



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAQUEL BARBOZA REIS DE OLIVEIRA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE CINCO POPULAÇÕES DE
Aegiphila sellowiana CHAM. (LAMIACEAE) DA BACIA DO
RIO TIBAGI POR MARCADORES MICROSSATÉLITES**

LONDRINA
2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

INSTITUTO AGRÔNOMICO DO PARANÁ

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

RAQUEL BARBOZA REIS DE OLIVEIRA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE CINCO POPULAÇÕES DE
Aegiphila sellowiana CHAM. (LAMIACEAE) DA BACIA DO
RIO TIBAGI POR MARCADORES MICROSSATÉLITES**

RAQUEL BARBOZA REIS DE OLIVEIRA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE CINCO POPULAÇÕES DE
Aegiphila sellowiana CHAM. (LAMIACEAE) DA BACIA DO RIO
TIBAGI POR MARCADORES MICROSSATÉLITES**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas

LONDRINA
2010

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48e Oliveira, Raquel Barboza Reis de.
Estrutura genética de cinco populações de *Aegiphila sellowiana* Cham. (Lamiaceae) da bacia do rio Tibagi por marcadores microssatélites / Raquel Barboza Reis de Oliveira. – Londrina, 2010.
63 f. : il.

Orientador: Paulo Mauricio Ruas.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2010.
Inclui bibliografia.

1. Genética de populações – Teses. 2. Genética molecular – Teses. 3. Genética florestal – Teses. 4. Florestas – Conservação – Teses. 5. Degradação ambiental – Teses. 6. Diversidade biológica – Teses. I. Ruas, Paulo Mauricio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

CDU 575.17:634.02

RAQUEL BARBOZA REIS DE OLIVEIRA

**ESTRUTURA GENÉTICA DE CINCO POPULAÇÕES DE *Aegiphila
sellowiana* CHAM. (LAMIACEAE) DA BACIA DO RIO TIBAGI POR
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. José Antonio Pimenta
Universidade Estadual de Londrina

Dr. Eduardo Augusto Ruas
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 24 de fevereiro de 2010.

A Deus e a minha família, imprescindíveis para a
minha formação e em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Roberto e Fátima, por me ensinarem com paciência e amor, por estarem presentes em todos os momentos, sempre me ajudando e me resgatando em minhas dificuldades, me aconselhando e incentivando. E também a minha avó Victória, pelas orações e palavras de confiança, por me mostrar que é sempre possível mudar para melhor.

Às minhas irmãs, Virgínia e Roberta, por me ajudarem todas as vezes em que precisei e por acreditarem que eu poderia fazer mais.

À Universidade Estadual de Londrina, em particular ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, por mais essa oportunidade e pelo suporte na realização desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas por orientar com paciência e dedicação, pela confiança e por me incentivar ao longo destes dois anos. Levarei sempre comigo os seus ensinamentos e bom humor. Para mim o sr. é um exemplo de profissionalismo, competência e determinação com a ciência.

À Prof^a. Dra. Claudete de Fátima Ruas, pela contribuição dada na qualificação, ensinamentos e incentivos.

Ao Prof. Dr. José Antonio Pimenta, pela colaboração e sugestões para a melhoria deste trabalho.

Ao Dr. Eduardo Augusto Ruas, por ter me auxiliado nas análises estatísticas, pela paciência em transmitir ensinamentos e também por ter contribuído como membro da comissão examinadora.

Aos colegas de laboratório: André R. O. Conson, Bruno F. Costa, Carina C. F. Lucio, Juliana Oliveira Damasceno, Laís B. de Souza, Leonardo G. Androcioli, Luana R. Alves e Maikel Reck. Quando eu cheguei “leiga” ao laboratório vocês praticamente pegaram em minhas mãos para me ensinar com paciência e lá estavam sempre quando eu precisava de uma (talvez duas, três...) mão(s) para me ajudar. Sem vocês, definitivamente, este trabalho não teria sido possível.

Aos colegas de curso, em especial à Jacqueline E. de Souza e ao Éverton T. Kunz, pelo companheirismo e bons momentos passados juntos. Para vocês, muito sucesso!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, principalmente ao Dr. Carlos A. Arrabal Arias, Dr. José Francisco F. de Toledo e Dr. Josué M. Ferreira, por ensinarem com disposição e alegria, pelas conversas, auxílio e sugestões.

À secretária do Programa Pós-Graduação, Sueli T. Miranda, por sempre ajudar, incansavelmente e com bom humor.

