



Universidade Estadual de Londrina

---

**Eduardo Augusto Ruas**

Estudos de Diversidade Genética e Anatomia Ecológica de  
Populações da Espécie Arbórea Ciliar da Bacia do Rio  
Tibagi *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anarcadiaceae).

---

**Londrina**  
**2006**



**Universidade Estadual de Londrina**

**Instituto Agrônomo do Paraná**

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

---

Eduardo Augusto Ruas

Estudos de Diversidade Genética e Anatomia Ecológica de  
Populações da Espécie Arbórea Ciliar da Bacia do Rio  
Tibagi *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anarcadiaceae).

---

**Londrina**  
**2006**

**Eduardo Augusto Ruas**

“Estudos de Diversidade Genética e Anatomia Ecológica  
de Populações da Espécie Arbórea Ciliar da Bacia do Rio  
Tibagi *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anarcadiaceae)”.

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Genética e Biologia Molecular  
Da Universidade Estadual de  
Londrina, como requisito Para  
a obtenção do título de Mestre.

Orientador: *Prof<sup>o</sup>. Dr. Moacyr Eurípedes Medri*

Londrina  
2006

**Eduardo Augusto Ruas**

Estudos de Diversidade Genética e Anatomia Ecológica de  
Populações da Espécie Arbórea Ciliar da Bacia do Rio  
Tibagi *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anarcadiaceae).

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

COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof Dr Moacyr Eurípedes Medri  
Universidade Estadual de Londrina**

**Profª Drª Viviane Maria Davanso**

**Profª Drª Sílvia Helena Sofia  
Universidade Estadual de Londrina**

**Londrina, 23 de fevereiro de 2006.**

## SUMÁRIO

<b>1.0 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2.0. Revisão de Literatura</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Descrição da espécie</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Matas ciliares</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Alagamento do Solo</b>	<b>8</b>
<b>2.3.1 Mecanismos de tolerância ao alagamento</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2 Formação de aerênquima</b>	<b>14</b>
<b>2.3.3 Respostas das raízes ao alagamento</b>	<b>17</b>
<b>2.3.4 Respostas hormonais ao alagamento</b>	<b>19</b>
<b>2.3.5 Lenticelas Hipertrofiadas</b>	<b>20</b>
<b>2.3.6 Crescimento e Desenvolvimento</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Marcadores moleculares</b>	<b>24</b>
<b>2.4.1 Estrutura genética de populações naturais</b>	<b>28</b>
<b>2.4.2 Análise da Estrutura Genética com Marcadores Codominantes</b>	<b>28</b>
<b>2.4.3 Análise da Estrutura Genética com Marcadores Dominantes</b>	<b>33</b>
<b>2.4.4 Fluxo Gênico em Plantas</b>	<b>36</b>
<b>3.0 Justificativas e Objetivos</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Justificativas</b>	<b>38</b>
<b>3.2 Objetivos</b>	<b>39</b>
<b>3.2.1 Objetivos Gerais</b>	<b>39</b>
<b>3.2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>40</b>
<b>4.0 Artigo Científico I</b>	<b>41</b>

<b>Abstract</b>	<b>42</b>
<b>Introdução</b>	<b>44</b>
<b>Material e Métodos</b>	<b>46</b>
<b>Resultados</b>	<b>51</b>
<b>Discussão</b>	<b>64</b>
<b>Conclusões</b>	<b>70</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>70</b>
<b>5.0 Artigo Científico II</b>	<b>80</b>
<b>Abstract</b>	<b>81</b>
<b>Introdução</b>	<b>83</b>
<b>Materiais e Métodos</b>	<b>84</b>
<b>Resultados</b>	<b>87</b>
<b>Discussão</b>	<b>93</b>
<b>Conclusões</b>	<b>95</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>96</b>
<b>6.0 Referências Bibliográficas</b>	<b>100</b>

## **Agradecimentos**

**Agradeço em primeiro lugar ao Grande Pai e a Grande Mãe que são a fonte infindável de todo amor do Cosmos.**

**Aos meus pais, que nesta vida me deram todo amor e possibilidade de crescimento pessoal e profissional.**

**A minha noiva por sempre estar do meu lado agüentando meu mau-humor nas horas de cansaço e sorrir comigo nas horas de alegria.**

**Ao meu orientador que mesmo com milhões de coisas para fazer na UEL, sempre achou tempo para se dedicar a minha orientação.**

**A todos os colegas de Laboratório, pois sem eles a realização deste trabalho seria impossível.**

**A Capes por me conceder uma bolsa de estudos por todo este período de trabalho.**

## 1.0 INTRODUÇÃO

A bacia do rio Tibagi está localizada no centro leste do Estado do Paraná, entre as maiores bacias hidrográficas do Estado, com uma área correspondente a 13% de sua área total. O rio Tibagi possui 550 km de extensão com uma rede hidrográfica composta por 65 afluentes e centenas de subafluentes. Sua nascente encontra-se ao sul do estado no município de Palmeira, a 1.150 metros de altitude, percorrendo até sua foz ao norte do Estado, no município de Primeiro de Maio, onde atinge uma altitude de 334 m. Em virtude das variações climáticas ao longo da bacia, esta é comumente dividida em: alto, médio e baixo Tibagi. No alto Tibagi a vegetação é campestre com ilhas de floresta ombrófila densa, no médio Tibagi ocorre uma floresta de transição, e no baixo Tibagi a floresta é estacional semidecidual ou mesófila. Esta paisagem atualmente encontra-se profundamente alterada, restando apenas 2% de fragmentos de floresta secundária.

Admite-se hoje que 60 mil espécies vegetais, das cerca de 250 mil existentes no planeta, correm risco de extinção nos próximos 20 anos, devido à destruição de seus habitats naturais (Heywood, 1989). Neste contexto, as matas ciliares se estabelecem como importantes formações florestais a serem conservadas ou recuperadas (Barbosa, 2000).

Apesar de amparadas pela atual legislação brasileira como áreas de proteção permanente, as matas ciliares continuam sendo amplamente devastadas. Estas matas são imprescindíveis ao equilíbrio ecológico de uma bacia hidrográfica, uma vez que atuam na manutenção da qualidade da água e na estabilidade do solo das áreas marginais aos rios (Rezende, 1998).

As matas ciliares são importantes por diminuírem a ocorrência do

escoamento superficial, que provoca erosão e conseqüente arraste de solo e nutrientes, assoreando a calha dos rios; por desempenharem um efeito de filtragem dos fluxos d'água, melhorando a qualidade desta (Lima, 1989) e também por serem locais de refúgio e fornecimento de alimento para a fauna terrestre e aquática (Marinho Filho; Reis, 1989).

As florestas ciliares são zonas de transição com características definidas numa escala temporal e espacial, e têm forte interação com sistemas ecológicos adjacentes. As interfaces possuem atributos físicos e químicos, propriedades bióticas e processos de fluxo material e de energia específicos. Além disso, as interfaces, como é o caso das zonas ripícolas, são locais de reserva genética e migração longitudinal, ou sítios para microevolução ativa (Naiman & Dechamps, 1997).

Diversos autores (Simpósio Sobre Mata Ciliar, 1989 e 1995), têm alertado para o fato de que o reflorestamento heterogêneo nas regiões tropicais deve proporcionar formações florestais com estrutura e função semelhante às que ocorrem naturalmente, ou seja, deve incluir na sua conservação ou recuperação, além dos fatores bióticos e abióticos, a complexidade de suas funções e inter-relações. Não podem ser confundidos, portanto, com reflorestamentos para fins energéticos, paisagísticos, ou que visem a recreação (Barbosa, 2000).

A necessidade de um amplo conhecimento da vegetação para subsidiar esquemas de manejo e recuperação das áreas sujeitas a inundações tem levado a um aumento nas pesquisas quanto à tolerância das plantas ao alagamento do solo (Armstrong *et al.*, 1994). Estudos desta natureza têm apresentado contribuições significativas para o melhor conhecimento dos processos envolvidos na recuperação destas áreas,

especialmente quanto à sua dinâmica sucessional e à estabilidade do ecossistema implantado frente a condições ambientais como solos e clima (Barbosa *et al.*, 1996).

O estudo da tolerância de espécies de mata ciliar ao alagamento tem revelado alterações nas características do ciclo de vida, nos caracteres morfológicos e em aspectos funcionais (Crawford, 1978; Armstrong, 1979; Voesenek & Van der Veen, 1994 citado em Colli, 1998). Segundo Joly (1994), as alterações morfoanatômicas e fisiológicas são as mais freqüentemente verificadas em espécies arbóreas tropicais. Estas alterações são principalmente representadas pela formação de aerênquima, hipertrofia de lenticelas, desenvolvimento de raízes secundárias modificadas e alterações no desenvolvimento (BLUM, 1999). O entendimento destas alterações e de sua contribuição à adaptação é importante em projetos que visam a recuperação de matas ciliares degradadas. Entretanto, o sucesso destes projetos depende da associação da conservação dos recursos genéticos ao trabalho de recomposição (Kageyama, 1994). Para isso, é necessária a caracterização da variação genética da espécie estudada com relação ao seu ambiente.

O surgimento das técnicas de biologia molecular envolvendo a PCR, possibilitaram um acesso direto a variabilidade genética contida no genoma de diferentes tipos de organismos, isto possibilitou o estudo direto da diversidade genética tanto dentro quanto entre populações de espécies vegetais (Ferreira *et al.*, 1996)

*Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardeaceae) comumente conhecida como Aroeirinha Brava, é uma espécie amplamente distribuída na bacia do rio Tibagi. Por se tratar de uma espécie pioneira, esta é de grande importância para programas que

visam recuperar áreas de matas ciliares degradadas principalmente por atividades agrícolas e agropecuárias.

## **2.0 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Descrição da espécie**

A aroeirinha (*Schinus terebinthifolius* Raddi; Anacardiaceae) é uma espécie arbórea nativa do Paraguai, nordeste da Argentina, e Brasil. Esta pequena lenhosa em geral chega de 5 a 10 m de altura, podendo em algumas regiões alcançar até 16 a 18 m, possuindo um tronco revestido de casca grossa de 30-60 centímetros de diâmetro. As suas folhas são compostas imparipenadas, de 3 a 10 pares de folíolos de 10-15 centímetros de comprimento por 2-3 centímetros de largura. Trata-se de uma planta perenifólia, heliófila e pioneira, comum em beira de rios, córregos e em várzeas úmidas de formação secundária, contudo, cresce também em terrenos secos e pobres. É amplamente dispersada por pássaros, o que explica sua regeneração natural. Sua distribuição é ampla, ocorrendo desde a restinga até as florestas pluviais e semidecíduais de altitude. A sua área de predominância no Brasil vai de Pernambuco ao Mato Grosso do Sul e do Rio Grande a Santa Catarina, mas também ocorrendo por todo o Estado do Paraná (Lorenzi, 2002).

A madeira desta espécie arbórea e utilizada para moirões, esteios, lenha,

carvão e tingimento de redes. *S. terebinthifolius* é muito ornamental, principalmente durante o longo período em que os frutos permanecem na planta. Pelo porte pequeno, é indicada para arborização de ruas sob linhas elétricas (Rizzini, 1971).

Plantas desta espécie podem florir e frutificar no período de 3 anos de sua germinação. Aroeirinha produz frutos geralmente durante os meses de outono e inverno, quando a disponibilidade de alimento para a fauna é restrita, apesar de drupas terem sido observadas em vários indivíduos desta espécie durante todo o ano. É uma das espécies mais procurada pela avifauna, sendo, portanto, útil nos reflorestamentos heterogêneos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente sendo uma das espécies de maior índice de valor de importância (IVI) em todas as suas regiões de distribuição (Lorenzi, 2002).

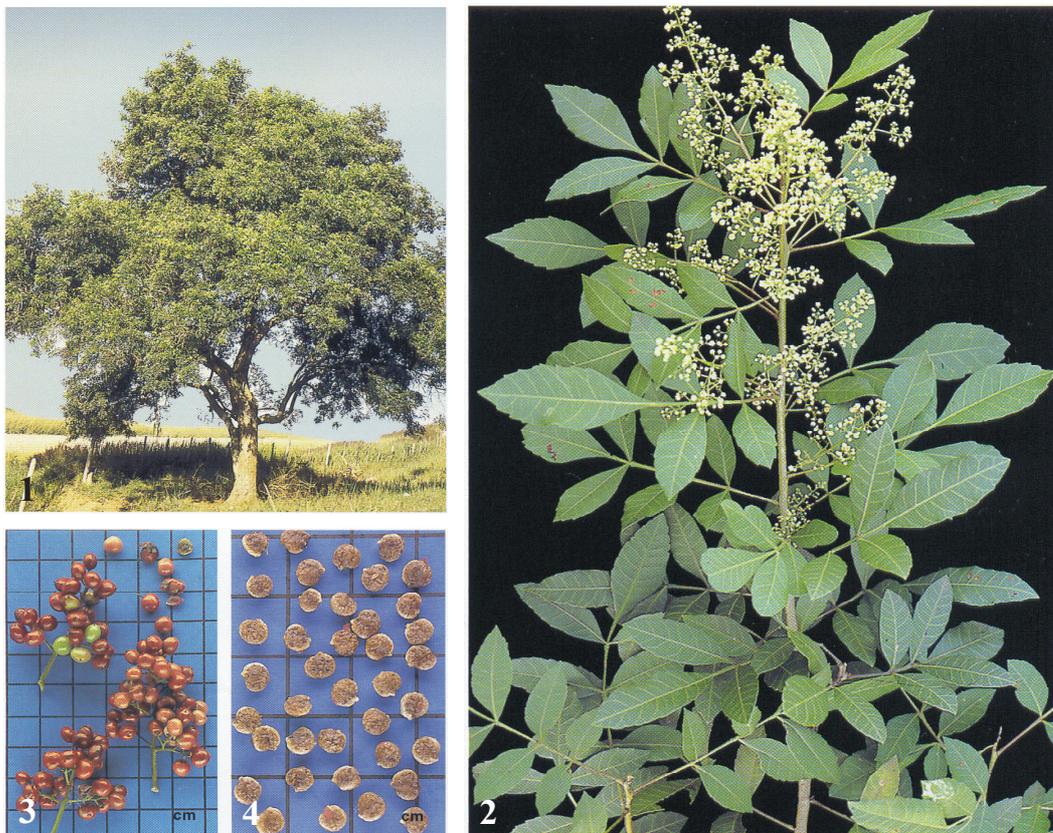


Figura 1. Indivíduo (1), ramo com flores (2), frutos (3) e sementes (4) de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anarcadiaceae) (Lorenzi, 2002).

## 2.2 Matas ciliares

Matas ciliares conhecidas como matas ripárias são definidas pelo Código Florestal, como vegetação que ocorrem as margens de cursos d'água, lagos, lagoas, córregos, reservatórios d'água naturais ou artificiais e nascentes (Machado, 1989). Podem também ocorrer distantes das margens dos rios, mas ainda em superfícies de inundação (Reichardt, 1989). As matas ciliares atuam como barreira física, regulando os processos de troca entre os ambientes terrestre e aquático e desenvolvendo condições propícias à infiltração. A infiltração e drenagem são rápidas no substrato ripário uma vez que o mesmo geralmente consiste de materiais de textura grossa que são depositados pelos rios (Mahoney, 1996 citado em Kranjcec *et al.*, 1998).

Os maiores determinantes para a composição da vegetação em florestas ripárias são as frequências, intensidade e duração das inundações, sendo estas influenciadas pelo regime pluviométrico, tipos de solo, e traçado dos rios (Matovani, 1989). Espécies exclusivas deste ecossistema interagem com as espécies da vegetação adjacente que avançam até a proximidade dos cursos d'água (Kageyama *et al.*, 1989), garantindo a alta diversidade da flora nestes locais.

As matas ciliares apresentam grande importância para uma bacia hidrográfica do ponto de vista hidrológico. Elas atuam como sistemas reguladores do fluxo d'água e de sedimentos entre o ecossistema terrestre e o fluvial, uma vez que

impedem o escoamento de resíduos para o leito dos rios e, conseqüentemente, a perda do solo por erosão e a contaminação da água por resíduos de fertilizantes e agrotóxicos (Salvador, 1987; Rezende, 1998), o que ocasiona o acúmulo de sedimentos no leito dos rios, com conseqüente rebaixamento do nível do lençol freático e diminuição da vida útil das barragens e hidroelétricas. O rebaixamento do lençol freático pode ser considerado como a principal causa de ocorrência de enchentes e inundações (Assis, 1991).

Dados de estudos realizados na Carolina do Norte (EUA) por Naiman e Deschamps (1997) em áreas onde há existência de intensa agricultura e agropecuária indicam que, quando presentes, as florestas ciliares removem de 80 a 90% dos resíduos oriundos de áreas agricultáveis.

A vegetação ciliar pode exercer também um grande controle sobre o microclima dos cursos d'água, uma vez que influencia a temperatura do solo ao redor destes e conseqüentemente a temperatura da água (Naiman & Dechamps, 1997).

Fica claro então que a ausência do complexo florestal ripário gera um desequilíbrio ecológico de grandes dimensões em ecossistemas aquáticos e, afetam o habitat dentro dos rios, interferindo diretamente nos nichos ecológicos dos organismos destes locais. Assim as matas ciliares são imprescindíveis na manutenção da diversidade da fauna (composta por peixes, anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos) destes locais (Croonquist & Brooks, 1993; Keller *et al.*, 1993). As matas ciliares têm portanto, papel estratégico na conservação da biodiversidade da fauna flora destes ecossistemas, e na formação de corredores entre as manchas de florestas primárias que ocorrem ao longo dos rios (Kageyama *et al.*, 1989). Estes corredores naturais propiciam a continuidade do fluxo gênico ao longo de toda extensão do rio, através da dispersão de sementes pela água

e por animais (zoocoria), principalmente pelo processo conhecido como ornitocoria (dispersão de sementes por pássaros) (Naiman & Deschamps, 1997), da dispersão de pólen e da migração de animais e plantas ao longo da margem dos rios.

### **2.3 Alagamento do Solo**

O alagamento representa uma força seletiva muito antiga. Todas as plantas vasculares evoluíram a partir das algas verdes aquáticas, tendo colonizado a terra há mais de 400 milhões de anos. O sucesso sobre a terra, em uma atmosfera com crescente pressão parcial de oxigênio, esteve associado com sistemas de transporte supravascular e sistemas reprodutivos cada vez mais sofisticados, que conferiram uma crescente independência da água (Davy *et al.* 1990). Somente uma pequena porção das espécies traqueófitas regressou, posteriormente, a uma existência totalmente aquática. A partir do período Siluriano, um componente muito maior da flora essencialmente terrestre tem sido encontrado em habitats que são periodicamente ou permanentemente inundados. Representantes de todos os principais grupos retiveram a capacidade de viver em solos hipóxicos com sucesso, talvez, porque tais ambientes representam refúgios às pressões de competição ou herbivoria (Crawford, 1978).

Em solo drenado, a grande parte dos espaços vizinhos as partículas e aos agregados do solo, mantém um íntimo contato com a atmosfera, permitindo assim, uma rápida difusão do oxigênio para todas as raízes (Armstrong, 1979). No entanto, quando o solo se encontra alagado, estes espaços do solo são ocupado pela água alterando uma série de processos físico-químicos e biológicos, o que influencia diretamente a qualidade

do solo para as plantas (Ponnamperuma, 1984). A difusão de gases da atmosfera para o solo e vice-versa é bruscamente reduzida (cerca de 10.000 vezes) durante o período de alagamento, devido a baixa difusão dos gases em meio aquoso (Drew, 1984; Ponnamperuma, 1984; Watkin *et al.*, 1998).

A aeração inadequada no solo leva a uma rápida depressão nos níveis de oxigênio (Kozłowski, 1984), o qual é rapidamente consumido pela respiração aeróbia das raízes das plantas e dos microrganismos da rizosfera (Drew, 1992). Com a falta do oxigênio, processos aeróbios são substituídos por anaeróbios com produção de gás carbônico, etileno (Jackson & Drew, 1984; Ponnamperuma, 1984; Watkin *et al.*, 1998), nitrogênio, hidrogênio, compostos fenólicos, álcoois, ácidos graxos voláteis, metano, acetaldeído e etanol, os quais ficam acumulados no solo, nas raízes da plantas e na base dos caules (Ponnamperuma, 1984; Crawford, 1989).

Sob condições anaeróbias, microrganismos do solo produzem elevadas concentrações de etileno (Smith & Restall, 1971 citado em Kawase, 1978), que é o principal fitohormônio envolvido em respostas ao estresse. A utilização de etileno marcado com  $C^{14}$ , feita por Jackson e Campbell (1975), demonstrou que o etileno produzido externamente a planta é absorvido pelas raízes e transportado caule acima (Kawase, 1978).

O alagamento altera também a composição iônica do solo afetando a disponibilidade de nutrientes para as plantas. A falta de oxigênio no solo leva a mudanças nos níveis de especiação de muitos íons, os quais vão de um estado oxidado para um estado reduzido. O ferro, por exemplo, é reduzido de  $F^{3+}$  para  $F^{2+}$ , o manganês é reduzido de  $Mn^{4+}$  para  $Mn^{2+}$  (Ponnamperuma, 1984; Vartapetian, 1993) e o sulfato é reduzido a

sulfeto (Schiff & Hodson, 1973 citado em Ernst, 1990). Em condições de solo reduzido, a concentração solúvel destes íons aumenta e sua absorção escapa do controle metabólico das raízes, gerando conseqüentemente um excesso destes dentro da planta, o que pode ser levar a fitotoxicidade (Ponnamperuma, 1984).

Por sua vez o nitrogênio se encontra preferencialmente disponível para absorção na sua forma oxidada, o nitrato ( $\text{NO}^{-3}$ ). Um pequeno decréscimo do potencial redox do solo propicia a sua redução, por bactérias, a amônia ( $\text{NH}_4$ ), a qual não pode ser absorvida em quantidades suficientes pela grande maioria das plantas;  $\text{NO}^{-2}$ , que é potencialmente tóxico ou  $\text{N}_2$  que é volátil (Ernst, 1990). Em solos alagados, a oxidação de amônia para nitrato, por bactérias, se torna restrita, não ocorrendo em quantidades suficientes para as plantas como em solos drenados. Uma das conseqüências diretas deste processo é o aparecimento de sintomas de falta de nitrogênio nas plantas. A disponibilidade do enxofre também é afetada ou alterada pelo menor potencial redox do solo. O sulfato que se encontrava disponível no solo é reduzido a sulfeto que entra em grandes quantidades nas plantas, levando-se em conta que a entrada de sulfato na planta é altamente controlada (Schiff; Hodson, 1973 citado em Ernst, 1990).

Além dos efeitos diretos do alagamento sobre a dinâmica do solo, Drew (1991) afirma que um dos principais efeitos fisiológicos do alagamento é a redução na absorção ativa de íons pelas raízes das plantas. As concentrações reduzidas de oxigênio no solo afetam o metabolismo das raízes, impedindo a fosforilação oxidativa, responsável pela regeneração de  $\text{NAD}^+$  e concomitantemente de ATP, desviando o metabolismo para vias de obtenção de energia através da fermentação (Davy *et al.*, 1990; Fox *et al.*, 1994, Bloom & Voesebeck, 1996). Em conseqüência destes e dos outros fatores, a manutenção

das células e a aquisição de nutrientes e água pode ser impedida (Drew, 1988; Atwell & Steer, 1990), levando a uma deficiência nutricional na parte aérea da planta (Drew & Stolzy, 1991).

A redução na absorção dos nutrientes do solo pode ser ainda mais grave com plantas que dependem de associações simbióticas com fungos para sua nutrição. Para estas plantas, a manutenção de níveis normais de absorção de nutrientes está associada à capacidade dos fungos micorrízicos tolerarem baixos níveis de oxigênio; ao enfraquecimento da planta hospedeira, que poderia impossibilitar a associação e a atração dos oósporos por exudatos das raízes como açúcares e aminoácidos, cuja produção pode ser alterada em solos alagados (Cao & Conner, 1999).

Quando o alagamento se estende a uma total ou parcial submersão do caule e folhas, as conseqüências para a vegetação são ainda maiores do que quando o solo é apenas encharcado, pois a submersão restringe a oxigenação e também o suprimento de dióxido de carbono para a fotossíntese. Além disso, com a submersão das folhas, a radiação incidente sobre esta fica reduzida, já que a luz é exponencialmente atenuada com o aumento da profundidade da água. (Crawford, 1992; Armstrong *et al*, 1994).

