvores adultas foi baixa ( $\Phi_{ST} = 0,03$ ) indicando que as altas taxas de fluxo gênico ( $N_m = 12,70$ ) estão anulando os efeitos da deriva genética. Tais resultados também foram confirmados pelas análises de distância genética de Nei, análises de coordenadas principais (PCoA) e pela abordagem bayesiana realizada pelo *software* STRUCTURE. Os dados obtidos permitiram avaliar o potencial das árvores adultas como matrizes para obtenção de mudas com variabilidade genética certificada.

**Palavras-chave:** árvores matrizes, marcador molecular ISSR, variabilidade genética, vinhático, florestas – conservação.

## ABSTRACT

Forest fragmentation and selective logging of certain species are responsible for the reduction of large continuous areas, leading to the reduction of genetic diversity. Therefore, it is necessary to define strategies for the conservation and management of forest remnants to ensure the survival and maintenance of reduced populations. Molecular markers stand out as interesting tools for these studies. The species *Plathymenia reticulata* Benth., popularly known as vinhático, belongs to the family Fabaceae. This species stands out for its economic and ecological importance due to high quality wood and the potential for use in the recovery and restoration of degraded areas. The objective of this study was to characterize the diversity and genetic structure of a natural *P. reticulata* population in a seasonal semideciduous montane forest in the southern state of Espírito Santo, using molecular markers Inter Single Sequence Repeats (ISSR). DNA samples from 149 individuals were analyzed using ten ISSR primers, generating 156 fragments, of which 101 were polymorphic (64.74%). The sampled individuals were classified into three sample units: healthy and reproductive age adult trees (A), seedlings originated from seeds collected within the fragment - mixture of progenies (B) and young individuals in natural regeneration areas around the fragment (C). The polymorphic information content (PIC) for the markers revealed an average of 0.38, characterizing them as moderately informative. The number of loci used ( $n = 101$ ) was greater than that established as optimal number ( $n = 88$ ), indicating precision in the analyzes. High genetic diversity was found in the species, based on the values of the diversity index of Nei ( $H' = 0.407$ ), Shannon index ( $I = 0.594$ ) and the formation of distinct groups by the UPGMA method. In addition, through the diversity parameters evaluated, it was possible to confirm that in the areas of natural regeneration and progeny mix there is genetic diversity equivalent to that found in adults. The analysis of molecular variance indicated that most of the genetic variation is found within the groups (96.53%) and showed moderate differentiation between adults and regenerants and adults and mixture of progenies. Genetic differentiation among adult trees was low ( $\Phi_{ST} = 0.03$ ) indicating that high gene flow rates ( $N_m = 12.70$ ) are negating the effects of genetic drift. These results were also confirmed by the Nei genetic distance analysis, principal coordinate analysis (PCoA) and the Bayesian approach performed by the STRUCTURE software. The data obtained allowed to evaluate the potential of adult trees as matrices to obtain seedlings with certified genetic variability.

**Key words:** matrix trees, molecular marker ISSR, genetic variability, vinhático, forests – conservation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa de distribuição natural do Vinhático (*P. reticulata*), nos estados brasileiros. A área demarcada em vermelho evidencia os locais de ocorrência. Fonte: CNCFlora, 2016..... 21
- Figura 2 - Figuras ilustrativas de *P. reticulata* considerando: árvore adulta (a); tronco e casca (b), folhas (c), flores (d), frutos (e) e sementes (f)..... 23
- Figura 3 - Mapa de localização da área de estudo, indicando o estado (Espírito Santo) e o município (Guaçuí) onde a população de *P. reticulata* da Floresta do Rosal está localizada. Fonte: A autora..... 30
- Figura 4- Mapa de localização dos grupos amostrados incluindo as unidades amostrais de adultos de *P. reticulata* na área preservada (A1), na área particular (A2) e as três áreas de regeneração (C1, C2 e C3), ocorrentes em Guaçuí-ES. Fonte: A autora..... 32
- Figura 5 - Experimento conduzido em BOD (A) e plântulas transferidas para sacos de polietileno após a germinação (B), Laboratório de Análise de Sementes- CCAE/UFES, Alegre/ES. Fonte: A autora. .... 34
- Figura 6 - Experimento conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal do Espírito Santo CCAE/UFES, Alegre/ES. Fonte: A autora. .... 34
- Figura 7 - Fragmentos resultantes da amplificação do DNA genômico de 27 indivíduos de *P. reticulata* em gel de agarose 2% com a utilização do *primer* UBC 807..... 45
- Figura 8 - Coeficiente de correlação ( $r$ ) obtido pela análise de *bootstrap* e número de fragmentos amplificados para os 149 indivíduos de *P. reticulata* empregando 10 *primers* ISSR. .... 47
- Figura 9 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética na subunidade amostral A1, representada por 19 indivíduos adultos de *P. reticulata*, agrupados pelo método UPGMA, formando quatro grupos. Ponto de Corte (Pc): 94,55%. .... 49
- Figura 10 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética na subunidade amostral A2, representada por 48 indivíduos adultos de *P. reticulata*, agrupados pelo método UPGMA, formando seis grupos. Ponto de Corte (Pc): 85,41%. .... 50
- Figura 11 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 67 indivíduos adultos de *P. reticulata*, agrupados pelo método UPGMA, formando nove grupos. Ponto de Corte (Pc): 85,23%..... 51
- Figura 12 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos 149 indivíduos de *P. reticulata* com base em marcadores moleculares ISSR..... 60
- Figura 13 - Abordagem Bayesiana (*software* STRUCTURE) de 67 indivíduos adultos de *P. reticulata* ocorrentes em Guaçuí-ES. A- Gráfico da média  $\pm$  o desvio padrão de

LnP(K) para 20 corridas. B - Gráfico de barras identificando o número de agrupamentos, indicando k=1. As letras A1 e A2 referem-se aos conjuntos de indivíduos adultos. C - Saída de dados do método proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005) usando o *software* STRUCTURE HARVESTER, indicando a média  $\pm$  o desvio padrão de LnP(K). ..... 61

Figura 14 - Abordagem Bayesiana (*software* STRUCTURE) de 149 indivíduos de *P. reticulata* ocorrentes em Guaçuí-ES. A- Gráfico dos valores de  $\Delta K$  para cada valor de K. Melhor K (2), seguindo o critério proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005). B - Gráfico de barras identificando o número de agrupamentos em relação as unidades amostrais. As letras A1, A2, C1, C2, C3 e B referem-se às unidades e subunidades amostrais avaliadas..... 62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação taxonômica atual de <i>P. reticulata</i> .....	21
Tabela 2 - Coordenadas geográficas (latitude e longitude) e o número de indivíduos (N) das três subunidades amostrais de regenerantes de <i>P. reticulata</i> , localizados no entorno do fragmento estudado em Guaçuí-ES .....	35
Tabela 3 - Distâncias geográficas em metros entre as áreas de regeneração e as localidades de adultos de <i>P. reticulata</i> em Guaçuí-ES .....	35
Tabela 4 - <i>Primers</i> ISSR desenvolvidos pela <i>University of British Columbia</i> (UBC), testados em amostras de DNA de cinco indivíduos da espécie <i>Plathymenia reticulata</i> e suas respectivas sequências (5'-3') .....	37
Tabela 5 - <i>Primers</i> ISSR selecionados para <i>P. reticulata</i> e descrição do número total de bandas amplificadas (NTB) por <i>primer</i> ISSR (incluindo todas as unidades amostrais), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP), variação de tamanho dos fragmentos gerados em pares de bases (TPB) estabelecido com base em marcador de 100pb e conteúdo de informação polimórfica (PIC).....	44
Tabela 6 - Parâmetros de diversidade genética para cada unidade amostral e subunidades de <i>P. reticulata</i> calculadas com o auxílio do <i>software</i> POPGENE, assumindo Equilíbrio de Hardy-Weinberg .....	53
Tabela 7 - Análise de variância molecular (AMOVA) da população geral (espécie) e entre as unidades amostrais de <i>P. reticulata</i> .....	56
Tabela 8 - Distância genética de Nei calculada entre os indivíduos de <i>P. reticulata</i> .	58

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 Perda e fragmentação de habitat.....	17
2.2 Seleção de árvores matrizes.....	18
2.3 Gênero <i>Plathymenia</i> Benth .....	20
2.3.1 Descrição, ocorrência e potencialidades de <i>Plathymenia reticulata</i> .....	20
2.4 Diversidade genética e Marcadores moleculares .....	24
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	29
3.1 Objetivo Geral .....	29
3.2 Objetivos Específicos .....	29
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 Área de estudo .....	30
4.2 Coleta dos dados.....	32
4.3 Extração do DNA.....	35
4.4 Análises com marcadores <i>Inter-Simple Sequence Repeat</i> –ISSR.....	37
4.5 Análise estatística dos dados .....	39
4.5.1 Análises dentro dos grupos .....	40
4.5.2 Análises entre os grupos .....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
5.1 Seleção dos <i>primers</i> ISSR .....	43
5.2 Diversidade dentro dos grupos .....	48
5.3 Diversidade entre os grupos .....	55
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	64
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>APÊNDICE 1</b> .....	79
<b>ANEXO 1</b> .....	82

## 1 INTRODUÇÃO

O avanço das atividades antrópicas no Brasil associado à crescente demanda por madeira e expansão populacional, tem ameaçado a conservação da biodiversidade. As florestas tropicais, em particular o domínio da Floresta Atlântica e seus ecossistemas associados, têm sido afetados por atividades que intensificam a perda, degradação e fragmentação da cobertura florestal (PERES et al., 2010; SILVA JÚNIOR et al., 2016).

A fragmentação de habitat associada a cortes seletivos ilegais de madeiras nobres modificam a composição e a estrutura da paisagem (YOUNG; BOYLE, 2000). Em decorrência de tais processos antrópicos as populações e indivíduos podem ser reduzidos e isolados espacialmente, levando a um aumento de autofecundações e cruzamentos correlacionados (DAL BEM et al., 2015). Adicionalmente, a dinâmica de processos genéticos como o fluxo gênico e processos estocásticos como a deriva genética podem ser afetados, alterando a diversidade genética dentro e entre grupos de indivíduos (YOUNG; BOYLE, 2000; TEMPLETON, 2011).

Diante desse contexto, os estudos genéticos em populações reduzidas e fragmentadas tornam-se imprescindíveis. Diversas pesquisas têm sido direcionadas com o objetivo de expansão da cobertura florestal, embasadas em técnicas de manejo e identificação de indivíduos com características genéticas satisfatórias para serem utilizados como matrizes para coletas de sementes com finalidades de recuperação e restauração de áreas degradadas (HIGA; SILVA, 2006; RODRIGUES et al., 2009). Além disso, a quantificação dos níveis de variação genética dentro e entre as populações tornam-se essenciais para a definição de estratégias para a manutenção e conservação das espécies vegetais (ESTOPA et al., 2006; GALETTI JR. et al., 2008).

A espécie arbórea *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae), conhecida popularmente como vinhático, apresenta potencial para exploração econômica devido sua madeira de ótima qualidade, sendo também utilizada em plantios mistos na recuperação de áreas degradadas (LACERDA et al., 2002). A espécie possui vasta distribuição nos estados brasileiros (MORIM, 2015). No estado do Espírito Santo, dentre as ocorrências naturais de *P. reticulata*, destaca-se a região sul do estado, a qual nas duas últimas décadas sofreu intensa exploração e redução, devido ao extrativismo de madeiras florestais.

Embora levantamentos florísticos realizados na vegetação dessa área não tenham identificado indivíduos de *P. reticulata* (LAGE, 2012), expedições a campo revelaram um número expressivo de indivíduos adultos da espécie, distribuídos ao longo de todo o remanescente florestal no sul do Espírito Santo e indivíduos regenerantes/jovens em áreas no entorno de toda a área em regeneração natural.

A literatura fornece exemplos de estudos enfatizando a importância da proximidade de áreas de regeneração com uma matriz florestal próxima e ressaltam que o sucesso da regeneração natural depende, dentre outros fatores, da chegada de propágulos dessas fontes florestais adjacentes (VOLPATO et al., 2012; MARTINS, 2014). Dessa forma, a comparação da diversidade e similaridade genética de indivíduos jovens regenerantes com a de indivíduos adultos, permite identificar essa importância da proximidade da matriz florestal com áreas em processo de regeneração (MARTINS et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; MARTINS et al., 2014).

Nessa perspectiva, a utilização de marcadores moleculares de DNA, como o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), torna-se ferramenta importante para subsidiar estudos genéticos com espécies vegetais. Estes marcadores possibilitam quantificar a diversidade genética que é fundamental para o potencial adaptativo das populações (CRUZ et al., 2011, IDREES; IRSHAD, 2014). Os marcadores ISSR são universais, de natureza dominante, possuem baixo custo e boa reprodutibilidade (NG; TAN, 2015; SOUZA, 2015).

Dentro desse contexto, objetivou-se caracterizar a diversidade e estrutura genética de uma população de *P. reticulata* na região sul do Espírito Santo e investigar por meio de dados genéticos, obtidos por marcadores ISSR, as seguintes questões: i) a exploração de *P. reticulata*, em decorrência de corte seletivo, influenciou os índices de diversidade genética da população? ii) os regenerantes da espécie que estão se desenvolvendo próximos a uma matriz florestal e as plântulas originadas de sementes do interior do fragmento florestal, tem variabilidade genética similar às árvores adultas da população?



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Perda e fragmentação de habitat da Floresta Atlântica

A Floresta Atlântica, conhecida por ser um dos biomas mais ricos em biodiversidade, é em contrapartida um dos ambientes mais afetados pelos impactos antrópicos. A exploração desordenada de seus recursos naturais, principalmente pela retirada de árvores para fins madeireiros e sua ocupação desenfreada, levou a redução e fragmentação da floresta, classificando-a como uma das mais ameaçadas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2010; VARJABEDIAN, 2010).

A perda e a fragmentação de habitat naturais juntamente com a exploração ilegal por meio do corte seletivo irregular, têm sido identificadas como as principais ameaças à conservação e a diversidade genética das espécies. Devido à essas atividades antrópicas, áreas anteriormente contínuas encontram-se reduzidas em pequenos fragmentos florestais isolados espacialmente (BRANDON et al., 2005; SATO et al., 2011).

A perda de habitat foi considerada por Fahring (2003) como a diminuição da área total de uma região, referindo-se à quantidade de área remanescente. O termo fragmentação por sua vez, é denominado como a subdivisão populacional em demes isolados, isto é, um habitat contínuo é reduzido a vários fragmentos pequenos e isolados (TEMPLETON, 2011).

O corte seletivo refere-se à retirada de um grupo de árvores de alto valor comercial, ou seja, apenas as árvores mais valiosas comercialmente são selecionadas e retiradas da floresta (MATRICARDI et al., 2010). Embora esse processo possa ser associado a um manejo florestal adequado, a retirada de árvores de forma exploratória e desordenada pode ocasionar perdas expressivas na diversidade genética das espécies vegetais (SEBBENN et al., 2008).

Todos esses processos podem alterar a estrutura genética das espécies, contribuindo para a redução e esgotamento da diversidade genética dentro das populações e aumento da diferenciação entre elas. Do ponto de vista da conservação genética, as alterações dentro e entre populações podem ser afetadas diretamente pelos processos de deriva genética e fluxo gênico (AGUILAR et al., 2008; TEMPLETON, 2011).

A deriva genética é uma força evolutiva que promove mudanças aleatórias nas frequências alélicas em populações finitas. Devido ao isolamento das populações, a

deriva atuará de forma independente em cada subpopulação. Portanto, devido a aleatoriedade, as subpopulações irão evoluir em direções diferentes levando a fixação de um ou outro alelo. Assim, se as populações permanecem isoladas por muito tempo haverá um aumento da divergência genética entre elas. Além disso, a redução drástica do tamanho populacional, conhecida como efeito *bottleneck*, favorece a ocorrência da deriva genética, que é mais contundente em pequenas populações, resultando em perda de variação genética (SEOANE et al., 2005; TEMPLETON, 2011).

O fluxo gênico por sua vez, atua de forma oposta à deriva genética. O termo refere-se ao movimento de genes, troca genética entre as populações locais, permitindo reduzir as diferenças nas frequências alélicas entre elas. O resultado é a redução da variabilidade genética entre as populações, aumentando a variabilidade dentro da população (SLAKTIN, 1987; SEBBENN, 2002; TEMPLETON, 2011).

Dessa forma, em decorrência dos processos antrópicos de fragmentação, corte seletivo e redução da vegetação, os indivíduos tendem a se tornar isolados espacialmente. Como consequência, os efeitos da deriva serão mais contundentes e pelo fato dos indivíduos reprodutivos estarem isolados, ocorrerá uma diminuição do fluxo gênico entre as árvores remanescentes, aumentando a diferenciação genética entre as populações (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998; MARTINS et al., 2008; TEMPLETON, 2011).

Portanto, diante do atual cenário, estudos genéticos em remanescentes florestais tornam-se necessários para a definição de estratégias para a conservação de espécies vegetais e a expansão da cobertura florestal (ESTOPA et al., 2006; HIGA; SILVA, 2006; GALETTI JR. et al., 2008).

## **2.2 Seleção de árvores matrizes**

Uma árvore é denominada como matriz quando apresenta características fenotípicas superiores às demais da mesma espécie. Tais características dependem da finalidade em que as sementes coletadas serão destinadas. Todavia, algumas características são comuns a todas as finalidades, como a boa condição fitossanitária, o vigor e a produção de sementes (NOGUEIRA; MEDEIROS, 2007; SENA; GARIGLIO, 2008).

A marcação de árvores matrizes é uma alternativa viável para a obtenção de

sementes com qualidade genética certificada, visto que existe uma carência na disponibilidade de informações sobre a procedência dos lotes de sementes no mercado (MARTINS et al., 2009). Entretanto, para se obter sucesso na coleta de sementes de alta qualidade, as árvores matrizes selecionadas devem ser representativas da diversidade genética da população, a fim de conservar o potencial evolutivo das espécies (SEBBENN, 2002; MARTINS et al., 2009).

A utilização de sementes florestais tornou-se uma ferramenta importante para os programas de restauração, conservação de espécies e para fins madeireiros (PIÑA- RODRIGUES et al., 2007). Vale salientar que para o sucesso dos programas de recuperação e restauração utilizando espécies florestais nativas, é primordial o conhecimento da origem genética das sementes (VIEIRA et al., 2001).

Para a coleta de sementes com a finalidade de uso em programas de recuperação ou restauração florestal, características de fuste, forma de copa e outros aspectos produtivos não precisam ser levados em consideração. Recomenda-se a seleção aleatória de indivíduos com características semelhantes daquelas onde o plantio será realizado. O ideal é que haja o máximo de variabilidade genética possível para garantir que a área tenha plantas geneticamente diversificadas, capazes de resistir às pressões ambientais (SENA; GARIGLIO, 2008; MARTINS et al., 2009).

O número de árvores matrizes que serão selecionadas para a coleta de sementes é de fundamental importância. A utilização de poucas árvores matrizes na coleta de sementes pode afetar a futura adaptabilidade da vegetação, pois os novos indivíduos podem conter apenas uma pequena amostra do conjunto gênico original, resultando em baixa variabilidade genética na população (VIEIRA et al., 2001; SEBBENN, 2002).

Diferentes fontes literárias apontam números mínimos de matrizes para coleta de sementes bastante variáveis. Segundo Sebben (2006) as sementes devem ser coletadas de no mínimo 30 matrizes. Nogueira e Medeiros (2007) indicam que a coleta deve ser feita entre 10 a 20 árvores matrizes ao acaso em cada população. Já Sena e Gariglio (2008) recomendam que a coleta seja feita, no mínimo, em 15 árvores por espécie. Mesmo tendo-se um número variável, em todos os casos descritos o objetivo é o mesmo, obter sementes com alta variabilidade genética.

Dentre as espécies arbóreas com potencial para serem utilizadas em

pesquisas visando a marcação de matrizes e coleta de sementes, destaca-se *Plathyenia reticulata* Benth., espécie com características desejáveis para programas de recuperação e restauração florestal (CRUZ et al., 2012; PILON; DURIGAN, 2013). Assim, estudos que forneçam informações sobre as populações naturais da espécie são importantes para subsidiar estratégias de conservação e manejo sustentável.

### **2.3 Gênero *Plathyenia* Benth.**

O gênero *Plathyenia* Benth. é nativo da América do Sul e foi primeiramente descrito em 1842 por George Bentham. O autor incluiu em sua descrição duas espécies para o gênero: *P. reticulata* Benth., de ocorrência no Cerrado, e *P. foliolosa* Benth. na Floresta Atlântica (WARWICK; LEWIS, 2003). Para tal classificação, as características usadas para a diferenciação das espécies foram o habitat, a altura da copa, o indumento da inflorescência, o número de folíolos por folha e o número de foliólulos por folíolo (HERINGER, 1956, WARWICK; LEWIS, 2003).

Entretanto, algumas mudanças taxonômicas foram propostas para o gênero. Tais mudanças foram apoiadas pelas análises desenvolvidas por Lacerda et al. (2001; 2002), que enfatizaram a genética de populações de *Plathyenia*, usando marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), onde se observou uma indicação de fluxo gênico entre as duas espécies.