Ao Edson Mendes Francisco, do Departamento de Biologia Animal e Vegetal, por ter nos ajudado nas coletas de *Aegiphila sellowiana*.

À Dra. Vânia Moda-Cirino, por ter me acolhido por mais de um ano no IAPAR, por ser um exemplo de mulher e pesquisadora, pelos ensinamentos, orientações, carinho e amizade.

Aos funcionários do IAPAR, principalmente aos do Apoio do Feijão, do Laboratório de Sementes e aos colegas do Laboratório de Solos. A ajuda, amizade, sugestões e boas conversas não serão esquecidas. Guardo vocês em meu coração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

A todos aqueles que me ajudaram indiretamente nesta caminhada.

Muito obrigada!

OLIVEIRA, Raquel Barboza Reis. **Estrutura genética de cinco populações de *Aegiphila sellowiana* Cham. (Lamiaceae) da bacia do rio Tibagi por marcadores microssatélites.** 2010. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Aegiphila sellowiana é uma espécie arbórea nativa da Mata Atlântica. Por apresentar grande quantidade de frutos, dispersos por pássaros, crescimento rápido e ser indiferente às condições físicas do solo pode ser utilizada para recompor florestas e áreas degradadas. *A. sellowiana* se distribui ao longo de toda a bacia do rio Tibagi. Esta bacia sofreu um intenso processo de ocupação nos últimos 50 anos, principalmente com a expansão da cultura do café a partir da década de 1930. Com isso a cobertura florestal nativa da região foi reduzida a apenas 4% da original, podendo ser encontrada em pequenos fragmentos isolados entre si por culturas agrícolas e pastagens. A fragmentação florestal provoca alterações na dinâmica das populações, o que pode levar a consequências deletérias na diversidade genética. Estudos de genética de populações, utilizando técnicas moleculares, permitem avaliar a estrutura e a variabilidade genética de espécies de plantas em áreas fragmentadas. Visando a contribuir para estratégias de conservação e manejo de espécies arbóreas pioneiras da bacia do rio Tibagi, este trabalho objetivou estudar por meio de nove loci microssatélites, a diversidade e a estrutura genética de cinco populações de *A. sellowiana* ao longo da bacia. Neste estudo foram amostrados 150 indivíduos em cinco fragmentos denominados Baixo Tibagi 1 e 2, e Médio Tibagi 1, 2 e 3. Os níveis de diversidade genética obtidos nas cinco populações estudadas foram baixos, em média $H_O = 0,42$, quando comparados com outras espécies tropicais arbóreas. Os valores encontrados, nas populações do Baixo Tibagi 2, Médio Tibagi 1 e 3, para heterozigosidade observada foram maiores que os da heterozigosidade esperada. Nestas populações foram constatados valores de F_{IS} negativos, elevados e estatisticamente significativos, indicando que estas populações não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Observou-se que a maior parte da variabilidade está contida dentro das populações e não entre (80,30 e 19,70%, respectivamente). As análises moleculares indicaram diferenciação significativa e alta entre as populações, apesar de não ter sido observado correlação entre distância geográfica e genética. Ainda assim, observou-se a presença de migrantes nas populações Médio Tibagi 1 e Baixo Tibagi 1 e 2, sugerindo dispersão de sementes pela avifauna da região entre estes fragmentos. Considerando o atual estágio de degradação da paisagem, foram detectados leves efeitos de gargalo de garrafa nas populações estudadas. Os dados sugerem que o processo histórico de fragmentação ocorrido na bacia do rio Tibagi levou a uma pequena perda da variabilidade genética, resultando em uma maior diferenciação entre as populações. Contudo, o fluxo gênico através de sementes pode ter auxiliado na manutenção da variabilidade dentro das populações estudadas.

Palavras-chave: SSR. Diversidade genética. Árvore tropical. Fragmentação florestal. Conservação.