Pode se considerar ainda que muitas vezes os danos causados à planta não são uma conseqüência somente do processo de alagamento, mas também podem ocorrer durante processo de reaeração dos tecidos vegetais (Crawford & Braendle, 1996), no retorno as condições normais de pressão de O<sub>2</sub>. A reaeração dos tecidos vegetais pode causar a formação de radicais superóxidos livres, os quais são altamente prejudiciais às células, além de provocar a superoxidação de produtos do metabolismo anaeróbio, levando à formação de outras substâncias tóxicas, como é o caso do etanol, que pode ser

eliminado pelas lenticelas ou oxidado a acetaldeído, potencializando sua toxicidade.

Os estudos relacionados ao prejuízo provocado pelo alagamento em espécies cultiváveis têm concentrado especial atenção às reações fisiológicas e anatômicas das raízes ao alagamento (Crawford & Braendle, 1996). Pesquisas recentes feitos com germinação de sementes e órgãos subterrâneos, como raízes em crescimento ativo e rizomas, têm demonstrado que tais órgãos são mais eficientes para o estudo dos efeitos do alagamento sobre as plantas do que qualquer outro órgão, uma vez que suas atividades absorptivas demandam muito oxigênio e estão sob contato direto com o déficit deste elemento (Armstrong *et al.*, 1994; Crawford & Braendle, 1996; Vartapetian & Jackson, 1997).

Muitas espécies, entretanto, através de ganhos evolutivos adaptativos, evitam tais prejuízos, restabelecendo as trocas com o ambiente através de uma série de modificações morfoanatômicas e fisiológicas induzidas por alterações hormonais estimuladas pelo déficit de O<sub>2</sub> nos tecidos vegetais (Reid & Bradford, 1984; Blom, 1999).

Embora a deficiência de oxigênio na rizosfera seja eventualmente fatal para todas as espécies, independente do grau de tolerância, há diferenças evidentes na capacidade de tolerância das plantas a hipoxia (Froend; Van Der Moezel; 1994). O grau de tolerância das plantas a solos encharcados varia não só entre espécies, mas também entre genótipos dentro da mesma espécie (Gill, 1970), o que sugere que características geneticamente determinadas estejam ligadas à tolerância ao alagamento (Drew, 1988).

### **2.3.1 Mecanismos de tolerância ao alagamento**

A classificação das espécies vegetais como tolerantes ou não tolerantes ao

alagamento do solo é bastante ampla e pode, muitas vezes, estar incompleta se não forem consideradas as suas variações ao longo do ciclo de vida da planta (Scarano & Crawford, 1992) e a duração do estresse (Crawford & Braendle, 1996).

Existem basicamente 3 interpretações sobre as estratégias de tolerância ao alagamento do solo. A primeira considera que as plantas, ativariam rotas anaeróbias alternativas nas raízes, com produção de ATP (Crawford, 1978). A segunda, é que as plantas não necessitariam de rotas metabólicas alternativas porque apresentariam adaptações morfoanatômicas que possibilitam a difusão do oxigênio da parte aérea para as raízes, mantendo a respiração aeróbia (Armstrong, 1979). E, a terceira, ressalta que a sobrevivência das plantas ao alagamento pode não resultar de mecanismos morfológicos ou metabólicos, mas sim das características do ciclo de vida destas (Hook & Scholtens, 1978). Apesar de igualmente importantes, tais características da história de vida das plantas (dormência, fenologia, germinação, crescimento e reprodução), são menos freqüentemente reconhecidas como sendo potencialmente adaptativas em ambientes periodicamente alagados (Davy *et al.*, 1990). No entanto Joly (1994) estudando espécies tropicais sugere que nestas ocorre tanto adaptações metabólicas como anatômicas, como uma interação entre elas, como estratégias de tolerância.

De acordo com Blom *et al.* (1994), as seguintes respostas adaptativas são conhecidas e têm sido apontadas como variações nas estratégias de tolerância ou evitação aos efeitos da falta de oxigênio (Menges & Waller, 1983, Van der Sman *et al.* 1991) tais como formação de aerênquima, raízes adventícias ou diageotrópicas, formação de lenticelas hipertrofiadas e alterações fisiológicas e nos processos metabólicos resultando em adaptações morfológicas, as quais levam a espécie a evitar a hipoxia causada pela

submersão ou pelo alagamento do solo (Justin & Armstrong, 1991; Laan & Bloom, 1991; Voeselek *et al.*, 1990, 1992, 1993).

Em um estudo com plântulas de milho (*Zea mays*), Sachs *et al.* (1980), verificou que o tratamento anaeróbico de raízes primárias causou a síntese seletiva de pelo menos 20 proteínas, que em sua maioria, eram enzimas envolvidas nos processo de glicólise ou metabolismo de açúcares, fosfato e inibição da expressão da maioria das proteínas solúveis envolvidas no metabolismo aeróbico.

A redução da atividade da Rubisco é um dos primeiros sinais que contribuem para a redução do potencial fotossintético das folhas em plantas submetidas ao alagamento (Vu & Yelenosky, 1992). Em trabalhos recentes Yordanova & Popova (2001), demonstraram que o alagamento do solo levou a um considerável decréscimo nas taxas de assimilação de CO<sub>2</sub>, transpiração, e condutância estomática.

### **2.3.2 Formação de aerênquima.**

Mesmo com o estresse imposto pelo alagamento, algumas espécies são capazes de crescer vigorosamente, mediante o desenvolvimento de tecidos frouxos facilitadores da aeração dos caules e raízes. A formação de aerênquima segundo Armstrong (1994), consta da produção de inúmeros espaços intercelulares, os quais aumentam a porosidade das raízes e assim reduzem a resistência ao movimento dos gases desde o caule até o ápice das raízes. A maneira mais comum e efetiva das raízes tolerarem a falta de oxigênio no solo é pelo transporte deste gás a partir do caule e, na maioria das plantas, um contínuo de espaços intercelulares preenchidos por gás pode ser

encontrado, principalmente nos tecidos corticais, se estendendo desde os estômatos até as raízes (Armstrong, 1979; Serôdio & Novais, 1991; Schlüter *et al.*, 1993; Drew *et al.*, 1994).

Em condições de estresse as plantas desenvolvem um extenso sistema cortical aerenquimatoso nas folhas, caules e raízes (Serodio & Novais, 1991; Schlüter *et al.*, 1993; Drew *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1995; Visser *et al.*, 1997), o qual pode ser formado por esquizogenia, decorrente do afastamento das células (Justin & Armstrong 1987; Medri *et al.*, 1998), ou por lisogenia, decorrente da morte ou dissolução das células parenquimáticas pela ação de celulases (Drew *et al.*, 1979; Konings, 1982; Feldman, 1984; Wiedenroth, 1993). Em alguns casos, a esquizogenia pode ser resultante de alterações nas dimensões ou no formato das células, que passam de hexagonais a cúbicas (Justin; Armstrong, 1987; Medri *et al.*, 1998). De acordo com Roberts *et al.* (1984), a lise de células corticais pode ser devida à acidose citoplasmática decorrente da perda do tonoplasto e subsequente saída de prótons do vacúolo.

Em plantas tolerantes ao alagamento o aerênquima lisígeno desenvolve-se secundariamente em tecidos corticais diferenciados, diferindo do aerênquima esquizógeno, que é formado concomitantemente ao desenvolvimento da raiz e se estende quase até o seu ápice (Konings, 1982). Nas espécies onde ocorre esquizogenia, as células corticais continuam a ser um local de demanda pelo oxigênio e plantas que formam aerênquima esquizógeno, o que inclui muitas espécies tolerantes, têm freqüentemente enraizamento não tão profundo como as que o formam por lisogenia (Justin & Armstrong, 1987). Assim, o desenvolvimento de aerênquima por lisogenia pode ser considerado como uma forma de economia de energia necessária para o desenvolvimento

do sistema de raízes profundo, por exemplo (Ernst, 1990).

A aeração através do aerênquima não é somente um mecanismo eficiente em possibilitar o transporte de oxigênio para as raízes em processo de desenvolvimento durante o alagamento, mas também como um mecanismo que fornece um imediato e eficiente meio de diluição de compostos voláteis produzidos em meio hipóxico (Armstrong *et al.*, 1994). Deste modo, o etileno produzido e absorvido em grandes quantidades pela planta é mantido em uma concentração abaixo da que inibiria o crescimento da raiz (Kawase, 1981; Visser *et al.*, 1997).

Segundo Crawford (1992), uma alteração pode ser vantajosa num aspecto e prejudicial no outro, e, no caso do aerênquima, é necessário considerar que sua presença também tem suas desvantagens. Uma delas é a redução da capacidade de transporte ascendente de nutrientes, pela presença de grandes espaços de ar no lugar em que haveriam células em plena atividade (Koncalona, 1990 citado em Crawford, 1992). Isto pode resultar em oxigênio suficiente para respiração aérea, mas protoplasto insuficiente para suprir toda a demanda de nutrientes da planta. Na maioria das plantas que mostram aeração interna, nem todo o oxigênio proveniente do caule chega ao ápice das raízes, onde processos de absorção ativa e crescimento requerem um suprimento constante de energia respiratória. Um pouco deste oxigênio é consumido durante o trajeto e grande parte dele pode ser perdida através de um processo denominado ROL (perda radial de oxigênio), sendo esta resultante do gradiente de concentração existente entre o solo alagado e as raízes.

A ROL que por um lado leva a oxidação de uma maior amplitude da rizosfera, por outro lado, reduz significativamente a atividade nos ápices radiciais,

prejudicando a penetração máxima das raízes no solo alagado (Armstrong, 1979; Moog 1998).

Em algumas espécies o aerênquima é produzido em resposta ao alagamento, mas em outras ele é uma característica constante, podendo, porém, ser mais extenso durante o alagamento (Justin & Armstrong, 1987). A presença de maior quantidade deste tecido em caules e raízes alagadas do que em plantas cultivadas em solos drenados foi constatada por vários autores (Medri & Correa, 1985; Lobo, 1990; Colombo, 1996; Medri *et al.*, 1998).

Em algumas espécies, quando submetidas a condições anaeróbias, o desenvolvimento de aerênquima parece estar intimamente relacionado ao acúmulo de altas taxas de etileno (Drew *et al.*, 1979; Drew *et al.*, 1981; Topa & McLeod, 1986; Brailsford *et al.*, 1993; Grimold *et al.*, 1998). No entanto, Yamamoto e Kozlowski (1987) consideram que as auxinas também podem estar diretamente associadas à formação destes espaços.

### **2.3.3 Respostas das raízes ao alagamento**

As raízes, quando submetidas ao estresse por alagamento, apresentam maior suscetibilidade do que caules e folhas, tendo sua vida útil reduzida devido às baixas pressões de oxigênio. A raiz da planta possui um intenso metabolismo demandando grandes quantidades deste gás para processos absorptivos (Armstrong *et al.*, 1994; Crawford; Braendle, 1996; Vartapetian; Jackson, 1997). As raízes laterais com desenvolvimento primário completo na maioria das espécies de plantas terrestres não

desenvolveram características efetivamente adaptativas quando sujeitas ao alagamento (Laan *et al.*, 1991; Visser *et al.*, 1997), por serem diferenciadas e terem seu metabolismo energético grandemente prejudicado pelas condições hipóxicas. Na maioria das vezes, a sobrevivência da planta não depende de um sistema de raízes tolerante em si, mas da capacidade para substituir aquelas raízes danificadas pela anoxia (Colin-Belgrand, 1991; Crawford, 1992). Apresentando-se mais porosas do que as raízes produzidas pelas plantas sob condições de solo drenado, raízes sob o efeito de alagamento podem também surgir a partir do caule (raízes adventícias) ou a partir da porção mais proximal da raiz primária (raízes laterais superficiais ou diageotrópicas) (Voeselek *et al.*, 1999). As raízes produzidas durante condições de hipoxia são mais ramificadas contem mais aerênquima que as raízes laterais primárias, sendo assim mais efetivas no transporte de oxigênio e na absorção de água e íons, o que torna supostamente menos susceptíveis à condição anaeróbia do solo (Armstrong, 1978; Visser *et al.*, 1997). De acordo com Tsukahara & Kozłowski (1985), a formação de novas raízes superficiais em plantas sob condições hipóxicas, é fisiologicamente importante, pois amplia a síntese de hormônios de crescimento, especialmente das giberelinas e citocininas, as quais podem ter sua síntese diminuída com o alagamento das raízes.

Segundo Reid & Bradford (1984), o motivo pelo qual ocorre o surgimento de raízes superficiais ainda não é conhecido, podendo ser devido ao fato de raízes que penetram profundamente no solo simplesmente morram, ou pode ser que raízes sob alagamento percam sua orientação, tendo nesses casos orientação horizontal, e neste caso, certamente com envolvimento de hormônios (Armstrong *et al.*, 1994).

A capacidade da planta de desenvolver raízes superficiais e adventícias parece estar diretamente ligada a sua capacidade de tolerar o processo de alagamento. Estudos feitos com *Eucalyptus* (Clemens *et al.*, 1978; Sena-Gomes & Kozlowski, 1980) e *Betula* (Norby & Kozlowski, 1983) demonstram que as espécies que possuíam a maior capacidade de desenvolver raízes adventícias eram também as mais tolerantes ao alagamento (Yoshikawa & Hokusima, 1997).

O desenvolvimento de novas raízes é um importante mecanismo para amenizar os efeitos causados pelo estresse de oxigênio em plantas terrestres, permitindo a sobrevivência a longos períodos de alagamento (Vartapetian & Jackson, 1997). O desenvolvimento de raízes adventícias tem sido associado a um certo grau de tolerância ao alagamento, por exemplo, para as espécies *Spathodea campanulata* (Medri & Correa, 1985), *Rumex palustris* (Blom *et al.*, 1994), *Malus toringo* (Yoshikawa & Hokusima, 1997), *Triticum vulgare* (Huang *et al.*, 1997), *Sebastiania comersoniana* (Kolb *et al.*, 1998), *Brassica napus* (Voesenek *et al.*, 1999), *Quercus robur* (Schmull & Thomas, 2000). Para a última espécie foi também encontrado o desenvolvimento de novas raízes superficiais associado ao desenvolvimento de raízes adventícias.

#### **2.3.4 Respostas hormonais ao alagamento**

O alagamento do solo causa alterações no balanço hormonal das plantas, o que pode desencadear muitas respostas adaptativas devido ao estresse imposto pela hipoxia do solo (Crawford & Braendle, 1996; Blom, 1999). A baixa taxa de oxigênio no solo faz com que todo etileno produzido nas raízes seja acumulado. Este hormônio

gasoso é biossintetizado em pequenas quantidades, mas a concentração endógena deste nas raízes pode aumentar em até 500 vezes em solos alagados (Konings & Jackson, 1979; Visser *et al.*, 1997). De acordo com Konings (1982), em seu experimento com raízes de milho (*Zea mays* L.), o aumento dos níveis de etileno endógeno devido a hipoxia pode levar à lise das células corticais, resultando na formação de aerênquima lisígeno. O desenvolvimento de raízes adventícias e diageotrópicas tem sido amplamente atribuído a ação conjunta dos hormônios etileno e auxina (Yamamoto; Kozlowski, 1987; Visser *et al.*, 1997). A ação do etileno tem sido relacionada com outros hormônios como a auxinas, giberelinas, e ABA como responsáveis pelo desencadeamento de diferentes processos anatômicos e fisiológicos nas plantas, como, epinastia das folhas, hipertrofia de lenticelas, fechamento estomático, alongamento do caule e a senescência e abscisão foliar (Walters; Osborne, 1979; Blom *et al.*, 1990, 1994; Rinne *et al.*, 1992; Crawford; Braendle, 1996).

Para um maior entendimento da função dos fitorreguladores nas respostas das plantas ao alagamento, é necessário observar as ações separadas e combinadas deles e também o seu mecanismo de ação em nível molecular, pois existem diferenças tanto na regulação destas substâncias, quanto na sensibilidade entre diferentes tecidos, indivíduos, populações e espécies (Blom *et al.*, 1994).

### **2.3.5 Lenticelas Hipertrofiadas**

As lenticelas são estruturas comuns de caules e raízes. Aparecem externamente como massas de células afrouxadas, salientadas através de fissuras na

periderme. As lenticelas são resultado da proliferação do felogênio, que por divisões sucessivas pressiona o tecido externo com conseqüente rompimento da epiderme (Esau, 1990). O tecido da lenticela apresenta numerosos espaços intercelulares que permitem a entrada de ar e comunicação do aerênquima interno com o ambiente externo (Esau, 1990).

As lenticelas hipertrofiadas são estruturas comuns em caules e raízes de plantas submetidas ao alagamento, como relatado por vários autores como Hook & Scholtens (1978), Newsome *et al.*, (1982), Tsukahara & Kozlowski (1985), Medri & Correa (1985), Pimenta *et al.*, (1994), Joly (1994), Yamamoto *et al.*, (1995), Medri *et al.*, (1998), Bianchini *et al.*, (2000), Anderson & Pezeshki (2001). Elas estão envolvidas com o aumento das trocas gasosas entre a atmosfera e os espaços intercelulares, suprindo oxigênio aos tecidos submersos e oxidando a rizosfera (Hook & Scholtens, 1978; Tsukahara & Kozlowski, 1985; Pimenta *et al.*, 1998).

As lenticelas hipertrofiadas podem também estar associadas com a eliminação de metabólitos voláteis potencialmente tóxicos para as plantas, produzidos em maior quantidade durante o processo de alagamento, como etanol, acetaldeído e etileno (Hook & Scholtens, 1978; Tsukahara & Kozlowski, 1985).

Larson *et al.*, (1993) detectaram que a presença de lenticelas hipertrofiadas em *Mangifera indica* foi fundamental para a sobrevivência desta em condições de alagamento, pois quando estas estruturas foram cobertas com uma substância isolante, as plantas morreram.

### 2.3.6 Crescimento e Desenvolvimento

A saturação hídrica do solo afeta o crescimento das plantas de diferentes formas. O efeito do alagamento em geral é a redução da biomassa (Tsukahara & Kozlowski, 1985; Nash & Graves 1993), relacionado com a diminuição do comprimento da planta (Ewing, 1996). A redução de biomassa reflete alterações das taxas fotossintéticas das plantas sob alagamento, as quais, decorrem principalmente do fechamento estomático e/ou de danos irreversíveis no aparelho fotossintético. Este efeito ocorre em condições hipóxicas ou anóxicas e inúmeras vias metabólicas oxigênio-dependentes, especialmente as de geração de energia, são suprimidas (Yardanova *et al.*, 2004). São poucos os estudos que mostram um maior crescimento de plantas arbóreas alagadas, quando comparadas com aquelas mantidas em solos bem drenados (Clemens *et al.*, 1978; Mckelvin *et al.*, 1995; Kolb *et al.*, 1998), ou que a inundação não altera o crescimento das espécies (Joly & Crawford, 1982; Joly, 1994; Lobo & Joly, 1995; Calbo *et al.*, 1998), entretanto, Davanso-Fabro *et al.*, (1999) verificaram maior alocação de biomassa em plantas alagadas de *Sebastiania virgata* comparadas às de solo bem drenado.

O efeito do alagamento sobre o crescimento das plantas foi estudado em 14 espécies nativas da bacia do Tibagi e o seu efeito negativo sobre a massa seca total foi verificado em 13 delas, portanto, 92,9% das espécies estudadas.

Os padrões de crescimento das plantas são também alterados pelo alagamento, sendo o crescimento hipertrofiado da base do caule documentado para muitas espécies de angiospermas arbóreas como uma resposta a processos causados pelo

alagamento. Embora, uma redução no crescimento do caule em diâmetro tenha sido também constatada por Pelacani *et al.*, (1998) em plantas de ameixa.

Em trabalho realizado por Yamamoto *et al.*, (1995) foi verificada uma redução no incremento de massa seca das raízes de *Fraxinus mandshurica*, apesar do aumento de biomassa dos caules e folhas. De acordo com Cao & Conner, (1999) as respostas gerais ao alagamento incluem a redução na iniciação foliar, redução no crescimento foliar, redução no conteúdo de clorofila, queimadura das folhas, necrose e abscisão foliar (Cao & Conner, 1999). Estas respostas ao alagamento têm sido observadas em espécies arbóreas tropicais como *Cedrela fissilis* (Marques *et al.*, 1996), *Jacaranda peberula* (Pimenta *et al.*, 1996), *Sebastiania commersoniana* (Kolb *et al.*, 1998), *Peltophorum dubium* (Medri *et al.*, 1998) e *Chorisia speciosa* (Bianchini *et al.*, 2000).

Kozlowski (1984), estudando *Betula papyrifera*, constatou intensa senescência e abscisão foliar após 60 dias de alagamento, enquanto que nas plantas não alagadas o número de folhas dobrou neste mesmo período. Resultados como este já haviam sido obtidos por Jackson & Osborne (1970), quando plantas não alagadas eram submetidas a aplicações de etileno.

Estudando o processo de total submersão em plantas, Cao & Conner (1999) observaram uma intensa redução de biomassa de folhas, caule e raízes, bem como acentuada redução no crescimento em altura. Algumas espécies capazes de tolerar a submersão retiveram o crescimento em biomassa do caule e raiz durante o período adverso, retomando-o vigorosamente quando cessou o estresse por submersão (Blom *et al.*, 1994; Pelacani *et al.*, 1998).

Quando plantas submetidas a longos períodos de alagamento são novamente reaeradas, o crescimento é retomado apenas naquelas plantas que possuem estratégias para evitar ou minimizar os danos causados pelo processo de reaeração (Tsukahara & Kozlowski, 1985). A recuperação do crescimento durante a reaeração do solo foi encontrada em 66,6% das espécies estudadas na bacia do Tibagi (Pimenta, 1998; Colli, 1998; Kolb *et al.*, 1998; Bianchini, 1998).

Muitas plantas não são tolerantes a total submersão, buscando estratégias de evitação do estresse como aceleração da extensão do caule, e assim, trazendo as folhas para fora da água e em contato com o ar (Blom *et al.*, 1994).

## **2.4 Marcadores moleculares**

Os Marcadores moleculares de DNA têm sido utilizados para acessar polimorfismo genético, para construir mapas genéticos (Williams *et al.*, 1990), assim como para revisar a posição sistemática de vários grupos de plantas e fazer estudos comparativos, permitindo fazer inferências sobre sua origem e evolução. Além disso, os marcadores moleculares podem facilitar o desenvolvimento de estratégias para conservação de recursos genéticos (Rajora & Mosseler, 2001) e a condução de programas de melhoramento.

Uma ampla variedade de técnicas são utilizadas para estudar a variação genética em plantas. Estas incluem os marcadores isoenzimáticos, o polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) (Vos *et al.*, 1995) e métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR demanda menor esforço técnico que o RFLP e

requer menores quantidades de DNA. A PCR fornece, ainda, uma flexibilidade maior na detecção da variabilidade genética, uma vez que uma vasta quantidade de *primers* pode ser utilizada, os quais podem ser sintetizados para revelar tipos particulares de polimorfismo (Rafalski *et al.* 1991), incluindo microssatélites (Litt & Luty, 1989), restrição endonucleásica de produtos de amplificação (AFLP) (Vos *et al.*, 1995) e polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (Williams *et al.*, 1990).

A metodologia do RAPD consiste na amplificação de fragmentos de DNA ao acaso com um único iniciador ou primer (pequena molécula de DNA fita simples) de seqüência arbitrária, que resulta na síntese final de vários fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. A partir deste conjunto de fragmentos é possível determinar polimorfismo na seqüência do DNA, o qual pode ser utilizado como marcador genético, medindo a similaridade entre indivíduos (Williams *et al.*, 1990). A amplificação dos fragmentos de DNA é feita de modo exponencial e, devido à grande quantidade produzida, os fragmentos gerados podem ser visualizados diretamente em géis de eletroforese através de corantes específicos.

Os marcadores moleculares de RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) vêm sendo utilizados na análise da estrutura genética de populações (Sun & Wong, 2001), estudo de diversidade genética entre espécies (Obara-Okeyo & Kako, 1998), análise da biologia reprodutiva e conservação genética em vegetais (Wong & Sun, 1999), produzindo ótimos resultados.