Assim, a partir desses trabalhos e revisões morfológicas, a mais recente revisão taxonômica do gênero indicada por Warwick e Lewis (2003), propuseram a sinonimização de *P. foliolosa* em *P. reticulata*, tornando o gênero monoespecífico. Vários estudos morfológicos e ecofisiológicos tem corroborado com esses trabalhos e tem também considerado o gênero como monoespecífico com ocorrência nos dois biomas (LACERDA et al., 2004; GOULART; LEMOS FILHO; LOVATO, 2005; LEMOS FILHO; GOULART; LOVATO, 2008; NOVAES et al., 2010).

#### **2.3.1 Descrição, ocorrência e potencialidades de *Plathyenia reticulata***

*P. reticulata* é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae. É popularmente conhecida como vinhático, vinhático-do-campo, amarelinho, pau-amarelo, entre outras, de acordo com sua localidade geográfica. O nome popular vinhático é relativo a vinha que remete à madeira da espécie que é da cor “vermelho vinho” (SILVA JÚNIOR, 2005; CARVALHO, 2009). A posição taxonômica da espécie

obedece a hierarquia descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação taxonômica atual de *P. reticulata*

<b>Categorias</b>	<b>Taxonomia</b>
Classe	Equisetopsida
SubClasse	Magnoliidae
Super ordem	Rosanae
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Gênero	<i>Plathymenia</i> Benth.
Espécie	<i>Plathymenia reticulata</i> Benth.

Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Acesso 20 Ago. 2016.

A espécie encontra-se distribuída de forma natural nos estados do Amazonas, Pará, Bahia, Ceará, Maranhão, Piauí, Pernambuco, Alagoas, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (Figura 1) (MORIM, 2015). O vinhático também possui ocorrência confirmada em outros países, como Bolívia, Paraguai e Suriname (WARWICK; LEWIS, 2003).

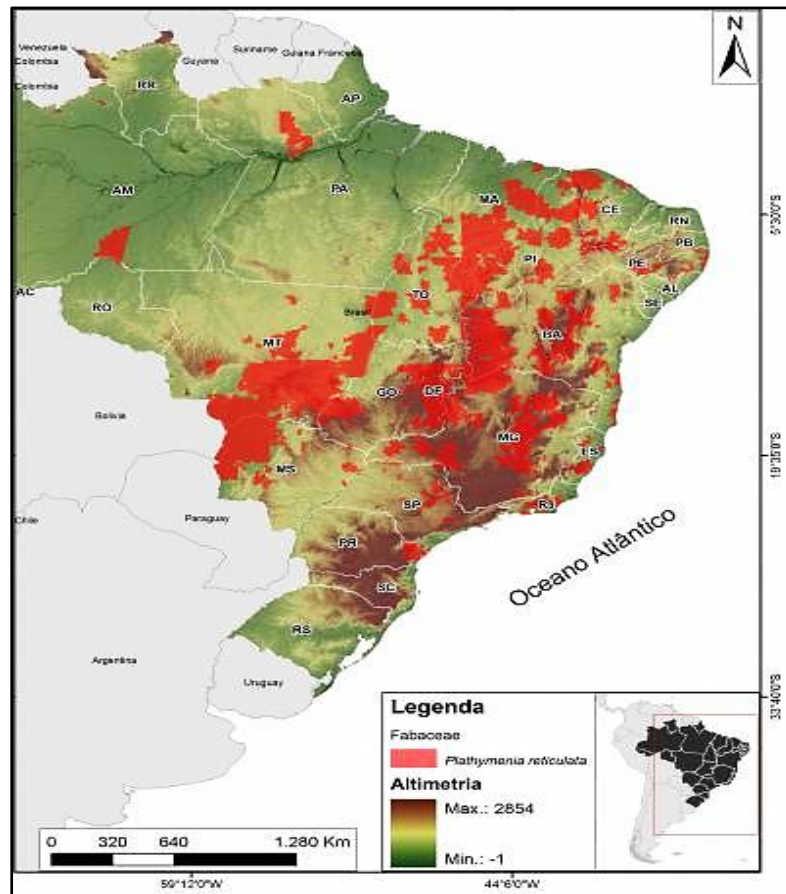


Figura 1 - Mapa de distribuição natural do Vinhático (*P. reticulata*), nos estados brasileiros. A área demarcada em vermelho evidencia os locais de ocorrência. Fonte: CNCFlora, 2016.

Os indivíduos de *P. reticulata* possuem ampla distribuição nos biomas em que ocorrem. Na Floresta Atlântica encontra-se distribuída na floresta semidecidual e em menor ocorrência na floresta ombrófila. No Cerrado, cresce principalmente no cerradão e no cerrado *stricto sensu*. Pode também ser encontrada na Amazônia e na Caatinga (CARVALHO, 2009; MORIM, 2015).

O vinhático é uma árvore diploide ( $2n=26$ ), caducifólia, heliófita, seletiva xerófila. Na Floresta Atlântica pode atingir na idade adulta até 40 m de altura e 150 cm de diâmetro à altura do peito (Figura 2a), mas não ultrapassam 12 m de altura e 50 cm de diâmetro, no Cerrado (WARWICK; LEWIS, 2003; GOULART; LEMOS FILHO; LOVATO, 2005).

A espécie foi identificada como uma das principais espécies arbóreas presentes em áreas de regeneração do Espírito Santo (MARTINS et al., 2014). Os indivíduos apresentam dispersão irregular, descontínua, ocorrendo em densidade moderada em algumas áreas estando completamente ausentes em outras, preferencialmente em terras altas com boa drenagem (LORENZI, 2002).

Devido às características marcantes de *P. reticulata*, as árvores podem ser facilmente reconhecidas em campo (NOVAES et al., 2010). Apresentam tronco cilíndrico, ramificação dicotômica, copa irregular aberta, pouco densa e com ramos terminais lenticelados. A superfície da casca externa ou ritidoma é suberosa e relativamente fina, de cor grisácea a pardacenta, com fissuras que se fragmentam em placas lenhosas que são soltas na porção superior (Figura 2b) (CARVALHO, 2009, ROCHA; BORGES; ROMERO, 2014).

As folhas são compostas, bipinadas de 15 a 20 cm de comprimento, possuem 3 a 12 pares de pinas opostas e 10 a 19 folíolos alternos (Figura 2c). As flores são hermafroditas, numerosas, esbranquiçadas, dispostas em inflorescências em forma de espiga (Figura 2d) (ROCHA; SOUZA-SILVA, 2002; MORIM, 2015).

O fruto é um criptolomento seco composto por duas partes, o epicarpo-mesocarpo deiscente de coloração marrom (fruto maduro), e pelo endocarpo indeiscente e segmentado que envolvem as sementes individualmente (Figura 2e) (ROCHA; SOUZA-SILVA, 2002).

Os frutos possuem em média 10 a 12 sementes, estas são largo oval e compressa, testa lisa, polida e de coloração marrom claro a escuro (Figura 2f). A espécie possui abundante produção de sementes, cerca de 15.000 a 33.200 por quilo (WARWICK; LEWIS, 2003; CARVALHO, 2009).

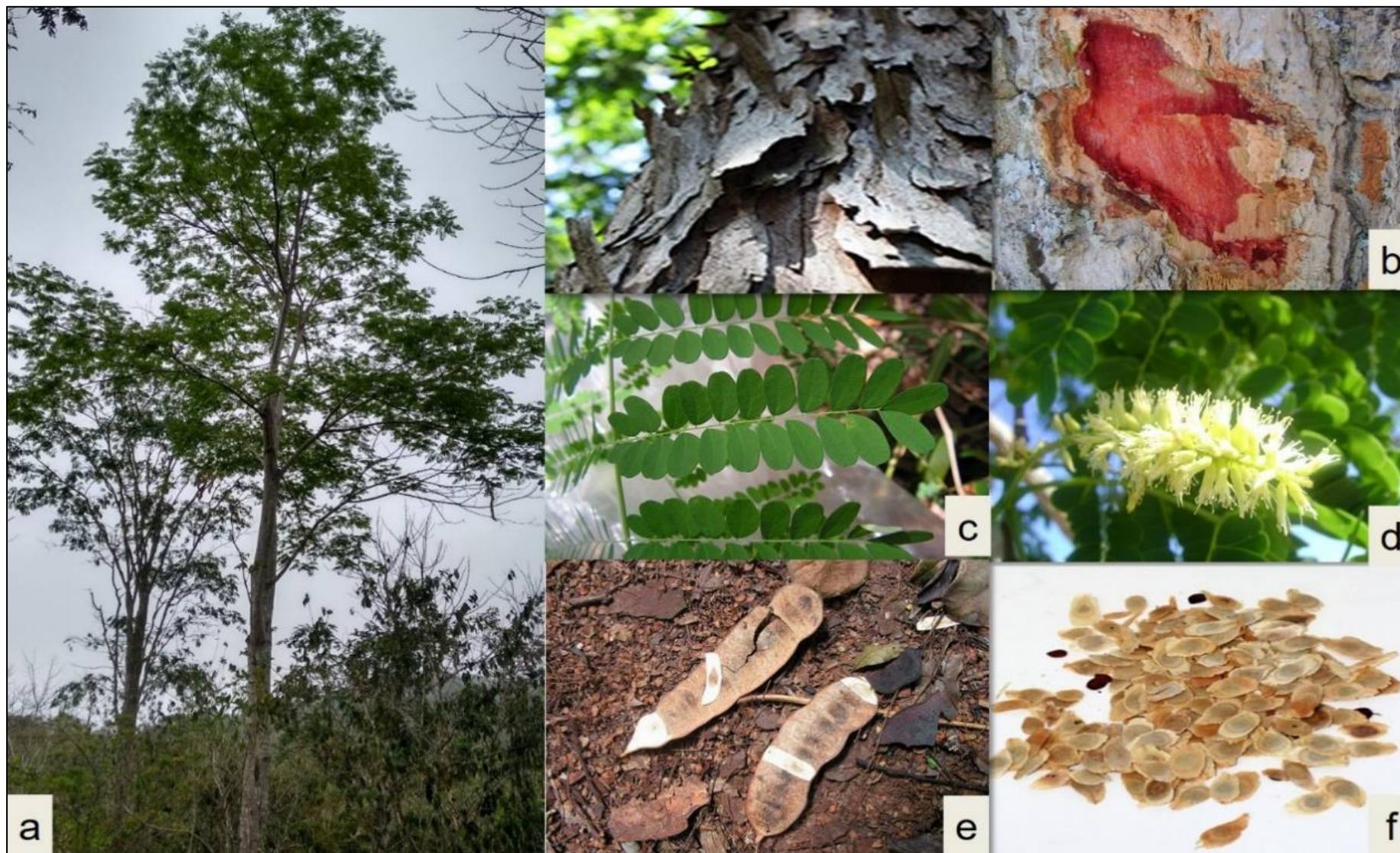


Figura 2 - Figuras ilustrativas de *P. reticulata* considerando: árvore adulta (a); tronco e casca (b), folhas (c), flores (d), frutos (e) e sementes (f).  
Fonte: QUEIROZ, 2012. Adaptado pela autora.

Segundo Lorenzi (2002), *P. reticulata* floresce entre os meses de setembro a novembro e seus frutos amadurecem entre agosto e setembro, período onde a planta está destituída de folhagem. Suas flores são atraentes a pequenos insetos e principalmente abelhas e vespas, sendo esses os agentes de polinização da espécie (entomofilia). Suas sementes são dispersadas pelo vento (anemocoria) e o sistema reprodutivo é principalmente por fecundação cruzada (alógama) (LACERDA et al., 2002; WARWICK; LEWIS, 2003).

A espécie apresenta importância econômica devido a madeira de alta qualidade que tem sido empregada para diversos fins. Por ser uma madeira leve, fácil de trabalhar e resistente aos organismos xilófagos é amplamente utilizada para construção naval e civil, mobiliário de luxo, estacas, esteios e mourões (BRAGA et al., 2007; CARVALHO, 2009)

Além disso, *P. reticulata* apresenta importância ecológica devido ao seu potencial para uso em recuperação e restauração de áreas degradadas. É uma espécie pioneira, capaz de fixar nitrogênio, com boa deposição de folhas sobre o solo, dispersam sementes a longas distâncias e adaptam-se a terrenos mais pobres, características que revelam o seu potencial para restauração e recuperação de ambientes degradados (CRUZ et al., 2012; PILON; DURIGAN, 2013).

As árvores também são úteis à ornamentação e paisagismo. A casca do tronco fornece tinta amarela que pode ser utilizada em tinturaria e coloração de fios de algodão e suas flores e frutos formam arranjos intitulados “flores do planalto”. Apresentam ainda propriedades medicinais, sendo muito utilizada como cicatrizante (ROCHA; SOUZA-SILVA, 2002; AQUINO; WALTER; RIBEIRO, 2007).

#### **2.4 Diversidade genética e Marcadores moleculares**

Ao longo das últimas décadas, as iniciativas conservacionistas aumentaram em grande escala, porém, ainda não são suficientes para garantir a conservação dos ecossistemas, cuja manutenção está seriamente comprometida (CUNHA et al., 2011; SILVA JÚNIOR et al., 2016).

Para que as ações de manejo e de conservação sejam bem-sucedidas, é fundamental conhecer como as espécies estão estruturadas em suas populações e como a diversidade genética, que fornece o potencial adaptativo de uma espécie, está estruturada dentro e entre as populações (GALETTI JR. et al., 2008).



Do ponto de vista molecular, a diversidade genética é visualizada por meio do polimorfismo, de um ou mais fragmentos de DNA, entre os indivíduos de uma população (RAMALHO et al., 2012). Pode ser definida ainda, como a quantidade total de variações genéticas observadas tanto dentro como entre as populações (MUNIZ et al., 2014).

De acordo com Hamrick et al. (1982) as espécies arbóreas tendem a ter os mais elevados níveis de diversidade devido aos variados sistemas reprodutivos, síndromes de polinização e dispersão. Entretanto, tem-se observado uma alteração na porcentagem de variação encontrada em populações naturais, devido ao isolamento dessas populações, decorrente dos processos de fragmentação florestal (VIEGAS et al., 2011).

Assim, o conhecimento da diversidade genética nas espécies vegetais é de fundamental relevância para subsidiar estratégias conservacionistas e para avaliar o impacto das atividades humanas na biodiversidade (CRUZ et al., 2011). A literatura fornece diversos exemplos de pesquisas que já estão sendo realizadas com essa finalidade (MARTINS et al., 2008; SANTANA et al., 2011; ROSSI et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2015; RAMALHO et al., 2016).

A avaliação da diversidade genética era a princípio realizada a partir de informações fenotípicas. Com os avanços na biologia molecular, as análises puderam ser realizadas com o auxílio dos marcadores moleculares, que permitiram detectar a variação genética nas espécies diretamente a nível de DNA (CRUZ et al., 2011).

Os marcadores moleculares surgiram na década de 1980 e se destacam por serem fenotipicamente neutros, aplicáveis a qualquer material vegetal e em qualquer estágio de desenvolvimento, permitindo obter um número quase ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma (FALEIRO, 2007; GUIMARÃES et al., 2009). Um marcador molecular pode ser definido como sendo qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As isoenzimas foram os primeiros marcadores moleculares a serem desenvolvidos, entretanto, a baixa capacidade de evidenciar polimorfismo entre genótipos muito próximos, levaram à busca por aprimoramentos nas técnicas da biologia molecular. A partir daí os novos marcadores passaram a ser desenvolvidos especificamente a partir do DNA, sendo conhecidos como marcadores de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO, 2007)

Os marcadores de DNA, segundo Silva (2012), são herdados geneticamente e são capazes de detectar variações nas sequências de DNA. Assim, é possível identificar divergências e semelhanças entre os indivíduos a partir das diferenças entre as sequências de nucleotídeos (TOPPA; JADOSKI, 2013).

Com a possibilidade de detecção de polimorfismo diretamente a nível de DNA, diversas classes de marcadores puderam ser desenvolvidas. Inicialmente, os marcadores foram evidenciados por meio de enzimas de restrição, que permitiram a análise de comprimento de fragmentos de DNA, como no caso do RFLP (*“Restriction Fragment Length Polymorphism”*) (AVISE, 1993; FALEIRO, 2007; SILVA, 2012).

Posteriormente, com o advento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) outras classes de marcadores moleculares foram desenvolvidas. Entre eles pode-se citar o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) (WILLIAMS et al., 1990); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) (VOS et al, 1995); SSR (*Simple Sequence Repeats* - Sequências Simples Repetidas) ou microssatélites (LITT; LUTY, 1989) e o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats* - Inter Repetições de Sequência Simples) (MEYER et al., 1993; GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ, RAFALSKY; LABUDA, 1994). Tais marcadores são considerados as principais classes para estudos genéticos vegetais (MALIK et al., 2014).

As diferentes classes de marcadores são caracterizadas pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade ao nível do DNA, quanto à capacidade de identificar polimorfismos, custo, facilidade de uso e repetibilidade. Para serem visualizados, tais marcadores precisam ser submetidos a técnicas eletroforéticas, o que permite diferenciar os indivíduos de acordo com o perfil que ele apresenta (BORBA et al., 2005; HOFFMANN; BARROSO, 2006; FALEIRO, 2007).

Existe um acervo de publicações revelando as finalidades para as quais os marcadores moleculares podem ser utilizados. Dentre essas finalidades pode-se citar os estudos de diversidade genética em populações naturais, melhoramento e mapeamento genético, *fingerprinting*, caracterização e identificação de variações genéticas, estudos de conservação e manejo florestal (BORÉM; CAIXETA, 2009; GONÇALVES et al., 2014; ROSSI et al., 2014; RAMALHO et al., 2016).

Os marcadores moleculares podem ser divididos em marcadores dominantes e marcadores codominantes de acordo com a capacidade de diferenciar genótipos homozigotos dominantes de heterozigotos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998;

MARCELINO et al., 2007).

Os marcadores codominantes (RFLP, VNTR e SSR) permitem a diferenciação entre os genótipos homocigotos dominantes (AA) dos heterocigotos (Aa), sendo o polimorfismo identificado pela presença de bandas de tamanhos diferentes (alelos) em um mesmo loco. Já os marcadores dominantes, tais como o RAPD, AFLP e ISSR, são aqueles que não fazem distinção entre homocigotos dominantes dos heterocigotos. Nesse caso, os polimorfismos entre os indivíduos são identificados nas análises eletroforéticas pela presença ou ausência de bandas (MARCELINO et al., 2007; CRUZ et al., 2011; RAMALHO et al., 2012).

Por apresentarem tais características, os marcadores dominantes são considerados menos informativos que os codominantes, no entanto, tais marcadores produzem numa única reação múltiplos fragmentos de DNA (considerados locos), sem a necessidade de primeiro conhecer a sequência de DNA das regiões alvo (NG; TAN, 2015). Além disso, os marcadores dominantes apresentam natureza hipervariável, alta transferibilidade e baixo custo, enquanto que os marcadores codominantes são desenvolvidos especificamente para a espécie de interesse, o que eleva o custo de sua utilização, pois embora existam trabalhos com sucesso de transferibilidade, essa ainda é limitada (BORÉM; CAIXETA, 2009; SOUZA, 2015).

Dentre os marcados dominantes, os marcadores ISSR tem revelado grande potencial para análises de diversidade genética, sendo uma técnica alternativa para estudos de polimorfismos baseados em microssatélites (SILVA et al., 2011).

Para a técnica de marcadores ISSR, são utilizados como *primers* oligonucleotídeos complementares às regiões do genoma conhecidas como sequências microssatélites. Os microssatélites consistem em curtas regiões no genoma (dois a cinco nucleotídeos) repetidas em tandem na sequência de DNA. Assim, os ISSRs são segmentos de DNA flanqueados nas extremidades, por tais sequências microssatélites (NG; TAN, 2015; SOUZA, 2015).

A técnica de marcadores ISSR foi desenvolvida por grupos de pesquisas independentes por volta de 1990 (MEYER et al., 1993; GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ, RAFALSKY; LABUDA, 1994) e envolve a amplificação de DNA por PCR e a utilização de um único *primer* (de 16 a 25 pares de base) desenvolvido com base nas sequências microssatélites nas extremidades 5' e 3' (GUIMARÃES et al., 2009; IDREES; IRSHAD, 2014).

Nas análises de variação genética a escolha de um bom marcador deve levar

em consideração o poder do marcador em detectar alta variabilidade genética, a natureza da informação (dominante ou codominante) e a facilidade no uso da técnica (ANNE, 2006).

Nessa perspectiva, os marcadores ISSR tem se mostrado ideais para vários estudos, apresentando em relação aos outros marcadores dominantes diversas vantagens, como alta informatividade, facilidade da técnica no laboratório, baixo custo e alta reprodutibilidade (IDREES; IRSHAD, 2014; NG; TAN, 2015).

Devido a essas características, esses marcadores têm sido utilizados em estudos para diferentes finalidades, como análises de diversidade e conservação genética, mapeamento genético, biologia evolutiva, filogenia, investigação de germoplasma, relações intraespecíficas (SANKAR; MOORE, 2001; REDDY et al., 2002; TANYA et al., 2011; CAMARGO et al., 2013).