OLIVEIRA, Raquel Barboza Reis. **Genetic structure of five populations of *Aegiphila sellowiana* Cham. (Lamiaceae) from Tibagi basin evaluated by microsatellite markers.** 2010. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Aegiphila sellowiana is an arboreous native species of the Atlantic Rain Forest. Due to its large quantity of fruits, dispersed by birds, quick growth and indifference to the physical conditions of the soil, it can be utilized to recompose forests and degraded areas. *A. sellowiana* distributes itself along the entire Tibagi river basin. This basin has suffered an intense occupation process in the last 50 years, mainly because of the expansion of the coffee culture starting at the beginning of the 1930 decade. With that, the native forest cover of the region was reduced to only 4% of the original, which can be found in small fragments, isolated amongst themselves by agricultural cultures and pastures. The forest fragmentation provokes alterations in the dynamic of the populations that can lead to harmful consequences in the genetic diversity. Population genetic studies, utilizing molecular techniques, allow the evaluation of plant species structure and genetic variability in fragmented areas. Aiming to contribute to conservation strategies and management of pioneer tree species of the Tibagi river basin, the objective of this work was to study, using nine loci microsatélites, the diversity and genetic structure of five populations of *A. sellowiana* along the basin. In this study were sampled 150 individuals in five fragments denominated Low Tibagi 1 and 2, and Middle Tibagi 1, 2 and 3. The levels of genetic diversity obtained in the five populations studied were low, in average $H_O = 0.42$, when compared with other tropical tree species. The values found, in the populations of the Low Tibagi 2, Middle Tibagi 1 and 3, for the heterozygosity observed were higher than the expected. In these populations were established F_{IS} negative elevated and statistically significant values, indicating that these populations are not in the Hardy-Weinberg equilibrium. It was observed that most part of the variability is contained inside the populations and not in between them (80.30 and 19.70%, respectively). The molecular analyses indicated high and significant differentiation between the populations, in spite of no correlation between genetic and geographical distance being observed. Nevertheless, it was observed the presence of migrants in the Medium Tibagi 1 and Low Tibagi 1 and 2 populations, suggesting dispersion of seeds by birds of the region in between these fragments. Considering the current stage of degradation of the landscape, were detected slight bottleneck effects in the studied populations. The data suggest that the historical fragmentation process occurred in the Tibagi river basin lead to a small loss of the genetic variability, resulting in a larger differentiation between the populations. However, the genetic flow through seeds may have helped in the maintenance of the variability within the studied populations.

Key words: SSR. Genetic diversity. Tropical tree. Forest fragmentation. Conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização da bacia hidrográfica do rio Tibagi no Estado do Paraná.....	13
Figura 2 – Tipos climáticos encontrados na bacia hidrográfica do rio Tibagi.....	14
Figura 3 – Tipos de vegetação encontrados na bacia do rio Tibagi.....	15
Figura 4 – <i>Aegiphila sellowiana</i> : a - árvore adulta; b e c - ramo com flores; d - ramo com frutos; e - sementes.....	17

ARTIGO A

Figura 1 – Dendrograma UPGMA apresentando as distâncias genéticas de Nei (1978) entre cinco populações de <i>Aegiphila sellowiana</i> amostradas nas porções baixa (B1 e B2) e média (M1, M2 e M3) da bacia do rio Tibagi.....	40
---	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