O RAPD é uma técnica que oferece muitas vantagens devido à facilidade de uso, baixo custo, utilização de pouca quantidade de DNA e a geração de grande

quantidade de dados em curto espaço de tempo, possibilitando utilizar uma maior quantidade de amostras (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

Algumas desvantagens do RAPD, segundo relatado por alguns autores, é que pode não haver homologia entre seqüências das bandas com a mesma mobilidade no gel, não sendo possível afirmar se bandas com o mesmo peso molecular correspondem a fragmentos genômicos similares. Da mesma forma, as estimativas de similaridade genética, baseadas em RAPDs, devem ser realizadas a partir de cálculos que não consideram a ausência da banda no gel para dois perfis no gel como uma similaridade (Thormann *et al.*, 1993).

Outra importante limitação dos marcadores de RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco (Ferreira e Grattapaglia, 1996), já que os marcadores RAPD são dominantes, ou seja, não se pode determinar se uma banda no gel de RAPD é produto da amplificação de um ou dois fragmentos de DNA (no caso de estudos de organismo diplóides) e, assim, indivíduos homozigotos dominantes não podem ser diferenciados dos indivíduos heterozigotos (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990; Carlson *et al.*, 1991).

Outro tipo de marcador que vêm sendo amplamente utilizado são os que têm base na amplificação de microssatélites (SSR). Diferentes experimentos no início dos anos 80 demonstraram que os genomas eucarióticos são densamente povoados por diferentes classes de seqüências repetidas (Hamada *et al.*, 1982).

Seqüências simples repetidas (“SSR - Simple Sequence Repeats”), mais tarde também conhecidas como microssatélites, consistem de pequenas seqüências

(“sequence motif”) com um a quatro nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem (Litt & Luty, 1989).

Microsatélites tem sido observados em diversos organismos como em seres humanos (Litt & Luty, 1989), baleias, *Drosophila* (Tautz, 1989), camundongos (Love *et al.*, 1990), bovinos e caprinos (Moore *et al.*, 1991), entre outros. Em plantas, sua existência já havia sido sugerida com a observação de que oligonucleotídeos contendo elementos repetidos de TG e GATA/GACA detectam polimorfismo quando utilizados como sonda RFLP (Weising *et al.*, 1989; Beyermann *et al.*, 1992).

Em plantas, uma busca em bancos de dados de seqüências de DNA publicadas revelou que sítios de microsatélites são largamente distribuídos com uma freqüência de um a cada 50 mil pares de bases (Morgante & Olivieri, 1993).

A amplificação de seqüências simples repetidas (SSR) é feita através da PCR utilizando-se de um par de “primers” específicos (de 20 a 30 bases) complementares à seqüência única que flanqueia o microsatélite. Cada segmento amplificado representa um alelo diferente do mesmo loco (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

Tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo “PIC” (“Polimorphism Information Content”). Os SSR são muito freqüentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais ampla cobertura de qualquer genoma eucarioto. A observação, pelo menos em genomas animais, de que ocorre conservação de sítios de microsatélites entre espécies relacionadas, torna possível em alguns casos, a transferência de marcadores entre espécies e mesmo gêneros usando se

primers heterólogos (Moore *et al.*, 1991; Pepin *et al.*, 1995; Menottiraymond & Obrien, 1995).

Marcadores de microssatélites (SSRs) têm sido amplamente usados em estudos de ligação gênica, genética de populações e história evolutiva dos organismos (Bowcock *et al.*, 1994). Esses locos vem também sendo usados como ferramentas de auxílio para seleção em programas de melhoramento (Powell *et al.*, 1996), caracterização de linhas endogâmicas e estudos de plantas cultivadas (Smith *et al.*, 1997).

Outros trabalhos recentes têm usado este tipo de marcador molecular para um grande número de estudos, envolvendo desde estudos de padrões de mutações (Vigouroux *et al.*, 2002), discriminação de genótipos de cultivares (Russel *et al.*, 1997), até a comparação de populações de plantas invasoras com as populações que lhes deram origem (Saltonstall, 2003).

A maior limitação da tecnologia de microssatélites é a grande quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores, que envolve um processo de construção de bibliotecas de fragmentos genômicos pequenos (300 a 500 pares de bases) para o organismo de interesse, fazendo deste um processo dispendioso do ponto de vista do tempo e recursos financeiros (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

## **2.4 Estrutura genética de populações naturais**

### **2.4.1 Análise da Estrutura Genética com Marcadores Codominantes**

A estrutura genética refere-se à distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e no tempo resultante da ação de forças evolutivas tais

como: mutação, migração, seleção e deriva genética que atuam dentro do contexto de cada espécie e população (Hamrick, 1982).

O número de alelos por loco, a heterozigozidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) têm sido as variáveis gênicas mais utilizadas em vários estudos para quantificar a variabilidade genética em populações de plantas (Pinto, 2001). A estimativa da frequência de um alelo particular em uma população, chamada frequência gênica ou alélica, é considerada fundamental nos estudos evolutivos, pois a mudança genética de uma população pode ser avaliada pela mudança nas suas frequências gênicas (Nei, 1978). A frequência de um determinado alelo em um grupo de indivíduos diplóides é igual a duas vezes o número de indivíduos homozigóticos para o alelo, mais o número de indivíduos heterozigóticos, dividido por duas vezes o número de indivíduo na amostra, em virtude de cada indivíduo carregar dois alelos em um loco. O número de alelos observados por loco aumenta em função do tamanho da amostra. Deste modo, amostras grandes possuem maior chance de detectar alelos raros.

O conhecimento da frequência dos heterozigotos apresenta importância na medida que cada heterozigoto carrega diferentes alelos, os quais demonstram a existência de variação genética na população (Weir, 1996).

De acordo com o princípio de Hardy-Weinberg em uma população de tamanho infinito, praticando cruzamentos ao acaso, as frequências gênicas e genotípicas permanecem constantes de geração para geração na ausência de migração, seleção e deriva. Este princípio permite o cálculo teórico da frequência de um determinado genótipo independente do número de alelos existente. A caracterização da estrutura genética entre populações, através de marcadores codominantes pode ser abordada de três

maneiras diferentes: estatísticas F de Wright (Wright, 1965), análise da diversidade gênica em populações subdivididas (Nei, 1977) e os coeficientes de coancestralidade de Cockerham (Cockerham, 1969; Vencovsky, 1992 e Weir, 1996).

As três abordagens apresentam bases genéticas similares, porém, são complementares em relação ao significado biológico das estimativas obtidas (Reis, 1996).

Desta forma, as estatísticas F permitem a caracterização da distribuição da variabilidade genética entre as populações ( $F_{ST}$ ), assim como dos níveis médios de endogamia ao nível populacional ( $F_{IS}$ ) e total ( $F_{IT}$ ). Os coeficientes de coancestralidade ( $q$ ) possibilitam a avaliação da divergência em diferentes níveis de hierarquia, além de possibilitar a obtenção de estimativas de endogamia, a partir de uma base não viesada. E a análise da divergência gênica em populações subdivididas permite a comparação dos níveis de heterozigosidade entre e dentro das populações, bem como a obtenção de uma estimativa de divergência, a partir de uma base diferente daquela que fundamenta as estimativas de  $F_{ST}$  e  $q$ . As estatísticas F podem ser apresentadas de várias maneiras, conforme Wright (1951, 1965), Cockerham (1969) ou sob a ótica da diversidade de acordo com Nei (1978).

De acordo com Wright (1965):

$$1 - \hat{F}_{IT} = (1 - \hat{F}_{IS})(1 - \hat{F}_{ST})$$

$\hat{F}_{IT}$  = índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto das populações (devido ao sistema reprodutivo e subdivisão)

$\hat{F}_{IS}$  = índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional (devido ao sistema reprodutivo)

$\hat{F}_{ST}$  = índice de fixação ou coeficiente de endogamia entre populações (devido à subdivisão)

Sob modelo aleatório, pode-se considerar que as populações amostradas representam a espécie tendo história evolutiva comum. Mesmo que as populações tenham se diferenciado com o decorrer do tempo, a análise é construída sob a hipótese de que há uma única população de referência. Na ausência de forças evolutivas que alterem as frequências gênicas, como diferentes pressões de seleção em diferentes populações, espera-se que todas as populações tenham as mesmas frequências alélicas. A análise da diferenciação em modelos aleatórios é subordinada ao fato de que amostragem genética faz com que diferentes alelos na população sejam dependentes ou relacionados. Mesmo que indivíduos ou alelos possam ser amostrados aleatoriamente, quando se obtêm as esperanças, deve-se saber que são dependentes de um ancestral comum. Zucci (2002).

O interesse deve ser voltado ao quanto as populações se diferenciam dentro de uma espécie, a qual se diferenciou no decorrer do tempo. A ação das forças evolutivas ou da amostragem genética, resultarão na diferenciação intraespecífica, quantificada com as estatísticas  $F$  de Wright ou medidas análogas de Cockerham. Estas medidas também quantificam o grau de parentesco entre pares de alelos. As três quantidades básicas, na situação onde indivíduos diplóides são amostrados em várias populações, de acordo com Cockerham (1969). Considerando os níveis de hierarquia ( $s$  = populações,  $n$  = indivíduos e  $g$  = 2 em organismos diplóides), pode-se verificar no esquema de análise de variância na Tabela 1:

Tabela 1. Esquema de Análise de Variância (ANAVA).

FONTE DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	E(QM)
Entre populações	s-1	SQ <sub>P</sub>	QM <sub>P</sub>	$\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2 + 2n\sigma_P^2$
Entre indivíduos dentro de populações	n(s-1)	SQ <sub>I</sub>	QM <sub>I</sub>	$\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2$
Genes dentro de indivíduos	ns(2-1)	SQ <sub>G</sub>	QM <sub>G</sub>	$\sigma_G^2$
TOTAL	2ns-1			

$$\sigma_T^2 = \sigma_G^2 + \sigma_I^2 + \sigma_P^2$$

Os componentes de variância podem ser definidos como:

$$\sigma_P^2 = p(1-p)\theta \quad \text{para populações}$$

$$\sigma_I^2 = p(1-p)(F - \theta) \quad \text{para indivíduos dentro de populações}$$

$$\sigma_G^2 = p(1-p)(1-F) \quad \text{para alelos dentro de indivíduos}$$

Seguindo a analogia, podemos reescrever as equações acima para os parâmetros das Estatísticas F.

$F_{II}$  de Wright = F de Cockerham: é a correlação entre alelos dentro de

$$F_{ST} = \frac{\sigma_P^2}{\sigma_T^2}$$

$$F_{II} = \frac{\sigma_I^2 + \sigma_P^2}{\sigma_T^2}$$

$$F_{IS} = \frac{\sigma_I^2}{\sigma_I^2 + \sigma_G^2}$$

indivíduos em todas as populações. É o coeficiente de endogamia que se refere aos indivíduos em relação ao conjunto de populações, reunindo a informação dos índices de fixação  $F_{ST}$  e  $F_{IS}$ .

$F_{ST}$  de Wright =  $\theta$  de Cockerham: é a correlação dos alelos dentro de indivíduos na mesma população. É o coeficiente de coancestralidade.

$F_{IS}$  de Wright = f de Cockerham: correlação dos alelos dentro de indivíduos dentro das populações.

De acordo com Nei (1977):

$$\hat{F}_{IT} = 1 - \frac{\hat{H}_{ot}}{\hat{H}_{et}}; \quad \hat{F}_{IS} = 1 - \frac{\hat{H}_{ot}}{\hat{H}_{ei}} \quad \hat{F}_{ST} = 1 - \frac{\hat{H}_{ei}}{\hat{H}_{et}}$$

onde:

$$\hat{H}_{ot} = \frac{\sum \sum \hat{x}_{il}}{l_s} \quad \hat{H}_{ei} = 1 - \frac{\sum \sum \hat{x}_{ilk}^2}{l_s} \quad \hat{H}_{et} = 1 - \frac{\sum \left( \frac{\sum \hat{x}_{ilk}}{s} \right)^2}{l}$$

sendo:

$\hat{H}_{et}$  = heterozigosidade esperada total

$\hat{H}_{ot}$  = heterozigosidade observada total

$\hat{H}_{ei}$  = heterozigosidade esperada média total

$\hat{x}_{il}$  = frequência de heterozigotos do loco l na população i

$\hat{x}_{ilk}$  = frequência do alelo k do loco l na população i

s = número de populações

l = número de locos

#### 2.4.2 Análise da Estrutura Genética com Marcadores Dominantes

Para analisar marcadores dominantes, Excoffier *et al.* (1992) pela introdução da estatística  $\theta$  proporcionaram uma nova alternativa para esse tipo de marcadores, que foi utilizada pela primeira vez por Huff & Smouse (1993). Informações sobre a divergência de DNA de dados provenientes de haplótipos foram incorporadas na forma de análise de variância, derivada da matriz de distâncias quadradas entre todos os

pares de haplótipos. Esta análise de variância, denominada AMOVA, produz estimativas dos componentes de variância análogas à estatísticas  $F$ , que os autores chamaram de estatísticas  $\phi$ , que refletem a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. O método acomoda diversos tipos de matrizes de entrada fornecidas por diversos tipos de marcadores moleculares, e diferentes tipos de pressuposições evolutivas, sem modificar a estrutura básica da análise. A significância dos componentes de variância e das estatísticas  $\theta$ , é testada através do uso de permutações. Os autores, ao aplicarem esta análise a dados de haplótipos de DNA mitocondrial humano, verificaram que as subdivisões de populações são melhor resolvidas se alguma medida de diferenças moleculares entre haplótipos for introduzida na análise. Segundo os autores, a AMOVA é facilmente aplicável em diferentes situações e constitui uma estrutura coerente e flexível para análise dos dados moleculares.

A base da análise apresentada por Excoffier *et al.* (1992) é que as somas de quadrados convencionais (SQ) podem ser escritas na forma de somas de quadrados de diferenças entre pares de observações. Desta forma, eles construíram uma análise de variância molecular hierárquica, partindo diretamente da matriz das distâncias quadradas de todos os pares de haplótipos. Os autores estudaram dez populações humanas, para as quais amplos conjuntos de dados são disponíveis na literatura. Estas populações representam cinco grupos regionais, com duas populações cada.

O polimorfismo do material amostrado foi analisado através de cinco enzimas de restrição. A análise de variância hierárquica de mtDNA de humanos mostrou significativa subdivisão entre populações, mas com grande variação dentro de populações (acima de 74%). Os resultados sugeriram que estudos dentro de cada região são

necessários para determinar se o fato de a diversidade observada entre regiões ser maior que a observada entre populações dentro de regiões é um artefato da escolha arbitrária das populações, uma consequência do isolamento pela distância, ou zonas de fronteira limite de trocas genéticas entre regiões (Excoffier *et al.*, 1992).

Huff *et al.* (1993) utilizaram a AMOVA pela primeira vez em plantas estudando a variação genética entre e dentro de populações naturais de *Buchloe dactyloides*, baseando-se em dados provenientes de quatro populações provenientes do México e duas do Texas (EUA). Buso *et al.* (1998) estudaram a variabilidade genética de populações de arroz da América do Sul utilizando marcadores isoenzimáticos e RAPD.

Exemplificando, podemos considerar os níveis de hierarquia (P= número total de populações, N=número total de dados genotípicos ou número total de genes para dado haplótipo), pode-se verificar na Tabela 2:

Tabela 2. Esquema de Análise de Variância Molecular (AMOVA).

FONTE DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	E(QM)
Entre populações	P- 1	SQ <sub>a</sub>	QM <sub>a</sub>	$\sigma_b^2 + 2\sigma_a^2$
Dentro de populações	N-P	SQ <sub>b</sub>	QM <sub>b</sub>	$\sigma_b^2$
TOTAL	N- 1			
$\sigma^2 = \sigma_b^2 + \sigma_a^2$				

Os componentes de variâncias de cada nível de hierarquia são extraídos das esperanças dos quadrados médios. Segundo Cockerham (1969), temos:

$$\phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma^2}$$

Onde  $\phi_{ST}$  = a proporção da variabilidade molecular de haplótipos entre populações.

#### 2.4.4 Fluxo Gênico em Plantas

A perda da variabilidade genética é o tópico central da conservação genética (Avice, 1994). Áreas fragmentadas onde existem pequenas populações principalmente de plantas alógamas estão propensas à endogamia e deriva genética resultante da subdivisão. A endogamia pode atuar desmascarando determinados alelos deletérios recessivos, diminuindo num curto espaço de tempo o valor adaptativo da população, nas quais ocorre redução da heterozigosidade e pode resultar em perda da diversidade alélica. Biologistas e conservacionistas acrescentam que este declínio na variação genética pode inibir no futuro a adaptação do organismo às mudanças ambientais e conseqüentemente limitar seu potencial evolucionário, podendo levar essas populações a um possível risco de extinção.

A terminologia aplicada para o fluxo gênico em modelos populacionais é potencialmente confusa por causa dos muitos significados dos termos migração e dispersão, que não correspondem aos seus significados quando aplicados ao fluxo gênico. Em geral, migração pode ser definida como qualquer movimento, incluindo movimentos cíclicos que podem regularmente retornar o organismo ao seu local de origem. Em contraste, o termo dispersão é mais precisamente, restrito para movimentos que aumentam a distância entre os organismos, gametas ou propágulos da fonte dispersora

(Neigel, 1997).

Neste contexto, fluxo gênico é definido como o movimento de genes em populações e, portanto inclui todos os movimentos de gametas, propágulos e indivíduos que efetivamente trocam genes na distribuição espacial (Neigel, 1997). Conforme Slatkin (1981, 1985) fluxo gênico (ou fluxo alélico) é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população para outra. Ainda, Levin & Kerster (1974) definem fluxo gênico potencial como a deposição do pólen e sementes a partir de uma população fonte em função da distância. O fluxo gênico efetivo, refere-se à incidência de fertilização (no caso de pólen) e ao estabelecimento de indivíduos reprodutivos (no caso de sementes), em função da distância da população fonte e fluxo gênico no tempo. É devido à ocorrência de dormência nas sementes de algumas espécies, gerando uma sobreposição de gerações sucessivas, podendo funcionar como mecanismo de fluxo gênico no tempo.

O fluxo gênico tem sido amplamente discutido em relação à sua magnitude e influência na estrutura genética das populações. A importância do fluxo gênico principalmente em populações naturais está na homogeneização das frequências alélicas entre as populações pequenas, deste modo, mesmo que separadas geograficamente elas comportam-se como uma grande população panmítica. Com frequências alélicas que antes do fluxo eram diferentes, depois do fluxo elas se tornam homogêneas entre si. A sua maior importância está na manutenção da diversidade genética e do polimorfismo. Em plantas, a transferência de genes pode ocorrer tanto pelo movimento de organismos individuais (sementes, rizomas, estolões), como, pelo movimento de gametas (pólen). Segundo Futuyma (1993), o grau no qual uma população

pode ser delimitada de outras depende do nível de fluxo gênico entre elas. A taxa de fluxo  $m_{ij}$  da população  $j$  para a população  $i$  é a proporção de indivíduos que se reproduzem na população  $i$  que migram para a população  $j$  naquela geração. Se  $m_{ij}$  é muito alta, próxima de 0,5, as duas populações são, na realidade, uma população panmítica cujo tamanho populacional é a soma das duas. Desta forma, a taxa de fluxo gênico influencia o tamanho efetivo da população.

A importância do fluxo gênico está justamente em contrapor os efeitos da deriva genética, permitindo a homogeneização das frequências alélicas. O fluxo pode ser quantificado através de medidas diretas e indiretas. Os métodos diretos são via: corantes, marcadores morfológicos e análise da paternidade. Os métodos indiretos são via:  $F_{ST}$ , alelos privados, autocorrelação espacial e coalescência. Recentemente, abordagens mais precisas têm sido utilizadas neste sentido como: marcadores organelares (cpDNA e mtDNA), análise da paternidade utilizando microssatélites, aliados a estudos ecológicos.

### **3.0 Justificativas e Objetivos**

#### **3.1 Justificativas**

Devido à intensa degradação das matas ciliares do Estado do Paraná, provocada principalmente pelo estabelecimento de campos de cultivo que se estendem até às margens dos rios e pelo represamento dos cursos d'água com a construção de barragens para a instalação de usinas hidroelétricas, se fazem necessários a elaboração e execução de projetos de recuperação e manejo das áreas inundáveis. Tais projetos só

serão adequados e eficientes se embasados em informações científicas obtidas a partir de estudos sistematizados das características do ambiente e das espécies vegetais que poderão colonizar áreas a serem recuperadas.

A ausência de estudos científicos envolvendo espécies vegetais tropicais, especialmente arbóreas, com respeito a variabilidade genética entre e dentro de populações, e variações morfológicas, histológicas e fisiológicas provocadas pelo alagamento, leva à necessidade da elaboração de um quadro de informações científicas, a partir de estudos com o maior número de espécies possível e que possa orientar a seleção de espécies e populações a serem utilizadas em projetos de reflorestamento das áreas ribeirinhas.

## **3.2 Objetivos**

### **3.2.1 Objetivos Gerais**

- Compreender os níveis de tolerância de *Schinus terebinthifolius* a solos hidromórficos, a recuperação de áreas ciliares degradadas;
- Verificar os padrões de mudanças morfoanatômicas que o alagamento provoca em *Schinus terebinthifolius*;
- Analisar a variabilidade e estrutura genética de diferentes populações de *Schinus terebinthifolius*.

### 3.2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a plasticidade morfoanatômica da espécie em estudo, como capacidade de formação de lenticelas ou rachaduras corticais, formação de aerênquima, raízes adventícias e superficiais.
- Caracterizar a variabilidade genética e estrutural de diferentes populações de *S. therebinthifolius* sujeitas ao alagamento utilizando marcadores moleculares de RAPD e microssatélites (SSR).

**Artigo a ser publicado na Revista Brasileira de Botânica**

“Estudos de Anatomia Ecológica e Diversidade Genética de duas Populações da Espécie Arbóreas *Schinus terebinthifolius* da Bacia do Rio Tibagi”.

Ruas, E. A.<sup>1</sup>; Medri, P. S.<sup>2</sup>; Medri, C.<sup>3</sup>; Ruas, P.M; Ruas<sup>1</sup>, C.F<sup>1</sup>; Sahyum, S.A.<sup>4</sup>; Medri, M. E<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Animal e Vegetal.

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Maringá.

<sup>4</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina.

[Edu\\_wicca@hotmail.com](mailto:Edu_wicca@hotmail.com)

### ***Abstract***

In this study we investigate the aspects of flooding tolerance and the distribution of genetic variation in two riparian population of *Schinus terebinthifolius* distributed along two different regions along the Tibagi river. The flooding tolerance was evaluated through the investigation of plants submitted to different flooding intensities, and what were its morphological, anatomical and physiological responses to flooding. Two experiments were made, one using seedlings regenerated from plants collected in both regions and the other using leaves as source of DNA to collect genetic information of these two populations. The first experiment was set in a greenhouse and consisted of ten plants for each treatment from each population. The growth rate of *Schinus terebinthifolius* was not affected by flooding, but total submergion proved to be lethal for 100% of the plants studied. The study of distribution of genetic variation between

these two populations showed a medium variation between them (13.7%) and most of the genetic diversity was found to be within population. These results show that for conservation purposes, both populations should be well represented and that they may also be used in conservation programs for riparian forests.

Key words: *Schinus terebinthifolius*, Morphology, RAPD.

## **Introdução**

As plantas se adaptam a ambientes em constante mudanças, levando a uma riqueza de formas e complexidades variadas. Certos habitats exigem adaptações espaciais, especialmente quando um ou mais recursos essenciais são raros ou ausentes como um todo. As condições que prevalecem em terrenos alagados são um exemplo de tais ambientes extremos já que solos saturados de água excluem o oxigênio, uma das necessidades fundamentais para a vida das plantas (Visser *et al.* 2003).