Esses marcadores também têm sido utilizados com sucesso em análises de diversidade genética em espécies arbóreas tais como: *Bertholletia excelsa* (RAMALHO, 2016), *Elaeis guineensis* (CHAGAS et al., 2015), *Hancornia speciosa* Gomes (COSTA et al., 2015) e *Lecythis pisonis* Cambess (BORGES, 2016). Também são utilizados para análises em espécies da família Fabaceae, como *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. (ARAÚJO et al., 2016), *Prosopis cineraria* (L.) Druce (SHARMA, 2011) e *Vicia amoena* (LIU et al., 2013). Em tais pesquisas, os marcadores demonstraram potencial para revelar e quantificar a diversidade genética das espécies.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a diversidade e estrutura genética da espécie *Plathymenia reticulata*, em um remanescente de Floresta Estacional Semidecidual Montana na região sul do Espírito Santo.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Estimar e comparar a magnitude e a distribuição da variabilidade genética entre os indivíduos amostrados, utilizando marcadores moleculares *Inter Simple Sequence Repeat –ISSR*;
- Verificar os possíveis efeitos do corte seletivo sobre a variabilidade genética da espécie;
- Comparar a variabilidade genética das árvores adultas com a variabilidade genética das plântulas originadas de sementes coletadas no interior do fragmento (mistura de progênies) e regenerantes nas áreas em processo de regeneração natural no entorno;
- Analisar como a diversidade genética está particionada entre e dentro das unidades amostrais;
- Avaliar o potencial dos indivíduos adultos demarcados para serem utilizados como árvores matrizes para coleta de sementes e produção de mudas com maior variabilidade genética.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

O estudo foi desenvolvido em dois fragmentos florestais e em áreas de pastagens nas proximidades em processo de regeneração natural, localizados no município de Guaçuí-ES e entre as coordenadas geográficas 20°53' latitude Sul e 41°42' de longitude Oeste, com distância de cerca de 20 km da sede do município (Figura 3) (SANSEVERO; PIRES; PEZZOPANE, 2006).

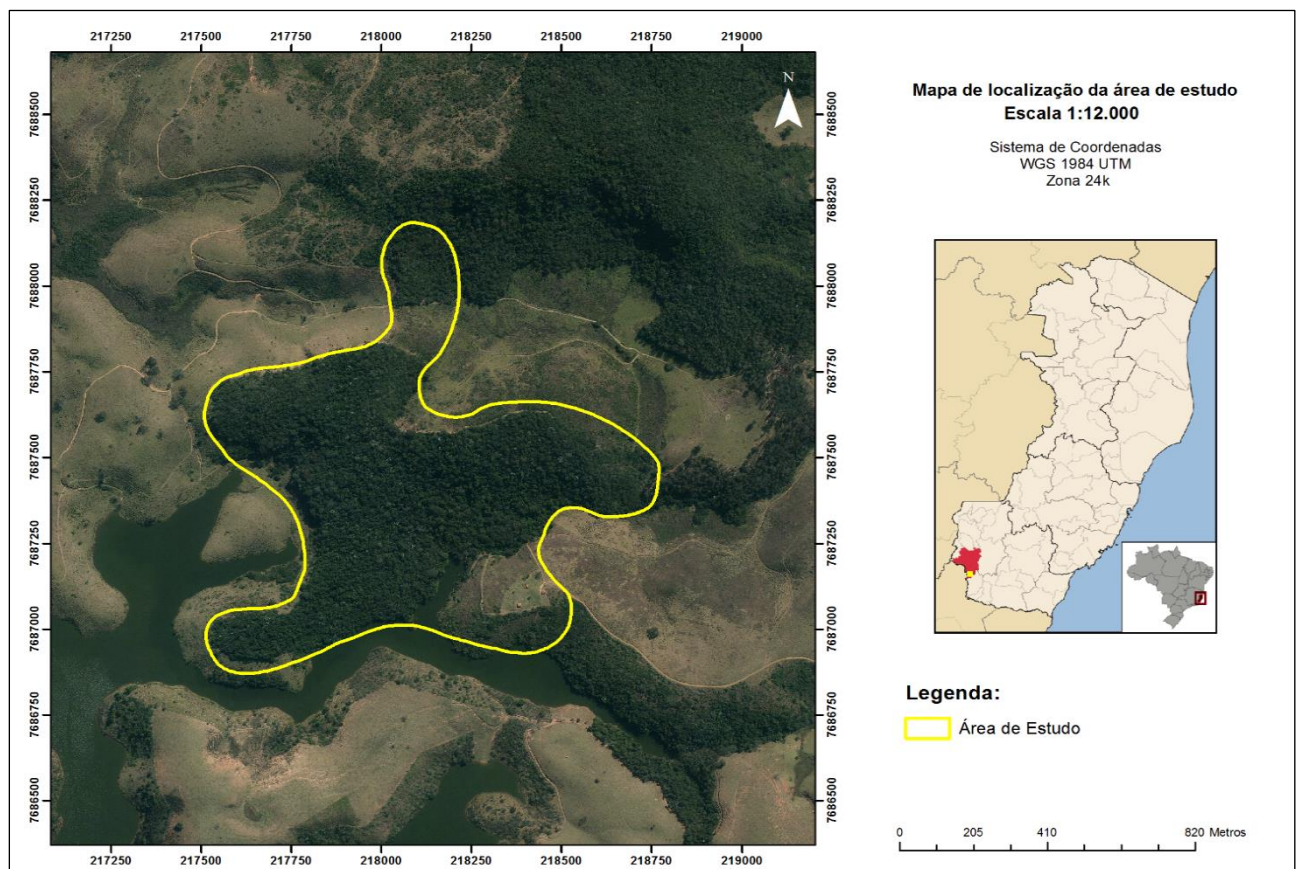


Figura 3 - Mapa de localização da área de estudo, indicando o estado (Espírito Santo) e o município (Guaçuí) onde a população de *P. reticulata* da Floresta da Rosal está localizada. Fonte: A autora.

Um dos fragmentos florestais é conhecido como Floresta da Rosal, um dos remanescentes de Floresta Atlântica mais importante da região (CURTO et al., 2013). Possui aproximadamente 93 hectares e está localizado na Área de Preservação Permanente (APP) da Usina Hidrelétrica Rosal (UHE Rosal), pertencente à empresa CEMIG (Companhia Energética de Minas Gerais). A usina possui uma área de espelho d'água de 170 hectares e é limitada pelos municípios de Guaçuí, São José do Calçado/ES e Bom Jesus do Itabapoana/ RJ (REZENDE et al., 2009; CURTO, 2011).

O segundo fragmento florestal está em uma propriedade particular e possui acessibilidade para coletas. A separação entre estas áreas florestais é de aproximadamente 100 metros e estão interconectadas por pequenos remanescentes florestais e áreas de pastagens.

Toda a área de estudo é contemplada pela fitofisionomia Floresta Estacional Semidecidual Montana e relevo acidentado com altitude média de 650 metros (REZENDE et al., 2009).

Segundo a classificação de Köppen, o clima da região se enquadra no tipo *Cfa* (subtropical, com verão quente), com temperatura média anual de 19 °C e precipitação anual em torno de 1.246 mm (ALVARES et al., 2013).

A construção da UHE Rosal teve início em 1999 e ao final de 2004 a empresa CEMIG adquiriu o controle acionário da usina (CACHAPUZ, 2006). Entretanto, por volta de 1990, toda a área de estudo, incluindo os fragmentos no entorno da usina passaram por um grande processo de exploração de seus recursos madeireiros, pois ainda pertencia a uma propriedade particular. Para atender a demanda da fazenda, os recursos madeireiros eram explorados de forma desordenada por meio de cortes seletivos de madeiras nobres. Dentre as espécies arbóreas do fragmento, a espécie *P. reticulata* teve sua madeira utilizada na construção de estacas, esteios e mourões para cercas e currais. Além disso, grande parte das atividades de pecuária eram desenvolvidas dentro do fragmento, o que resultou na formação de trilhas e destruição da regeneração local (LAGE, 2012).

De acordo com Oliveira, Santos e Santos (2010) apenas 14,6% da área no entorno da represa é coberta por fragmentos florestais. Estas informações ressaltam a importância do desenvolvimento de estudos nos fragmentos remanescentes da região.

O presente estudo está inserido no projeto intitulado “Desenvolvimento de ações para a recuperação de áreas degradadas no sul do Espírito Santo”, de parceria institucional com a Empresa Rosal Energia S.A e o DCFM/CCAUE/UFES, que prevê a revegetação do entorno da UHE Rosal com espécies nativas em toda a faixa da área de preservação permanente, além de elencar o potencial do fragmento como uma área para coleta de sementes.

## 4.2 Coleta dos dados

Foram amostrados indivíduos em três fases de desenvolvimento, os quais foram caracterizados em três unidades amostrais: árvores adultas saudáveis e em idade reprodutiva (A), plântulas originadas de sementes coletadas no interior do fragmento – mistura de progênies (B) e indivíduos em áreas de regeneração natural no entorno do fragmento (C).

Para a amostragem e coleta dos indivíduos adultos (unidade amostral A), o método utilizado foi a busca exaustiva, que consistiu de caminhadas por toda a área e consultas a um parobotânico para reconhecimento da espécie e o levantamento do número de indivíduos de *P. reticulata* remanescentes. Cada indivíduo adulto amostrado foi demarcado utilizando GPS (Sistema de Posicionamento Global), avaliado dendrometricamente (altura estimada por avaliação visual e diâmetro à altura do peito (DAP), medido a 1,30 m do solo com fita diamétrica) e descrito conforme ficha de campo para cadastro e caracterização de árvores matrizes (Anexo 1).

A unidade amostral A foi dividida em duas subunidades amostrais (A1 e A2), que se referem a dois pontos de coletas dos indivíduos adultos (Figura 4).

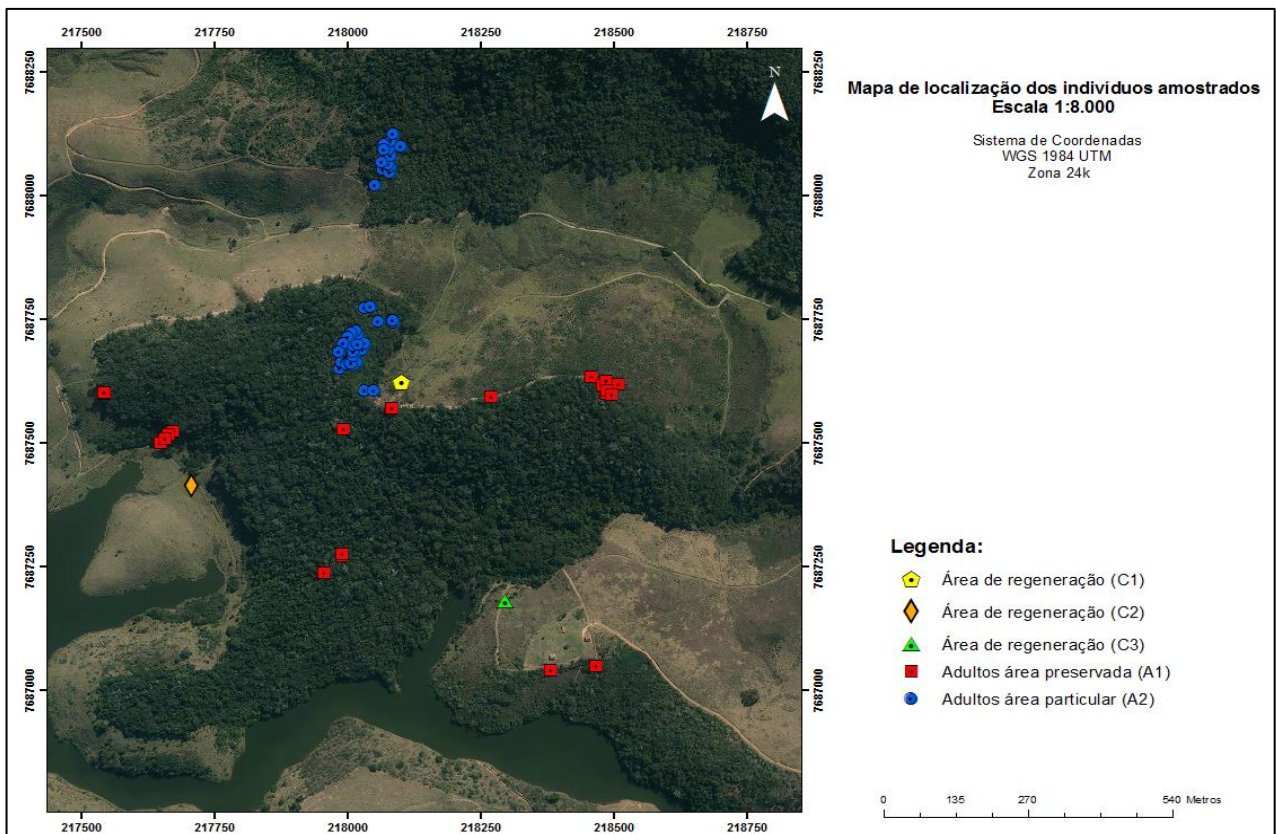


Figura 4- Mapa de localização dos grupos amostrados incluindo as unidades amostrais de adultos de *P. reticulata* na área preservada (A1), na área particular (A2) e as três áreas de regeneração (C1, C2 e C3), ocorrentes em Guaçuí-ES. Fonte: A autora.



A subunidade A1 foi composta por 19 árvores (de 7 a 35 m de altura e 15 a 119 cm de DAP), numeradas de 1 a 19 para as análises. Tais árvores foram amostradas no interior do fragmento, na Área de Preservação Permanente - APP pertencente a CEMIG. A subunidade A2 refere-se a uma área particular onde foram amostrados 48 indivíduos (de 10 a 40 m de altura e 15 a 65 cm de DAP), numerados de 20 a 67. Essa área particular é propriedade de um produtor rural e está localizada próxima ao fragmento, separado deste por aproximadamente 100 metros. É uma área de maior extensão, comparada a área da Floresta da Rosal e possui um número expressivo de indivíduos adultos de *P. reticulata*, além de acessibilidade para coletas. Totalizou-se 67 árvores adultas coletadas (Apêndice 1).

A unidade amostral B foi composta por plântulas originadas de sementes coletadas no interior do fragmento. As sementes foram extraídas de frutos maduros coletados após a queda natural no solo. Para tal amostragem, um número aproximadamente semelhante de frutos foi coletado em cada árvore, sendo o número de sementes variável para cada fruto. Dessa forma, foram coletadas 360 sementes de 20 indivíduos adultos que estavam em idade reprodutiva.

Após as coletas das sementes, estas foram armazenadas em sacos de papel e acondicionadas na geladeira. Posteriormente, foram submetidas a testes de germinação, conduzidos no Laboratório de Análise de Sementes (LAS) do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, CCAE/UFES, Alegre/ES. Para os testes, foram utilizadas 180 sementes em BOD (câmara de germinação) com temperatura constante de 25 °C e 180 em casa de vegetação com tela sombrite 50%, sem controle de temperatura.

Os testes se iniciaram pela retirada da película membranácea das sementes e aquelas que apresentavam tamanho reduzido, presença de insetos e malformações foram descartadas. As etapas seguintes consistiram em lavagem em álcool 70% por 15 segundos; enxágue com água destilada; imersão em hipoclorito de sódio por 2 minutos, finalizando com 3 enxágues com água destilada.

O experimento conduzido em BOD foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado de 4 repetições com 45 sementes cada. As sementes foram dispostas em quatro bandejas com areia esterilizada em estufa à 140 °C durante 16 horas. Após 30 dias de semeadura, o experimento em BOD resultou na germinação de 80 plântulas sadias que foram transferidas para sacos de polietileno preto-opaco de 10 cm largura x 18 cm de comprimento, contendo substrato Terra Nutri (Figura 5).

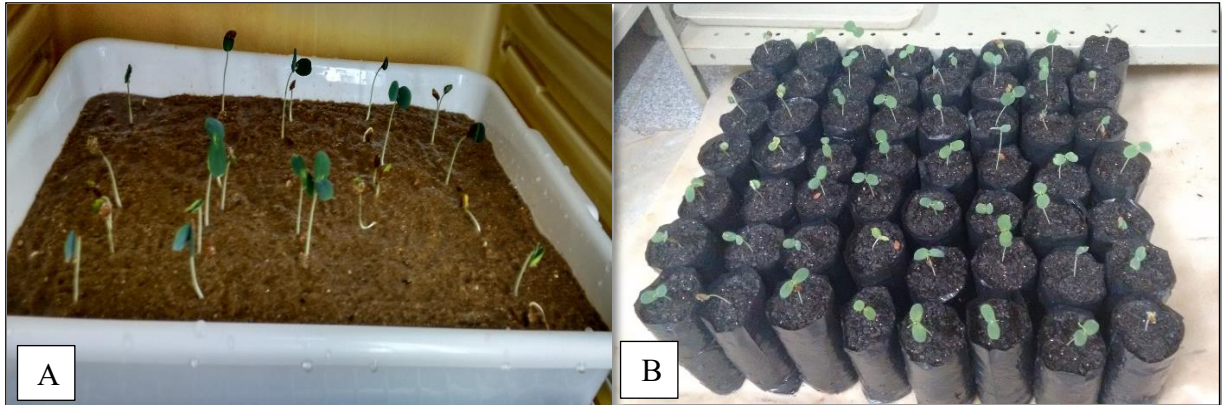


Figura 5 - Experimento conduzido em BOD (A) e plântulas transferidas para sacos de polietileno após a germinação (B), Laboratório de Análise de Sementes- CCAE/UFES, Alegre/ES. Fonte: A autora.

Para os testes de germinação em casa de vegetação (Figura 6), as sementes foram semeadas em sacos de polietileno preto-opaco 10 cm de largura x 18 cm de comprimento (uma semente por saco), contendo substrato Terra Nutri e foram irrigadas de acordo com a necessidade da espécie. Um total de 76 sementes germinaram ao final de 30 dias de semeadura.



Figura 6 - Experimento conduzido em casa de vegetação da Universidade Federal do Espírito Santo CCAE/UFES, Alegre/ES. Fonte: A autora.

Embora o experimento total tenha resultado na germinação de 156 plântulas, apenas 42 indivíduos, de aproximadamente 20 cm, sobreviveram até a fase onde as amostras foliares puderam ser coletadas.

A unidade amostral C foi constituída por indivíduos regenerantes amostrados em três áreas de regeneração natural ao redor do fragmento (Figura 4). Cada área demarcada foi denominada como uma subunidade de regenerantes (C1, C2 e C3) e estão distantes entre si por aproximadamente 550 m. O número total de regenerantes demarcados em cada subunidade foi variável, contudo foi coletado um N

representativo da quantidade de indivíduos presentes nas áreas. Totalizou-se 40 indivíduos regenerantes demarcados. As coordenadas geográficas de cada área e o número de indivíduos coletados em cada uma, estão descritas na Tabela 2 e a Tabela 3 indica a distância aproximada (em metros) das áreas de regeneração em relação a cada uma das localidades de árvores adultas.

Tabela 2 - Coordenadas geográficas (latitude e longitude) e o número de indivíduos (N) das três subunidades amostrais de regenerantes de *P. reticulata*, localizados no entorno do fragmento estudado em Guaçuí-ES

Subunidades de Regenerantes	Latitude	Longitude	N
C1	20°53'25.3" S	041°42'36.7" W	23
C2	20°53' 28.0"S	041°42'49.9" W	9
C3	20°53'39.3" S	041°42'28.4" W	8

Tabela 3 - Distâncias geográficas em metros entre as áreas de regeneração (C1, C2 e C3) e as localidades de adultos (A1 e A2) de *P. reticulata* em Guaçuí-ES

Grupos	A1	A2
C1	25 m	30 m
C2	60 m	450 m
C3	100 m	550 m

Portanto, foram coletados para o estudo 67 árvores adultas (coletados na APP e na área particular), 42 indivíduos compondo uma mistura de progênie e 40 jovens regenerantes (em três áreas ao redor do fragmento), totalizando 149 amostras para as análises moleculares.

### 4.3 Extração do DNA

As amostras foliares dos indivíduos de cada unidade amostral foram coletas, acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados contendo sílica gel e encaminhados ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (BqMol) do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, CCAE/UFES, Alegre-ES, onde as análises foram realizadas.

No laboratório, as amostras foram transferidas para sacos de alumínio e armazenadas em *freezer* -30 °C para serem submetidas a liofilização, método que possibilita a preservação das amostras, por meio da desidratação do produto congelado, impedindo a oxidação. Para o processo de liofilização (Liofilizador L108 da Liobras) cada amostra foi deixada por no mínimo 24 horas a -30 °C e após serem liofilizadas, foram novamente armazenadas em sacos de alumínio e em caixas

vedadas contendo sílica gel.

O protocolo para a extração de DNA das amostras foi baseado no método originalmente descrito por Doyle e Doyle (1990) com algumas modificações propostas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), adequado para espécies que possuem altas concentrações de polissacarídeos.

Cada amostra liofilizada foi macerada individualmente em almofariz com pistilo de porcelana e cerca de 300 mg foi armazenado em eppendorf de 2 mL. O tampão de extração utilizado no protocolo teve a seguinte composição: 2% CTAB, 100 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1,4 M de NaCl, 20 mM de EDTA pH 8,0, 1% de PVP e 0,2%  $\beta$ -mercaptoetanol.