- Tabela 1** – Tipos de vegetação e características climáticas e pedológicas das três regiões da bacia do rio Tibagi onde houve amostragem de indivíduos das populações de *Aegiphila sellowiana* 32
- Tabela 2** – Localização geográfica e altitude das áreas de amostragem de indivíduos de populações de *Aegiphila sellowiana* na bacia do rio Tibagi..... 33
- Tabela 3** – Sequências dos pares de primers desenvolvidos por Ruas et al. (2010) para *Aegiphila sellowiana*, utilizados nas reações de amplificação, com as respectivas temperaturas de anelamento (T_A) e as amplitudes alélicas..... 35
- Tabela 4** – Estimativas de variação genética de nove locos microssatélites de cinco populações de *Aegiphila sellowiana*. N, número de indivíduos por população; P_P , porcentagem de locos polimórficos; A, número de alelos por loco; A_E , número de alelos efetivos por loco; H_O , heterozigosidade observada; H_E , heterozigosidade esperada; F_{IS} por população para todos os locos. Desvio padrão (SD) é incluído para A, A_E , H_O e H_E 38
- Tabela 5** – Análise de variância molecular (AMOVA) de cinco populações de *Aegiphila sellowiana* da bacia do rio Tibagi..... 39
- Tabela 6** – Distância geográfica, em km, entre as populações estudadas, acima da diagonal. Valores de F_{ST} entre pares de populações de *Aegiphila sellowiana*, abaixo da diagonal. Todos os valores de F_{ST} foram significativos ($P < 0,05$, significância dada pelo teste com 1023 permutações) 39
- Tabela 7** – Distância genética de Nei (1978) entre as populações de *Aegiphila sellowiana* amostradas na bacia do rio Tibagi 40
- Tabela 8** – Médias e intervalo de confiança a 95% (IC) das distribuições *a posteriori* das proporções de indivíduos não-migrantes e migrantes para as cinco populações de *Aegiphila sellowiana*, baseado no método de atribuição bayesiana de Wilson e Rannala (2003) em BAYESASS. Os migrantes são indicados pela população de origem e pelas taxas de migração (N/M ausência de migrantes)..... 41
- Tabela 9** – Teste de sinal para excesso de heterozigotos para nove locos microssatélites em cinco populações de *Aegiphila sellowiana* 41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 ÁREA DE ESTUDO	13
2.2 ESPÉCIE ESTUDADA	16
2.3 EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO EM POPULAÇÕES VEGETAIS	18
2.4 FLUXO GÊNICO	20
2.5 MANUTENÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA	21
2.6 MARCADORES MOLECULARES	22
2.6.1 Marcadores Microsatélites	24
3 JUSTIFICATIVA	26
4 OBJETIVOS	27
4.1 OBJETIVOS GERAIS	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
ARTIGO A - Estrutura genética de cinco populações de <i>Aegiphila Sellowiana</i> Cham. (Lamiaceae) da bacia do rio Tibagi utilizando marcadores microsatélites	28
Introdução	30
Material e Métodos	31
Resultados	37
Discussão	42
Agradecimentos	46
Referências	46
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Originalmente a Mata Atlântica cobria mais de três quartos da superfície do Estado do Paraná (168.482 km² dos 201.203 km² totais). A partir da década de 1930, com a intensificação da ocupação humana, grande parte da mata cedeu lugar à agricultura e pastagem. A mata nativa era vista como um fator dificultador, quase que como uma inimiga a ser eliminada, conforme a realidade da época (MACHADO, 2005). A composição florística natural era bastante rica, mas o rápido desenvolvimento, principalmente na extensão da bacia do rio Tibagi, levou a redução drástica da cobertura florestal (BARROS; MENDONÇA, 2000; MAACK, 2002). Até o ano 2000, o Estado contava com 19,63% de seu território constituído por floresta nativa (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2002). A mesma situação ocorre na bacia do rio Tibagi, com redução de aproximadamente 96%, restando poucos remanescentes preservados (MEDRI et al., 2002).

Esse processo de fragmentação florestal levou a perda de habitat, a formação de manchas remanescentes com variadas formas e tamanhos, redução no tamanho das populações e aumento no grau de isolamento dos remanescentes imersos em uma matriz antropogênica (RIBEIRO et al., 2009; VIEIRA et al., 2009). Os efeitos genéticos da fragmentação são redução da diversidade genética, devido ao baixo fluxo gênico e à deriva genética (YOUNG et al., 1996) e aumento da endogamia, associado a populações de tamanho reduzido (BOUZAT, 2001).

Cresce o interesse de biólogos e conservacionistas em estudar os efeitos da fragmentação na diversidade e estrutura genética das espécies vegetais (BITTENCOURT; SEBBENN, 2008; GAIOTTO et al., 2003). Segundo Bertagna (2007), estudos de genética de populações, de ambientes fragmentados, permitiriam entender quais são os mecanismos que envolvem a dinâmica destas populações nestes ambientes e o fluxo gênico entre elas. Esforços nesta área são decisivos para formular estratégias, definir as prioridades de manejo de recursos genéticos e as unidades de conservação (COATES; ATKINS, 2001; JAGGI et al., 2000; KAGEYAMA et al., 2003).

Uma das prioridades da conservação é a manutenção da variabilidade. Esta é a base da biodiversidade e pode ser acessada por meio de várias técnicas moleculares atualmente disponíveis. Dentre elas, destacam-se os marcadores microssatélites. O conteúdo genético informativo de um loco microssatélite é geralmente bastante alto, devido às altas taxas de mutação de suas sequências (LI et al., 2004). Algumas vantagens estão associadas ao

uso deste marcador em estudos populacionais. A primeira é a codominância que permite distinguir o genótipo heterozigoto do homozigoto e possibilita o cálculo das frequências alélicas. Outra característica é o multialelismo, que torna os locos microssatélites informativos em populações diferentes. Além disso, a praticidade na integração e comparação dos dados obtidos fazem dos marcadores microssatélites ideais para estimar os parâmetros genéticos de populações (HOSHINO et al., 2002).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁREA DE ESTUDO

A bacia hidrográfica do rio Tibagi está localizada na região centro-leste do Estado do Paraná, ocupando uma área de aproximadamente 25.000 km² e por isso é considerada a terceira maior do Estado (Figura 1). Esta bacia destaca-se pelo seu potencial hidráulico e por possuir terra roxa e latossolo roxo, solos férteis localizados em seu curso inferior. Abrange 54 municípios, destacando-se Londrina e Ponta Grossa pela área e importância econômica (STIPP, 2000a).