O estudo da tolerância de espécies de mata ciliar ao alagamento, tem revelado alterações nas características do ciclo de vida, nos caracteres morfológicos e em aspectos funcionais (Crawford, 1978; Armstrong, 1979; Voeselek & Van der Veen, 1994). Segundo Joly (1994), as alterações morfoanatômicas e funcionais são freqüentemente verificadas em espécies arbóreas tropicais. Estas alterações são principalmente representadas pela formação de aerênquima (Colmer, 2003; Purnobasuki & Suzuki, 2004; Joly, 1996), hipertrofia de lenticelas (Lopez & Kursar, 1999; Mielke *et al.*, 2005), desenvolvimento de raízes adventícias e diageotrópicas (Schmull & Thomas, 2000; Chen *et al.*, 2002) e alterações no desenvolvimento (Blom, 1999). O entendimento destas alterações e de sua contribuição à adaptação é importante em projetos que visam a recuperação de matas ciliares degradadas. Entretanto, o sucesso destes projetos depende da associação da conservação dos recursos genéticos ao trabalho de recomposição (Kageyama, 1994). Para isso, é necessária a caracterização da variação genética da espécie estudada com relação ao seu ambiente.

O surgimento das técnicas de biologia molecular envolvendo a PCR (Reação em Cadeia das Polimerases), possibilitaram um acesso direto a variabilidade genética contida no genoma de diferentes tipos de organismos, o que possibilitou o estudo direto da diversidade genética tanto dentro quanto entre populações de espécies vegetais. Dentre as técnicas mais utilizadas, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) destaca-se pela facilidade de uso, baixo custo e possibilidade de emprego em qualquer espécie vegetal, sem a necessidade do conhecimento prévio de seu genoma (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Adequações nos experimentos, bem como nas análises estatísticas dos dados obtidos, garantem a eficiência de seu uso para estudos genéticos de populações naturais.

*Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardeaceae) comumente conhecida como Aroerinha Brava é uma espécie amplamente distribuída na bacia do rio Tibagi. Por se tratar de uma espécie pioneira e com altos índices de valor de importância (IVI) por toda sua área de distribuição, é de grande importância para programas que visam recuperar áreas de matas ciliares degradadas principalmente por atividades agrícolas e agropecuárias.

Assim, neste trabalho pudemos verificar a capacidade de tolerância a solos hidromórficos e inferir a variabilidade genética de duas populações de *S. terebinthifolius*, sendo uma localizada no Alto Tibagi e a outra no Baixo Tibagi.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção de sementes, germinação e delineamento experimental

Sementes de *Schinus terebinthifolius* foram coletadas de indivíduos de duas populações ripárias, distantes 180 Km uma da outra, sendo uma no baixo Tibagi – Londrina, e a outra no médio – Imbaú, na micro-região de Telêmaco Borba (Figura 2).

Para verificar qual a susceptibilidade das plantas a injúrias provocadas pelo alagamento, qual o seu ritmo de crescimento, e também o tempo de resposta ao alagamento, foram realizados, anteriormente, ensaios preliminares. Estes ensaios foram importantes para determinar itens da metodologia como: número de repetições nos tratamentos, período de alagamento, de pós-alagamento e de submersão.

As sementes das duas populações foram colocadas para germinar em substrato úmido constituído de 80% de terra e 20% de uma mistura de palha de grama, cama de frango, calcário e borra de café, contidos em tubetes. Com aproximadamente 60 dias de desenvolvimento, plantas selecionadas por uniformidade de tamanho e desenvolvimento, foram transplantadas, juntamente com o substrato, para vasos plásticos (4 litros) contendo terra e areia na proporção 3:1. O experimento teve início dois meses após a transferência para os vasos plásticos – período de aclimação e teve duração de 90 dias. Os vasos foram distribuídos por sorteio na casa de vegetação.

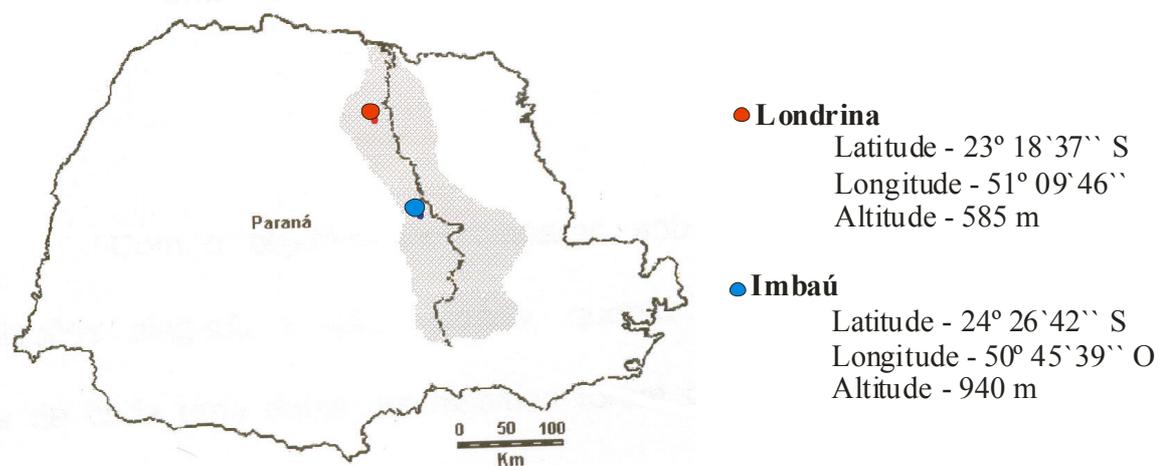


Figura 2. Localizações da bacia do rio Tibagi no Estado do Paraná, dos municípios de Londrina e Imbaú na bacia, e suas respectivas coordenadas geográficas.

### **Crescimento e desenvolvimento**

Foram utilizadas neste experimento 130 plantas, as quais foram subdivididas em seis diferentes tratamentos, sendo três destes por 30 dias e três por 60 dias, e ainda, 10 plantas foram sacrificadas no início do experimento para que se pudesse tirar as medidas iniciais do trabalho (GR) (tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das Plantas de *Schinus terebinthifolius* nos tratamentos drenado por trinta dias (D30), alagado por trinta dias (A30), submerso por trinta dias (SB30), drenado por sessenta dias (D60), submerso por trinta dias e posterior reaeração por trinta dias (SB/REA30), alagado por trinta dias e posterior reaeração por trinta dias (A/REA30), alagado por trinta dias, e grupo referencial (GR).

Proveniências	Tratamentos							
	D30	A30	SB30		SB/REA30	A/REA30	D 60	GR
Pop – Londrina	10	10	10		10	10	10	10
Pop – Imbaú	10	10	10		10	10	10	10

No primeiro dia de experimento contou-se as folhas e, em seguida, determinou-se o peso de cada órgão em separado (raiz, caule e folha) para determinação da TCR geral e específica de cada parte das plantas do Grupo Referencial (GR). Também foram feitas, em todas as plantas, demarcações a partir da última folha totalmente expandida para a avaliação da abscisão foliar e do número de folhas formadas durante o experimento. Estes parâmetros foram determinados em todos os tratamentos, com registros semanais para abscisão no controle D30 e nos tratamentos A30 e SB30.

Para a obtenção da massa seca constante, os órgãos foram colocados em estufa a 60 °C por 72 horas e pesados em balança semi-analítica. A partir dos dados de massa seca calculou-se a taxa de crescimento relativo (TCR) para cada parte da planta, assim como da planta inteira. Utilizou-se a fórmula:  $TCR = \frac{\ln M_{sf} (g) - \ln M_{si} (g)}{\text{tempo (dias)}}$ , onde  $M_{sf}$  é a matéria seca final e  $M_{si}$  é a matéria seca inicial. A TCR expressa o

crescimento como uma função do ganho de matéria seca com o tempo.

### **Taxa de mortalidade de Plantas de *Schinus terebinthifolius* submetidas ao alagamento.**

Foi realizado um acompanhamento semanal da taxa de mortalidade das plantas submetidas aos tratamentos. Esta taxa foi observada pelo número de plantas que morriam em relação ao total inicial de plantas no experimento.

### **Área Foliar**

Realizou-se a medição da área foliar com utilização do aparelho ÁREA METER, Li-Cor, modelo Li-3100.

### **Anatomia comparada de raiz e caule-colo.**

Para a confecção de lâminas permanentes, coletou-se plantas do grupo controle e submetidas aos tratamentos no meio e final do experimento. Utilizou-se segmentos de 1 cm da região de transição entre caule e raiz (caule-colo) e da porção proximal de raízes secundárias. O número de plantas utilizadas para repetição foi igual ou superior a 8.

Os segmentos foram fixados em Formol-Ácido-Acético (F.A.A.) 70%, desidratados, diafanizados e incluídos em paraplast. Os blocos foram seccionados transversalmente, à espessura de cerca de 10 a 12 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). As secções foram coradas e em seguida montadas em bálsamo do Canadá. A coloração foi feita com azul-de-astre e fucsina básica, havendo como critério de seleção de corantes a especificidade do material amostrado.

Foram realizadas medidas de espessura do córtex e cilindro central da raiz e caule-colo, como também o comprimento e a altura da abertura das lenticelas.

Todas as medidas histológicas foram feitas utilizando o software Image Pro-Plus. As imagens foram digitalizadas em um sistema de microscópio fotônico acoplado à câmera digital – *Leica Microscopy Systems DM LB CH-9435 Heerbrugg DC 200 (10446274)* 12V/300mA.

### **Análises Moleculares**

Para análise de DNA, foram coletadas folhas jovens de 35 indivíduos de cada população descrita na Figura 2, identificadas e conservadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para a extração de DNA foi utilizado o procedimento descrito DOYLE & DOYLE (1987) com modificações. Quando necessário, as amostras obtidas foram purificadas com uma solução de acetato de amônio 3M para retirar impurezas que pudessem inibir a amplificação do DNA. A concentração de DNA foi estimada através do uso de um fluorômetro DyNA Quant-200, Hoefer, segundo as instruções do fabricante.

Para a amplificação das amostras foi utilizada uma mistura para reação (Água:  $7,85\mu\text{L}$ , tampão:  $1,50\mu\text{L}$ , Dntp's:  $1,70\mu\text{L}$ , primer:  $1,80\mu\text{L}$ ). Para cada material a ser amplificado, foram adicionados  $13\mu\text{L}$  da mistura para reação e  $2\mu\text{L}$  de DNA previamente diluído a uma concentração de  $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ . Para cada primer um controle de reação sem DNA, mas contendo todos os demais reagentes foi incluído. A seguir as amostras foram colocadas em um termociclador PTC 100 para 60 tubos, da MJ Research. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4 % em tampão TAE (Tris-acetato 0,04M; EDTA 0,01M; pH 8,0). O DNA amplificado foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. As fotografias foram armazenadas em computador para posterior análise.

### **Análise estatística**

As análises estatísticas para os dados morfológicos e anatômicos foram baseadas na análise de variância (ANOVA) e a Diferença Mínima Significativa (DMS) foi determinada pelo teste "a posteriori" de Tukey ao nível de significância de 5%. Utilizou-se os softwares SAS (SAS Institute Inc. 1988) e Statistica 6.0.

Os marcadores moleculares obtidos (RAPD) foram avaliados pela presença e ausência de bandas de DNA homólogas entre os indivíduos de cada população. Os dados gerados foram analisados utilizando os programas Ntsys 2.1 e Arlequin 1.1 (Schneider *et al.*, 1997) e Dboot 1,1 (Coelho, 2000). Foi realizada uma análise de variância para dados moleculares (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), ajustado para RAPD por Huff e Smouse (1993) e além disso determinado o Fluxo gênico pela fórmula de Wright, (1951).

## **RESULTADOS**

### **Crescimento e desenvolvimento**

A abscisão foliar das duas populações não mostrou um padrão uniforme de variação nos tratamentos com os substratos alagados, diferente das submetidas à submersão (Tabela 1). Ao final dos 30 dias de experimento em submersão, observou-se que as plantas da população de Londrina perderam todas as folhas, enquanto, a população de Imbaú perdeu 95%.

Tabela 2. Taxa de abscisão foliar de plantas jovens cultivadas em substrato drenado 30 dias (D30), alagado 30 dias (A30) e submerso 30 dias (SB30), de duas populações ripárias de *S. terebinthifolius* provenientes de Londrina e Imbaú.

Procedência	Londrina			Imbaú			
Tratamentos	D30	A30	SB30	D30	A30	SB30	
1 <sup>a</sup>	0,1 c	1,4 b c	3,0 a b	0,0 c	0,5 c	3,6 a	
Tempo	2 <sup>a</sup>	1,8 b	0,7 b c	6,5 a	2,6 b	0,3 b	6,0 a
(semana)	3 <sup>a</sup>	0,3 b c	0,1 c	3,7 a	2,6 b	0,1 c	2,7 a b
	4 <sup>a</sup>	1,6 a	0,6 a b	Sf* -	1,6 a	1,0 a b	0,8 a b

Nesta e demais Tabelas, médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ;  $n=10$ ).

\* Sf = sem folhas

As TCRs do caule, folha e planta inteira foram alteradas para as plantas submetidas a submersão. Não ocorreu redução da TCR da raiz (Figura 3). A redução da TCR do caule foi observada somente para os tratamentos SB30, SB/REA30 da população de Imbaú (Figura 4). A TCR foliar apresentou redução, em relação a seus respectivos controles (D30 e D60), para os grupos SB30 e SB/REA30. Os tratamentos SB30 e SB/REA30 apresentaram redução mais acentuada, da TCR foliar, para a população de Imbaú (Figura 5). A TCR da planta inteira foi menor para SB30 e SB/REA30, sendo visualizado um decréscimo maior na população de Imbaú para os tratamentos SB30 e SB/REA30 (Figura 6).

A taxa de mortalidade de indivíduos foi significativamente maior no tratamento SB/REA30, com maior expressividade para a população de Londrina (Figura 7).

As plantas submetidas ao alagamento por 60 dias da população de Londrina apresentaram diminuição significativa da quantidade de folhas (Tabela 2). O controle da população de Londrina apresentou uma maior quantidade de folhas que o controle e o A60 da população de Imbaú. Observou-se variação de área foliar entre as populações, sendo que a população de Londrina apresentou maior área foliar que as folhas da população de Imbaú, entretanto, não houve diferenças entre os tratamentos em uma mesma população (Tabela 2).

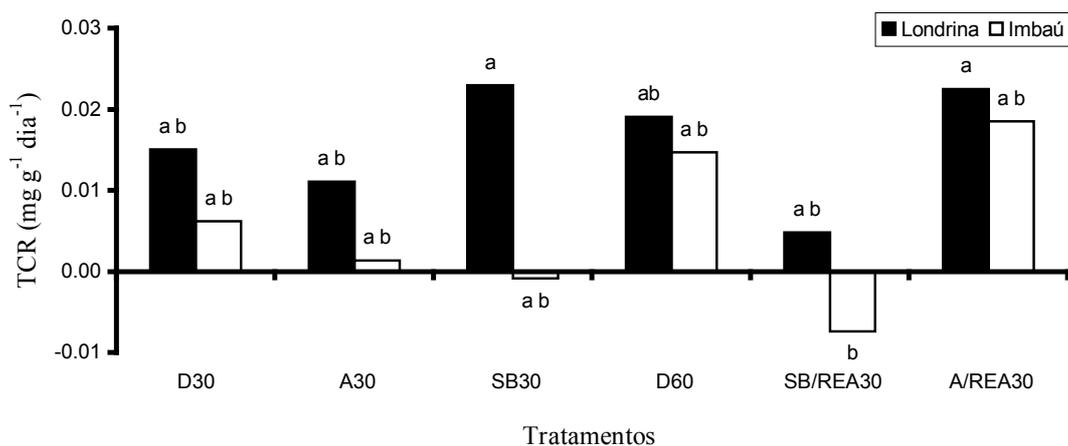


Figura 3. Taxa de crescimento relativo (TCR) da raiz de duas populações (Londrina e Imbaú) de *S. terebinthifolius* cultivadas em substrato drenado (D30), alagado (A30), submerso (SB30), drenado (D60), submerso/reaerado (SB/REA-30) e alagado/reaerado (A/REA-30).

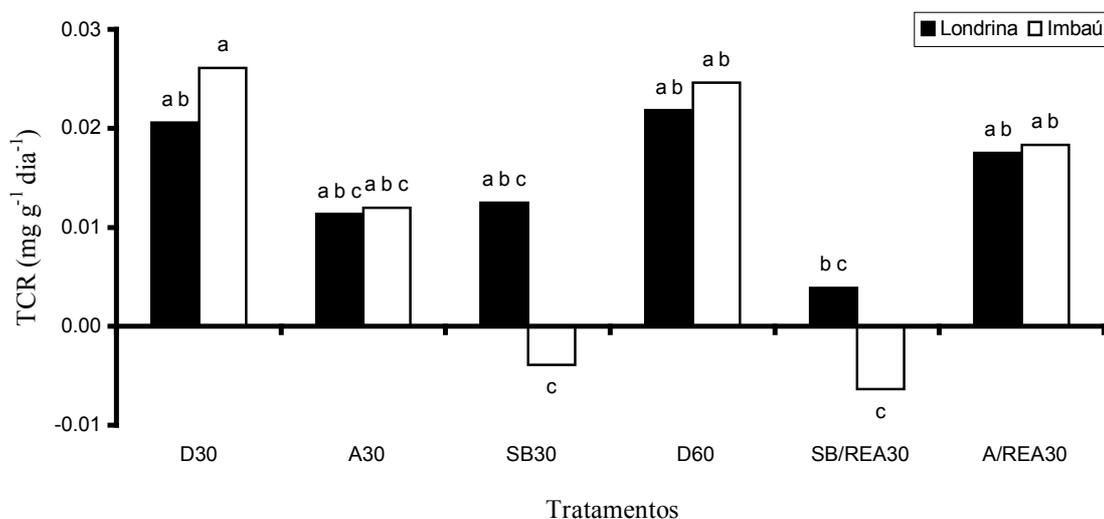


Figura 4. Taxa de crescimento relativo (TCR) do caule de duas populações (Londrina e Imbaú) de *S. terebinthifolius* cultivadas em substrato drenado (D30), alagado (A30), submerso (SB30), drenado (D60), submerso/reaerado (SB/REA-30) e alagado/reaerado (A/REA-30).

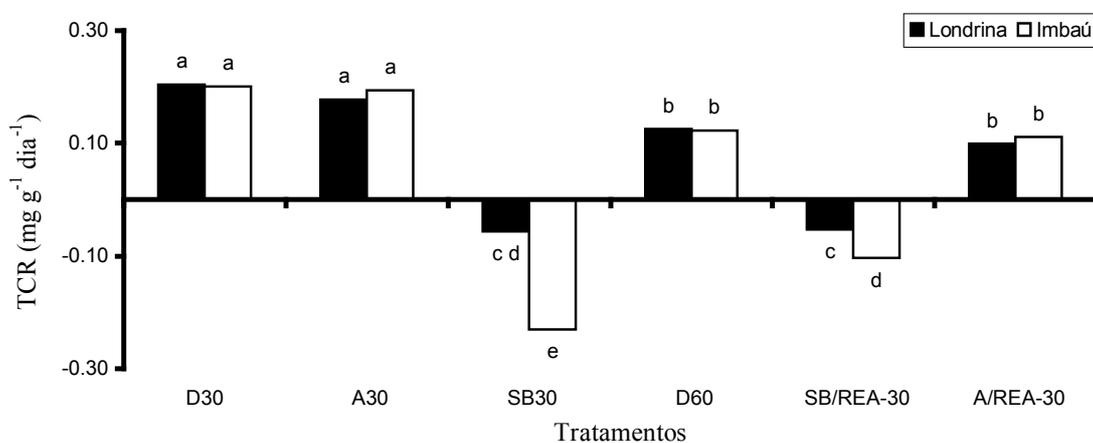


Figura 5. Taxa de crescimento relativo (TCR) foliar de duas populações (Londrina e Imbaú) cultivadas em substrato drenado (D30), alagado (A30), submerso (SB30), drenado (D60), submerso/reaerado (SB/REA-30) e alagado/reaerado (A/REA-30).

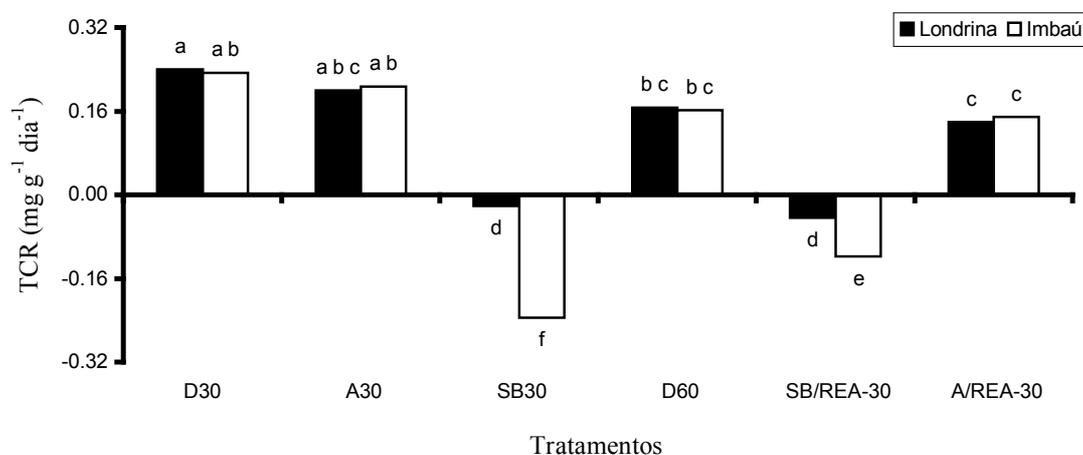


Figura 6. Taxa de crescimento relativo (TCR) da planta inteira de duas populações (Londrina e Imbaú) de *S. terebinthifolius* cultivadas em substrato drenado (D30), alagado (A30), submerso (SB30), drenado (D60), submerso/reaerado (SB/REA-30) e alagado/reaerado (A/REA-30).

Tabela 3: Número e área de folhas de duas populações (Londrina e Imbaú) de *S. terebinthifolius* cultivadas em substrato drenado (D60) e alagado por 60 dias (A60).

Variáveis foliares	População Londrina		População Embaú	
	D60	A60	D60	A60
Número de folhas por planta	21,42 a b	13,28 c	15,57 c	12,28 c
Área foliar (cm <sup>2</sup> )	296,1 a	348,43 a	258,7 b	241,49 b

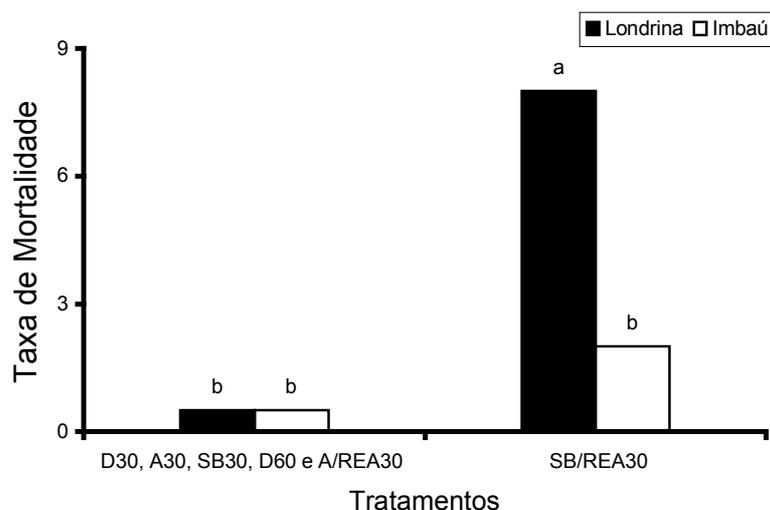


Figura 7. Taxa de mortalidade de duas populações (Londrina e Imbaú) cultivadas em substratos drenado (D30), alagado (A30), submerso (SB30), drenado (D60), submerso/reaerado (SB/REA-30) e alagado/reaerado (A/REA-30).

### Morfoanatomia

O tamanho da abertura de lenticelas foi significativamente maior na população de Imbaú (A60), já os controles não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para este parâmetro (Figura 8 e 9). A espessura do cilindro central (Figura 11) apresentou uma pequena diferença estatística tanto no controle como no tratamento (A60) entre as populações de Londrina e Imbaú. Sendo a população de Imbaú a única a apresentar uma diferença estatística grande entre seu controle e o tratamento. Não ocorreu um aumento significativo na área dos espaços aerenquimatosos tanto no controle como no tratamento (A60) de indivíduos de Londrina e Imbaú (Figura 12). Ocorreu uma pequena diferença estatística apenas entre o controle e o tratamento (A60) da população de Londrina, no que diz respeito ao número de espaços aerenquimatosos de cortes transversais de raiz (Figura

12). Não houve diferenças significativas entre o controle e o tratamento (A60) para o tamanho da área de raízes secundárias, sendo neste caso a área estatisticamente homogênea para os controles como também para os alagados (Figura 14).