Os procedimentos da técnica de extração de DNA adotada estão descritos a seguir:

1. Adicionar 700  $\mu$ L de tampão de extração no eppendorf contendo o tecido vegetal macerado e homogeneizar;
2. Deixar por 30 min a 65 °C em banho-maria e homogeneizar a cada 10 minutos a fim de permitir que o tampão esteja em contato com todo o material macerado;
3. Após a retirada do banho-maria adicionar 650  $\mu$ L de Clorofórmio-Álcool Isoamílico (CIA) na proporção 24:1 e homogeneizar até formar uma emulsão;
4. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 min (todos os passos de centrifugação foram realizados em centrífuga Pico 21 da Thermo Scientific, raio de 7,5 cm),
5. Transferir a fase aquosa formada na centrifugação para um novo eppendorf de 2,0 mL;
6. Adicionar 200  $\mu$ L de tampão de extração juntamente com 650  $\mu$ L de CIA e homogeneizar;
7. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min;
8. Transferir a fase aquosa para um novo eppendorf de 1,5 mL e adicionar 650  $\mu$ L de CIA;
9. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min;
10. Transferir a fase aquosa para outro eppendorf de 1,5 mL e adicionar 1 volume de isopropanol gelado + 230  $\mu$ L de acetato de amônio para precipitação do DNA e homogeneizar;
11. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min;
12. Lavar a superfície do precipitado com 250  $\mu$ L de etanol 70% por 3 vezes;

13. Retirar o etanol e deixar secar em temperatura ambiente;

14. Resuspender o DNA em 50  $\mu\text{L}$  de TE com RNase (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e deixar em banho maria a 37 °C por 30 min.

Ao finalizar as extrações, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria no aparelho NanoDrop (*Thermo Scientific 2000C*) para identificar a pureza e as concentrações do DNA obtido. O parâmetro de pureza adotado foi a relação de absorbância a 260 e 280 nm ( $A_{260} / A_{280}$ ), ideal no intervalo de 1,8 a 2,0 (BARBOSA, 1998).

Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas para a concentração final de 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  e armazenadas em *freezer* -20 °C para serem utilizadas nas análises moleculares. O DNA estoque concentrado foi armazenado em *freezer* -30 °C.

#### 4.4 Análises com marcadores *Inter-Simple Sequence Repeat* –ISSR.

Para a realização dos testes de amplificação foram utilizadas inicialmente 28 *primers* ISSR (Tabela 4), a fim de que fossem selecionados os iniciadores mais polimórficos, com melhor perfil de amplificação, bandas nítidas e distintas. Estes *primers* foram desenvolvidos pela *University of British Columbia* (UBC), Vancouver, Canadá, sendo os testes iniciais realizados em amostras de DNA de cinco indivíduos.

Tabela 4 - *Primers* ISSR desenvolvidos pela *University of British Columbia* (UBC), testados em amostras de DNA de cinco indivíduos da espécie *Plathymenia reticulata* e suas respectivas sequências (5'-3')

(Continua)

<i>Primers</i>	Sequências (5'-3') *
UBC 802	ATA TAT ATA TAT ATA TG
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC 813	CTC TCT CTC TCT CTC TT
UBC 814	CTC TCT CTC TCT CTC TA
UBC 815	CTC TCT CTC TCT CTC TG
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG
UBC 822	TCT CTC TCT CTC TCT CA
UBC 824	TCT CTC TCT CTC TCT CG
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG

Tabela 4 - *Primers* ISSR desenvolvidos pela *University of British Columbia* (UBC), testados em amostras de DNA de cinco indivíduos da espécie *Plathymenia reticulata* e suas respectivas sequências (5'-3'

(Conclusão)

<b>Primers</b>	<b>Sequências (5'-3') *</b>
UBC 829	TGT GTG TGT GTG TGT GC
UBC 833	ATA TAT ATA TAT ATA TYG
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG
UBC 849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA TCC A
UBC 852	TCT CTC TCT CTC TCT CRA
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
UBC 868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA
UBC 891	HVH TGT GTG TGT GTG TG

\* A= Adenina; T= Timina; C= Citosina; G= Guanina; H = (A, T ou C); R = (A ou G); V = (A, C ou G) e Y = (C ou T).

Os ensaios de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram realizados em um volume final de 20 µL por amostra, sendo o mix constituído por: tampão 1X (10 mM Tris-HCl (pH 8.5) e 50 mM de KCl), MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM), dNTP (1 mM), *primer* (0,2 mM), 1 unidade de Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA genômico.

As amplificações foram realizadas em termociclador *Applied Biosystem*, modelo Veriti, nas seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 5 min, seguidas de 35 ciclos constituídos por 3 etapas: 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 52 °C e 90 segundos a 72 °C, e extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% para a separação dos fragmentos. Todas as corridas eletroforéticas foram realizadas em TBE 1X (Tris - 0,089 M, Ácido bórico – 0,089 M e EDTA- 0,002 M), a uma voltagem de 96 Volts, com duração de aproximadamente 5 horas. Em seguida, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,50 µg/mL) durante 40 minutos.

Posteriormente, os géis foram lavados em água corrente para retirada do excesso de brometo e foram fotografados sob luz UV em fotodocumentador (ChemiDoc MP Imaging System – Bio Rad). O tamanho molecular dos fragmentos amplificados foi estimado com marcador de peso molecular (*Ladder*) de 100 pares de base (pb).

#### 4.5 Análise estatística dos dados

Os géis fotodocumentados foram submetidos a uma leitura cuidadosa a fim de se identificar os fragmentos com melhor perfil de amplificação. A análise consistiu em interpretar para cada *primer* o padrão de bandas exibidas. Cada banda ISSR foi considerada como um loco independente. Dessa forma, as bandas que ocupavam a mesma posição para os indivíduos indicavam amplificação do mesmo fragmento de DNA, ou seja, uma banda monomórfica para aquele loco gênico. Bandas em posições distintas eram de locos diferentes e portanto polimórficas.

A partir dessa análise foi gerada uma matriz binária envolvendo os 149 indivíduos amostrados, onde foi atribuído valor igual a 1 para a presença de banda e 0 para ausência. Análises descritivas dos dados incluindo número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por *primer* e a variação de tamanho dos fragmentos gerados, em pares de bases (TPB), também foram realizadas.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado para discriminar o poder do marcador em detectar polimorfismos entre os indivíduos, conforme proposto por Roldan-Ruiz et al. (2000), tendo como indicadores a ausência e a presença de bandas:

$$PIC_i = 2f_i (1 - f_i) \quad (1)$$

Onde:

$PIC_i$  = O conteúdo de informação polimórfica do marcador  $i$ ;

$f_i$  = A frequência dos fragmentos presentes na amostra;

$1 - f_i$  = A frequência dos fragmentos ausentes.

A matriz binária de presença/ausência de bandas foi submetida a análises estatísticas para estimativas dentro e entre os grupos (unidades amostrais).

O número ótimo de fragmentos polimórficos indicados para estudos de diversidade genética com a espécie *P. reticulata*, foi estimado por meio da análise de *bootstrap* com o auxílio do *software* GENES (CRUZ, 2013). Para cada par de indivíduos a similaridade genética foi estimada a partir de simulações com reamostragens de diferentes tamanhos (10, 11, 12...100 bandas) com 2.000 permutações, obtendo-se as estimativas de correlação ( $r$ ) entre os valores da matriz

de similaridade original e a matriz simulada com diferentes números de fragmentos. O valor de estresse (E) que indica o ajuste entre essas matrizes também foi calculado. O número de fragmentos foi considerado satisfatório quando o valor do estresse foi inferior a 0,05 e a correlação mais próxima de 1 (KRUSKAL, 1964).

#### 4.5.1 Análises dentro dos grupos

A comparação genética entre os pares de indivíduos de árvores adultas, foi estimada por meio dos índices de dissimilaridade, a fim de verificar a variação genética entre os indivíduos. A comparação foi realizada considerando todas as árvores adultas coletadas e para cada subunidade (A1 e A2) individualmente. Para tal análise, foram estimados inicialmente os coeficientes de similaridade (S) entre os pares de indivíduos com base no coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1901), que representa a razão entre o número de coincidências e o número total de bandas, excluindo a coincidência negativa (MEYER et al., 2004), pela expressão:

$$S_j = \frac{a}{a + b + c} \quad (2)$$

Onde:

a = Número de coincidências do tipo 1 – 1 para cada par de indivíduos;

b = Número de discordâncias do tipo 1 – 0 para cada par de indivíduos;

c = Número de discordâncias do tipo 0 – 1 para cada par de indivíduos;

A partir das medidas de similaridade obteve-se os índices de dissimilaridade entre os pares de indivíduos pela expressão:

$$D = 1 - S \quad (3)$$

Onde:

D= Dissimilaridade

S= Similaridade

Com base na matriz de dissimilaridade obtida, foi determinado o número de agrupamentos genéticos entre os indivíduos pelo método da ligação média não ponderada entre grupos (UPGMA), sendo o resultado representado na forma de



dendrograma.

O ponto de corte ( $P_c$ ) para determinação do número de grupos formados no dendrograma, foi estabelecido pelo critério estatístico proposto por Mojema (1977), pela equação:

$$P_c = m + kdp \quad (4)$$

Onde:

$m$  = a média dos valores de distância dos níveis de fusão correspondentes aos estádios;

$k$  = 1,25 (MILLIGAN; COOPER, 1985);

$dp$  = desvio padrão.

O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi estimado a fim de verificar a confiabilidade dos dados e a consistência dos agrupamentos, ou seja, o ajuste entre as medidas de dissimilaridades originais e as geradas graficamente (SOKAL; ROHLF, 1962). Todas as análises descritas acima foram realizadas com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2013).

A diversidade genética molecular foi estimada por meio do programa POPGENE 1.32 (YEH; BOYLE, 1997), pressupondo para os cálculos que os locos estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram estimados os seguintes parâmetros de diversidade: porcentagem de locos polimórficos (PLP), número de alelos observados ( $N_a$ ), número de alelos efetivos ( $N_e$ ), índice de diversidade genética de Nei ( $H'$ ) (NEI, 1973) e índice de Shannon ( $I$ ) (SHANNON; WEAVER, 1949). Os parâmetros foram calculados para cada uma das unidades amostrais e suas subunidades e em nível populacional considerando todos os indivíduos amostrados.

#### **4.5.2 Análises entre os grupos**

Para as estimativas entre os grupos, calculou-se a análise de variância molecular (AMOVA) de acordo com Excoffier, Smouse e Quattro (1992), para revelar a distribuição de diversidade genética dentro e entre as unidades amostrais. Com o auxílio do programa Arlequin, versão 3.11, foi calculado uma AMOVA geral considerando todas as unidades amostrais e uma AMOVA entre cada uma das unidades amostrais comparadas entre si.

O fluxo gênico entre as árvores adultas foi estimado indiretamente a partir das

estimativas de divergência genética entre grupos ( $G_{ST}$ ), em função de  $N_m$ , pela fórmula  $N_m = 0,5 (1-G_{ST}) / G_{ST}$  (McDERMOTT; McDONALD, 1993). A distância genética entre todas as unidades amostrais também foi realizada usando o modelo proposto por Nei (1978). Essas análises foram realizadas com o programa POPGENE 1.32 (YEH; BOYLE, 1997).

A partir da matriz de dissimilaridade genética entre os indivíduos obtida no programa GENES (CRUZ, 2013), foi realizada a análise de coordenadas principais (PCoA) para identificar a posição relativa entre os indivíduos em um espaço multidimensional, por meio do *software* estatístico R (TEAM, 2015).

Por fim, para inferir o número de grupos genéticos ( $K$ ), nos quais os genótipos encontram-se estruturados, foi conduzida a abordagem bayesiana entre as subunidades de árvores adultas e em nível de espécie (incluindo todos os indivíduos amostrados na área em estudo), utilizando o *software* STRUCTURE 2.3 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Para cada valor de  $K$ , foram realizadas 20 corridas com 1.000.000 de interações de Monte Carlo, via Cadeias de Markov (MCMC), com um descarte inicial (*burn-in*) de 250.000 interações.

Inicialmente, a análise foi aplicada para os genótipos das árvores adultas. Para verificar o número de grupos mais provável, foram testados os valores de  $K$  variando de  $K = 1$  a  $K = 4$ . Ao assumir valores de  $K$  nos intervalos de 1 a 4, pressupõe-se que o  $K$  real é 1 (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). Neste caso, a definição do valor de  $K$  mais provável para os agregados genéticos, foi estimada com base na média e no desvio padrão de cada valor de probabilidade de  $K$ , logaritmo neperiano da probabilidade [ $\ln P(K)$ ].

Posteriormente, a análise foi realizada em nível de espécie. Nesse caso, o número ideal de grupos genéticos ( $K$ ) foi estimado com simulações entre  $K=1$  a  $K=9$ , partindo do princípio que era possível obter qualquer número de  $K$  nesse intervalo, entre os seis grupos (A1, A2, B, C1, C2, C3) de vinhático. A definição do valor de  $K$  mais provável nesta análise, foi estimada pelo método  $\Delta K$  proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005), usando o *software* STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Seleção dos *primers* ISSR

O método de extração de DNA adotado neste estudo mostrou-se eficiente, pois, permitiu a obtenção de DNA de boa qualidade, com valores de pureza (razão 260/280) variando entre 1,8 e 2,0 assim como sugerido por Barbosa (1998). Portanto, o material obtido permitiu a amplificação do DNA nos ensaios de PCR contribuindo para a detecção de polimorfismos entre os indivíduos de *P. reticulata*.

Embora a maioria dos iniciadores tenham mostrado perfil de amplificação satisfatórios, entre os 28 *primers* testados, 10 foram selecionados (Tabela 5), por apresentarem número considerável de locos e boa definição dos fragmentos amplificados. Para os 149 indivíduos de *P. reticulata* avaliados, os 10 *primers* ISSR selecionados possibilitaram a obtenção de 156 fragmentos amplificados. O número de bandas por iniciador, conforme descrito na Tabela 5, variou entre 9 (UBC 810) a 22 (UBC 812), mas em média, foram obtidas 15,6 bandas/*primer*, que variaram de 250 a 2080 pb. Dos 156 fragmentos, 101 foram polimórficos, resultando em um percentual de 64,74% de polimorfismo. O iniciador UBC 818 foi o que revelou o maior número de bandas polimórficas (88,23%), enquanto o UBC 855 foi o menos informativo apresentando apenas 28,57% de polimorfismo (Tabela 5).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) para cada marcador variou entre 0,18 (UBC 840) a 0,44 (UBC 818) com média de 0,38 (Tabela 5).

Tabela 5 - *Primers* ISSR selecionados para *P. reticulata* e descrição do número total de bandas amplificadas (NTB) por *primer* ISSR (incluindo todas as unidades amostrais), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP), variação de tamanho dos fragmentos gerados em pares de bases (TPB) estabelecido com base em marcador de 100pb e conteúdo de informação polimórfica (PIC)

<i>Primer</i>	NTB	NBP	PBP (%)	TPB (máx-min.)	PIC
UBC 807	21	16	76,19	2080 - 250	0,41
UBC 810	9	6	66,66	1000 - 400	0,39
UBC 812	22	13	59,09	2000 - 300	0,37
UBC 818	17	15	88,23	1000 - 400	0,44
UBC 827	19	9	47,36	1900 - 450	0,42
UBC 834	17	14	82,35	1400 - 250	0,37
UBC 840	14	11	78,57	1000 - 250	0,18
UBC 842	13	9	69,23	900 - 350	0,43
UBC 855	14	4	28,57	1500 - 500	0,39
UBC 868	10	4	40	1000 - 500	0,42
<b>TOTAL</b>	<b>156</b>	<b>101</b>	<b>64,74</b>	-	-

A título de ilustração do padrão de fragmentos obtidos, a Figura 7 exemplifica o perfil de amplificação com o *primer* UBC 807 em 27 indivíduos.

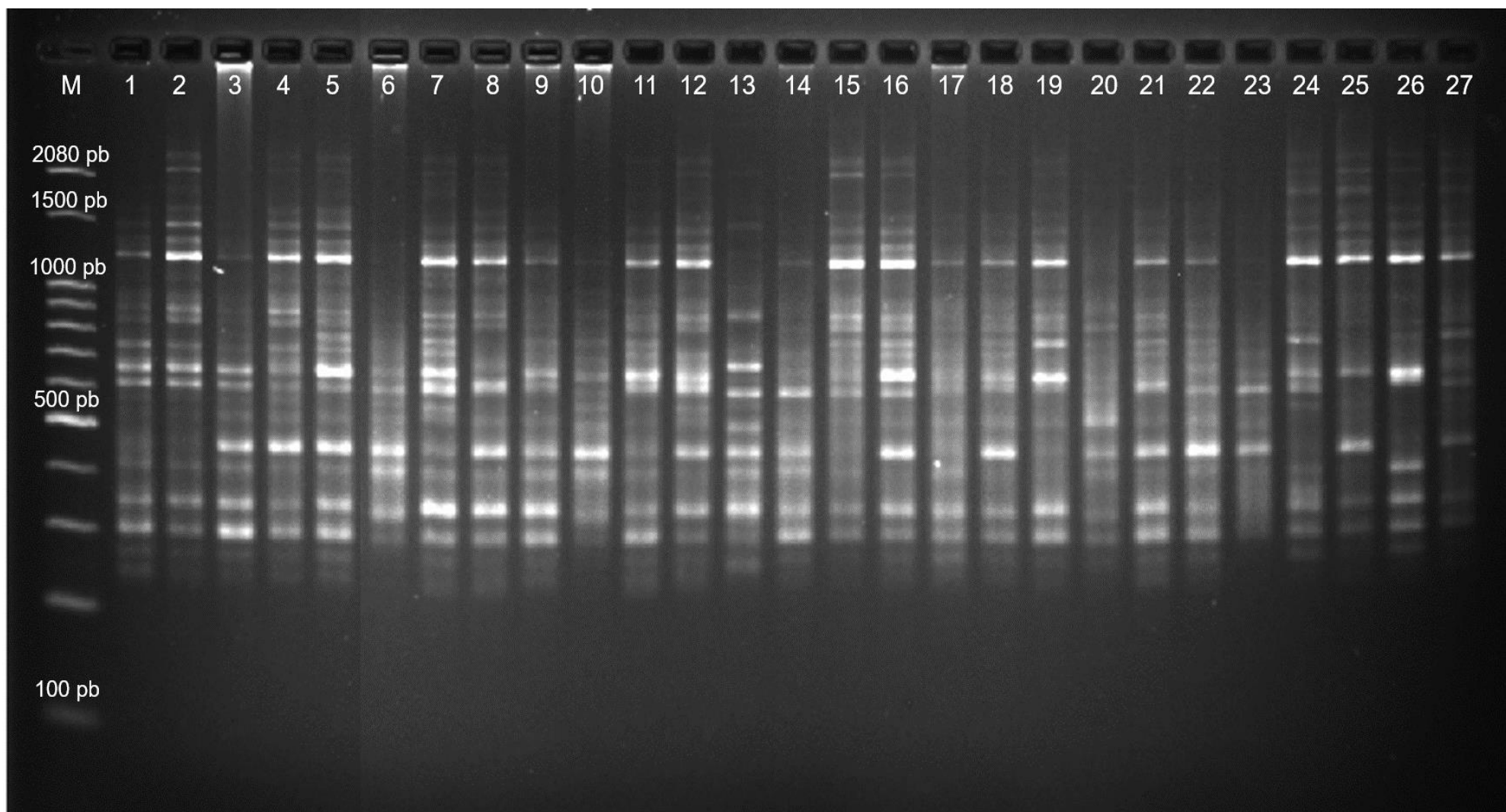


Figura 7 - Fragmentos resultantes da amplificação do DNA genômico de 27 indivíduos de *P. reticulata* em gel de agarose 2% com a utilização do *primer* UBC 807. M - Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb).

Os polimorfismos detectados em estudos genéticos vegetais permitem inferir como a diversidade genética está distribuída dentro e entre os grupos e são de particular importância para a definição de estratégias de manutenção da variabilidade das espécies (YEEH et al., 1996; CRUZ et al., 2011).

Em análises genéticas utilizando marcadores dominantes, como os ISSR, o número de fragmentos amplificados e fragmentos polimórficos utilizados para avaliar a diversidade genética vegetal, é bastante variável (GOIS et al., 2014). Os dados obtidos neste estudo, corroboram com os resultados encontrados por outros autores em estudos com metodologias similares. No trabalho de Ramalho et al. (2016) a diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia excelsa* foi estimada utilizando oito *primers* ISSR, obtendo-se 52 fragmentos, sendo 46 polimórficos. A diversidade e a estrutura populacional de *Capparis spinosa*, foram avaliadas por 10 iniciadores ISSR, onde obteve-se 313 fragmentos, sendo 52% polimórficos (LIU et al., 2015). E em estudos com *Theobroma grandiflorum* foram selecionados 15 *primers* ISSR, gerando 102 fragmentos amplificados, dos quais 53 eram polimórficos (52% de polimorfismo) (SILVA et al., 2016).