Figura 1 - Localização da bacia hidrográfica do rio Tibagi no Estado do Paraná.
Fonte: Pinese (2002, p.22)

O rio Tibagi nasce ao sul do Estado do Paraná, a 1.060 m de altitude, próximo ao município de Palmeira, e corre 550 km, desembocando no rio Paranapanema, numa altitude de 298 m, entre os municípios Primeiro de Maio e Sertaneja (MEDRI et al., 2002; STIPP, 2000b). A bacia apresenta variações climáticas, topográficas e edáficas consideráveis em toda a sua extensão, resultando numa heterogeneidade ambiental que reflete

na diversificação da vegetação ao longo de toda a sua área, o que permite dividi-la em três regiões: baixo, médio e alto Tibagi (Figuras 2 e 3).

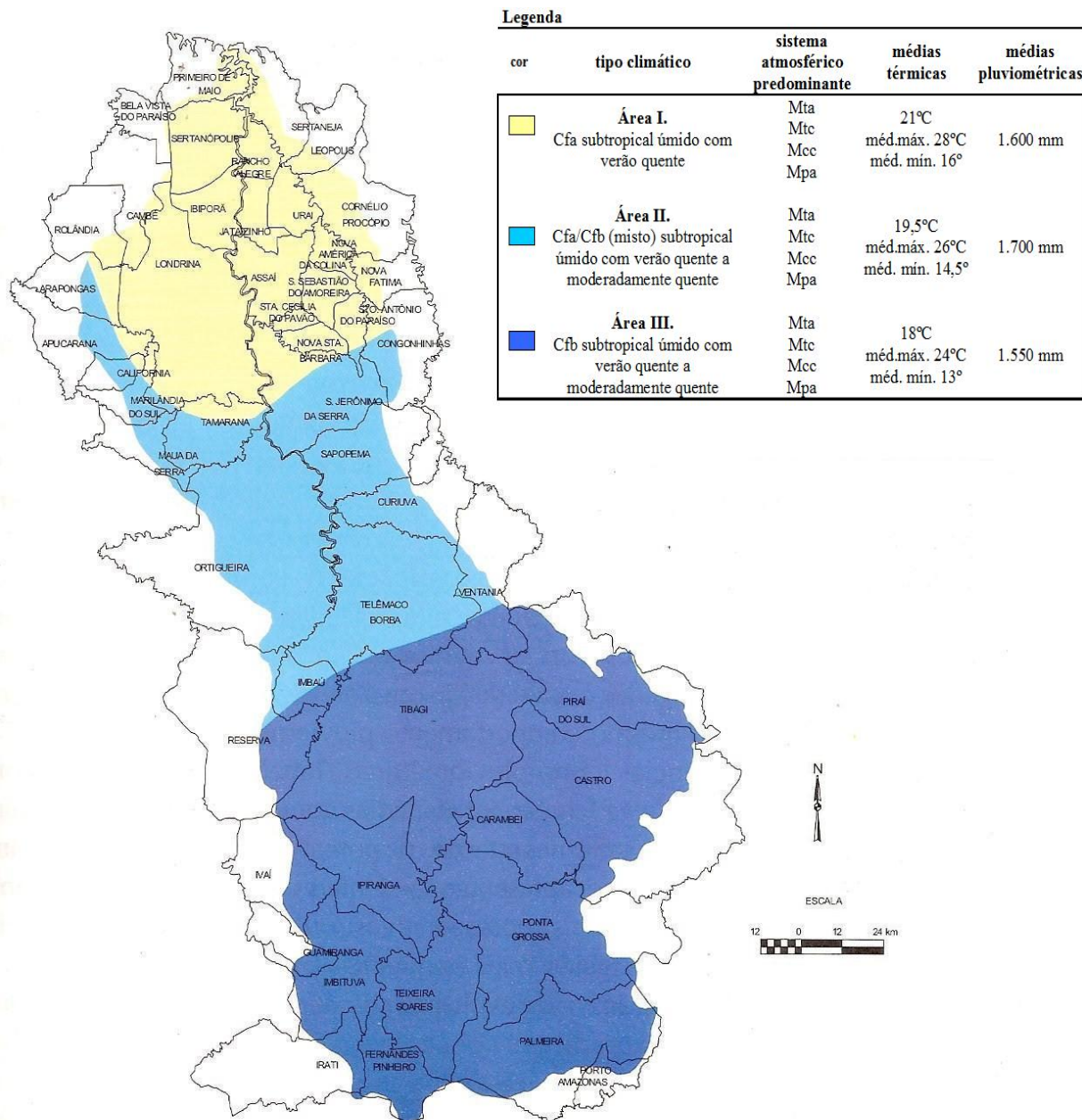


Figura 2 - Tipos climáticos encontrados na bacia hidrográfica do rio Tibagi.
Fonte: Mendonça e Danni-Oliveira (2002, p.65)