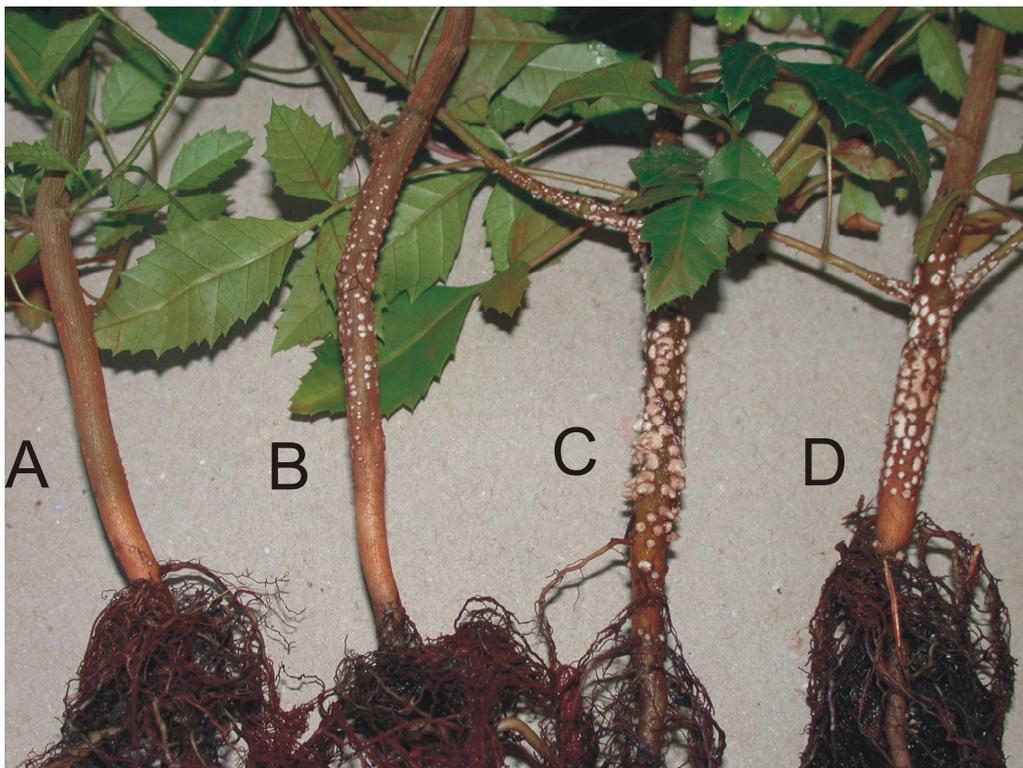


Figura 8. Plantas de *Schinus terebinthifolius* cultivadas em substrato drenado (A ausência de lenticelas hipertrofiadas), alagado por 15 dias (B com lenticelas ligeiramente hipertrofiadas) e 60 dias (C e D com lenticelas hipertrofiadas).

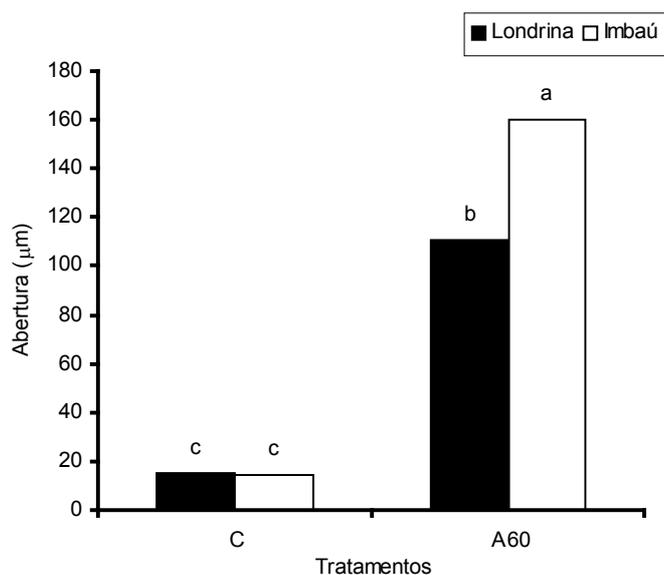


Figura 9. Abertura das lenticelas em plantas de *Schinus terebinthifolius* controle (C) e alagadas (A60) de duas populações (Londrina e Imbaú).

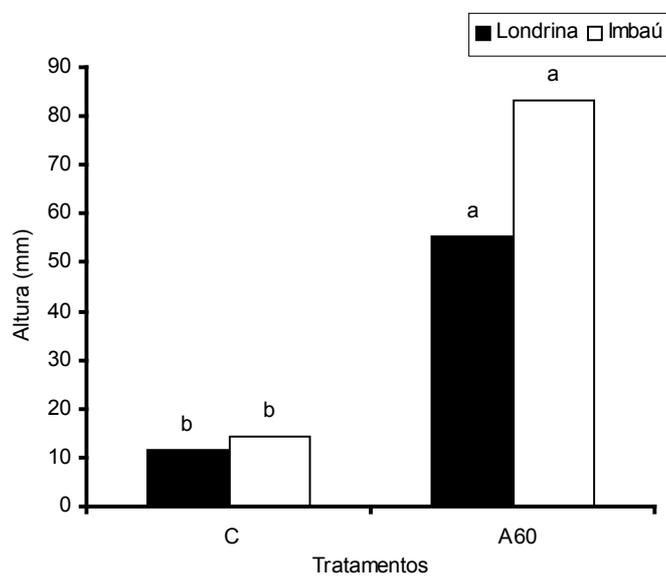


Figura 10. Altura das lenticelas em plantas de *Schinus terebinthifolius* controle (C) e alagadas (A60) de duas populações (Londrina e Imbaú).

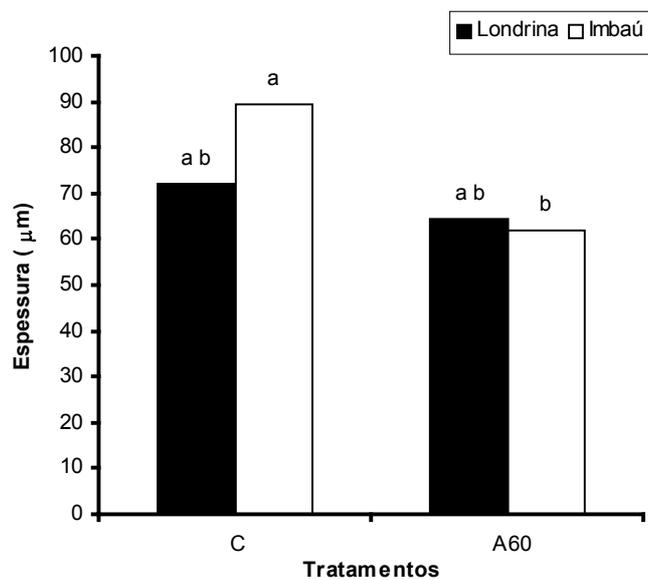


Figura 11. Espessura do cilindro central em raízes secundárias de plantas de *Schinus terebinthifolius* controle (C) e alagadas (A60) de duas populações (Londrina e Imbaú).

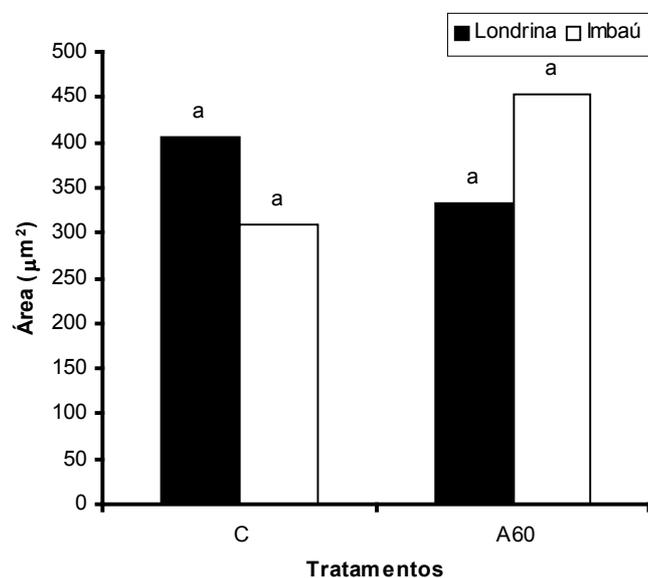


Figura 12. Área de espaços intercelulares aerenquimatosos do córtex de raízes secundárias de plantas de *Schinus terebinthifolius* de duas populações (Londrina e Imbaú).

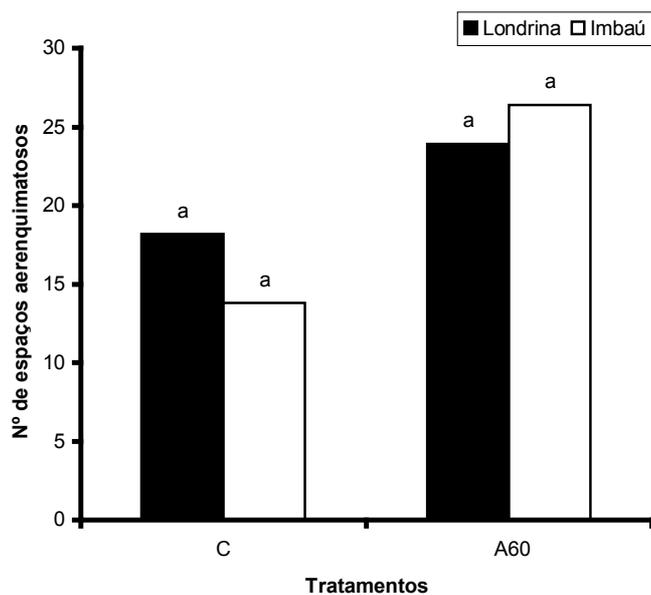


Figura 13. Número de espaços aerenquimatosos de cortes de raízes secundárias de *Schinus terebinthifolius* de duas populações (Londrina e Imbaú).

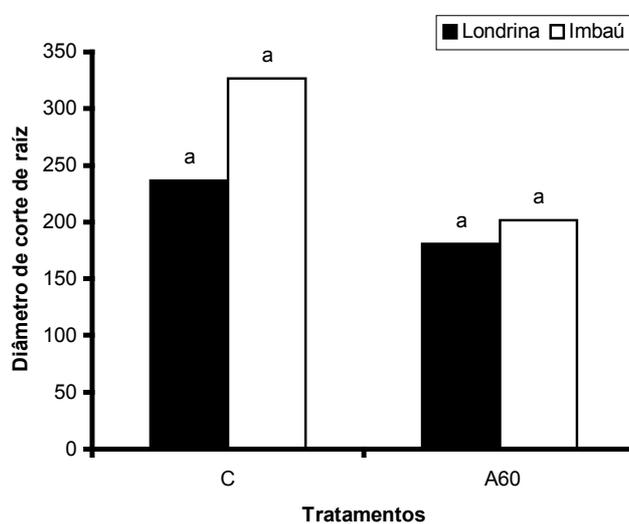


Figura 14. Diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) de raízes secundárias em secção transversal em duas populações (Londrina e Imbaú) de *Schinus terebinthifolius* controle (C) e alagadas (A).

### Diversidade Genética

Foram utilizados 22 *primers* de RAPD os quais resultaram em 181 marcadores amplificados. Estes marcadores foram submetidos a um bootstrap para o número de marcadores resultando em um coeficiente de variação (C.V.) menor que 0,005 (Figura 15). Foi calculada a frequência de fluxo gênico ou estimativa do número de imigrantes por geração ( $Nm = 5,1782$ ) através da fórmula de Wright ,1951 (Tabela 4). O teste de Análise de Variância para dados Moleculares foi aplicado para determinar o índice de variabilidade genética entre e dentro das populações estudadas. O valor de  $F_{st}$  obtido (0,1372) representa um valor de diferenciação médio entre as populações (Hartl *et al.*, 1997) (Tabela 4).

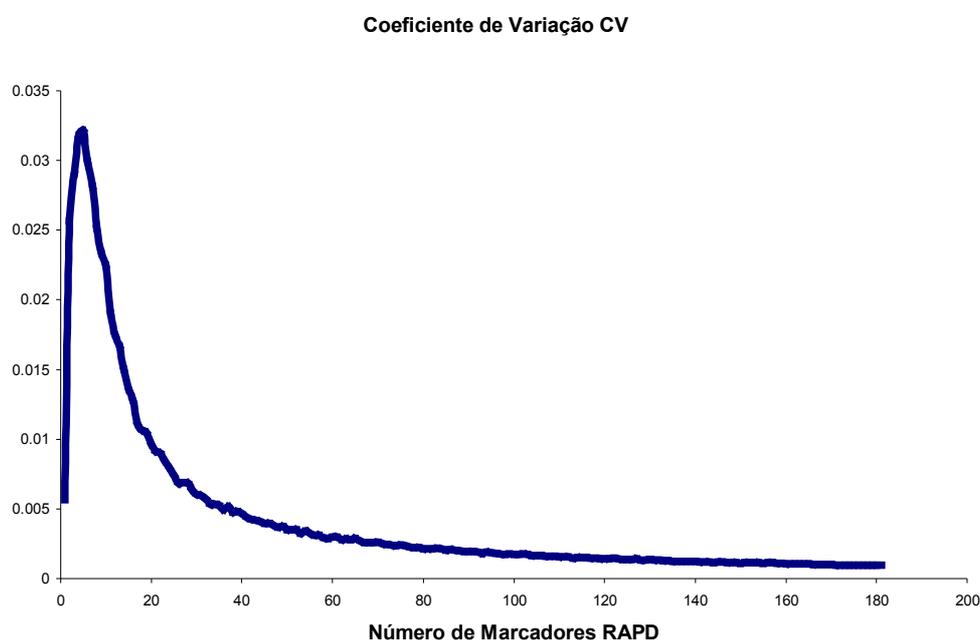


Figura 15: Bootstrap para o número de marcadores RAPD amplificados em 70 indivíduos de duas populações (Londrina e Imbaú) de *Schinus terebinthifolius*.

Tabela 4: Análise de Variância Para Dados Moleculares (AMOVA) para duas populações (Londrina e Imbaú) de plantas de *Schinus terebinthifolius*.

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	% de Variação
Entre Populações	1	95,833	2,43931 Va	<b>13,7**</b>
Dentro de Populações	64	981,515	15,33617 Vb	<b>86,28</b>
Total	65	1077,348	17,775	
Índice de Fixação	$F_{ST}$ :	0,13723		
Fluxo gênico	Nm	5,1782		

\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; (teste de significância dado por 1000 permutações).

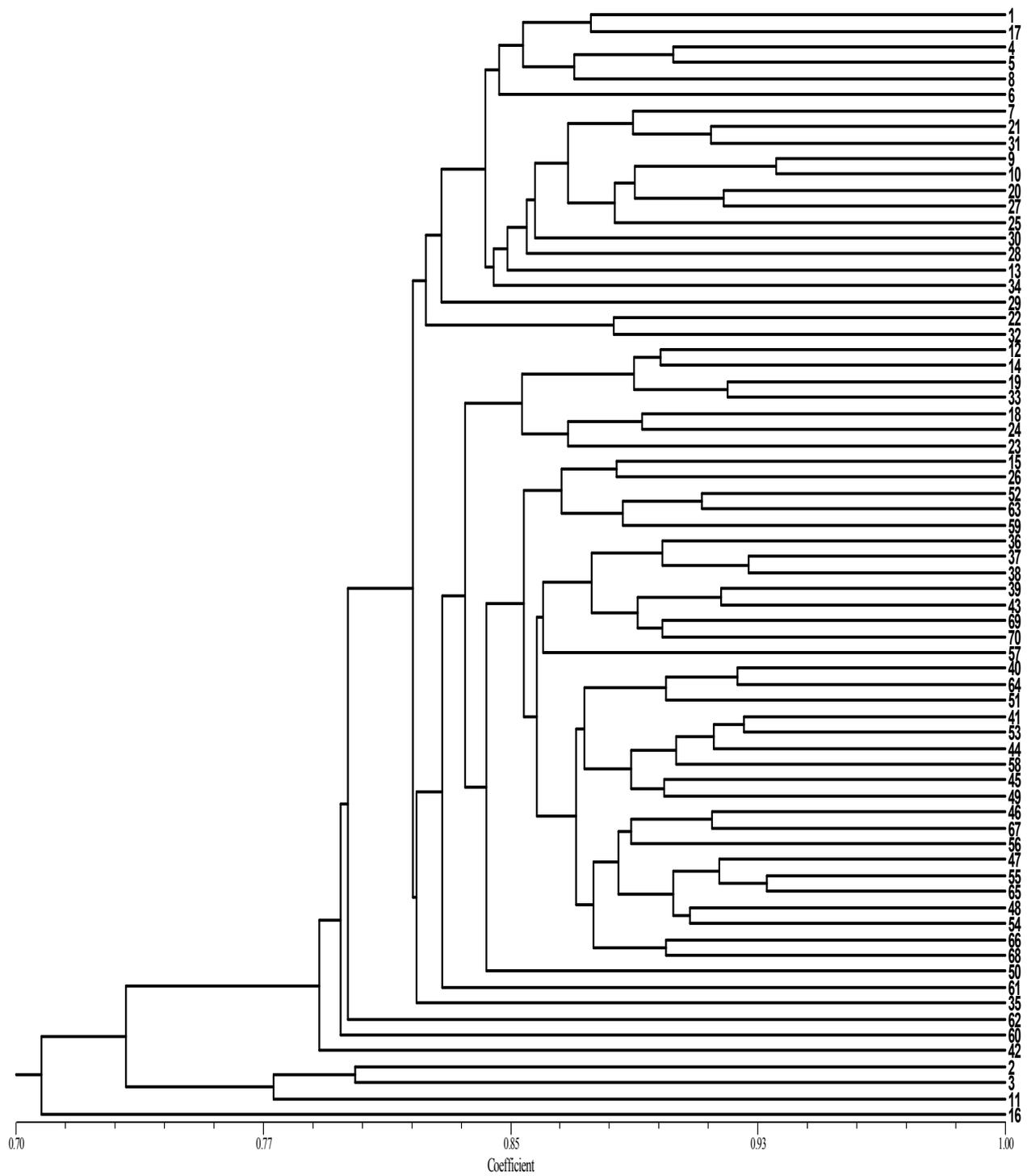


Figura 16: Dendrograma de duas populações (Imbaú 1-35 e Londrina 36-40) de *Schinus terebinthifolius* pelo método de Dice.

## DISCUSSÃO

### **Aspectos do desenvolvimento de *S. terebinthifolius***

O período em que as plantas foram submetidas ao alagamento não resultou em alteração da abscisão e das TCRs, enquanto a submersão total da parte aérea levou a um aumento da abscisão foliar e diminuição das TCRs das folhas, caules e plantas inteiras. Gallo (2002) e Silva (2002) verificaram em *Luehea divaricata* e *Parapiptadenia rigida* respectivamente, queda da TCR em plantas submersas, e consideraram que a redução foi ocasionada, principalmente, pela perda de folhas, afirmando que este órgão foi mais vulnerável que os demais no referido estresse. Resultados similares foram encontrados por Medri (2005) em *Schinus terebinthifolius*.

Quando o alagamento envolve a submersão da planta inteira, as limitações ao crescimento e sobrevivência são aumentadas muitas vezes em decorrência da maior restrição à oxigenação e também ao suprimento de dióxido de carbono para a fotossíntese. Além disso, a fotossíntese é também comprometida pela redução da radiação incidente sobre as folhas, já que a luz é atenuada exponencialmente com a profundidade (CRAWFORD, 1992; ARMSTRONG *et al.*, 1994; BLOM *et al.*, 1994; Medri, 2005).

A abscisão foliar e o processo que a antecede, como a senescência, podem ser abruptamente acelerados em situações de alagamento do solo em virtude dos altos níveis de etileno nas plantas (BRADFORD & YANG, 1980; REID & BRADFORD, 1984; TANG & KOZLOWSKI, 1982). Dessa maneira, infere-se que *S. terebinthifolius* possui estratégias, quando alagada, para eliminar o etileno excedente, todavia o mesmo não é

observado quando a mesma espécie sofre submersão.

Quanto à redução da TCR do caule das plantas de *S. terebinthifolius* submersas, pode ter sido uma consequência da menor quantidade de energia disponível para os processos de crescimento, já que em condições de hipoxia as plantas podem desviar o metabolismo para vias fermentativas (CRAWFORD & BRAENDLE, 1996), resultando em redução nos níveis energéticos do metabolismo celular, além do decréscimo na produção e translocação de fotoassimilados para a respiração (OSONUBI *et al.*, 1987; GALLO, 2002).

O comprometimento do crescimento em plantas sobre hipoxia foi correlacionado por Newsome *et al.*, (1982), Jackson & Drew, (1984), Reid & Bradford (1984) e Atwell & Steer, (1990) com alterações do metabolismo e do transporte hormonal, pois, nestas plantas, as substâncias que normalmente promoveriam o crescimento da parte aérea, como as citocininas e as giberelinas, teriam suas concentrações diminuídas, enquanto aquelas que tendem a inibir este processo, como o etileno e o ABA, teriam seus níveis aumentados. Resultados semelhantes aos apresentados por *Schinus terebinthifolius* foram encontrados por Gallo (2002) com *Luehea divaricata* e por Silva (2002) com *Parapiptadenia rigida*.

A taxa de mortalidade de indivíduos foi significativamente maior nos tratamentos submetidos à submersão seguidos de reaeração. Os resultados mostraram uma relação negativa entre a intensidade da hipoxia e a sobrevivência de plantas de *S. terebinthifolius*, visto que, no tratamento alagamento seguido de reaeração, observou-se 100% de sobrevivência para as duas populações, enquanto que, com a submersão seguida de reaeração, a mortalidade média entre as populações foi de 50%. CRAWFORD &

BRAENDLE (1996) afirmam que a reeração dos tecidos vegetais pode causar a superoxidação de produtos do metabolismo anaeróbio (como o etanol que é oxidado a acetaldeído) e de outros compostos formados durante o alagamento, os quais são tóxicos para a planta. Para muitas espécies de plantas vasculares, a redução da massa seca correlaciona-se com a morte em resposta à deficiência de oxigênio no solo e a presença de vários metabólitos tóxicos nas plantas (KOLB *et al.*, 1998; MEDRI *et al.*, 1998).

Foi observado o desenvolvimento de lenticelas hipertrofiadas já na primeira semana de alagamento. Lenticelas hipertrofiadas apareceram como uma massa de tecido macio que emergiu do colo do caule. O aparecimento de lenticelas hipertrofiadas tem sido documentado em muitas plantas de clima temperado e tropical (LOBO & JOLY, 1998; GALLO, 2002; SILVA 2002; MIELKE *et al.*, 2005). Tsukahara e Kozlowski (1985) associaram o aparecimento de lenticelas hipertrofiadas com o aumento do transporte de gás para áreas com déficit de O<sub>2</sub> e com a eliminação de gases tóxicos como etanol, acetaldeído e etileno que tem um aumento na sua produção durante o alagamento. Comparando as duas populações estudadas de *S terebinthifolius*, observou-se uma maior abertura média de lenticelas na população oriunda de Imbaú, em relação a população de Londrina, mesmo esta abertura não estando correlacionada com qualquer outro fator que indique que houve uma melhor oxigenação dos tecidos da planta ou um aumento na eliminação de metabólitos gasosos para esta população.

Geralmente lenticelas hipertrofiadas estão associadas com grandes espaços intercelulares em camadas corticais adjacentes (HOOK & SCHOLTENS, 1978) no caule, criando uma rede de transporte de gases das partes bem airadas até as que se encontram com déficit de oxigênio nos órgãos submersos (VISSER *et al.*, 2003). Em *S.*

*terebinthifolius*, não foi observado um aumento dos espaços intercelulares adjacentes nas duas populações em estudo, mesmo em regiões diretamente abaixo das lenticelas hipertrofiadas, ao contrário do observado em *Luehea divaricata* (GALLO 2002).