Para os autores acima, o número de iniciadores e a porcentagem de polimorfismo encontrado para as espécies foram considerados suficientes para avaliar e quantificar a diversidade genética. Da mesma forma, os marcadores moleculares ISSR utilizados nesse estudo mostraram eficiência em detectar polimorfismo em vinhático, revelando com a utilização de 10 *primers* variabilidade genética satisfatória para a espécie (64,74% de polimorfismo).

Os valores de PIC por sua vez, foram descritos primeiramente por Botstein et al. (1980) e revelam a qualidade do marcador em estudos genéticos, expressando a capacidade do marcador em detectar variabilidade entre os indivíduos. De acordo com o autor, marcadores que apresentam valores de PIC superiores a 0,5 são classificados como altamente informativos, valores entre 0,25 e 0,5 são mediantemente informativos e aqueles com valores inferiores a 0,25 são considerados pouco informativos.

Entretanto, marcadores dominantes tendem a apresentar menores valores de PIC devido ao seu caráter bialélico (ROLDAN-RUIZ et al., 2000). De acordo com Tatikonda et al. (2009) o valor máximo esperado para marcadores dominantes é 0,5. Assim, os *primers* mais informativos serão aqueles que apresentarem valores de PIC variando entre 0,45 e 0,5, pois quanto mais próximo de 0,5 maior será a eficiência do

marcador em determinar a variabilidade genética.

Dessa forma, os marcadores utilizados neste estudo podem ser classificados como satisfatórios em conteúdo informativo, pois apresentaram média de 0,38. Dentre os dez *primers* utilizados, nove apresentaram valores de PIC variando entre 0,37 a 0,44. Os iniciadores UBC 807, 818, 827, 842, 868, foram os mais informativos com PIC acima de 0,4, e apenas um dos iniciadores (UBC 840) foi considerado pouco informativo apresentando valor de 0,18.

O número ótimo de locos, para a caracterização confiável da diversidade genética para a espécie em estudo, foi a partir de 88 fragmentos polimórficos, quando a correlação ( $r$ ) atingiu 0,98 e o estresse ( $E$ ) assumiu valor de 0,04 (Figura 8).

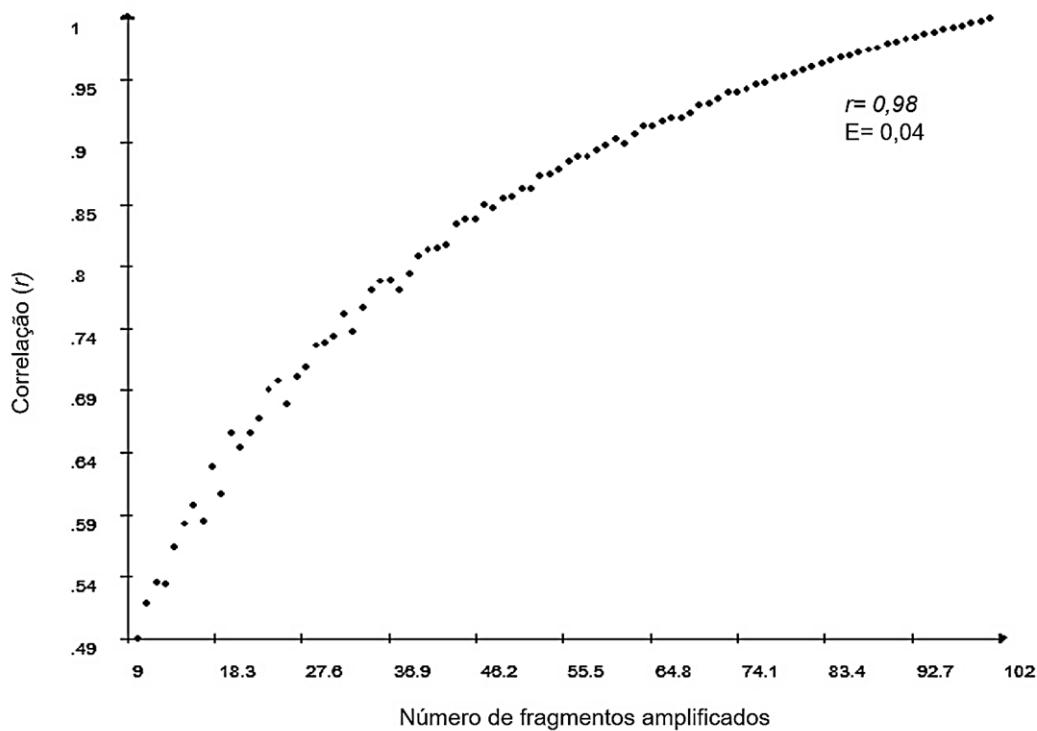


Figura 8 - Coeficiente de correlação ( $r$ ) obtido pela análise de *bootstrap* e número de fragmentos amplificados para os 149 indivíduos de *P. reticulata* empregando 10 *primers* ISSR.

A determinação do número ótimo de locos tem sido citada em outros trabalhos com espécies vegetais (SANTANA et al., 2011; GONÇALVES et al., 2014; VIEIRA et al., 2015). De acordo com esses autores, as análises contribuíram para otimização de recursos e tempo, indicando o número mínimo de locos que devem ser utilizados em análises de diversidade genética.

A partir da Figura 8 foi possível constatar que o valor de correlação se aproximou do valor máximo (1,0) a partir do número ótimos de fragmentos ( $n = 88$ ),

revelando a consistência dos dados. Valores de  $E < 0,05$  e de correlação mais próximo de 1 são apontados por Kruskal (1964) como indicativo de ótima precisão das estimativas. Neste estudo foram encontrados 101 locos polimórficos para *P. reticulata*, um número acima do estabelecido como ótimo ( $n=88$ ), indicando assim, que o número de *primers* utilizados e o de fragmentos obtidos mostraram-se eficientes e precisos para as análises de diversidade genética da espécie.

## 5.2 Diversidade dentro dos grupos

O grau de divergência e semelhança genética entre os pares de indivíduos de uma espécie podem ser verificados por meio dos valores de dissimilaridade, o que revela dados importantes da estrutura genética da população (CRUZ, 2011). Assim, os índices de dissimilaridade obtidos por meio da complementaridade do coeficiente de Jaccard, foram utilizados para a comparação genética entre as árvores adultas de *P. reticulata* e suas subunidades.

Entre os indivíduos da subunidade A1, os valores de dissimilaridade variaram de 0,18 a 0,52 com média de 0,36. A menor distância genética foi entre os indivíduos 15 e 16 e a maior distância entre as árvores 1 e 10. A representação gráfica dos agrupamentos obtida pelo método UPGMA revelou a presença de quatro grupos (Figura 9). Utilizando o método de Mojema (1977) com  $k = 1,25$ , foi estabelecido o ponto de corte de 94,55%. A consistência do agrupamento verificada pelo coeficiente de correlação cofenética foi de 87,18% (CCC= 0,8718).

Para as comparações entre os indivíduos da subunidade A2 os valores de dissimilaridade variaram de 0,15 a 0,64 com média de 0,41. A menor distância genética foi entre o par 35 x 36 e a maior distância entre 25 x 55. O agrupamento pelo método UPGMA revelou seis grupos (Figura 10). O ponto de corte estabelecido foi de 85,41% e o coeficiente de correlação cofenética foi de 81,93% (CCC= 0,8193).

Quando todas as árvores adultas foram avaliadas conjuntamente os valores de dissimilaridade variaram de 0,15 a 0,64, com média de 0,40, sendo as menores e maiores distâncias genéticas novamente evidenciadas entre os indivíduos 35 e 36 e 25 e 55, respectivamente. No dendrograma foram observados nove grupos (Figura 11). O ponto de corte estabelecido foi de 85,23% e o coeficiente de correlação cofenética foi de 80,88% (CCC= 0,8088).



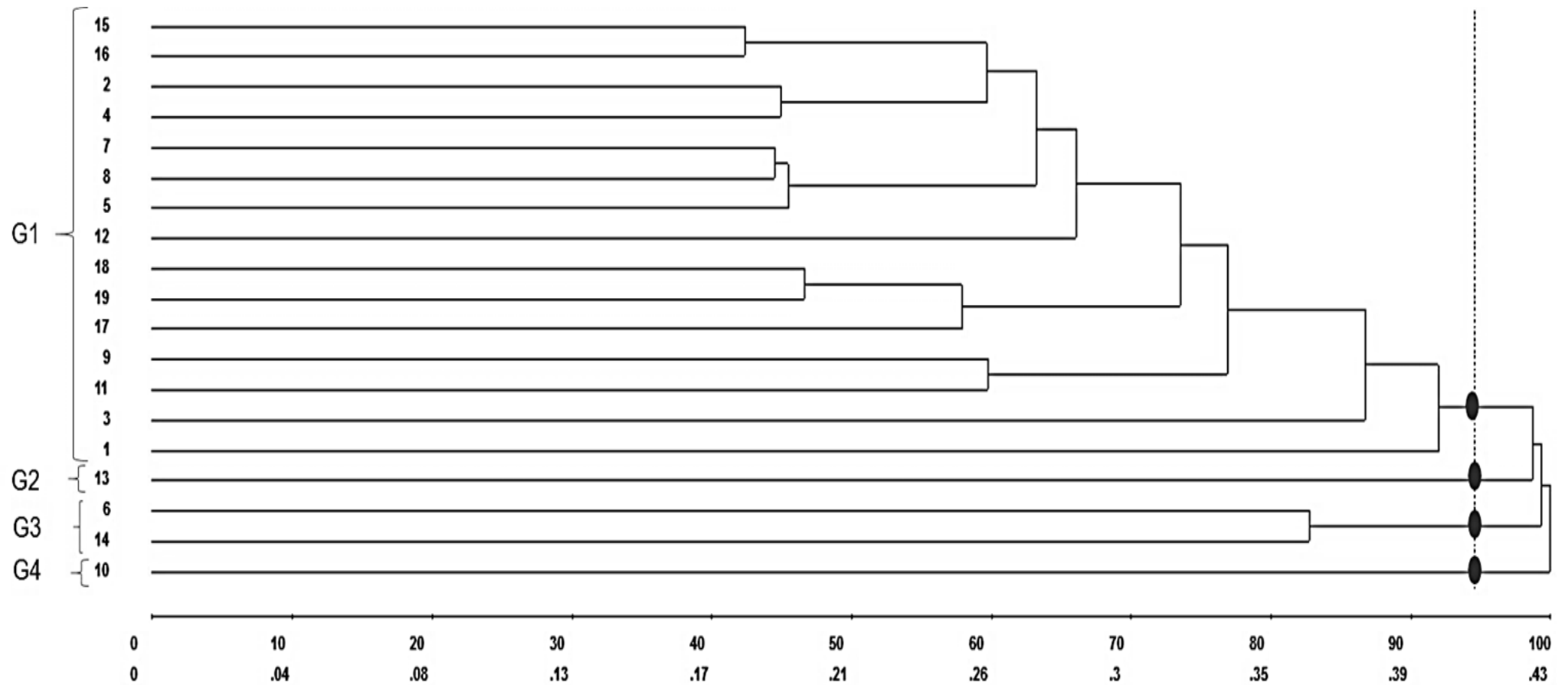


Figura 9 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética na subunidade amostral A1, representada por 19 indivíduos adultos de *P. reticulata*, agrupados pelo método UPGMA, formando quatro grupos. Ponto de Corte (Pc): 94,55%.

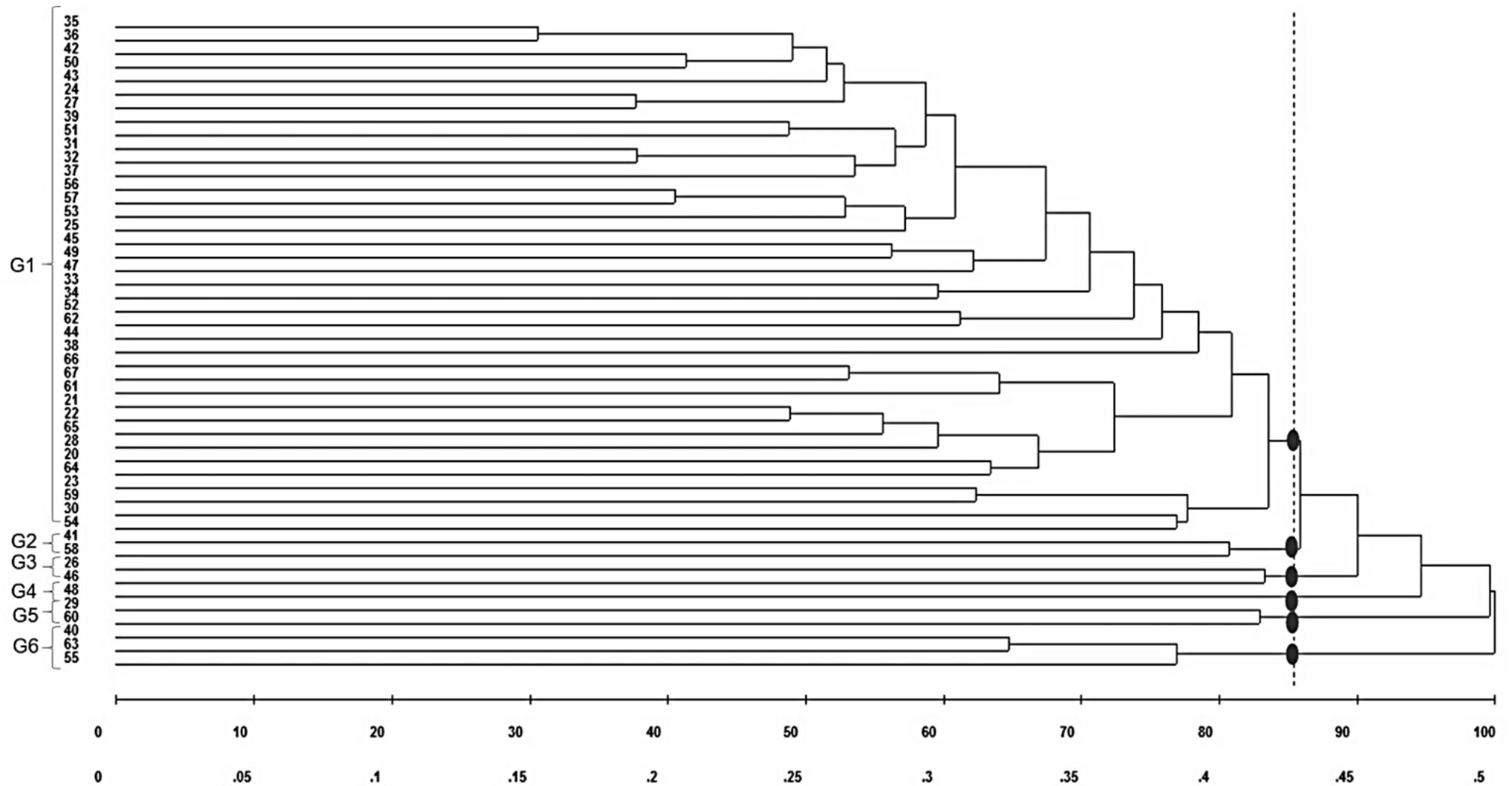


Figura 10 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética na subunidade amostral A2, representada por 48 indivíduos adultos de *P. reticulata*, agrupados pelo método UPGMA, formando seis grupos. Ponto de Corte (Pc): 85,41%.

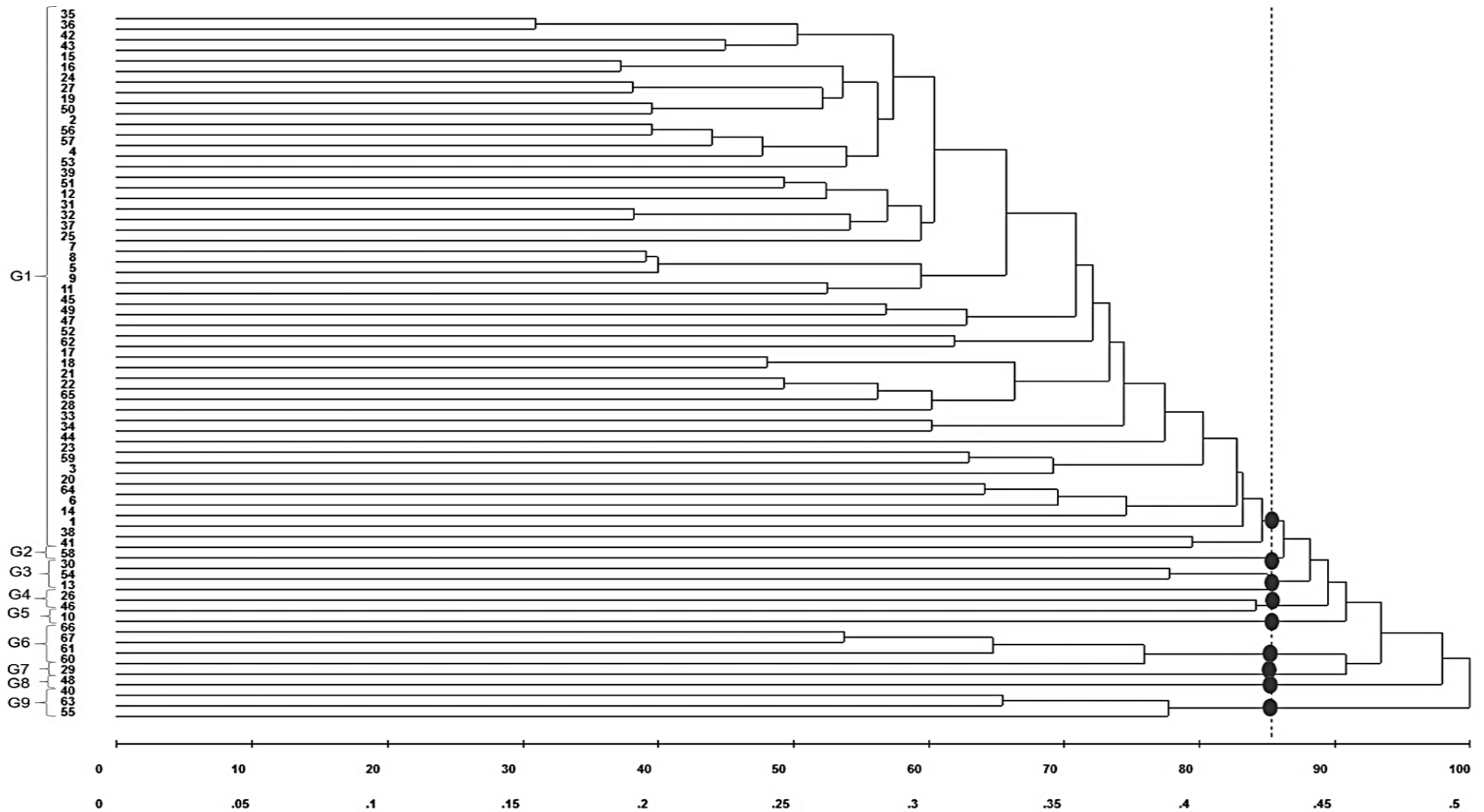


Figura 11 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 67 indivíduos adultos de *P. reticulata*, agrupados pelo método UPGMA, formando nove grupos. Ponto de Corte (Pc): 85,23%.

É possível observar que a matriz de dissimilaridade revelou dados ajustados ao dendrograma em todas as análises. Tal ajuste pode ser confirmado pelo alto valor do coeficiente de correlação cofenética, que segundo Rohlf e Fisher (1968) deve apresentar valores acima de 0,8. Assim, os resultados mostram-se satisfatórios e revelam a conformidade entre as representações gráficas das distâncias e a suas matrizes originais.

Ao analisar as representações gráficas das distâncias genéticas entre os indivíduos, observa-se que o par de genótipos 25 x 55 da subunidade A2 apresentaram a maior distância genética e o par 35 x 36 a menor distância, tanto na análise individual do grupo quanto no agrupamento total das árvores. Além disso, ao analisar o dendrograma total das árvores (Figura 11) é possível identificar que a maioria dos indivíduos da subunidade A1 se agruparam em um único grupo (G1) com exceção das árvores 13 e 10, que também se agruparam isoladamente quando a subunidade A1 foi avaliada de forma independente.

A formação de grupos isolados formados por um único genótipo indica que tais indivíduos são os mais divergentes em relação aos demais (VIEIRA et al., 2008; LIMA et al., 2015). Isso foi claramente observado para as árvores 10 e 48 que formaram grupos isolados em todas as análises.

As estimativas de dissimilaridade entre os pares de indivíduos permitem avaliar a heterogeneidade das amostras (LINDEN, 2009; CRUZ, 2011). Verifica-se que houve grande distribuição dos genótipos em grupos diferentes. Assim, os dados revelam ampla variabilidade entre os indivíduos avaliados, sem nenhuma evidência de indivíduos idênticos em termos genéticos, indicando que todos podem ser usados para coleta de sementes.

Dessa forma, nos casos em que se deseja obter lotes de sementes com a máxima variabilidade genética para fins de recuperação ou restauração florestal, é importante priorizar a escolha daqueles indivíduos mais distintos geneticamente (SANTANA et al., 2008). Assim, as informações na matriz de dissimilaridade podem ser indicadoras para a escolha dos indivíduos mais diversificados para esse fim.