O baixo Tibagi refere-se à região de São Jerônimo da Serra até a foz do rio Tibagi. Apresenta um relevo suave ondulado em sua maior parte, com altitudes variando entre 300 e 1.100 m. O clima é classificado como do tipo Cfa (subtropical úmido com verão

quente) (STIPP, 2000b). O verão concentra a maior parte das chuvas e as temperaturas médias máximas podem atingir 28 °C. A estação de inverno é caracterizada por temperaturas médias de cerca de 18°C e ocorrência de geadas, principalmente no mês de julho (MENDONÇA, 2000). A região do baixo Tibagi era recoberta inicialmente por exuberante floresta estacional semidecidual (TOREZAN, 2002), que sofreu um intenso processo de fragmentação com a cultura intensiva do café, a partir da década de 1930 (MAACK, 2002). A presença de mata natural e/ou secundária, em relação a totalidade da bacia, é pouco expressiva, e ocorre de forma concentrada no sul. Os solos são férteis e profundos, permitindo um alto nível de desenvolvimento da agropecuária (BARROS; MENDONÇA, 2000).

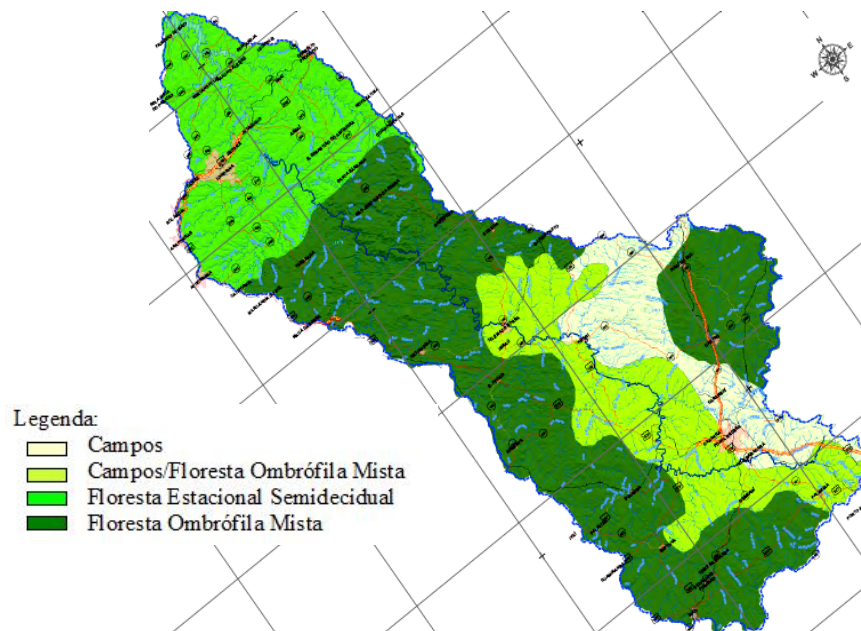


Figura 3 - Tipos de vegetação encontrados na bacia do rio Tibagi.
Fonte: Maack (2002)

O médio Tibagi é a zona central que se estende de Telêmaco Borba até o rio Apucarantina. É uma área de transição climática entre o tipo Cfa e Cfb, por isso apresenta um clima úmido em todas as estações e verão quente a moderadamente quente. As chuvas são melhores distribuídas durante o ano, com médias mais elevadas do que na porção inferior da bacia (MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2002). O relevo também é ondulado com altitudes variando de 400 a 1.100 m. O solo é utilizado na pecuária extensiva e agricultura. A vegetação desta região é de transição entre a floresta ombrófila mista e a floresta estacional

semidecidual. A degradação ambiental da região foi de baixa a média, e apresenta pequenas áreas de reservas de mata natural (BARROS; MENDONÇA, 2000). Esta região também apresenta os maiores e mais bem preservados fragmentos de vegetação nativa de toda a bacia, com ocorrência de alguns remanescentes de savanas (cerrados). De acordo com Torezan (2002), este tipo vegetacional, de ocorrência já bastante restrita no Paraná, está seriamente ameaçado.