A capacidade e quantidade de formação de aerênquimas em raízes tem sido diretamente associada à tolerância ao alagamento em muitas espécies (JUSTIN & ARMSTRONG, 1983; DREW & STOLZY, 1991). Esta hipótese, no entanto, foi questionada por Moog (1998). De acordo com o autor, as raízes com grandes quantidades de aerênquima formadas durante o processo de alagamento, não possuem células vivas ou fisiologicamente ativas em números suficientes para manter as principais funções de uma raiz: absorção mineral, absorção de água e armazenamento de produtos assimilados. Portanto, plantas com este tipo anatômico de raiz, não poderiam suprir demandas metabólicas altas durante o período de crescimento e desenvolvimento (Moog, 1998). Em *Schinus terebinthifolius* não foi observada a formação de aerênquima em raízes alagadas, o que sugere que outros mecanismos possam estar atuando para conferir a tolerância ao alagamento observado nesta espécie. Medri (2005) não encontrou detectadas alterações significativas na taxa fotossintética, condutância estomática, concentração interna de CO<sub>2</sub>, taxa transpiratória e temperatura foliar de *Schinus therebinthifolius*.

Em *Schinus terebinthifolius*, não foi observada uma alteração significativa da área de raízes desenvolvidas sob o efeito do alagamento em relação à das plantas controles. No entanto, enquanto a espessura do cilindro central se mostrou estatisticamente similar para plantas controle e alagado de Londrina, a população de Imbaú apresentou uma diminuição significativa na espessura do cilindro central após 60

dias de alagamento. Esta diferença não pode ser correlacionada com um aumento ou diminuição diferencial da TCR de raiz caule e folhas de *Schinus terebinthifolius* já que todos estes outros parâmetros foram estatisticamente similares para as duas populações.

Em estudos anteriores publicados por Moog e colaboradores (1990) defenderam a hipótese de que espécies de plantas tolerantes ao alagamento conseguem manter seu crescimento mesmo sob condições de alagamento, por manter uma alta proporção de células vivas no córtex da raiz em relação a tecidos aerenquimatosos.

### **Diferenciação Genética de *Schinus terebinthifolius***

Neste trabalho foram utilizados 22 *primers* de RAPD, gerando um total de 181 marcadores sendo que destes 160 eram polimórficos e 21 monomórficos.

O coeficiente de variação (C.V.) para o números de marcadores obtidos foi aplicado através do programa Dboot v.1.1 (Coelho, 2000), obtendo um bootstrap com abaixo de 0,005, o que indica uma alta confiabilidade nos resultados obtidos através dos “primers” utilizados (Figura 13). Segundo Hollingworth (2004), baixos níveis de  $F_{st}$  ( $<0,07$ ) podem ser obtidos para populações naturais quando um número suficiente de marcadores é utilizado. Em contraste com estes valores, em uma mesma população natural, níveis altos de  $F_{st}$  ( $> 0,15$ ) têm sido encontrados quando poucos marcadores moleculares são utilizados para o cálculo do  $F_{st}$ , gerando uma distorção nos resultados apresentados. Então, torna-se muito importante a obtenção de baixos níveis de C.V. para o número de primers utilizados em um trabalho com marcadores dominantes, para obtenção de resultados confiáveis.

A estimativa de fluxo gênico por geração dada através do  $F_{st}$ , onde  $Nm = \frac{1}{4} (1/F_{st} - 1)$  (WRIGHT, 1951), apresentou um valor de 5,1782, que representa um fluxo gênico alto para populações naturais que se encontram tão distantes. Este fato pode ser oriundo da recente fragmentação destas matas ciliares que se deu nos últimos cinquenta anos, resultando em uma estimativa de  $Nm$  que reflita não o fluxo gênico atual entre as populações, mas sim um valor remanescente de quando estas formavam uma vegetação contínua.

Um dendrograma foi gerado através do método de Dice, utilizando os marcadores amplificados por RAPD gerando dois grupos distintos de plantas oriundas de Londrina e outras de Imbaú, no entanto, algumas plantas de Imbaú se isolaram de ambos os grupos, constituindo um “outgroup” no dendrograma. Este fato pode ser resultado de um início de diferenciação destes indivíduos do restante das populações, já que estes indivíduos apresentaram uma maior distância genética em relação aos outros dois grupos formados no dendrograma.

A análise de variância para dados moleculares AMOVA foi calculada, demonstrando que 13,7% da variabilidade destas populações de *Schinus terebinthifolius* se encontrava entre populações e 86,28% dentro das populações, sendo este resultado esperado para populações arbóreas alógamas naturais. O índice de fixação  $F_{st}$  de Wright (1951) foi calculado, revelando um valor médio de  $F_{st} = 0,13723$  que segundo Hartl (1988) representa uma divergência média para alta entre estas duas populações. Levando em conta que estas duas populações estão distantes entre si por 180 km e que estas duas regiões possuem altitudes (Londrina 585m – Imbaú 940m), latitudes (Londrina 23°18'37''S – Imbaú 24°26'42''S), solo e climas diferentes, pode se inferir que este

valor mediano de  $F_{st}$  possa estar diretamente relacionado com necessidades diferentes de adaptação de cada uma dessas populações ao local onde elas se encontram.

Estes valores de  $F_{st}$  encontrados para estas populações (0,13723) indicam que para efeito de conservação genética da espécie, as duas populações têm que ser minuciosamente amostradas para formação de bancos de germoplasma.

## CONCLUSÕES

Plantas de *Schinus terebinthifolius* das duas populações estudadas se mostraram altamente tolerantes a pequenos períodos de alagamento, apresentando algumas alterações anatômicas que permitiram sobreviver a este tipo de estresse. Estas alterações permitiram que a planta retomasse o seu metabolismo aeróbio e evitasse a letalidade.

As duas populações de *Schinus terebinthifolius* demonstraram uma média variabilidade genética entre populações e alta variabilidade dentro de populações, determinando que para amostragens no caso de bancos de sementes, muitos indivíduos dentro de cada população devem ser amostrados, para que evite a perda de variabilidade genética destas populações naturais.

### Referências Bibliográficas:

ARMSTRONG, W.; BRÄNDLE, R.; JACKSON, M. B. 1994. Mechanisms of flood tolerance in plants. *Acta Bot. Neerl.*, v. 43, n. 4, p. 307-358.

ARMSTRONG, W. 1979. Aeration in higher plants. **Adv. Bot. Res.**, v. 7, p. 225-332.

ATWELL, B. J. & STEER, B. T. 1990. The effect of oxygen deficiency on uptake and distribution of nutrients in maize plant. **Plant Soil**, 122(1): 1-8.

BARROSO, G. M., 1984. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. UFV, Viçosa, v.2. p.266-267.

BLOM, C.W.P.M. 1999. Adaptations to Flooding Stress: From Plant Community to Molecule. **Plant Biol** 1: 261-273

BLOM, C. W. P. M.; VOESENEK, L. A. C. J.; BANGA, M.; ENGELAAR, W. M. H. G.; RIJNDERS, J. H. G. M.; STEEG, H. M. VAN DE; VISSER, E. J. W. 1994. Physiological ecology of riverside species: adaptive responses of plants to submergence. **Ann. Bot.**, v. 74, p. 253-263.

BRADFORD, K. J.; YANG. S. F. 1980. Stress-induced ethylene production in the ethylene-requiring tomato mutant diageotropica. **Plant Physiol.**, v. 65, p. 327-330.

CHEN, H.; QUALLS, R G.; MILLER, G. C. 2002. Adaptive responses of *Lepidium latifolium* to soil flooding: biomass allocation, adventitious rooting, aerenchyma formation and ethylene production. **Environmental and Experimental Botany** 48: 119-128.

COELHO, A.S.G. 2000. **Dboot**: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores (software). Goiânia: UFG, **Instituto de Ciências Biológicas**, Laboratório de Genética Vegetal.

COLMER, T.D. 2003. Aerenchyma and an inducible barrier to radial oxygen loss facilitate root aeration in upland, paddy and deep-water rice (*Oryza sativa* L.). **Annals of Botany** 91: 301-309.

CORREA, G. T. 1998. Anatomia ecológica de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae) submetida ao alagamento. **Rev. Bras. Bot.**, p. 305-312 v. 21.

CRAWFORD, R.M.M. 1992. Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution. **Advances in Ecological Research**, v. 23, p. 93-185.

CRAWFORD, R. M. M.; BRÄNDLE, R. 1996. Oxygen deprivation stress in a changing environment. **J. Exp. Bot.**, v. 47, n. 295, p. 145-159.

CRAWFORD, R. M. M. 1978. Metabolic adaptation to anoxia. In: Plant life in anaerobic environments. HOOK, D. D.; CRAWFORD, R. M. M. Michigan: **Ann Arbor Science**. p. 119-136.

DIAS, M. C.; VIEIRA, A. O. S.; PAIVA, M. R. C. . 2002. Florística e fitossociologia das espécies arbóreas das florestas da baía do rio Tibagi. **In:** A bacia do Rio Tibagi. 109-124.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v.19, n.1, p.11-15.

DREW, M.C.; STOLZY, H. 1991. Growth under oxygen stress. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkai U, eds. **Plant roots – the hidden half. Dekker:** New York, 331-350.

ECOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. **Genetics** 131: 479-491.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2º ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995, pp.220.

GALLO, M. C. C. 2002. Tolerância ao alagamento e caracterização da variação genética em populações ciliares de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.**

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. 1990. Alloenzyme diversity in plant species. In: A.H.D. BROWN; M.T. CLEGG, A.L. KAHLER; B.S. WEIR (eds.) **Plant population genetics, breeding, and genetic resources**, 43-63. Sinauer, Sanderland, MA, USA.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; SHERMAN-BOYLERS, S.L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forest**. 6: 95-124

HARTL, D.L.; CLARK, A. G. 1988. **Principles of population genetics**. Sinauer Associates. Massachusetts.

HOLLINGWORTH, P.M.; ENNOS, R.A. 2004. Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure. **Heredity**, 92, 490-498.

HOOK, D. D.; SCHOLTENS, J. R. 1978. Adaptations and flood tolerance of tree species. **In: Plant life in anaerobic environments**. HOOK, D. D.; CRAWFORD, R. M. M. Michigan: Ann Arbor Science. p. 299-331.

HUFF, P. R.; SMOUSE, P.E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalo grass (*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.). **Theoretical and Applied Genetics** 86: 927-934.

JACKSON, M. B.; DREW, M. C. 1984. Effect of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. In: Kozlowski; T. T. (ed.) **Flooding and plant growth**. London: Academic. p. 47-128.

JOLY, C. A. 1994. Flooding tolerance: a reinterpretation of Crawford's metabolic theory. **Proceedings of the Royal Society of Edimburg**, v. 102B, p. 343-354.

JOLY, C.A. 1996. The Role of Oxygen Diffusion to the Root System on the Flooding Tolerance of Tropical Trees. *Revista Brasileira de Biologia* 56(2): 375-382.

JUSTIN, S. H. F. W.; ARMSTRONG, W. 1991. Evidence for the involvement of ethylene in aerenchyma formation in adventitious roots rice (*Oriza sativa* L.). **New Physiol.**, v. 118, n. 1, p. 49-62.

KAGEYAMA, P.Y. 1994. Dinâmica de Populações de Espécies Arbóreas: implicações para o manejo e conservação. **In:** III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira – subsídios a um gerenciamento ambiental. V.2 Mata Atlântica e Ecossistemas Marinhos. Serra Negra, São Paulo, p.1-7.

KOLB, R. M.; MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; GILONI, P. C.;

LOBO, P.C.; JOLY, C.A. 1998. Tolerance to hypoxia and anoxia in neotropical tree species. In: Scarano FR, Frando AC, eds. *Ecophysiological strategies of xerophytic and*

*amphibious plants in the neotropics*. **Series Oecologia Brasiliensis**: PPGE-UFRJ, Brazil, 4: 137-156.

LOPEZ, O. R.; KURSAR, T. A. 1999. Flood Tolerance of four Tropical Tree Species. **Tree Physiology** 19: 925-932.

LORENZI, H. 2002. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum.

MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; DELGADO, M. F.; CORREA, G. T. 1998. Aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de *Peltophorum dubium* (Spr.) Taub. submetida ao alagamento e aplicação de ethrel. **Rev. Bras. Bot.**, v. 21, p.261-267.

MIELKE, M.S.; ALMEIDA, A.A.F.; GOMES, F.P.; MANGABEIRA, P.A.O.; SILVA, D.C. 2005. Effects of Soil Flooding on Leaf Gas Exchange and Growth of Two Neotropical Pioneer Tree Species. **New Forest** 29: 161-168.

MOOG, P.R.; JANIESCH, P. 1990. Root-Growth and Morphology of *Carex* species as influenced by Oxygen Deficiency. **Functional Ecology** 4(2): 201-208.

MOOG, P.R. 1998. Flooding tolerance of *Carex* species. I. Root structure. **Planta** 207: 189-198.

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Am. Nat.** 106: 283-292.

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

NEI, M. 1987. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York, NY.

NEWSOME, R. D.; KOZLOWSKI, T. T.; TANG, Z. C. 1982. Responses of *Ulmus americana* seedlings to flooding of soil. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 1688-1695.

OSONUBI, O.; OSUNDINA, M.A. 1987. Comparison of the responses to flooding of seedlings and cuttings of *Gmelina*. **Tree Physiol.**, 3: 147-156.

PURNOBASUKI, H.; SUZUKI, M. 2004. Aerenchyma Formation and Porosity in Root of a mangrove plant, *Sonneratia alba* (Lythraceae). **Journal of Plant Research** 117: 465-472.

REID, D. M. & BRADFORD, K. J. 1984. **Effects of flooding on hormone relations. Flooding and plant growth.** Kozlowski, T. T. (ed). Academic Press, London 195-219.

REIS, M.S. 1996. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitero (*Euterpe edulis* Martius). **Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, USP, para obtenção do título de Doutor em Agronomia.**

SAS 1990. **SAS Procedures guide.** SAS Inc, Cary NC, 544p.

SCHMULL, M.; Thomas, F. M. 2000. Morphological and physiological reactions of young deciduous trees (*Quercus robur* L., *Q. petraea* (Matt.) Liebl., *Fagus sylvatica* L.) to waterlogging. **Plant Soil** 225: 227-242.

SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J. M.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. 1997. Arlequin Ver. 1,1: **A Software for population genetic data analysis.** Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

SILVA, D. C. G. 2002. Tolerância ao Alagamento e Caracterização Genética de Populações de *Parapiptadenia rígida* Benth. Brennan (Leguminosae) Naturais de Mata Ciliar. **Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.**

TANG, Z. C. & KOZLOWSKI, T. T. 1982. Some physiological and growth responses of *Betula papyrifera* seedlings to flooding. **Physiol. Plan.**, 55: 415-420. 1982.

TSUKAHARA, H.; KOSLOWSKI, T. T. 1985. Importance of adventitious roots to growth of flooded *Platanus occidentalis* seedlings. **Plant and Soil**, v.88, p.123-132.

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

VISSER E.J.W.; VOESENEK, L.A.C.J.; VARTAPETIAN, B.B.; JACKSON, M.B. 2003. Flooding and Plant Growth. **Annals of Botany** 91: 107-109.

VOESENECK, L. A. C. J.; VAN DER VEEN, R. 1994. The role of phytohormones in plant stress. Too much or too little water. . V. 43, p. 91-127.

**Artigo as ser publicado no American Journal of Botany**

“Estudos de Diversidade Genética de seis populações de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardeaceae) da Bacia do Rio Tibagi utilizando marcadores de microssatélites (SSR)”.

Ruas, E. A.<sup>1</sup>; Medri, C.<sup>3</sup>; Ruas, P.M<sup>1</sup>; Ruas, C.F<sup>1</sup>; Medri, P, S<sup>2</sup>; Sahyum, S.A.<sup>4</sup>; Medri, M. E<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina.

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Animal e Vegetal.

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Maringá.

<sup>4</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina.

[Edu\\_wicca@hotmail.com](mailto:Edu_wicca@hotmail.com)

### Resumo

A fragmentação e distúrbios nos habitats devido ao desmatamento, invasão de plantas daninhas, queimadas, e a introdução de animais, podem reduzir diretamente os tamanhos efetivos de populações de plantas e alterar a abundância e eficiência dos polinizadores e dispersores de sementes. Neste contexto, marcadores moleculares de microssatélites ou repetições de seqüência simples (SSR) têm sido utilizados para estudos que visam compreender a estruturação genética das populações naturais. Neste trabalho foram estudadas as estruturas genéticas seis populações de *Schinus terebinthifolius*. Estas populações mostraram uma alta estruturação genética ( $F_{st} = 0,199$ ) e heterozigidade média de 0,544, indicando que para efeito de conservação se

faz necessário uma ampla amostragem de cada uma destas populações.

Palavras-Chave: Genética de Populações, marcadores microssatélites, *Schinus terebinthifolius*.

### ***Abstract***

The fragmentation and disturbs in the habitats due to devastation, invasion of weeds, burnings and introduction of exotic animals can reduce directly the effective size of plant populations and alter the abundance and efficiency of pollinators and seed dispersors. Microsatellites or simple sequence repeats (SSR) have been used on studies that intend to comprehend the genetic structure of natural populations. In the present study, the genetic structure of six populations of *Schinus terebinthifolius* were studied. These populations showed a high level of genetic structureing ( $F_{st} = 0,199$ ) and midium heterozygosity (0,544), indicating that for conservation purposes its necessary a wide sampling from each of these populations.

## Introdução

A fragmentação e distúrbios nos habitats devido ao desmatamento, invasão de plantas daninhas, queimadas, e a introdução de animais, podem reduzir diretamente os tamanhos efetivos de populações de plantas e alterar a abundância e eficiência dos polinizadores (Lamont *et al.* 1993; Aizen & Feisinger 1994; Kremen & Ricketts 2000) e dispersores de sementes. Tais fatores podem levar estas populações a um isolamento genético, redução da diversidade genética e aumento de endogamia. Estes processos quando muito acentuados podem levar tais populações a uma grande diminuição em sua adaptação e até mesmo a extinção (Frankham 1995; Newman & Pilson 1997; Saccheri *et al.* 1998).

Tem ocorrido um rápido aumento nos número de estudos que visam determinar os efeitos genéticos que ocorrem nas populações de plantas que têm sofrido recentes ações antropogênicas tais como fragmentação dos habitats (Ellstrand & Elam 1993; Gustafsson 2000; Young & Clarke 2000). Neste contexto, marcadores moleculares de microsatélites ou repetições de seqüência simples (SSR), que são constituídos de uma seqüência de DNA de 1-6 bases de comprimento repetidas em tandem geralmente de 5 a mais vezes, têm sido amplamente utilizados em estudos de grau de parentesco, ligação, genética de população, e história evolutiva, sendo também utilizados em programas que visam a recuperação de ambientes que venham sofrendo forte fragmentação (England *et al.*, 2002).

*Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardeaceae), popularmente conhecida como Aroerinha Brava, é uma espécie amplamente distribuída na bacia do Rio Tibagi. Por se

tratar de uma espécie pioneira e com altos índices de valor de importância (IVI) por toda sua área de distribuição, esta é de grande importância para programas que visam recuperar áreas de matas ciliares degradadas principalmente por atividades agrícolas e agropecuárias (Lorenzi, 2002).

Neste estudo os marcadores de microssatélites foram utilizados com o intuito de avaliar a estruturação genética de seis populações de *S. terebinthifolius* sendo estas localizadas em três zonas climáticas diferentes dentro da Bacia do Rio Tibagi, visando conhecer o efeito da colonização dos últimos 50 anos sobre a estrutura genética desta espécie.

## **Material e Métodos**

### Material Biológico

Foram coletadas folhas jovens de 30 indivíduos de *Schinus terebinthifolius* em cada população descrita na Figura 1, estas folhas foram então identificadas e acondicionadas em freezer – 80°C até serem utilizadas para extração de DNA

### Extração de DNA, Quantificação e Amplificação de DNA.

Para a extração de DNA foi utilizado o procedimento descrito por Doyle & Doyle (1987) com modificações. Quando necessário, as amostras obtidas foram purificadas com uma solução de acetato de amônio 3M. A concentração de DNA foi

estimada através do uso de um fluorômetro DyNA Quant-200, Hoefér, segundo as instruções do fabricante.

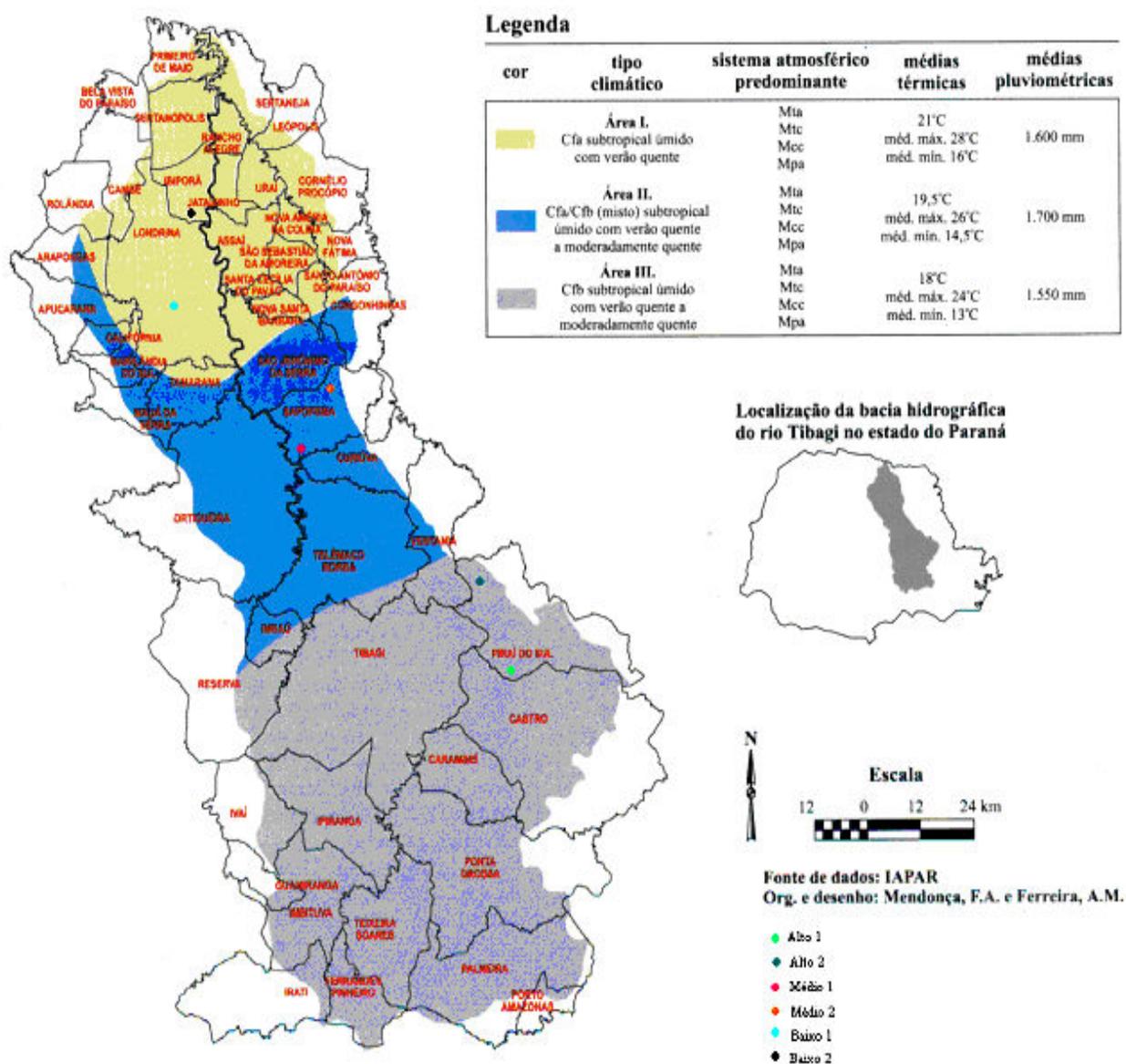


Figura 1: Áreas de coleta das seis populações de *Schinus terebinthifolius*.