Os parâmetros de diversidade genética calculados para *P. reticulata* estão descritos na Tabela 6. Tais análises foram calculadas para as árvores adultas (unidade A) e suas subunidades, para a mistura de progênies (unidade amostral B), para os regenerantes na sua totalidade (unidade C) e para cada subunidade e a nível de

espécie, considerando todos os indivíduos amostrados.

Tabela 6 - Parâmetros de diversidade genética para cada unidade amostral e subunidades de *P. reticulata* calculadas com o auxílio do *software* POPGENE, assumindo Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Unidades amostrais	n	PLP (%)	Na	Ne	H'	I
Unidade A	67	100	2,00±0,00	1,76±0,24	0,419±0,096	0,605±0,108
Subunidade A1	19	91,09	1,91± 0,28	1,68±0,31	0,380±0,152	0,548±0,206
Subunidade A2	48	98,02	1,98±0,14	1,75±0,25	0,416±0,107	0,600±0,133
Unidade B	42	93,07	1,93±0,25	1,60±0,30	0,348±0,146	0,515±0,192
Unidade C	40	100	2,00±0,00	1,67±0,28	0,383±0,120	0,563±0,142
Subunidade C1	23	93,07	1,93±0,25	1,68±0,30	0,379±0,144	0,550±0,192
Subunidade C2	9	78,22	1,78±0,41	1,55±0,38	0,310±0,195	0,452±0,269
Subunidade C3	8	75,25	1,75±0,43	1,51±0,39	0,287±0,199	0,421±0,276
Espécie	149	100	2,00±0,00	1,72±0,23	0,407±0,089	0,594±0,099

Tamanho da amostra (n), Porcentagem de locos polimórficos (PLP), Número de alelos observados (Na), Número de alelos efetivos (Ne), Índice de Nei (H'), Índice de Shannon (I). Valores de média ± desvio padrão.

Entre as unidades amostrais o número de alelos observados (Na) variou de 1,75 a 2,00 e número de alelos efetivos (Ne) de 1,52 a 1,76. Para a espécie, obteve-se um valor de 2,00 para alelos observados e 1,72 para alelos efetivos. Tais valores estão de acordo com os mencionados na literatura para marcadores dominantes avaliados em diferentes espécies (CHAGAS et al., 2015; COSTA et al., 2015; VIEIRA et al., 2015; YANG et al., 2016).

A porcentagem média de locos polimórficos para a espécie foi de 100% indicando altos níveis de diversidade. As subunidades C2 e C3 foram as que apresentaram o menor valor de porcentagem de locos polimórficos (C2 = 78,22% e C3 = 75,25%). Nota-se também, que tais subunidades de regenerantes apresentaram os menores valores para todos os parâmetros de diversidade analisados. Tal fato pode estar associado ao tamanho da amostra, visto que, esses parâmetros são sensíveis ao efeito da amostragem (LEBERG, 2002; HMELJEVSKI et al., 2011) e as subunidades C2 e C3 possuem os menores números de indivíduos amostrados.

Os valores de diversidade de Nei (H') das unidades amostrais variaram de 0,287 a 0,419 e os valores do índice de Shannon (I) de 0,421 a 0,605. Em nível populacional, obteve-se um valor de 0,407 para o índice de Nei e 0,594 para o índice de Shannon, valores considerados satisfatórios para espécie. Estudos com *P. reticulata* utilizando marcadores dominantes RAPD revelaram valores de Shannon

com média de 0,332 (LACERDA et al., 2001). De acordo com a literatura o índice de Shannon pode variar entre 0 e 1, sendo 1 o máximo de diversidade genética de uma população (LEWONTIN, 1972). Assim, o valor encontrado neste estudo (0,594) sugere que *P. reticulata* apresenta altos níveis de variação genética quando comparada a outros estudos com marcadores dominantes.

Abordagens da diversidade genética em *Lecythis pisonis* Cambess, por exemplo, revelaram valores de 0,311 para o índice de Nei e 0,473 para o índice de Shannon, considerados pelos autores como alta diversidade genética (BORGES et al., 2016). Alta diversidade também foi encontrada em análises com *Ziziphus joazeiro* Mart, com valores médios de 0,360 para o índice de Nei e 0,534 para o índice de Shannon (GOIS et al., 2014). A espécie *Prosopis cineraria* (L.) Druce (Fabaceae) também revelou valores similares para o índice de Nei (0,301) e índice de Shannon (0,438) (SHARMA et al., 2011).

Os altos níveis de diversidade encontrado para *P. reticulata* podem estar relacionados aos aspectos ecológicos da espécie. Segundo Loveless e Hamrick (1984), espécies com dispersão anemocórica e fecundação cruzada, tais como o vinhático (LACERDA et al., 2002), tendem a apresentar altos níveis de diversidade genética intrapopulacional.

A diversidade genética encontrada nos indivíduos presentes na área protegida da Floresta da Rosal foi de  $H' = 0,380$  e  $I = 0,548$  e nos indivíduos amostrados na área particular foi de  $H' = 0,416$  e  $I = 0,600$ . Esta última tem uma maior extensão que o da área preservada e possui um número expressivo de indivíduos adultos saudáveis de *P. reticulata*, que estão em áreas acessíveis e com facilidade para possíveis coletas de sementes. Nessa perspectiva, os altos valores de diversidade encontrados enfatizam a importância de conservação e de uso sustentável da espécie, para que tal diversidade não seja perdida por possíveis ações antrópicas.

Além disso, os resultados obtidos indicam que mesmo com o extrativismo de madeira ocorrido recentemente na área de estudo, a diversidade genética na população de *P. reticulata* se mantém elevada. Espécies arbóreas com ciclos de vida mais longos, que possuem banco de sementes e plântulas com alta sobrevivência, podem não ser afetadas pelos processos antrópicos durante um longo período de tempo (CABIN, 1996; ENGLAND et al., 2002). Dessa forma, é possível concluir que o corte seletivo ocorrido na área não ocasionou erosão genética significativa pois o

banco de sementes presentes no solo possivelmente está permitindo a regeneração de novos indivíduos adultos, assegurando a manutenção da variabilidade genética da espécie. Autores salientam que a capacidade de recolonização de uma área perturbada é assegurada pelo banco de sementes que permanecem no solo e que são provenientes das árvores matrizes que constituem a floresta (KAGEYAMA, 1992; PEREIRA; ALVARENGA; BOTELHO, 2010).

Para a mistura de progênies (unidade B), também foi identificado valores consideráveis de diversidade ( $H' = 0,348$ ;  $I = 0,515$ ), o que permite certificar a variação genética que poderá ser encontrada nos futuros lotes de mudas produzidas a partir das sementes coletadas nas árvores presentes no fragmento estudado. Os dados também revelam o potencial dos indivíduos adultos para serem utilizados como matrizes para coleta de sementes.

Para os regenerantes naturais, valores satisfatórios de diversidade também foram revelados ( $H' = 0,383$ ;  $I = 0,563$ ). Dados disponíveis na literatura ressaltam a importante relação entre a proximidade da matriz florestal com áreas em processo de regeneração (MARTINS et al., 2014). Dessa forma, os resultados obtidos indicam que a proximidade geográfica entre o fragmento florestal e as três áreas de regeneração (média de 200 m de distância), colaboraram para que os indivíduos regenerantes mantivessem uma diversidade genética equivalente ao encontrado entre os adultos.

Além do mais, a espécie tem suas sementes dispersadas pelo vento (WARWICK; LEWIS, 2003) o que aumenta a chance dos propágulos serem disseminados ao redor de todo o fragmento, contribuindo para o resultado obtido. Portanto, os dados indicam que os regenerantes, assim como a mistura de progênies de *P. reticulata* possuem variabilidade genética similar às árvores adultas amostradas.

### **5.3 Diversidade entre os grupos**

Por meio da Análise de Variância Molecular (AMOVA), foi realizada a partição da variância genética em dois níveis: entre e dentro das unidades amostrais, para verificar a estruturação e a distribuição da variabilidade genética (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise de variância molecular (AMOVA) da população geral (espécie) e entre as unidades amostrais de *P. reticulata*

Grupos	Fontes de Variação (%)		Estatística <i>F</i>
	Entre grupos	Dentro de grupos	$\Phi_{ST}$
Adultos (A1 x A2)	3,4661	96,5338	0,0346
Regenerantes (C1 x C2 x C3)	9,9698	90,0301	0,0997
Adultos x Regenerantes	6,8345	93,1654	0,0683
Adultos x Mistura de progênies	7,6907	92,3092	0,0769
Regenerantes x Mistura de progênies	9,5317	90,4682	0,0953
Espécie	8,0361	91,9638	0,0803

Em todas as análises realizadas, os resultados revelam que a maior parte da variação está dentro dos grupos. Os valores de  $\Phi_{ST}$  produzem estimativas de componentes de variância análogas a estatística *F* descrita originalmente por Wright (1921), permitindo quantificar a diferenciação genética entre grupos de indivíduos. Wright (1978) sugeriu que valores de  $F_{ST}$  com amplitude de 0 a 0,05 representam pequena diferenciação genética, de 0,05 a 0,15 moderada diferenciação, de 0,15 a 0,25 grande diferenciação e valores acima de 0,25 indicam uma diferenciação genética muito grande.

Com a AMOVA realizada para a população total (espécie), incluindo todas as unidades amostrais, foi identificado que 91,96% da variação genética está dentro dos grupos e apenas 8,03% da variação foi observado entre eles (Tabela 7). A maior variação dentro das unidades amostrais pode estar relacionada ao fato que os regenerantes e a mistura de progênies são provenientes, em sua maior parte, do cruzamento entre os adultos amostrados e revelam que a variação genética histórica existente nos adultos se mantêm nas gerações (MARTINS, 2008). Esses resultados também indicam que, entre os regenerantes e a mistura de progênies existe a representatividade genética das árvores adultas, assim como evidenciado pelos parâmetros de diversidade.

A análise de variância molecular também foi realizada considerando a comparação entre as unidades amostrais de cada categoria. A pequena diferenciação genética identificada entre os grupos de árvores adultas (A1 x A2,  $\Phi_{ST} = 0,034$ ), com a maior proporção de variação observada dentro dos grupos (96,53%) está de acordo com o descrito por Hamrick e Godt (1996). Os autores sugerem que em espécies arbóreas, preferencialmente alógamas, como *P. reticulata*, espera-se elevada diversidade dentro das populações e menor diferenciação entre elas. Da mesma



forma, resultados similares foram descritos em diferentes estudos para espécies arbóreas com fecundação cruzada (BETTENCOURT et al., 2015; BORGES, et al., 2016; RAMALHO et al., 2016).

A baixa diferenciação genética entre os grupos A1 x A2 indica que praticamente não existe uma subdivisão reprodutiva entre as localidades amostradas, ou seja, toda a área representa um único deme, isto é, constituem um único grupo de indivíduos, em proximidade suficiente para reproduzirem entre si (TEMPLETON, 2011). Assim, o baixo valor de  $\Phi_{ST}$  evidencia que as árvores não estão isoladas geneticamente em virtude da ocorrência de fluxo gênico entre elas. O fluxo gênico ao introduzir novas variações genéticas entre grupos de indivíduos, permite reduzir as diferenças nas frequências alélicas entre eles (HAMRICK, 2012). O valor do número médio de migrantes por geração ( $N_m$ ) deve ser maior que 1 ( $N_m > 1$ ) para que o fluxo gênico sobreponha os efeitos da deriva genética, evitando que ocorra diferenciação entre os grupos (WRIGHT, 1951). Para as árvores adultas de *P. reticulata* o fluxo gênico histórico, calculado indiretamente com base no estimador de divergência genética entre grupos ( $G_{ST} = 0,0379$ ), apresentou  $N_m$  igual a 12,70. O baixo valor de  $G_{ST}$  e o alto valor de  $N_m$  novamente confirmam a baixa divergência genética entre os indivíduos adultos nos dois locais de coleta, indicando a presença de fluxo gênico contínuo entre eles e permite afirmar que a fragmentação florestal observada na área de estudo não foi efetiva para ocasionar a diferenciação entre as árvores.

Para a AMOVA realizada entre adultos x mistura de progênies e adultos x regenerantes, os valores de  $\Phi_{ST}$  foram de 0,076 e 0,068, respectivamente. Tais valores indicam moderada diferenciação genética. A moderada diferenciação observada entre adultos e a mistura de progênies pode estar associado ao fato de terem sido coletadas sementes de apenas 20 indivíduos e a análise ter sido realizada considerando todos os indivíduos adultos amostrados (67). Além do mais, grãos de pólen de árvores que não foram amostradas, principalmente adultos localizados na área particular onde nem todas as árvores foram demarcadas, podem estar contribuindo para o patrimônio genético desses indivíduos.

Similarmente, o valor de  $\Phi_{ST}$  para adultos x regenerantes (0,068) indicou uma diferenciação moderada, fato que também pode estar associado à contribuição por indivíduos não amostrados e também da possibilidade dos indivíduos adultos estarem contribuindo com o patrimônio genético de forma diferenciada, visto que foram

amostradas três áreas de regeneração. O tipo de dispersão da espécie (anemocórica) possibilita que os propágulos alcancem o redor de todo o fragmento, entretanto, árvores mais próximas de cada área podem estar contribuindo como fonte de sementes, de forma mais expressiva (GUARIGUATA; OSTERTAG, 2001). Essa percepção pode ser confirmada pelo valor de  $\Phi_{ST}$  encontrado para a análise entre as três áreas de regeneração C1 x C2 x C3 ( $\Phi_{ST} = 0,099$ ). Neste caso, a moderada diferenciação genética, o valor mais alto encontrado no presente estudo, sugere que poucos indivíduos, que não representam o patrimônio genético total, estão contribuindo de forma diferenciada na constituição genética de cada uma das áreas de regeneração. Esse resultado pode ser explicado pelo evento conhecido como efeito fundador. Segundo Mayr (1963), o efeito fundador refere-se à contribuição de poucos indivíduos na colonização de uma nova área, em que tais indivíduos, possuem uma amostra limitada da variação genética presente na população original.

Nessa perspectiva, era de se esperar que entre regenerantes e mistura de progênies (Grupo C x B) também fosse evidenciado uma moderada diferenciação genética ( $\Phi_{ST} = 0,095$ ), visto que, as áreas de regeneração e a mistura de progênies podem ter sido originadas com contribuições genéticas de indivíduos diferenciados. Além do mais, as sementes provavelmente não são representativas do todo que podem ter originado os regenerantes, já que foram coletadas de apenas 20 indivíduos.

Os resultados de diferenciação genética obtidos na AMOVA corroboram com os encontrados para a distância genética de Nei (1978) descrito na Tabela 8. É possível observar, que entre os adultos (A1 e A2) também foi encontrado baixo valor de diferenciação (0,04), assim como observado na AMOVA, o que reforça mais uma vez que as duas áreas representam um único conjunto populacional.

Tabela 8 - Distância genética de Nei calculada entre os indivíduos de *P. reticulata*

<b>Grupos</b>	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>B</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>
<b>A1</b>	0					
<b>A2</b>	0,0408	0				
<b>B</b>	0,0694	0,0528	0			
<b>C1</b>	0,0644	0,0374	0,054	0		
<b>C2</b>	0,0909	0,0746	0,071	0,0791	0	
<b>C3</b>	0,0965	0,0746	0,0844	0,0763	0,0885	0

Além disso, os dados de distância genética permitem identificar que entre as áreas de regeneração, os indivíduos da área C1 são mais próximos geneticamente às

árvores amostradas na área particular (A2), pois exibiram o menor valor de distância genética (0,03) quando comparados à área preservada. Essa menor diferenciação poderia ser explicada pela distância geográfica entre as áreas A2 e C1, pois dentre as três áreas de regeneração a C1 é a mais próxima geograficamente da A2 (Figura 4, Tabela 3). Portanto, algumas árvores ali presentes, provavelmente, estão contribuindo de forma mais expressiva para a formação desse local de regeneração, o que confirma a ocorrência do efeito fundador e a diferenciação encontrada entre as áreas de regeneração pela AMOVA.

Análises de diversidade genética realizadas por Lima et al. (2015) com *Senna reticulata* e Rivas et al. (2013) com *Theobroma subincanum* por meio de marcadores dominantes, revelaram uma menor diferenciação genética entre indivíduos mais próximos geograficamente. Porém, os autores sugeriram que a distância geográfica não é um fator determinante para a diferenciação genética, o que também foi observado nesse estudo, pois as áreas C2 e C3 não apresentaram altos valores de diferenciação em relação a área A2, embora estejam mais distantes dela.

Tais resultados também foram comprovados pela análise de coordenadas principais (PCoA) (Figura 12) que permitiu dimensionar os dados e obter uma estimativa de como os indivíduos estão estruturados espacialmente quanto a sua distribuição genética (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001). A análise permitiu confirmar que na espécie existe baixa diferenciação entre os grupos amostrais, pois os indivíduos não formaram grupos isolados e se distribuíram como uma mistura de genótipos.

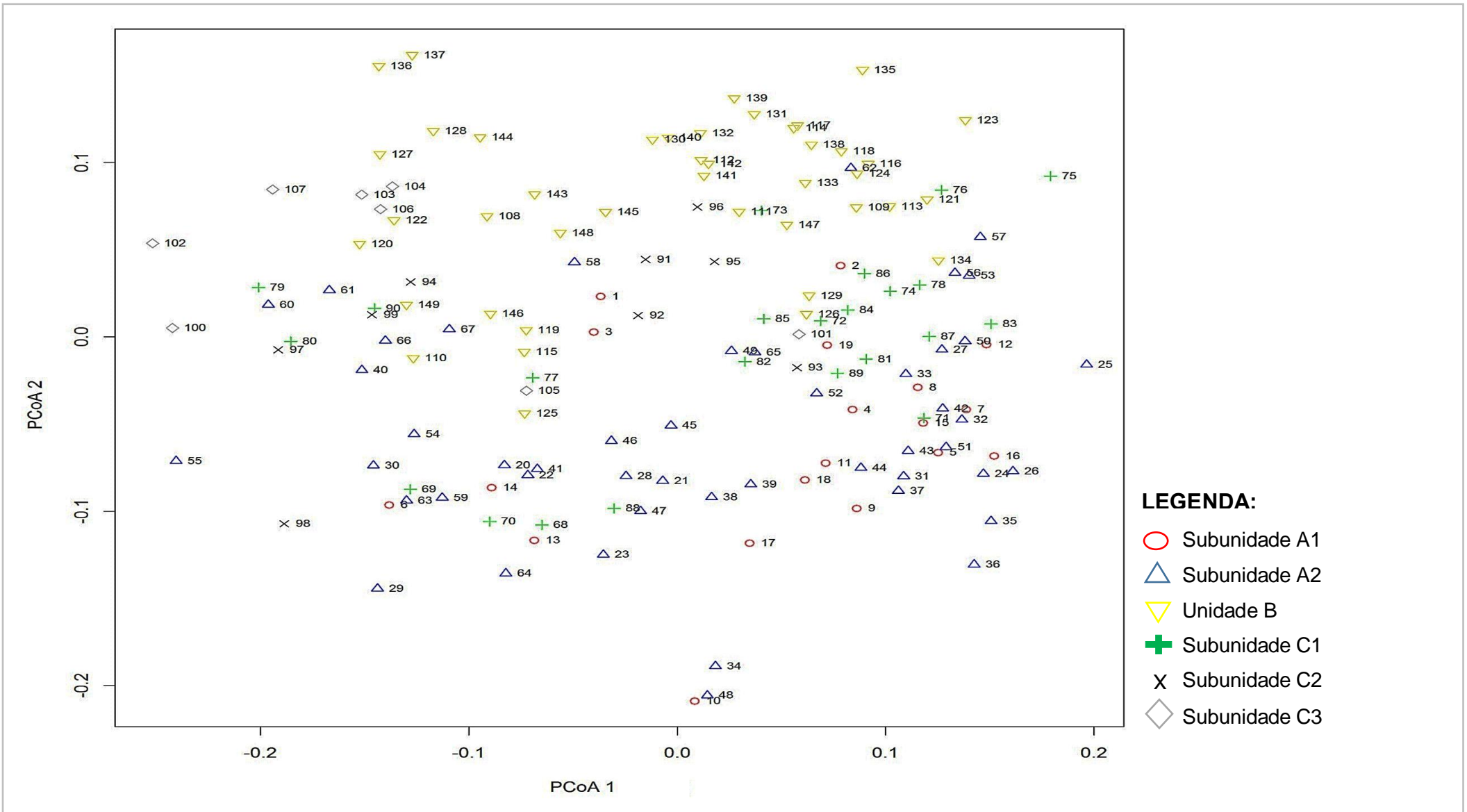


Figura 12 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) dos 149 indivíduos de *P. reticulata* com base em marcadores moleculares ISSR.

Corroborando com os dados obtidos nas análises anteriores, a PCoA indicou novamente que os adultos se agrupam próximos uns aos outros, devido à baixa diferenciação revelada. Os regenerantes se distribuíram de forma geral, como uma mistura entre os adultos, confirmando que entre eles existe a representatividade genética das árvores adultas. E observa-se que alguns indivíduos da mistura de progênes ficaram mais isolados, evidenciando que grãos de pólen de árvores que não foram amostradas podem estar contribuindo para o patrimônio genético desses indivíduos.