O alto Tibagi abrange a área desde a nascente, próxima a Ponta Grossa, até Telêmaco Borba. Possui um clima predominantemente do tipo Cfb, caracterizado por verões amenos e invernos severos, com geadas frequentes. O relevo apresenta uma grande variação, com regiões suaves a fortemente onduladas, e altitudes que oscilam entre 600 e 1.200 m. Nesta área desenvolve-se uma pecuária extensiva em razão de seus campos naturais (BARROS; MENDONÇA, 2000; MENDONÇA, 2000). A degradação desta área foi muito maior em relação às primeiras, porém, matas e pastagens naturais ainda são observadas (STIPP, 2000b). Ainda assim, em algumas áreas ocorrem fisionomias da floresta ombrófila mista, com agrupamentos de *Araucaria angustifolia* (pinheiro-do-paraná ou araucária) (TOREZAN, 2002).

2.2 ESPÉCIE ESTUDADA

Aegiphila sellowiana Cham. (Lamiaceae), conhecida popularmente como tamanqueiro, papagaio ou pau-de-tamanco, é uma árvore que alcança de 4 a 7 metros de altura, com tronco e ramificações do caule variando de 20 a 30 cm de diâmetro, folhas simples e opostas (LORENZI, 2002). Em estudo realizado por Santos et al. (2009) com espécies nativas do Brasil associadas a fitoterápicos, verificou-se que o extrato de folhas e sementes de *A. sellowiana* apresenta atividade antioxidante.

As flores da espécie são de cor branca (ALVES, 2008) e melíferas (Figura 4). A floração se dá no período de dezembro a janeiro (LORENZI, 2002), mas varia de acordo com a região (APPROBATO; GODOY, 2006). O fruto é do tipo drupa obovóide, com 5,2 mm de diâmetro, coloração amarelada e epicarpo liso; apresenta uma única semente, obovóide de aproximadamente 3,7 mm de diâmetro (ALVES, 2008; PIZO, 2004). A dispersão dos frutos é zoocórica (FERREIRA et al., 2009; YAMAMOTO et al., 2007).

É uma planta decídua e indiferente às condições físicas do solo. Ocorre naturalmente nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, nas florestas ombrófilas e semidecíduais (LORENZI, 2002), também presente em cerrado (PINHEIRO; MONTEIRO, 2006). É comum em remanescentes florestais envoltos por uma área bem afetada pela ação do homem (ARAÚJO et al., 2006; SOARES-SILVA et al., 2001).