Foram utilizados cinco *primers* de microssatélites desenvolvidos por Williams *et al.* (2002). Na amplificação do DNA genômico de *Schinus terebinthifolius*, foi utilizada uma mistura para reação (Água: 7,85µL, tampão: 1,50 µL, Dntp's: 1,70µL, *primers* direto e inverso: 1,80 µL). Para cada material a ser amplificado, foram adicionados 13µL da mistura para reação e 2µL de DNA previamente diluído a uma concentração de 10 ng/µL. Para cada *primer* um controle de reação sem DNA, mas contendo todos os demais reagentes foi incluído. A seguir as amostras foram colocadas em um termociclador PTC 100 da MJ Research. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4 % em tampão TAE (Tris-acetato 0,04M; EDTA 0,01M; pH 8,0). O DNA amplificado foi corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta. As fotografias foram armazenadas em computador para posterior análise.

#### Análise estatística

Os marcadores moleculares obtidos (SSR) foram avaliados pela comparação de bandas de DNA homólogas entre os indivíduos de cada população. Os dados gerados foram analisados utilizando os programas Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) e Popgene 1.31 (Yeh *et al.* 1999). Foi realizada uma análise de variância para dados moleculares (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), e, além disso, determinado o Fluxo gênico entre populações pela fórmula de Wright, 1951.

## Resultados

Foram utilizados 5 locos de microssatélites (SSR) os quais apresentaram 100% de polimorfismo nas seis populações estudadas. Através destes foram calculados vários parâmetros genéticos entre e dentro de cada uma das populações. Foi calculada frequência de fluxo gênico ou estimativa do número de imigrantes por geração ( $Nm = 1,111$ ) através do  $F_{st}$  (Wright, 1951). Foram calculadas a diversidade gênica e a heterozigosidade média (Tabela 1) de cada uma das populações, como também, foi estimada a distância genética entre as populações pelo método de Nei (1978) (Tabela 2) da qual foi gerado um dendrograma mostrando graficamente a distância genética entre cada população.

O teste de Análise de Variância para dados Moleculares foi aplicado para determinar o índice de variabilidade genética entre e dentro das populações estudadas (Tabela 3). O valor de  $F_{st}$  obtido (0,199) representa um alto valor de diferenciação entre as populações (Hartl *et al*, 1997). Foi realizado também um teste de interação entre os valores de  $F_{st}$  e  $G_{st}$  de cada uma das populações (Tabela 4).

Tabela 1: Diversidade gênica e heterozigosidade média em populações de *Schinus terebinthifolius* da bacia do Rio Tibagi.

Populações	Diversidade Gênica	Heterozigosidade (%)
Alto1	0,664	0,664
Alto 2	0,628	0,628
Médio 1	0,462	0,462
Médio 2	0,487	0,489
Baixo 1	0,558	0,557
Baixo 2	0,462	0,465
Média	0,544	0,544

Tabela 2: Distância genética de Nei (1978) entre populações de *Schinus terebinthifolius* da bacia do Rio Tibagi.

Populações	Alto 1	Alto 2	Médio 1	Médio 2	Baixo 1	Baixo 2
Alto 1	0,000					
Alto 2	0.102	0,000				
Médio 1	0,277	0,159	0,000			
Médio 2	0,303	0,361	0,312	0,000		
Baixo 1	0,356	0,294	0,379	0,069	0,000	
Baixo 2	0,535	0,422	0,882	0,564	0,402	0,000

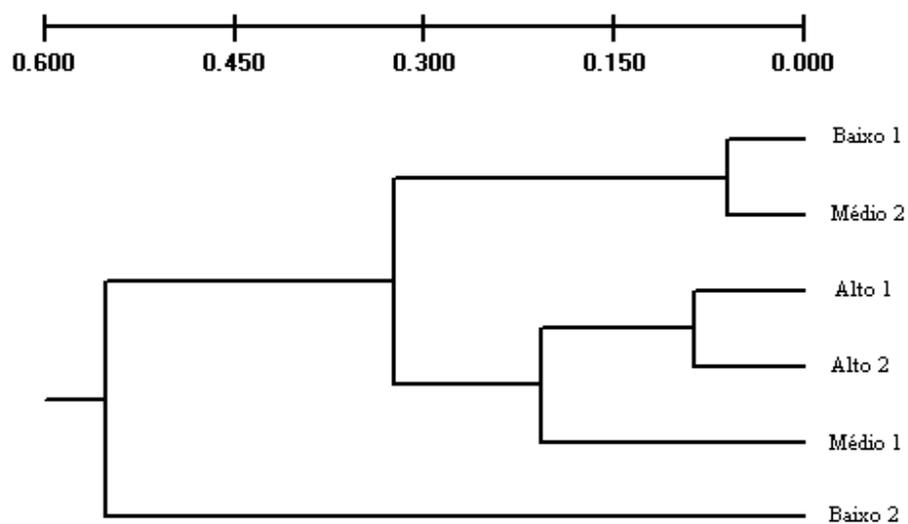


Figura 2: Dendrograma baseado na distância genética estimada por Nei (1978).

Tabela 3: AMOVA de seis populações de *Schinus terebinthifolius* da bacia do Rio Tibagi baseada no método  $F_{st}$ .

F.V.	G.L.	S.Q.	C.V.	% de Variação
Entre populações	5	108,414	0,339	19,930***
Dentro de populações	354	481,700	1,361	80,070
Total	359	590,114	1,699	–

\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; NS: não significativo (teste de significância dado por 1000 permutações).

Tabela 4: Interação dos parâmetros genéticos das seis populações de *Schinus terebinthifolius* da bacia do Rio Tibagi.

Interação	G <sub>st</sub>	F <sub>st</sub>	Fit	Fis
Alto1 x Alto2	0,040	0,042**	0,074	0,033
Alto1 x Médio1	0,164	0,164**	0,133	-0,038
Alto1 x Médio 2	0,165	0,166**	0,060	0,127***
Alto1 x Baixo1	0,158	0,158**	0,152	0,006
Alto1 x Baixo2	0,253	0,253**	0,096	-0,209
Alto2 x Médio1	0,111	0,111**	0,152	0,046
Alto2 x Médio2	0,195	0,195**	0,156	-0,048
Alto2 x Baixo1	0,144	0,144**	0,205	0,072
Alto2 x Baixo2	0,230	0,229**	0,129	0,406**
Médio1 x Médio2	0,224	0,224**	0,109	-0,148
Médio1 x Baixo1	0,229	0,229**	0,227	-0,002
Médio1 x Baixo2	0,410	0,410**	0,263	-0,249
Médio2 x Baixo2	0,327	0,326**	0,091	0,091*
Baixo1 x Médio2	0,055	0,055**	-0,040	-0,101
Baixo1 x Baixo2	0,244	0,244**	0,100	-0,1991
Total	0,200	0,200**	0,130	-0,088

Intervalo de confiança de 95%; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; (teste de significância dado por 100000 permutações para F<sub>st</sub>).

## Discussão

No presente trabalho foram utilizados 5 locos de microssatélites aplicados em seis populações da Bacia do Tibagi, estes se mostraram 100% polimórficos nas seis populações estudadas. Na população do Alto Tibagi 1, foram encontrados até seis alelos diferentes para um único locus de microssatélite e na população Baixo 2 foram encontrados apenas 2 alelos para um único loco amplificado. Foi estimado o fluxo gênico  $Nm = 1,111$  indicando que apesar da distância que separam estas populações, ainda ocorre um alto fluxo gênico. Govindajaru (1989) distinguiu três níveis de fluxo gênico: alto  $Nm > 1$ , intermediário ( $0,25 < Nm < 0,99$ ) e baixo  $Nm < 0,25$ . De acordo com esta definição o fluxo gênico encontrado neste estudo foi alto (1,111). Sendo a estimativa de fluxo gênico calculada através dos parâmetros  $F_{st}$  e  $R_{st}$  (Zucci, 2002), o fluxo estimado neste trabalho não deve ser considerado contemporâneo, mas baseado na história genética destas populações. Dessa forma, deve-se atentar para este fato nos estudos de conservação genética dessa espécie, bem como em outros estudos que utilizam esta estimativa (Zucci, 2002). Este alto fluxo gênico pode estar na verdade expressando um fluxo remanescente de quando estas populações tinham uma formação contínua por toda a área de estudo, já que a fragmentação destas áreas é recente, tendo ocorrido nos últimos 50 anos.

Foi encontrada uma alta diversidade gênica média de 0,544 e heterozigosidade média de 0,544 entre as populações estudadas, indicando que estas populações são bem distintas (Tabela 1). Estes valores se apresentaram maiores que os encontrados por Williams *et al.* (2005). Estes autores encontraram uma heterozigosidade média de 0,45

quando estudaram seis populações de *Schinus terebinthifolius* da América do Sul. Já o  $F_{st}$  encontrado neste trabalho foi de 0,199 (Tabela 3), valor este igual ao encontrado por Williams (2005) nas seis espécies sul americanas estudadas por ele. Este valor de  $F_{st}$  demonstrou uma alta estruturação genética entre populações, indicando que apesar do fluxo gênico ser considerado alto, estas populações possuem estruturas genéticas próprias. Quando duas populações de *Schinus terebinthifolius* da regiões Baixo e Médio Tibagi foram estudadas utilizando marcadores de RAPD, foi encontrado um  $F_{st}$  de 0,137, podendo esta diferença estar ligada a natureza distinta dos dois tipos de marcadores utilizados.

Estas populações apresentaram uma distância genética (Nei, 1978) que variou de 0.102 entre as populações Alto 1 e Alto 2, e 0,882 entre as populações Médio 1 e Baixo 2 (Tabela 2). Quando estas distâncias foram utilizadas para construção de um dendrograma (Figura 2), pôde se verificar a formação de dois grupos, sendo um composto pelas populações Baixo 1 e Médio 2, outro pelas populações Alto 1 e Alto2 e ligeiramente mais distante Médio 1 e um “outgroup” formado pela população Baixo 2, que se encontrou isolada das demais populações. Levando-se em conta que as condições climáticas e do solo são homogêneas para as populações somente em cada uma das três regiões (Alto, Médio e Baixo Tibagi), não pode ser feita uma correlação entre a distância genética as condições do solo e clima destas regiões. Esta distribuição da distância genética então pode estar relacionada com fatores antropomórficos, como desmatamento, já que visivelmente, algumas destas áreas de coleta apresentaram um maior desmatamento do que outras. Ainda neste trabalho, foram calculado os  $F_{st}$  e  $G_{st}$  relacionando cada uma das populações duas a duas (Tabela 4). Nesta interação foi possível verificar que estes  $F_{st}$  e

$G_{st}$  se apresentaram homogêneos entre si e que houve uma correlação positiva entre o aumento da distância genética e os índices de estruturação genética ( $F_{st}$  e  $G_{st}$ ) de cada uma das populações. Esta correlação reforça a solidez dos resultados, demonstrando que as populações que se mostraram mais próximas entre si no dendrograma foram as que apresentaram menores  $F_{st}$ ,  $G_{st}$  e menores distâncias genéticas quando comparadas. Estes resultados corroboram com os obtidos por Kageyama *et al.* (2003), quando estudaram duas espécies pioneiras (*Trema micrantha* e *Cecropia pachystachya*), sendo que estes autores sugerem que o padrão observado de estruturação genética esteja diretamente ligado ao ciclo de vida das plantas, alta densidade populacional e ocorrência agregada de dispersão de plantas pioneiras, promovendo assim uma alta diferenciação genética entre as populações que se apresentam mais distantes.

O  $F_{is}$  e o  $F_{it}$  para estas populações foi baixo, 0,130 e - 0,088, respectivamente, demonstrando que estas populações desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg, mas este desvio foi pequeno. Boys *et al.* (2005) em seu trabalho com *Pinus resinosa*, observaram altos níveis de  $F_{is}$  e  $F_{it}$  (0,504 e 0,643, respectivamente), demonstrando que as populações desviaram muito do equilíbrio de Hardy-Weinberg causando uma acentuada perda de heterozigose. Esta perda acentuada, não foi observada em *Schinus molle* que manteve níveis relativamente altos de heterozigosidade.

## **Conclusões**

Não foi possível relacionar a estrutura genética de cada uma das populações com as condições ambientais de cada uma das três regiões de estudo. Levando este fator em

conta, para fins de conservação se faz necessário então, uma ampla amostragem de cada uma das populações estudadas e não uma amostragem por região de estudo.

### **Referências Bibliográficas**

Aizen, M.; Feinsinger, P. 1994. Habitat fragmentation, native insect pollinators, and feral honeybees in Argentine 'Chaco Serrano. **Ecological Applications**, 4, 378-392.

Boys, J.; Cherry, M.; Dayanadan, S. 2005. Microsatellite analysis reveals genetically distinct populations of Red Pine (*Pinus resinosa*, Pinaceae). **American Journal of Botany** 92(5): 833-841.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v.19, n.1, p.11-15.

England, P. R.; Ayre, D. J.; Whelan, R. J. 2002. Do introduced honeybees lower outcrossing rates in the rare Australian shrub *Grevillea macleayana*. **Conservation Biology**, 15, 1645-1655.

Ellstrand, N.; Elam, D. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual review of Ecology and Systematics**, 24, 217-242.

EXCOFFIER, L.; SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J. M.; ROESSLI, D. 2005. **Arlequin Ver. 3.1: A Software for population genetic data analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. **Genetics** 131: 479-491.

Frankham, R. 1995. **Conservation genetics**. Annual Review of genetics, 29, 305-327.

Gustafsson, S. 2000. Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. **Molecular Ecology**, 9 1863-1872.

HARTL, D.L.; CLARK, A. G. 1988. **Principles of population genetics**. Sinauer Associates. Massachusetts.

Kageyama, P. Y.; Sebben, A.M.; Ribas, L.A.; Gandara, F. B.; Castellen, M.; Percim, M. B.Vencowsky, R. 2003. Diversidade genética em espécies trapiicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, nº 64, p. 93-107.

Kremen, C.; Ricketts, T. 2000. Global perspectives on pollination disruptions. **Conservation Biology**, 14, 1226-1228.

Lamont, B.; Klinkhamer, P.; Witkowski, E. 1993. Population fragmentation may reduce fertility to zero in *Bankisia goodii* – a demonstration of the Allee effect. **Oecologia**, 94, 446-450.

Lorenzi, H. 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**.

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

Newman, D.; Pilson, D. 1997. Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental population of *Clarkia pulchella*. **Evolution**, 512, 354-362.

Saccheri, I.; Kuussaari, M. Kankare, M.; Vikman, P.; Fortelius, W.; Kanski, I. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly meta-population. **Nature**, 392, 491-494.

Willians, D. A.; Overholt, W. A.; Cuda, J.P.; Hughes, C. R. 2005. Chloroplast and microsatellite DNA diversities reveal the introduction history of Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolius*) in Florida. **Molecular Ecology** 14, 3643–3656

Willians, D. A.; Sternberg, D. S. L.; Hughes, C. R. 2002. Characterization of polymorphic microsatellite loci in the invasive Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolius*. **Molecular Ecology Notes**, **2**, 231–232

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

Yeh, F. C.; Boyle, T.; Rongcai, Y.; Ye, Z.; Xiyang, J. M. **.Popgene 1.31, a software for for the analysis of genetic variation among and within populations using co-dominant and dominant markers.**

Young, A. G.; Clarke, G. M. 2000. Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations. **Cambridge University Press**, Cambridge, UK.

Zucci, M. A. 2002. Tese de Doutorado: Análise da Estrutura genética de *Eugenia dysenterica* utilizando marcadores RAPD E SSR. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Piracicaba** 130 p.

## 6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, P. H.; PEZESHKI, S. R. 2001. Effects of flood pre-conditioning on responses of three bottomland tree species to soil waterlogging. **J. Plant Physiol.** 158: 227-233.

ARMSTRONG, W. 1979. Aeration in higher plants. **Adv. Bot. Res.**, v. 7, p. 225-332.

ARMSTRONG, W.; BRÄNDLE, R.; JACKSON, M. B. 1994. Mechanisms of flood tolerance in plants. **Acta Bot. Neerl.**, v. 43, n. 4, p. 307-358.

ASSIS, M.A. 1991. Fitossociologia de um remanescente de mata ciliar do Rio Invinheima, MS. **Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.**

ATWELL, B. J. & STEER, B. T. 1990. The effect of oxygen deficiency on uptake and distribution of nutrients in maize plant. **Plant Soil**, 122(1): 1-8.

BARBOSA, L.M.; ASPERTI, L.M. & BARBOSA, J.M. 1996. Características importantes de componentes arbóreos na definição dos estágios sucessionais em florestas implantadas. **4º Simpósio Internacional de Ecossistemas Florestais**, Anais, p.242-245.

BARBOSA, L.M. 2000. Considerações gerais e modelos de recuperação de formações ciliares. **Matas Ciliares – Conservação e recuperação. Edusp.** 289-312. São Paulo.

BARROSO, G. M., 1984. Sistemática de Angiospermas do Brasil. **UFV, Viçosa**, v.2. p.266-267.

BEYERMANN, B.; NURNBERG, P.; WEIEHE, A.; MEIXNER, M.; EPPLEN, J. T. 1992. Fingerprinting plant genomes with oligonucleotide probes specific for simple repetitive DNA sequences. **Theor. Appl. Genet.**, 83: 691-694.

BIACHINI, E.; MEDRI, M.E.; PIMENTA, J.A.; GUILONE, P. C.; KOLB, R.M.; CORREA, G.T. 2000. Ecological anatomy of *Chorisia speciosa* A. St.-Hil submitted to flooding. São Paulo. **Revista Brasileira de Biologia**.

BIANCHINI, E. 1998. Ecologia de populações de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engle. no Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, Pr. **Tese de doutorado**. Universidade de Campinas, Campinas, SP.

BLOM, C.W.P.M. 1999. Adaptations to Flooding Stress: From Plant Community to Molecule. **Plant Biol.** 1: 261-273

BLOM, C. W. P. M.; VOESENEK, L. A. C. J.; BANGA, M.; ENGELAAR, W. M. H. G.; RIJNDERS, J. H. G. M.; STEEG, H. M. VAN DE; VISSER, E. J. W. 1994. Physiological ecology of riverside species: adaptive responses of plants to submergence. **Ann. Bot.**, v. 74, p. 253-263.

BLOM, C. W. P. M.; BÖGEMANN, G. M.; LAAN, P.; VAN DER SMAN, A. J. M.; VAN DE STEEG, H. M.; VOESENECK, L. A. C. J. 1990. Adaptations to flooding from river areas. **Aquatic Bot.** 38: 29-47.

BOWCOCK, A. M.; RUIZ-LINARES, A.; TOMFOHRDE, J.; MINCH, E.; KIDD, J. R.; CAVALLI-SFORZA, L. L. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. **Nature**, 368: 455 – 457.

BRADFORD, K. J.; YANG. S. F. 1980. Stress-induced ethylene production in the ethylene-requiring tomato mutant diageotropica. **Plant Physiol.**, v. 65, p. 327-330.

BRAILSFOLD, R. W.; VOESENEK, L. A. C. J.; BLOM, C. W. P. M.; SMITH, A. R.; HALL, M. A.; JACKSON, M. B. 1993. Enhanced ethylene production by primary roots of

*Zea mays* in response to sub-ambient partial pressure of oxygen. **Plant Cell Environment**, v. 16, p. 1071-1080.

CAO, F. L.; CONNER, W. H. 1999. Selection of flood-tolerant *Populus deltoides* clones for reforestation projects in China. **For. Ecol. Manage.** 117: 211-220.

CARLSON, J. E.; TULSIERAM, L. K.; GALUBITZ, J. C.; LUK, V. W. K.; JAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F<sub>1</sub> progeny of conifers. **Theor. Appl. Genet.**, 83: 194-200.

CHEN, H.; QUALLS, R. G.; MILLER, G. C. 2002. **Adaptive responses of *Lepidium latifolium* to soil flooding: biomass allocation, adventitious rooting, aerenchyma formation and ethylene production.** *Environmental and Experimental Botany* 48: 119-128.

CLEMENS, J.; KIRK, A. M.; MILLS, P. D. 1978. **The resistance to waterlogging of three *Eucalyptus* species.** *Oecol.*, v. 34, p. 125-131.

COCKERHAM, C.C. 1969. Variance of gene frequencies. **Evolution**, v.23, p.72-84.

COELHO, A.S.G. 2000. **Dboot: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores (software).** Goiânia: UFG, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Genética Vegetal.

COLMER, T.D. 2003. **Aerenchyma and an inducible barrier to radial oxygen loss facilitate root aeration in upland, paddy and deep-water rice (*Oryza sativa* L.).** *Annals of Botany* 91: 301-309.

COLIN-BELGRAND, M.; DREYER, E.; BIRON, P. 1991. **Sensitivity of seedlings from different oak species to waterlogging: effects on root growth and mineral nutrition.** *Ann. Sci. For.*, v. 48, p. 193-204. 1991.

COLLI, S. 1998. **Aspectos hormonais, anatômicos e do desenvolvimento de duas espécies de *Croton* submetidas ao alagamento.** Tese, Instituto de Biociências de São Paulo. São Paulo.

COLOMBO, L.R. **Efeito do alagamento sobre a anatomia de *Croton urucurana* (Baill.) Smith; Downs (Euphorbiaceae), 1996.** Monografia, Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 44 p.

CRAWFORD, R. M. M. 1978. **Metabolic adaptation to anoxia.** In: Plant life in anaerobic environments. HOOK, D. D.; CRAWFORD, R. M. M. Michigan: Ann Arbor Science. p. 119-136.

CRAWFORD, R.M.M. 1989. **Studies in plant survival.** Oxford: Blackwell Scientific Publications.

CRAWFORD, R.M.M. 1992. **Oxygen availability as an ecological limit to plant distribution.** Advances in Ecological Research, v. 23, p. 93-185.

CRAWFORD, R. M. M.; BRAENDLE, R. 1996. **Oxygen deprivation stress in a changing environment.** J. Exp. Bot., v. 47, n. 295, p. 145-159.

CROONQUIST, M.J. & BROOKS, K.P. 1993. **Effects of habitat disturbance<sup>3</sup> on bird communities in riparian corridors.** Soil Water Conserv. 48: 65-70.

DAVANSO-FABRO, V. M.; MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A. 1999. **Tolerância à inundação: aspectos da anatomia ecológica e do desenvolvimento de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (FABACEAE).** Braz. Arch. Biol. Technol.

DIAS, M. C.; VIEIRA, A. O. S.; PAIVA, M. R. C. . 2002. **Florística e fitossociologia das espécies arbóreas das florestas da baía do rio Tibagi**. In: A bacia do Rio Tibagi. 109-124.

DAVY, A.J.; NOBLE, S.M.; OLIVER, R.P. 1990. Genetic variation and adaptation to flooding in plants. In: *Aquatic Botany*. Vol. 38. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, p. 91-108.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v.19, n.1, p.11-15.

DREW, M. C.; COBB, B.G.; JOHNSON, D. A.; MORGAN, P. W.; JORDAN, W.; HE, C. J. 1994. Metabolic acclimation of root tips to oxygen deficiency. **Annal of Botany**, v. 74, p. 281-286.

DREW, M.C. 1992. Soil aeration and plant root metabolism. **Soil Sci**. 154: 259-268.

DREW, M. C.; STOLZY, H. 1991. Growth under oxygen stress. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkai U, eds. **Plant roots – the hidden half**. Dekker: New York, 331-350.

DREW, M. C. 1988. Effects of flooding in oxygen deficiency on plant mineral nutrition. In: Advances in plant nutrition, v.3. B. Tinker & A. Läuch (eds.). **Praeger**, New York. Pp. 115-159.

DREW, M. C.; JACKSON, M. B.; GIFFARD, S.; CAMPBELL, R. 1981. Inhibition by silver ions of gas space (aerenchyma) formation in exogenous ethylene or to oxygen deficiency. **Planta**, v. 153, p. 217-224.

DREW, M. C.; JACKSON, M. B.; GIFFARD, S. C. 1979. Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in *Zea mays* L.. **Plant**, v. 147, p.83-88.

ERNST, W. H. O. 1990. Ecophysiology of plants in waterlogged and flooded environments. **Aquatic Bot.**, v. 38, p. 73-90. 1990.

ESAU, K. 1990. Anatomia das plantas com sementes. **Edgard Blücher**, São Paulo, p.129.

EWING, K. 1996. Tolerance of four wetland plant species to flooding and sediment deposition. **Environmental and Experimental Botany**, v. 36, p. 131-146.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. **Genetics** 131: 479-491.