Adicionalmente, é possível associar os dados obtidos na PCoA com os encontrados no agrupamento genético entre as duas localidades de adultos, obtidos pelo método UPGMA nas análises dentro dos grupos. Como foi observado, os pares de indivíduos 25 x 55 foram os mais divergentes quando as duas localidades de adultos foram analisadas. Os dados se confirmam com a PCoA onde os mesmos genótipos se agruparam isolados espacialmente, confirmando a divergência genética entre eles.

A estruturação genética da população também foi avaliada com a abordagem bayesiana aplicada inicialmente apenas para os genótipos das árvores adultas (Figura13).

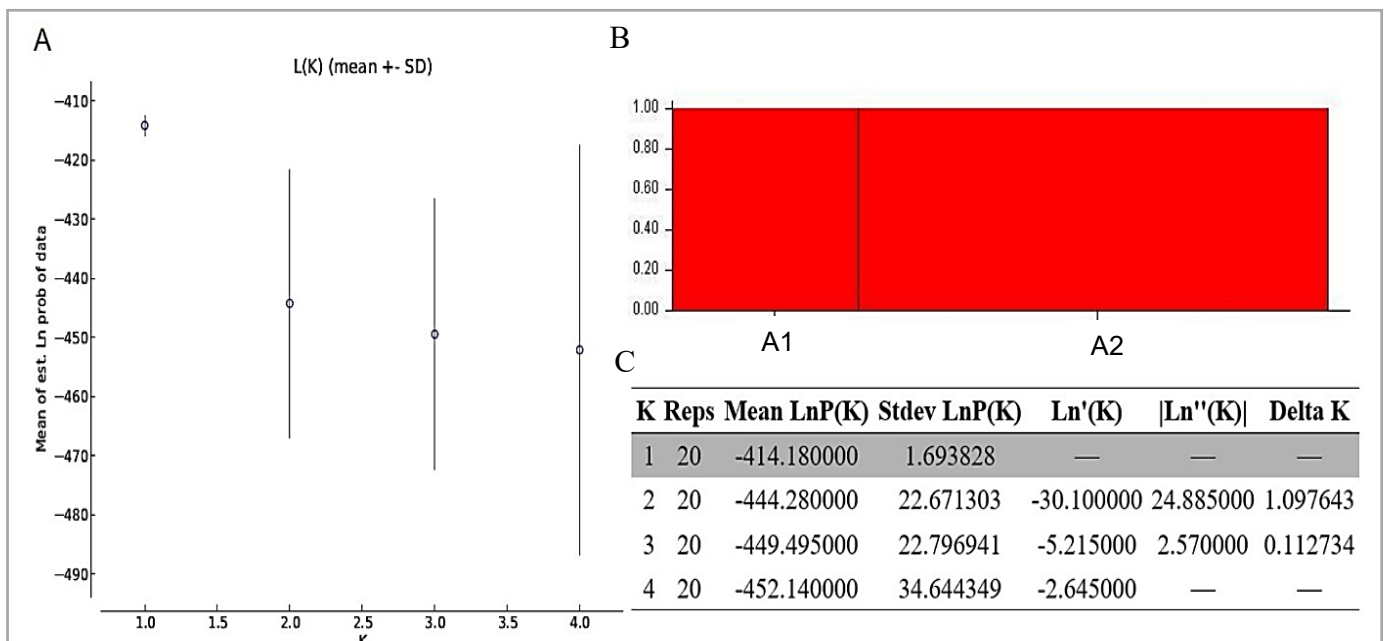


Figura 13 - Abordagem Bayesiana (*software* STRUCTURE) de 67 indivíduos adultos de *P. reticulata* ocorrentes em Guaçuí-ES. A- Gráfico da média  $\pm$  o desvio padrão de LnP(K) para 20 corridas. B - Gráfico de barras identificando o número de agrupamentos, indicando  $k=1$ . As letras A1 e A2 referem-se aos conjuntos de indivíduos adultos. C - Saída de dados do método proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005) usando o *software* STRUCTURE HARVESTER, indicando a média  $\pm$  o desvio padrão de LnP(K).

De acordo com a Figura 13 o maior valor de  $\ln P(k)$  e o menor desvio padrão foi para  $K=1$ , portanto, para as árvores adultas o melhor  $K$  encontrado foi representado por um único grupo. Comparando os dados da análise bayesiana com os obtidos pelos resultados anteriores com a AMOVA e PCoA, observa-se uma total correspondência entre os dados, confirmando a baixa diferenciação entre esses indivíduos, e que embora tenha-se duas áreas de coleta, as árvores não estão subdivididas e representam um único grupo populacional com potencial para coletas de sementes.

A abordagem bayesiana também foi realizada para todos os genótipos amostrados, para verificar como a população de *P. reticulata* está estruturada independente das faixas etárias analisadas. A definição do valor de  $K$  mais provável nesta análise, foi estimado pelo método  $\Delta K$  proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005), sendo o número mais provável de  $K$  definido como dois ( $K = 2$ ) (Figura14).

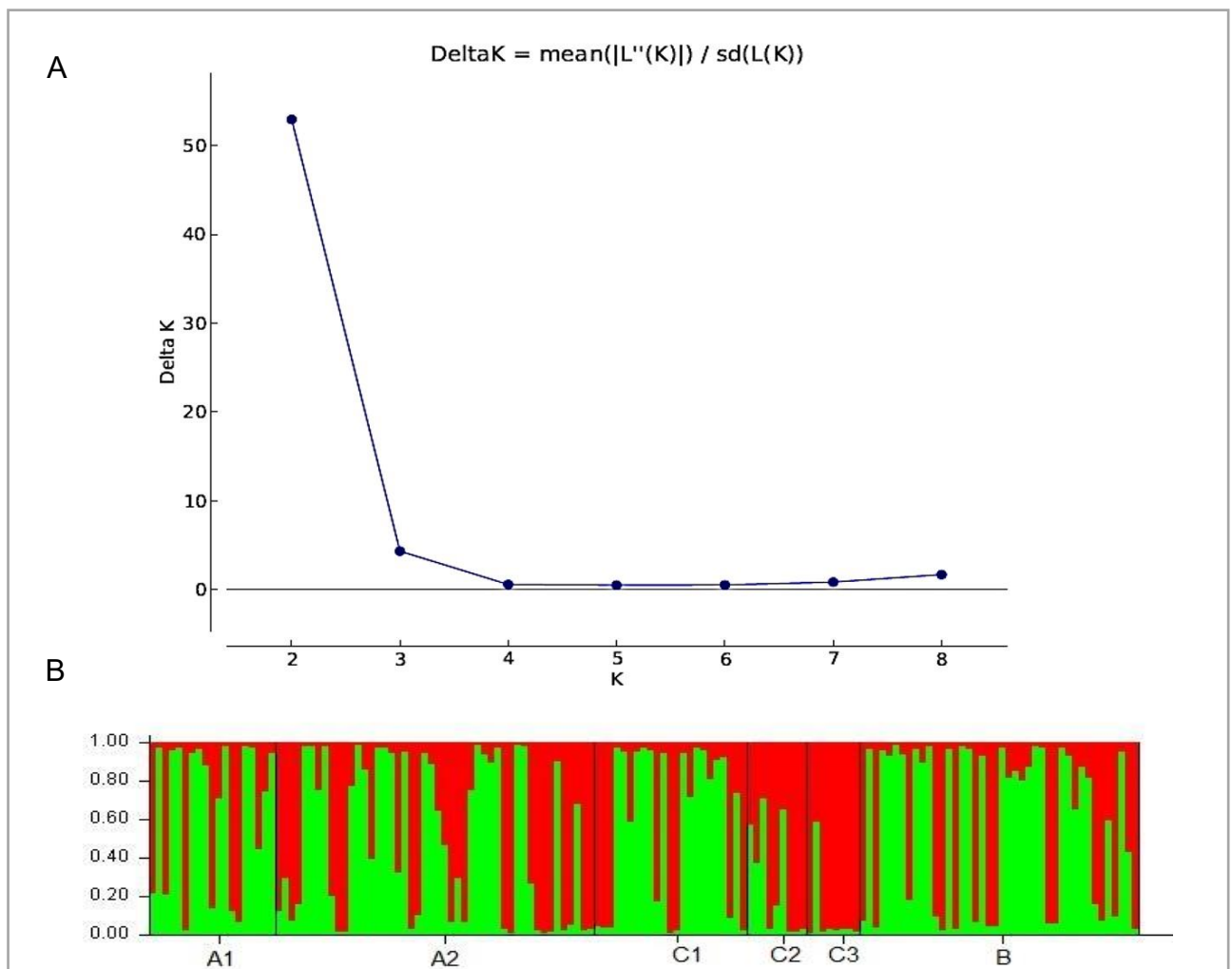


Figura 14 - Abordagem Bayesiana (*software* STRUCTURE) de 149 indivíduos de *P. reticulata* ocorrentes em Guaçuí-ES. A- Gráfico dos valores de  $\Delta K$  para cada valor de  $K$ . Melhor  $K$  (2), seguindo o critério proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005). B - Gráfico de barras identificando o número de agrupamentos em relação as unidades amostrais. As letras A1, A2, C1, C2, C3 e B referem-se às unidades e subunidades amostrais avaliadas.

É possível observar pela análise na Figura 14b, que a heterogeneidade que não foi observada entre as árvores adultas ( $K=1$ ), foi identificada quando toda a população foi analisada. As diferentes cores atribuídas aos grupos revelam a proporção de ancestralidade dos genótipos e indicam que as características genéticas estão sendo compartilhadas entre os indivíduos de cada unidade amostral (PRITCHARD; WEN, 2002). Os dados permitem confirmar a ocorrência do efeito fundador e a moderada diferenciação encontrada entre as áreas de regeneração, assim como evidenciado nas análises anteriores pela AMOVA. É notório que em termos de genoma a área C1 tem mais contribuição do grupo representado pela cor verde e as áreas C2 e C3 pelo grupo de cor vermelha.

Considerando todos os resultados obtidos neste estudo, é possível afirmar a alta diversidade genética presente na população de *P. reticulata*, ocorrente no remanescente de Floresta Estacional Semidecidual Montana avaliado. Os dados obtidos são inéditos para essa população e permitiram identificar o número de indivíduos remanescentes na área preservada da Floresta da Rosal, bem como permitiu estimar que na área particular também existe considerável diversidade genética entre os indivíduos.

As análises possibilitaram caracterizar a diversidade e a estrutura genética entre os adultos, evidenciando um único grupo populacional com potencial para serem utilizadas como matrizes para coleta de sementes, pois conservam uma satisfatória diversidade genética fundamentada nos valores de diversidade de Nei, índice de Shannon e pela formação de grupos distintos pelo método UPGMA.

Além disso, foi confirmado que entre as áreas de regeneração natural e a mistura de progênies existe diversidade genética equivalente ao que encontramos nos adultos, o que indica que a variabilidade genética está sendo mantida na espécie. Nessa perspectiva, é possível certificar a variação genética que poderá ser encontrada em futuros lotes de mudas, obtidos da coleta de sementes em árvores presentes na área.

## 6 CONCLUSÃO

- A população da espécie *P. reticulata* avaliada no presente estudo, apresenta alta diversidade genética;
- Os marcadores moleculares ISSR são eficientes para o estudo da diversidade genética em *P. reticulata*;
- O corte seletivo ocorrido na área não afetou a diversidade genética dos indivíduos;
- Entre os regenerantes e a mistura de progênies existe a representatividade genética das árvores adultas;
- Existe diversidade genética entre e dentro das unidades amostrais estudadas, sendo que a maior parte da variação genética é encontrada dentro dos grupos;
- Os indivíduos adultos demarcados conservam uma satisfatória diversidade genética e, portanto, revelaram potencial para serem utilizados como matrizes para coleta de sementes.



## 7 REFERÊNCIAS

AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 24, p. 5177-5188, 2008.

ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

ANNE, C. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. **Genetica**, v. 127, n. 1-3, p. 101-120, 2006.

AQUINO, F. G.; WALTER, B. M.; RIBEIRO, J. F. Espécies vegetais de Uso Múltiplo em Reservas Legais de Cerrado- Balsas, MA. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, supl. 1, p. 147-149, 2007.

ARAÚJO, F.S. et al. ISSR molecular markers for the study of the genetic diversity of *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. **Idesia**, v. 34, n. 3, p. 47-52, 2016.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1993. 511p.

BARBOSA, M. M. Quantificação e controle da qualidade do DNA genômico. In: MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998. 99-106p.

BETTENCOURT, S. X. et al. Genetic diversity and population structure of the endemic Azorean juniper, *Juniperus brevifolia* (Seub.) Antoine, inferred from SSRs and ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 314-324, 2015.

BORBA, R. S. et al. Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. **Neotropical Entomology**, v.34, p. 565-569, 2005.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. 2ª Ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2009. 532 p.

BORGES R.C. et al. Investigating genetic diversity in sapucaia using inter simple

sequence repeat markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016.  
BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetic**, v. 32, p. 314-331. 1980.

BRAGA, L. L. et al. Germinação de Sementes de *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae - Mimosoideae) sob Influência do Tempo de Armazenamento. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 258 - 260, 2007.

BRANDON, K. et al. Conservação Brasileira: desafios e oportunidades. **Megadiversidade**. v.1, p. 7-13, 2005.

CABIN, R. J. Genetic comparisons of seed bank and seedling populations of a perennial desert mustard, *Lesquerella fendleri*. **Evolution**, p. 1830-1841, 1996.

CACHAPUZ, P. B. B. **Usinas da Cemig**: a história da eletricidade em Minas e no Brasil. Centro da Memória da Eletricidade no Brasil. Rio de Janeiro, 2006. 306p.

CAMARGO, L. K. P. et al. Establishment and molecular characterization of a sweet potato germplasm bank of the highlands of Paraná State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v.4,n.12, p. 5574-5588, 2013.

CARVALHO, A. C. M. et al. Diversidade genética, endogamia e fluxo gênico em pequena população fragmentada de *Copaifera langsdorffii*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 4, p. 599-606, 2010.

CARVALHO, P. E. R. Vinhático-*Plathymenia reticulata*. **Embrapa Florestas. Comunicado técnico**, 2009.

CHAGAS, K. P. T. et al. Seleção de marcadores ISSR e diversidade genética em uma população de *Elaeis guineensis*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 1, 2015.

CNCFLORA. *Plathymenia reticulata* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2016.1. **Centro Nacional de Conservação da Flora**. Disponível em: <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Plathymenia reticulata](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Plathymenia%20reticulata)>. Acesso em 20 set. 2016.

COSTA, D. F. et al. Genetic diversity and ISSR initiators selection in a natural population of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista**

**Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. 1a ed. Visconde do Rio Branco-MG: Suprema, 2011. 620 p.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**, v.35, n.3, p. 271-276, 2013.

CRUZ, M. V. et al. Isolation and characterization of microsatellite markers of *Plathymenia reticulata* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, p. 210-212, 2012.

CUNHA, A. A. et al. **Pagamentos por serviços ambientais na Mata Atlântica: lições aprendidas e desafios**. 2ª ed. Ministério do Meio Ambiente. Brasília, 2011. 280p.

CURTO, R. A. **Avaliação de métodos de estimação de altura e de estratificação vertical em uma floresta estacional semidecidual**. 2011.123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)- Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro, 2011.

CURTO, R. A. et al. Métodos de estimação de altura de árvores em Floresta Estacional Semidecidual. **Floresta**, v. 43, n. 1, p. 105-116, 2013.

DAL BEM, E. A. et al. Cenários de corte seletivo de árvores na diversidade genética e área basal de populações de *Araucaria angustifolia* com base em modelagem Ecogene. **Scientia Forestalis**, n. 106, p. 453-466, 2015.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12:, n.1, p.13-15, 1990.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. Structure Harvester: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

ENGLAND, P. R. et al. Microsatellite diversity and genetic structure of fragmented populations of the rare, fire-dependent shrub *Grevillea macleayana*. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 6, p. 967-977, 2002.

ESTOPA, R. A. et al. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, n. 70, p. 97-106, 2006.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, n. 2, p. 479-49, 1992.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual review of ecology, evolution, and systematics**, p. 487-515, 2003.

FALEIRO, G. F. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. 1ª ed. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, p.102, 2007.

FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Brasília: Embrapa-CERNAGEN, 1998. 220p.

GALETTI JR, P. M. Genética da conservação brasileira. In: FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Editora SBG, 2008. 244-274p.

GOIS, I. B. et al. Variabilidade genética em populações naturais de *Ziziphus joazeiro* Mart., por meio de marcadores moleculares RAPD. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 38, n. 4, p. 621-630, 2014.

GONÇALVES, L. O. et al. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina willd.*) em áreas de baixa ocorrência. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 290-298, 2014.

GOULART, M. F; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Phenological variation within and among populations of *Plathymenia reticulata* in Brazilian Cerrado, the Atlantic Forest and transitional sites. **Annals of Botany**, v.96, p. 445-455, 2005.

GUARIGUATA, M. R.; OSTERTAG, R. Neotropical secondary forest succession: changes in structural and functional characteristics. **Forest ecology and management**, v. 148, n. 1, p. 185-206, 2001.

GUIMARÃES, C. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 30, p. 24-33, 2009.

GUPTA, M. et al. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89, p. 998-1006, 1994.

HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v.69, n.10, p.1685-1693, 1982.

HAMRICK, J. L. Tropical breeding systems: one and done?. **Heredity**, v. 109, n. 6, p. 330, 2012.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 351, n. 1345, p. 1291-1298, 1996.

HERINGER, E. P. O gênero *Plathymania*. **Anais da Sociedade Botânica do Brasil**, v.7, p. 55-64, 1956.

HIGA, A. R.; SILVA, L. D. Pomares de Sementes de Espécies Nativas - Situação Atual. In: HIGA, A. R.; SILVA, L. D. **Pomar de Sementes de Espécies Florestais Nativas**. Curitiba: FUPEF, 2006. 13-40p.

HMELJEVSKI, K. V. et al. Genetic diversity, genetic drift and mixed mating system in small subpopulations of *Dyckia ibiramensis*, a rare endemic bromeliad from Southern Brazil. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 3, p. 761-769, 2011.

HOFFMANN, L. V.; BARROSO, P. A. V. Marcadores Moleculares como Ferramentas para Estudos de Genética de Plantas. **Embrapa Algodão**. Documentos, v. 147, p. 1-36, 2006.

IDREES, M.; IRSHAD, M. Molecular Markers in Plants for Analysis of Genetic Diversity: A Review. **European Academic Research**, v. 2, n. 1, p. 1513-1540, 2014.

JACCARD, P. Etude comparative de la distribution florale dans une porion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles**, v.37, p. 547-579, 1901.

- KAGEYAMA, P. Y. Recomposição da vegetação com espécies arbóreas nativas em reservatórios de usinas hidrelétricas da CESP. **Série técnica IPEF**, Piracicaba, v. 8, n.25, p. 7-8,1992.
- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B; SOUZA, L. M. I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.
- KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrika**, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964.
- LACERDA, D. R. et al. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, v.10, p.1143-1152, 2001.
- LACERDA, D. R. et al. Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathymenia foliolosa* and *P. reticulata* (Mimosoideae), inferred using RAPD markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 235, n. 1-4, p. 67-77, 2002.
- LACERDA, D. R. et al. Seed-dormancy variation in natural populations of two tropical leguminous tree species: *Senna multijuga* (Caesalpinoideae) and *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae). **Seed Science Research**, v.14, p.127-135, 2004.
- LAGE, C. **Estrutura e florística do estrato lenhoso do gradiente bordainterior de um fragmento florestal no Município de Guaçuí-ES**.2012. 59f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2012.
- LEBERG, P. L. Estimating allelic richness: effects of sample size and bottlenecks. **Molecular ecology**, v. 11, n. 11, p. 2445-2449, 2002.
- LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E.D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. **Oecologia**, v. 129, n. 2, p. 271-280, 2001.
- LEMOS FILHO, J. P.; GOULART, M. F.; LOVATO, M. B. Populational approach in ecophysiological studies: the case of *Plathymenia reticulata*, a tree from Cerrado and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, p. 205-216, 2008.
- LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, New York, v. 6, p. 381-398, 1972.

LIMA, E. N. et al. Genetic diversity of clones of acerola assessed by ISSR molecular markers. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 2, p. 174-180, 2015.

LIMA, R. A. et al. Diversidade e estrutura genética de *Senna reticulata*. **Floresta**, v. 45, n. 3, p. 507-514, 2015.

LINDEN, R. Técnicas de Agrupamento. **Revista de Sistemas de Informação da FSMA**. n. 4, p. 18-36. 2009.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American journal of human genetics**, v. 44, n. 3, p. 397, 1989.

LIU, Y. et al. Genetic diversity in *Vicia amoena* (Fabaceae) germplasm resource in China using SRAP and ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 86-93, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação de plantas arbóreas do Brasil. 1 v. 4 ed. Nova Odessa, Plantarum, 2002. 290p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual review of ecology and systematics**, p. 65-95, 1984.

MAGALHAES, H. M. et al. Genetic diversity of endangered populations of *Butia capitata*: Implications for conservation. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 888-900, 2015.

MALIK, W. et al. Molecular markers and Cotton genetic improvement: current status and future prospects. **Scientific World Journal**, 2014.

MARCELINO, F. C. et al. Ferramentas biotecnológicas aplicadas à cultura da Soja. **Circular Técnico** 47, Londrina, PR: Embrapa Soja, p. 6, 2007.

MARTINS, K. et al. Estrutura genética populacional de *Copaifera langsdorffii* Desf.(Leguminosae-Caesalpinioideae) em fragmentos florestais no Pontal do Paranapanema, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, p. 61-69, 2008.

MARTINS, R. N. et al. Plano de ação para o desenvolvimento integrado do Vale do Parnaíba – PLANAP. Manual de técnicas de produção de mudas florestais. **CODEVASF**, Curitiba, 2009.

MARTINS, S. V. et al. Potencial de regeneração natural de florestas nativas nas diferentes regiões do Estado do Espírito Santo. Vitória: **CEDAGRO**, 2014.

MATRICARDI, E. A. T. et al. Assessment of tropical forest degradation by selective logging and fire using Landsat imagery. **Remote Sensing of Environment**, v. 114, n. 5, p. 1117-1129, 2010.

MAYR, E. **Animal species and evolution**. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press of Harvard University Press, 1963.

McDERMOTT, J. M. E; McDONALD, B. A. Gene flow in plant pathosystems. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.31, p. 353-373, 1993.

MEYER, A. S. et al. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with dominant markers in maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p. 83-91, 2004.

MEYER, W. et al. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 2274-2280, 1993.

MILLIGAN, G. W.; COOPER, M. C. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. **Psychometrika**, v. 50, n. 2, p. 159-179, 1985.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Mata Atlântica: patrimônio nacional dos brasileiros**. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Núcleo Mata Atlântica e Pampa; organizadores Maura Campanili [e] Wigold Bertoldo Schaffer. Brasília: MMA, 2010. 408p.

MOJEMA, R. Hierarchical grouping methods and stopping rules: an evaluation. **The Computer Journal**, v. 20, p. 359-363, 1977.

MORIM, M. P. *Plathymentia* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB83636>>. Acesso em: 20 Set. 2016.

MUNIZ, N. F. M. et al. Divergência genética entre touros da raça gir. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 2, p. 145-151, 2014.



NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Pittsburgh, v. 89, n. 3, p. 583-590, 1978.

NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. **ASM Science Journal**, v. 9, p. 30-39, 2015.

NOGUEIRA, A. C.; MEDEIROS, A. C. de S. Coleta de Sementes Florestais Nativas. Circular Técnico 144, Colombo - PR: **Embrapa Florestas**, p. 11, 2007.

NOVAES, R. M. L. et al. Phylogeography of *Plathymania reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. **Molecular Ecology**, v.19, p. 985-998, 2010.

OLIVEIRA, O. M.; SANTOS, E. M.; SANTOS A. R. Determinação do uso e ocupação do solo no entorno de uma hidroelétrica no município de Guaçuí, ES. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.6, n.11, 2010.

PEREIRA, I. M.; ALVARENGA, A. P.; BOTELHO, S. A. Banco de sementes do solo, como subsídio à recomposição de mata ciliar. **Floresta**, v. 40, n. 4, p. 721-730, 2010.  
PERES, C. A. et al. Biodiversity conservation in human-modified Amazonian forest landscapes. **Biological Conservation**, v. 143, n. 10, p. 2314-2327, 2010.

PILON, N. A. L.; DURIGAN, G. Critérios para indicação de espécies prioritárias para a restauração da vegetação de cerrado. **Scientia Forestalis**, v.41, n.99, p. 389-399, 2013.

PIÑA- RODRIGUES, F. C. M. et al. Parâmetros técnicos para produção de sementes florestais. Rede Mata Atlântica de Sementes Florestais; 1. Ed. **Seropédica**: EDUR, UFRRJ, 2007.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

PRITCHARD, J. K.; WEN, W. Documentation for structure software: Version 2.

**University of Chicago**, Chicago, IL, 2002.

QUEIROZ, R. Fabaceae - *Plathymenia reticulata* Benth. Plantas do Brasil, 2012.

Disponível em: <<http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com.br/2012/10/plathymenia-reticulata-benth.html>>. Acesso em: 21 set. 2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3 900051-07-0, URL <<http://www.Rproject.org>>. 2015.

RAMALHO, A. B. et al. Diversidade genética entre genótipos de *Bertholletia excelsa* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Floresta**, v. 46, n. 2, p. 207-214, 2016.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 5. Ed. Lavras: UFLA, 2012. 566p.

REDDY, M. P. et al. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, p. 9-17, 2002.

REZENDE, H. R. et al. Efeitos da implantação da Usina Hidrelétrica de Rosal, Rio Itabapoana, Estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, sobre anofelinos, planorbídeos e flebotomíneos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.160-164, 2009.

RIVAS, L. H. et al. Genetic diversity in natural populations of *Theobroma subincanum* Mart. in the Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4998-5006, 2013.

ROCHA, G. P. E; BORGES, L. M; ROMERO, R. Mimosoideae (Leguminosae) in the Reserva Ecológica do Panga, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3, p. 735-750, 2014.

ROCHA, H. M. C.; SOUSA-SILVA, J. C. Morfologia de frutos, sementes, plantulas e plantas jovens de *Plathymenia reticulata* Benth. (Leguminosae). Planaltina: **Embrapa Cerrados**, 2002.

RODRIGUES, R. R. et al. **(Orgs.) Pacto para a restauração ecológica da Mata Atlântica**: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal. São Paulo: Instituto BioAtlântica, 2009. 260p.

ROHLF, F. J.; FISHER, D.R. Tests for hierarchical structure in random data sets.

**Systematic Biology**, v. 17, n. 4, p. 407-412, 1968.

ROLDAN-RUIZ, I. et al. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, n.6, p.125–134, 2000.

ROSSI, F. S. et al. Diversidade genética em populações naturais de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) com uso de marcadores ISSR. **Scientia Forestalis**, v. 42, n. 104, p. 631-639, 2014.

SANKAR, A. A.; MOORE, G. A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of genetic linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, n.102, p. 206–214, 2001.

SANSEVERO, J. B. B.; PIRES, J. P. A.; PEZZOPANE, J. E. M. Caracterização ambiental e enriquecimento da vegetação de áreas em diferentes estágios sucessionais (pasto, borda, clareira e floresta). **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v.4, n. 7, 2006.

SANTANA, G. C. et al. Diversidade genética de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. no Baixo Rio São Francisco, por meio de marcadores RAPD. **Revista Árvore**, v.32, n.3, p. 427-433, 2008.

SANTANA, I. B. B. et al. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SATO, L. Y. et al. Classificação de áreas exploradas por sistema de corte seletivo na Amazônia. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, 15, 2011, Curitiba. **Anais...** Curitiba: INPE, 2011. p.6688.

SEBBENN, A. A. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: Higa AH, Silva LD, coordenadores. **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF; p. 93-138, 2006.

SEBBENN, A. M. et al. Modelling the long-term impacts of selective logging on genetic diversity and demographic structure of four tropical tree species in the Amazon forest. **Forest ecology and management**, v. 254, n. 2, p. 335-349, 2008.

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

SENA, C. M.; GARIGLIO, M. A. Sementes Florestais: Colheita, Beneficiamento e Armazenamento. **Guia Técnico**, Natal: MMA. Secretaria de Biodiversidade e Florestas, v. 2, p. 28, 2008.

SEOANE, C. E. S. et al. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e a estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Mart. **Revista do Instituto Florestal**, v. 17, n. 1, p. 25-43, 2005.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. A. **Mathematical model of communication**. Urbana: University of Illinois Press, 1949.

SHARMA, S. K. et al. Genetic diversity and gene flow estimation in *Prosopis cineraria* (L.) Druce: A key stone tree species of Indian Thar Desert. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 1, p. 9-13, 2011.

SILVA JÚNIOR, A. L. et al. Espécies arbóreas da Mata Atlântica: Importância e status de preservação. In: FERREIRA, A. et al. **Tópicos especiais em genética e melhoramento**. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora, 2016. p. 187-202.

SILVA JÚNIOR, M. C. **Cem árvores do Cerrado: guia de campo**. Rede de sementes do Cerrado. Brasília, 2005. 360p.

SILVA, A. V. C. **O uso de marcadores moleculares na pesquisa agropecuária**. Brasília-DF: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012, 65 p.

SILVA, B. M. et al. Diversidade genética estimada com marcadores entre sequências simplesrepetidas em cultivos comerciais de Cupuaçuzeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 1, p. 108-113, 2016.

SILVA, K. V. P. et al. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 46, n. 9, p. 1082-1088, 2011.

SLATKIN, M. Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. **Science**, Washington D. C., v. 236, 1987.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, p. 33-40, 1962.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 3, p. 495-503, 2015.

TANYA, P. et al. Genetic diversity among jatropha and jatropha-related species based on ISSR markers. **Plant Molecular Biology Report**. n.29, p. 252-264, 2011.

TATIKONDA, L. et al. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L. biofuel plant. **Plant Science**. v. 176, p. 505-513, 2009.

TEMPLETON, A. R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**. Ribeirão Preto-SP: Sociedade Brasileira de Genética, 2011, 705 p.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O Uso dos Marcadores Moleculares no melhoramento Genético de Plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/13006411>>. Acesso em: 20 Set. 2016.

VARJABEDIAN, R. Lei da Mata Atlântica: retrocesso ambiental. **Estudos Avançados**. v.24, n.68, p.147-160, 2010.

VIEGAS, M. P. et al. Diversidade genética e tamanho efetivo de duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob conservação ex situ. **Revista Árvore**, v.35, n.4, p. 769-779, 2011.

VIEIRA, A. H. et al. Técnicas de produção de sementes florestais. **Comunicado Técnico**, Rondônia: Embrapa CPAF, v. 01, n. 205, p. 1-4, 2001.

VIEIRA, E. A. et al. Variabilidade genética do banco ativo de germoplasma de mandioca do Cerrado acessada por meio de descritores morfológicos. **Científica**, Jaboticabal, v.36, n.1, p.56-67, 2008.

VIEIRA, F. A. et al. Diversidade genética de *Copernicia prunifera* com o uso de marcadores moleculares ISSR. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 4, 2015.

VOLPATO, G. H. et al. **O papel ecológico das aves dispersoras de sementes na restauração ecológica.** In: MARTINS, S.V. (Ed.) *Restauração Ecológica de Ecossistemas Degradados*, Viçosa, MG: Ed. UFV, 2012. p.191-211.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WARWICK, M. C.; LEWIS, G. P. Revision of *Plathymeria* (Leguminosae - Mimosoideae). **Edinburgh Journal of Botany**, v.60, p. 111-119, 2003.

WILLIAMS, J.G.K et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**: variability within and among natural populations. University of Chicago press, Chicago, IL, USA, 1978.

WRIGHT, S. Systems of mating. I. The biometric relations between parent and offspring. **Genetics**, v. 6, n. 2, p. 111, 1921.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, New York, v. 15, p. 395-420, 1951.

YANG, J. C. et al. Genetic diversity and structure among natural populations of *Sindora glabra* in Hainan Island, China as revealed by ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 69, p. 145-151, 2016.

YEEH, Y. et al. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Theaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Shanghai, v. 37, n. 1, p. 141-146, 1996.

YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany**, v. 129, p.156-157, 1997.

YOUNG, A. G.; BOYLE, T. J. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. **Forest conservation genetics**. Melbourne: CSIRO Publishing, 2000. 123-135p.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain-reaction amplification. **Genomics**, New York, v. 20, p. 176-183, 1994.

**APÊNDICE 1 - Descrição das 67 árvores matrizes selecionadas para as análises moleculares. Número da Matriz; H: Altura; DAP: Diâmetro à altura do peito; Estado Reprodutivo; Posição da Paisagem; Condição de Luminosidade; Coordenadas; Altitude. Indivíduos coletados na APP referem-se as sequências de A1 a A19 e os coletados na área particular são representados pelas sequências de A20 a A67**

(Continua)

<b>Nº Matriz</b>	<b>H (m)</b>	<b>DAP (cm)</b>	<b>Est. Reprodutivo</b>	<b>P. Paisagem</b>	<b>C. Luminosidade</b>	<b>Coord.</b>	<b>Alt. (m)</b>
<b>A1</b>	30	119	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 47' 34.7"/ W 041 03' 21.2"	528
<b>A2</b>	18	29	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 25.8"/ W 041 42' 21.6"	591
<b>A3</b>	8	17	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53'24.7"/ W 041 42' 22.6"	608
<b>A4</b>	7	17	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 25.9"/ W 041 42' 29.0"	619
<b>A5</b>	35	105	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 26.5"/ W 041 42' 35.5"	624
<b>A6</b>	35	102	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 27.8"/ W 041 42' 49.7"	591
<b>A7</b>	12	15	Fruto Maduro	Terço Inferior	Borda da Floresta	S 20 53' 28.0"/ W 041 42' 50.0"	589
<b>A8</b>	15	30	Fruto Dispersado	Terço Inferior	Borda da Floresta	S 20 53'28.6"/ W 041 42' 50.5"	490
<b>A9</b>	13	21	Fruto Maduro	Terço Inferior	Borda da Floresta	S 20 53' 28.3"/ W 041 42' 50.3"	580
<b>A10</b>	35	63	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 25.2"/ W 041 42' 54.0"	623
<b>A11</b>	18	31	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 25.2"/ W 041 42' 54.2"	561
<b>A12</b>	15	31	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 25.2"/ W 041 42' 21.8"	635
<b>A13</b>	15	26	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 25.2"/ W 041 42' 20.8"	634
<b>A14</b>	13	21	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 24.9"/ W 041 42' 21.6"	637
<b>A15</b>	22	28	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 25.6"/ W 041 42' 21.5"	637
<b>A16</b>	35	98	Fruto Maduro	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 25.8"/ W 041 42' 21.2"	644
<b>A17</b>	15	24	Fruto Dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 43.7"/ W 041 42' 22.6"	592
<b>A18</b>	10	18	Fruto Dispersado	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 43.8"/ W 041 42' 25.5"	594
<b>A19</b>	25	57	Fruto Dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 37.2"/ W 041 42' 40.1"	597
<b>A20</b>	16	41	Fruto Maduro	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 25.3"/ W 041 42' 37.2"	630
<b>A21</b>	20	27	Fruto Maduro	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 25.3"/ W 041 42' 36.6"	620
<b>A22</b>	15	38	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 23.5"/ W 041 42' 37.7"	646
<b>A23</b>	15	16	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 22.9"/ W 041 42' 37.6"	639
<b>A24</b>	12	19	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 22.6"/ W 041 42' 37.2"	634
<b>A25</b>	12	24	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 22.2"/ W 041 42' 37.1"	634

**APÊNDICE 1 - Descrição das 67 árvores matrizes selecionadas para as análises moleculares. Número da Matriz; H: Altura; DAP: Diâmetro à altura do peito; Estado Reprodutivo; Posição da Paisagem; Condição de Luminosidade; Coordenadas; Altitude. Indivíduos coletados na APP referem-se as sequências de A1 a A19 e os coletados na área particular são representados pelas sequências de A20 a A67**

(Continuação)

Nº Matriz	H (m)	DAP (cm)	Est. Reprodutivo	P. Paisagem	C. Luminosidade	Coord.	Alt. (m)
A26	20	28	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 20.8"/ W 041 42' 36.2"	647
A27	20	38	Fruto Maduro	Terço Inferior	Interior da Floresta	S 20 53' 20.9"/ W 041 42' 35.3"	646
A28	20	36	Fruto Maduro	Terço Inferior	Interior da Floresta	S 20 53' 20.8"/ W 041 42' 35.3"	643
A29	17	27	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 20.7"/ W 041 42' 35.3"	623
A30	20	47	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 23.9"/ W 041 42' 38.8"	602
A31	20	27	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 23.5"/ W 041 42' 38.6"	650
A32	20	27	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 23.4"/ W 041 42' 38.6"	650
A33	20	35	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 23.5"/ W 041 42' 38.3"	647
A34	15	15	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 23.6"/ W 041 42' 38.3"	647
A35	12	17	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 23.4"/ W 041 42' 38.1"	645
A36	20	35	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 23.7"/ W 041 42' 37.9"	642
A37	18	35	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 23.5"/ W 041 42' 38.0"	644
A38	15	39	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 23.0"/ W 041 42' 37.9"	645
A39	18	37	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 22.8"/ W 041 42' 37.8"	644
A40	15	20	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 22.4"/ W 041 42' 37.9"	643
A41	15	32	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 22.3"/ W 041 42' 37.6"	640
A42	10	30	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 21.6"/ W 041 42' 37.7"	646
A43	10	17	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 21.6"/ W 041 42' 37.5"	645
A44	10	20	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 21.4"/ W 041 42' 37.7"	649
A45	15	36	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 21.7"/ W 041 42' 37.9"	652
A46	12	21	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 21.5"/ W 041 42' 38.0"	653
A47	20	61	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 21.8"/ W 041 42' 38.2"	654
A48	25	31	Fruto Maduro	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 22.2"/ W 041 42' 38.5"	655
A49	25	38	Fruto Maduro	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 22.7"/ W 041 42' 38.8"	658
A50	15	44	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 19.9"/ W 041 42' 37.0"	651
A51	15	27	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 19.9"/ W 041 42' 36.7"	650




**APÊNDICE 1 - Descrição das 67 árvores matrizes selecionadas para as análises moleculares. Número da Matriz; H: Altura; DAP: Diâmetro à altura do peito; Estado Reprodutivo; Posição da Paisagem; Condição de Luminosidade; Coordenadas; Altitude. Indivíduos coletados na APP referem-se as seqüências de A1 a A19 e os coletados na área particular são representados pelas seqüências de A20 a A67**

(Conclusão)

<b>Nº Matriz</b>	<b>H (m)</b>	<b>DAP (cm)</b>	<b>Est. Reprodutivo</b>	<b>P. Paisagem</b>	<b>C. Luminosidade</b>	<b>Coord.</b>	<b>Alt. (m)</b>
<b>A52</b>	35	57	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 11.8"/ W 041 42' 36.3"	658
<b>A53</b>	25	38	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 10.8"/ W 041 42' 35.8"	657
<b>A54</b>	20	27	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 10.8"/ W 041 42' 35.8"	657
<b>A55</b>	20	47	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 11.1"/ W 041 42' 35.3"	652
<b>A56</b>	25	32	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 10.6"/ W 041 42' 35.3"	653
<b>A57</b>	18	19	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 10.5"/ W 041 42' 35.4"	656
<b>A58</b>	25	40	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 10.0"/ W 041 42' 35.2"	652
<b>A59</b>	40	65	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 09.4"/ W 041 42' 34.5"	644
<b>A60</b>	25	28	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 09.5"/ W 041 42' 35.5"	658
<b>A61</b>	27	47	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 09.3"/ W 041 42' 35.5"	659
<b>A62</b>	25	43	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 09.3"/ W 041 42' 35.4"	658
<b>A63</b>	25	44	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 09.6"/ W 041 42' 35.3"	658
<b>A64</b>	30	57	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 09.0"/ W 041 42' 35.2"	661
<b>A65</b>	30	37	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 09.2"/ W 041 42' 35.6"	663
<b>A66</b>	30	48	Fruto Maduro	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 09.5"/ W 041 42' 35.7"	661
<b>A67</b>	30	60	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 08.5"/ W 041 42' 35.0"	659
<b>Média</b>	<b>19.97</b>	<b>37.70</b>					

## ANEXO 1 - Ficha de cadastro e caracterização de matrizes

<b>FICHA DE CADASTRO DE MATRIZES</b>	
Data: ___/___/_____	
Responsável pelo cadastramento no campo: _____	
Propriedade: _____ Município: _____ Estado: _____	
Endereço: _____	
Acesso: _____	
NOME DA ESPÉCIE:	NOME VULGAR:
N° DA MATRIZ:	COORDENADAS DA MATRIZ: Lat: _____ Long: _____ Alt: _____
DATUM: _____	FOTO N°: _____
Descrição do ponto onde foram tiradas as coordenadas _____	
ALTURA da árvore: _____ m      DIÂMETRO (DAP): _____ cm	
ESTADO REPRODUTIVO: <input type="checkbox"/> vegetativo <input type="checkbox"/> flor <input type="checkbox"/> fruto verde <input type="checkbox"/> fruto maduro <input type="checkbox"/> fruto dispersado	
POSIÇÃO DA PAISAGEM:	
<input type="checkbox"/> Planície	<input type="checkbox"/> Terço médio
<input type="checkbox"/> Fundo de vale	<input type="checkbox"/> Terço superior
<input type="checkbox"/> Terço inferior	
AMBIENTE:	
<input type="checkbox"/> Ciliar	<input type="checkbox"/> Não ciliar
UMIDADE DO SOLO:	
<input type="checkbox"/> Encharcado	<input type="checkbox"/> Bem drenado
CONDIÇÃO DE LUMINOSIDADE:	
<input type="checkbox"/> Interior da floresta	<input type="checkbox"/> Borda da clareira
<input type="checkbox"/> Clareira	<input type="checkbox"/> Borda de floresta