FELDMAN, L. P. 1984. Regulation of root development. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. 35, p. 223-242.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1996. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2º ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995, pp.220.

FUTUYMA, D.J. 1993. **Biologia evolutiva**. 2.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 631p.

FOX, T.C.; KENNEDY, R.A.; RUMPHO, M.E. 1994. Energetics of plants growth under anoxia: metabolic adaptations of *Oryza sativa* and *Echinochloa phullopogon*. **Ann. Bot.** 74: 445-455.

GALLO, M. C. C. 2002. **Tolerância ao alagamento e caracterização da variação genética em populações ciliares de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae)**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

GILL, C.J. 1970. **The flooding tolerance of woody species – a review.** Forestry Abstract. V.31, p. 671-688.

GRIMOLDI, A. A.; INSAUSTI, P.; ROITMAN, G. G.; SORIANO, A. 1998. Responses to flooding intensity in *Leontodon taraxacoides*. **New Phytology**, v.141, p. 119-128.

HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 79: 6465-6469.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W.; SHERMAN-BOYLERS, S.L. 1992. **Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species.** New Forest. 6: 95-124

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. 1990. **Alloenzyme diversity in plant species.** In: A.H.D. BROWN; M.T. CLEGG, A.L. KAHLER; B.S. WEIR (eds.) **Plant population genetics, breeding, and genetic resources**, 43-63. Sinauer, Sanderland, MA, USA.

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

HARTL, D.L.; CLARK, A. G. 1988. **Principles of population genetics.** Sinauer Associates. Massachusetts.

HEYHOOD, V.H. 1989. **Estratégia dos jardins botânicos para a conservação.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

HOLLINGWORTH, P.M.; ENNOS, R.A. 2004. **Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure.** *Heredity* 92, 490-498. doi:10.1038/sj.hdy.6800445

HOOK, D. D.; SCHOLTENS, J. R. 1978. **Adaptations and flood tolerance of tree species.** In: Plant life in anaerobic environments. HOOK, D. D.; CRAWFORD, R. M. M. Michigan: Ann Arbor Science. p. 299-331.

HUANG, B.; JOHNSON, J.W.; BOX, J.E.; NE SMITH, D.S. 1997. **Root characteristics and hormone activity of wheat in response to hypoxia and ethylene.** Crop Science, v. 37, p. 812-818.

HUFF, P. R.; SMOUSE, P.E. 1993. **RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalo grass (*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.).** *Theoretical and Applied Genetics* 86: 927-934.

JACSON, M.B.; CAMPBELL, D.J. 1975. **Ethylene and waterlogging effects in tomato.** *Annals of Applied Biology*, v.81, p. 102-105.

JACKSON, M. B.; DREW, M. C. 1984. **Effect of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants.** In: Kozlowski; T. T. (ed.) *Flooding and plant growth*. London: Academic. p. 47-128.

JACKSON, M. B.; OSBORNE, D. J. 1970. Ethylene: the natural regulator of leaf abscission. **Nature** 225: 1019-1022.

JOLY, C. A. 1996. The Role of Oxygen Diffusion to the Root System on the Flooding Tolerance of Tropical Trees. *Revista Brasileira de Biologia* 56(2): 375-382.

JOLY, C. A. 1994. Flooding tolerance: a reinterpretation of Crawford's metabolic theory. **Proceedings of the Royal Society of Edimburg**, v. 102B, p. 343-354.

JOLY, C. A. & CRAWFORD, R. M. M. 1982. Variation in tolerance and metabolic responses to flooding in some tropical trees. **J. Exp. Bot.** 33: 799-809.

JUSTIN, S. H. F. W.; ARMSTRONG, W. 1991. Evidence for the involvement of ethylene in aerenchyma formation in adventitious roots rice (*Oriza sativa* L.). **New Physiol.**, v. 118, n. 1, p. 49-62.

KAGEYAMA, P.Y. 1994. Dinâmica de Populações de Espécies Arbóreas: implicações para o manejo e conservação. **In.** III Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira – subsídios a um gerenciamento ambiental. V.2 Mata Atlântica e Ecossistemas Marinhos. Serra Negra, São Paulo, p.1-7.

KAGEYAMA, P.Y.; CASTRO, C.F.A.; CARPANEZZI, A.A. 1989. Implantação de matas ciliares: estratégias para auxiliar a sucessão secundária. **In:** Simpósio sobre mata ciliar (L.M. Barbosa, ed.), Fundação Cargill, Campinas, p. 131-143.

KAWASE, M. 1981. Anatomical and morphological adaptation of plants to waterlogging. **Hort. Sci.**, 16: 30-34.

KAWASE, M. 1978. **Anaerobic elevation of ethylene concentration in waterlogged plants.** Amer. J. Bot. 65(7): 736-740.

KELLER, C. M. E.; ROBBINS, C. S.; HATFIELD, J.S. 1993. **Avian communities in riparian forests of different widths in Maryland and Delaware.** **Wetlands.** 13: 137-144.

KOLB, R. M.; MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; GILONI, P. C.; CORREA, G. T. 1998. Anatomia ecológica de *Sebastiania commersoniana* (Baillon) Smith & Downs (Euphorbiaceae) submetida ao alagamento. **Rev. Bras. Bot.**, p. 305-312 v. 21.

KONINGS, H. 1982. Ethylene-promoted formation of aerenchyma in seedling roots of *Zea mays* L. under aerated and non-aerated conditions. **Physiologia Plantarum**, v. 54, p. 119-124.

KONINGS, H. & JACKSON, M.B. 1979. A relationship between rates of ethylene production by roots and the promoting or inhibiting effects of exogenous ethylene and water on root elongation. **Zeits. Pflanzenphysiol.** 92: 385-397.

KOZLOWSKI, T.T. 1984. Flooding and Plant Growth. **Academic Press**, London.

KRANJCEC, J.; MAHONEY, J.M.; ROOD, S.B. 1998. The responses of three riparian cottonwood species to water table decline. **For. Ecol. Manage.** 110: 77-87.

LAAN, P.; CLEMENT, J.,A.M.; BLOM, C.W.P.M. 1991. **Growth and development of *Rumex* roots as affected by hipoxiv and anoxiv conditions.** *Plant Soil.* 136: 145-151.

LARSON, K. D.; SCHAFFER, B.; DAVIES, F. S. 1993. Floodwater oxygen content, ethylene production and lenticel hypertrophy in flooded mando ( *Mangifera indica* L. ) trees. **J. Exp. Bot.** 44: 665-671.

LEVIN, D.A.; KESTER, H.W. Gene flow in seed plants. **Evolutionary Biology**, v.7, p.139-220, 1974.

LIMA, W. P. 1989. Função hidrológica da mata ciliar. **In: Simpósio sobre mata ciliar.** BARBOSA, L. M. Campinas: Fundação Cargil.

LITT, M. & LUTY, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinocletide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.** 44: 398-401.

LOBO, P.C. 1990. Variações morfo-anatômicas e fisiológicas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Bren. e *Cedrela fissilis* Vell. submetidas à aplicação de diferentes fitorreguladores. **Monografia, Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina**, 46 p.

LOBO, P.C.; JOLY, C.A. 1995. Tolerance to hypoxia and anoxia in neotropical tree species. In: Scarano FR, Frando AC, eds. *Ecophysiological strategies of xerophytic and amphibious plants in the neotropics*. **Series Oecologia Brasiliensis**: PPGE-UFRJ, Brazil, 4: 137-156.

LOPEZ, O. R.; KURSAR, T.A. 1999. Flood Tolerance of four Tropical Tree Species. ***Tree Physiology* 19: 925-932.**

LORENZI, H. 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa**: Plantarum.

LOVE, J. M., KNIGHT, A. M.; MCALEER, M. A.; TODD, J. A. 1990. Toward construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatélites. **Nucl. Acids. Res.**, 18: 4123-4130.

MACHADO, P.A.L. 1989. Legislação das matas ciliares. **In: Simpósio sobre mata ciliar. (L.M. Barbosa, ed.)**, Fundação Cargill, Campinas, p.2-10.

MANTOVANI, W. 1989. Conceituação e fatores condicionantes. **In: Simpósio sobre mata ciliar. BARBOSA, L.M.** Campinas: Fundação Cargill.

MARINHO FILHO, J. S. & REIS, M. L. 1989. A fauna de mamíferos associada às matas de galeria. **In: Simpósio sobre mata ciliar. BARBOSA, L. M.** Fundação Cargill, Campinas.

MARQUES, M. C. M.; PIMENTA, J. A.; COLLI, S. 1996. Aspectos do metabolismo e da morfologia de *Cedrella fissilis* (Vell.) e *Anadenanthera columbiana* (Vell.) Bren.

submetidas a diferentes regimes hídricos. **Arquives in Biological Technology** 39: 385-392.

MCKELVIN, M.R.; HOOK, D.D.; MCKEE JR, W.H. 1995. Growth and nutrient use efficiency of water tupelo seedlings in flooded and well-drained soil. **Tree Physiology**, v. 15, p. 753-758.

MEDRI, M. E.; CORREA, M. A. 1985. Aspectos histológicos e bioquímicos de *Joannesia principis* e *Spathodea campanulata*, crescendo em solos drenado, encharcado e alagado. **Semina**, v. 6, n. 3, p. 147-154.

MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; DELGADO, M. F.; CORREA, G. T. 1998. Aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de *Peltophorum dubium* (Spr.) Taub. submetida ao alagamento e aplicação de ethrel. **Rev. Bras. Bot.**, v. 21, p.261-267.

MENGES, E. S.; WALLER, D. M. 1983. Plant Strategies in Relation to Elevation and Light in Floodplain Herbs. **American Naturalist**, Vol. 122, No. 4, pp. 454-473.

MENOTTIRAYMAND, M. A.; OBRIEN, S. J. 1995. Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of *Felidae*. **J. of Heredity** 86: 319-322.

MIELKE, M.S.; ALMEIDA, A.A.F.; GOMES, F.P.; MANGABEIRA, P.A.O.; SILVA, D.C. 2005. Effects of Soil Flooding on Leaf Gas Exchange and Growth of Two Neotropical Pioneer Tree Species. **New Forest** 29: 161-168.

MOOG, P.R.; JANIESCH, P. 1990. Root-Growth and Morphology of *Carex* species as influenced by Oxygen Deficiency. **Functional Ecology** 4(2): 201-208.

MOOG, P.R. 1998. Flooding tolerance of *Carex* species. I. Root structure. **Planta** 207: 189-198.

MOORE, S. S.; SARGEANT, L. L.; KING, T. J.; MATTICK, J. S.; JORGE, M.; HETZEL, D. J.; 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics** 10(3):654-60.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The plant J.**, 3: 175-182.

NAIMAN, R.J.; DÉCAMPS, H. 1997. The ecology of interfaces: riparian zones. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, 28:621-658.

NASH, L. J. & GRAVES, W. R. 1993. Drought and flood stress effects on plant development and leaf water relations of five taxa native to bottomland habitats. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 118: 845-850.

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Am. Nat.** 106: 283-292.

NEI, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided population. **Annals of Human Genetics**, v.41, p.225-33.

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

NEI, M. 1987. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York, NY.

NEWSOME, R. D.; KOZLOWSKI, T. T.; TANG, Z. C. 1982. Responses of *Ulmus americana* seedlings to flooding of soil. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 1688-1695.

NEIGEL, J.E. 1997. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers. **Annual Review Ecology Systematics**, v.28, p.105-128.

OBARA-OKEYO, P.; KAKO, S. 1998. Genetic diversity and identification of *cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Euphytica**, 99(2): 95-101.

OSONUBI, O.; OSUNDINA, M.A. 1987. Comparison of the responses to flooding of seedlings and cuttings of Gmelina. **Tree Physiol.**, 3: 147-156.

PEPIN, L.; AMIGUES, Y.; LEPINGLE, A.; BERTHIER, J. L.; BENSALD, A.; VAIMAN, D. 1995. Sequence conservation of microsatellites between *Bos Taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogenyanalysis. **Heredity** 74: 53-61.

PELACANI, C.R.; OLIVEIRA, L.E.M.; CRUZ, J.L. 1998. Respostas de algumas espécies florestais à baixa disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo. I – Alterações em algumas características de crescimento. **Revta. Árv.**, 22(1): 61-67.

PIMENTA, J. A.; BIANCHINI, E.; MEDRI, M. E. 1998. Adaptations to flooding by tropical trees: morphological and anatomical modifications. In: SCARANO; F. R.; FRANCO, A. C. (eds.) Ecophysiological strategies of xerophytic and amphibious plants in the neotropics. **Oecologia Brasiliensis Series** v. IV. Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, p. 151-171.

PIMENTA, J. A.; MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; MULLER, C.; OKAMOTO, J. M.; FRANCISCONI, L. M. J.; CORREA, G. T. 1996. Aspectos da morfoanatomia e fisiologia de *Jacarandá puberula* Cham. (Bignoneaceae) em condições de hipoxia. **Revista Brasileira de Botânica** 19: 215-220.

PIMENTA, J. A.; ORSI, M. M.; MEDRI, M. E. 1994. Aspectos morfológicos e fisiológicos de *Coleus blumei* Benth. submetido à inundação e à aplicação de ethrel e cobalto. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 53, n. 4, p. 427-433.

PINTO, L.R. 2001 Análise da estrutura genética das populações de milho (*Zea mays* L.) BR-105 e BR-106 e respectivos sintéticos IG-3 e IG-4 por meio de microssátelites, Piracicaba, 142p. **Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Universidade de São Paulo.

PONNAMPERUMA, F.N. 1984. Effects of flooding on soil. **In: Flooding and plant growth.** KOZLOWSKI, T.T. Academic Press, London.

POWELL, W.; MACHRAY, G.C.; PROVAN, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trend in Plant Science**, V. 1(7): 215-222(8).

PURNOBASUKI, H.; SUZUKI, M. 2004. Aerenchyma Formation and Porosity in Root of a mangrove plant, *Sonneratia alba* (Lythraceae). **Journal of Plant Research** 117: 465-472.

RALFASKI, J. A.; TINGLEY, S. V.; WILLIAMS, J. G. K. 1991. RAPD markers – a new technology for genetic mapping and plant breeding. **AgBiotech News and Information** 3: 645-648.

RAJORA, O. P.; MOSSELER, A. 2001. Challenges and opportunities for conservation of Forest genetic resources. **Euphytica** 118: 197-212.

RIECHARDT, K. 1989. Relações água-solo-planta em Mata Ciliar. In: Barbosa, L.M. (ed.) **Simpósio sobre Mata Ciliar**, Campinas: Fundação Cargil, p. 20-24.

REID, D. M.; BRADFORD, K. J. 1984. Effects of flooding on hormone relations. Flooding and plant growth. Kozlowski, T. T. (ed). **Academic Press**, London 195-219.

REIS, M.S. 1996. Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmitero (*Euterpe edulis* Martius). **Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, USP, para obtenção do título de Doutor em Agronomia.**

REZENDE, A. V. 1998. Importância das matas e galeria: manutenção e recuperação. **In:** Cerrado: Matas de galeria. J.F. Ribeiro (Ed.). Embrapa, Planaltina. pp.3-16.

RINNE, P.; TUOMINEN, H.; JUNTILA, O. 1992. Arrested leaf abscission in the non-abscising variety of pubescent birch: developmental, morphological and hormonal aspects. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, n. 252, p. 975-982.

RIZZINI, C.T. 1976. Árvores úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira. São Paulo: **Edgard Blücher**.

ROBERTS, J.K.M.; CLLIS, J.; JARDETZKI, O.; WALBOT, V.; FREELING, M. 1984. Cytoplasmic acidosis as a determinant of flooding intolerance in plants. **Proceedings of Natural Academic Science**, v. 83, p. 6029-6033.

Saltonstall, K.; 2003. Microsatellite variation within and among North American lineages of *Phragmites australis*. **Molecular Ecology**, **12**: 1689-\_\_\_\_\_.

SALVADOR, J.C. L. 1987. Considerações sobre as matas ciliares e a implantação de reflorestamentos mistos nas margens de rios e reservatórios. **Série Divulgação e informação**, 105. São Paulo: CESP.

SAS 1990. **SAS Procedures guide**. SAS Inc, Cary NC, 544p.

SCARANO, F.R.; CRAWFORD, R.M.M. 1992. Ontogeny and the Concept of Anoxia-tolerance: the case of the Amazonian Leguminous Tree *Parkia pendula*. **Journal of Tropical Ecology** 8: 349-352.

SCHMULL, M.; THOMAS, F.M. 2000. Morphological and Physiological reactions of young deciduous trees (*Quercus robur* L., *Q. patrea* (Matt.) Liebl. *Fagus sylvatica* L.) to waterlogging. **Plant and Soil**, v. 225, p.227-242.

SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J. M.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. 1997. Arlequin Ver. 1,1: A Software for population genetic data analysis. **Genetics and Biometry Laboratory**, University of Geneva, Switzerland.

SCHLÜTER, U. B.; FURCH, B.; JOLY, C. A. 1993. Physiological and anatomical adaptations by young *Astrocaryum jauari* Mart. (Araceae) in periodically inundated biotopes of Central Amazonia. **Biotropica**, v. 25, p. 384-396. 1993.

SLATKIN, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, v.39, n.1. p.53-65.

SLATKIN, M. 1981. Estimating level of gene flow in natural populations. **Genetics**, v.99, p.323-335.

SENA-GOMES, A. R. & KOZLOWSKI, T. T. 1980. Growth responses and adaptations of *Fraxinus pennsylvanica* seedlings to flooding. **Plant Physiol.**, 66: 267-271.

SERODIO, M.I.; NOVAIS, M.C. 1991. Nutrients, photosynthesis and growth of wheat under waterlogging soil conditions. **Revta. Brasil. Bot.** 14(2): 97-101.

SILVA, D. C. G. 2002. Tolerância ao Alagamento e Caracterização Genética de Populações de *Parapiptadenia rigida* Benth. Brennan (Leguminosae) Naturais de Mata Ciliar. **Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.**

- SMITH, J. S. C.; CHIN, E. C. L.; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL S. J.; M. L.; SENIOR, M. L.; MITCHELL S. E.; KRESOVICH S.; ZIEGLE, J. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPS and pedigree. **TAG**, 95: 163-173.
- SUN, M.; WONG, K. C. 2001. Genetic structure of three archid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **Amer. J. Bot.**, 88 (12): 2180-2188.
- SUN, M.; WONG, K. C. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.**, 86:1406-1413.
- TANG, Z. C. & KOZLOWSKI, T. T. 1982. Some physiological and growth responses of *Betula papyrifera* seedlings to flooding. **Physiol. Plan.**, 55: 415-420. 1982.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucl. Acid. Res.**, 17: 6463-6471.
- THORMANN, C. E.; FERREIRA, M. E.; CAMARGO, L. E. A.; TIVANG, J. G.; OSBORN, T. C. 1993. Comparison of genetic relationship estimates among cruciferous species based on RFLP and RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.**, 88: 973-980.
- TOPA, M. A.; MCLEOD, K. W. 1986. Response of *Pinus clausa*, *Pinus serotina* and *Pinus taeda* to anaerobic solution culture. **II- Changes in tissue nutrient concentrations and net acquisition. Physiologia Plantarum**, v. 68, p. 523-539.
- TSUKAHARA, H.; KOSLOWSKI, T. T. 1985. Importance of adventitious roots to growth of flooded *Platanus occidentalis* seedlings. **Plant and Soil**, v.88, p.123-132.

VAN der SMAN, A.J.M.; VOESENEK, L.A.C.J.; BLOOM, C.W.P.M.; HARREN, F.J.M.; REUSS, J. 1991. The role of ethylene in shoot elongation with respect to survival and seed output of flooded *Rumex maritimus* L. plants. **Funct. Ecol.** 5: 304-313.

VARTAPETIAN, B. B. 1993. Plant physiological responses to anoxia. **Internat. Crop Sci.**, v. 1, p. 721-726.

VARTAPETIAN, B. B.; JACKSON, M. B. 1997. Plant adaptations to anaerobic stress. **Annals of botany**, v. 79, suppl. A, p. 3-20.

VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. **Genetics and Molecular Biology**, v.15, p.53-60, 1992.

VIGOUROUX, Y.; JAQUETH, J. S.; MATSUOKA, Y.; SMITH, OS.; Beavis, W. D.; Smith J. S. C.; Doebley, J. 2002. Rate and Pattern of Mutation at Microsatellite Loci in Maize. **Molecular Biology and Evolution**, 19:1251-1260.

VISSER E.J.W.; NABBEN, R.H.M.; BLOM, C.W.P.M; VOESENEK, L.A.C.J. 1997. Elongation by primary lateral roots and adventitious roots during conditions of hypoxia and high ethylene concentration. **Plant Cell and Environment**. 20: 647-653.

VISSER E.J.W.; VOESENEK, L.A.C.J.; VARTAPETIAN, B.B.; JACKSON, M.B. 2003. **Flooding and Plant Growth**. *Annals of Botany* 91: 107-109.

VOESENECK, L. A. C. J.; ARMSTRONG, W.; BÖGEMANN, G. M.; McDONALD, M. P.; COLMER, T. D. 1999. A lack of aerenchyma and high rates of radial oxygen loss from the root base contribute to the waterlogging intolerance of *Bassica napus*. **Aust. J. Plant Physiol.** 26: 87-93.

- VOESENECK, L. A. C. J.; VAN DER VEEN, R. 1994. The role of phytohormones in plant stress. Too much or too little water. **Acta Botanica Neerlandica**. V. 43, p. 91-127.
- VOS, P.; HOTERS, R.; BLEEKER, M.; RIJANS, M.; VAN DER LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. 1995 A new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acid. Res.** 23: 4407–4414.
- VU, J.C.V.; YELENOSKY, G. 1991. Photosynthetic responses of citrus trees to flooding. **Physiologia Plantarum**, v. 81, p. 7-14.
- WALTERS, J.; OSBORNE, D.J. 1979. Ethylene and auxin-induced cell growth in relation to auxin transport and metabolism and ethylene production in the semi-aquatic plant *Rgnellidium diphyllum*. **Planta**, v. 146, p. 306-317.
- WATKIN, E.L.J.'CAMPBELL, J.T.; GREENWAY, H. 1998. Root Development and Aerenchyma Foramation in two Wheat Cultivars and One Triticale Cultivar Grown in Stagnant Agar and Aerated Nutrient Solution. **Ann. Bot.** 81: 349-354.
- WEISING, K.; WEIGAND, F.; DRIESEL, A. J.; KAHL, G.; ZISCHLER, H.; EPPLEN, J. T. 1989. Polymorphic simple GATA/GACA repeats in plant genomes. **Nucl. Acid. Res.**, 17: 120-128.
- WEIR, B.S. 1996. **Genetics data analysis II**: methods for discrete population genetic data. Suderland: Sinauer Associates, 455p.
- WELSH, J.; MCCLENDLLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, 18: 7213-7218.

WIEDENROTH, E. M. 1993. Responses of roots to hypoxia: their structural and energy relations with the whole plant. **Env. Exp. Bot.**, v. 33, p. 41-51.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology** 218: 704-740.

WRIGTH, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, p.395-420.

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

YAMAMOTO, F.; KOZLOWSKI, T. T. 1987. Effects of flooding, tilting of stems, and Ethrel application on growth, stem anatomy and ethylene production of *Pinus densiflora* seedlings. **J. Exp. Bot.**, v. 38, n. 187, p. 293-310.

YAMAMOTO, F.; SAKATA, T.; TERAZAWA, K. 1995. Growth, morphology, stem anatomy, and ethylene production in flooded *Alnus japonica* seedlings. **Iawa J.**, v. 16, n. 1, p. 47-59.

YORDANOVA, R. Y.; KOLEV, K. G.; SOINOVA, ZH. G.; POPOVA, L. P. 2004. Changes in the Leaf Polypeptide Patterns of Barley Plants Exposed to Soil Flooding. **Biol. Plantarum**. 48 v. 2: 301-304.

YOSHIKAWA, M.; HUKUSIMA, T. 1997. The impact of extreme run-of events from the Sakasaga river on the Senjogahara ecosystem, Nikko National Park. V. The importance of adventitious root systems for burial tolerance of diferent tree especies. **Ecological Research**, v. 12, p. 39-46.