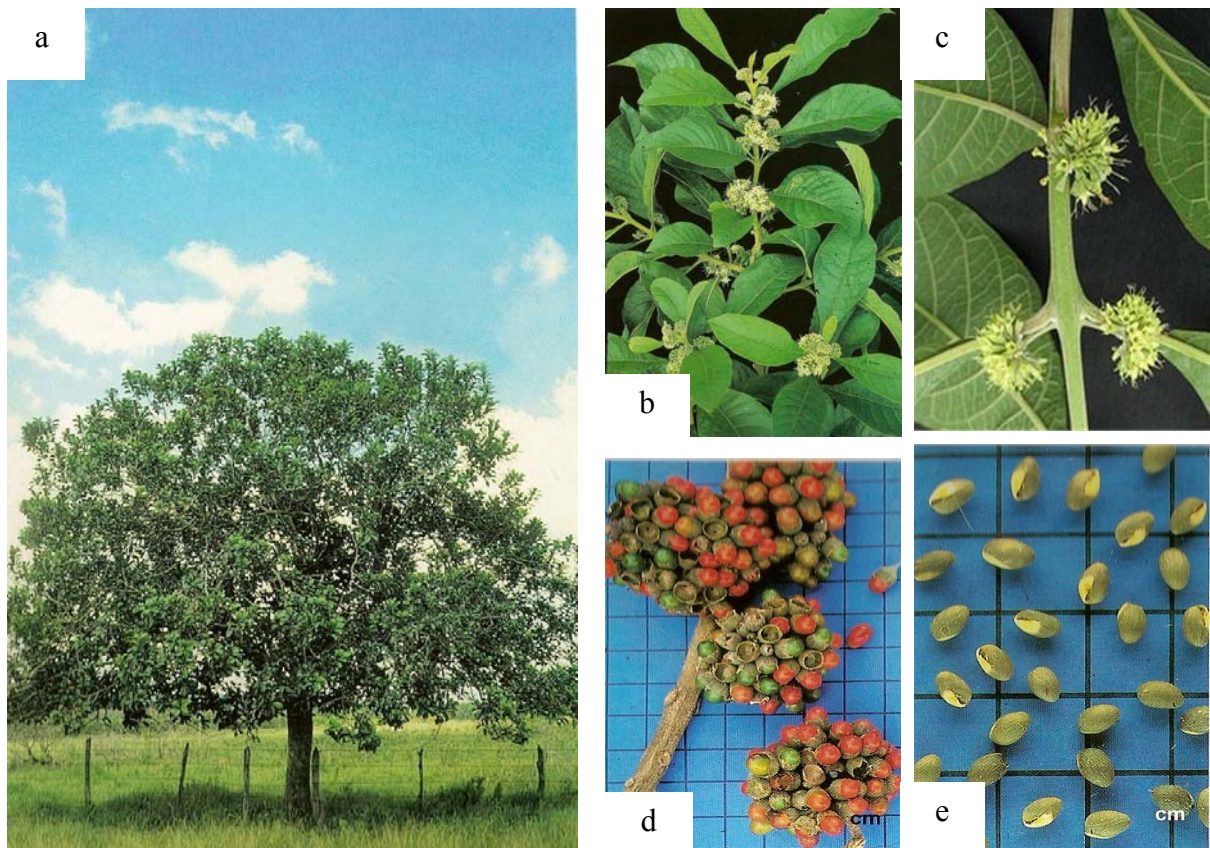


Figura 4 - *Aegiphila sellowiana*: a - árvore adulta; b e c - ramo com flores; d - ramo com frutos; e - sementes.

Fonte: Lorenzi (2002, p.357)

A espécie também é geralmente encontrada em mata ciliar e em todas as fases da sucessão secundária. Fragmentos florestais muito perturbados são caracterizados pela predominância de espécies que se encontram nos estágios iniciais da sucessão (GANDOLFI et al., 1995). Desse modo, por se tratar de uma espécie pioneira, ela apresenta importância ecológica e pode ser utilizada em áreas destinadas ao reflorestamento, bem drenadas e não alagadas (MEDRI, 2008; SÁ, 2002), principalmente aquelas degradadas por atividades agropecuárias (RUAS, 2006). *Aegiphila sellowiana* é uma espécie altamente resistente às

condições de grande luminosidade, tanto para germinação quanto para o crescimento e desenvolvimento (LIMA et al., 2009; PINTO et al., 2005). GOULART (2006) estudou a anatomia do lenho e caule desta espécie no cerrado, e verificou características relacionadas ao armazenamento de água e substâncias de reserva, o que garantiria o suprimento de nutrientes necessários nos períodos desfavoráveis. Isto pode estar relacionado ao fato de apresentar regeneração de raízes após queimadas (MARTINS et al., 2002). As espécies pioneiras, normalmente, apresentam sementes de grande longevidade e que exigem a formação de clareiras para germinação dependendo destas durante todo o seu ciclo de vida (NASCIMENTO et al., 1999).

2.3 EFEITOS DA FRAGMENTAÇÃO EM POPULAÇÕES VEGETAIS

Nos ecossistemas, a vegetação possui uma grande influência no clima, solo e recursos hídricos. O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) ressalta a importância da vegetação e suas principais funções para proteção do solo, fornecimento de matéria prima, modificação do micro-clima, habitat para a fauna, regulação do regime hídrico e beleza cênica (IBAMA *apud* PERINI, 2004).

O desmatamento pode gerar impactos diretos e indiretos no ambiente. Dentre os impactos diretos, destacam-se a perda da biodiversidade, a fragmentação da biota e a invasão por espécies exóticas. Os indiretos referem-se à diminuição da capacidade de armazenamento hídrico no solo pelas raízes, que auxiliam na retenção de água no solo e sem elas ocorre o desenvolvimento de processos erosivos e assoreamento dos corpos d'água (MACHADO, 2005).

A fragmentação florestal deixa uma série de manchas remanescentes ou fragmentos de mata entremeados por uma matriz de vegetação diferenciada e/ou de usos diversos. Alteram-se, assim, os fluxos de vento, radiação e água ao longo da paisagem bem como a migração de alelos. Todos os remanescentes de vegetação estão expostos a essas mudanças, em maior ou menor grau, mas seus efeitos são modificados pelo tamanho, forma e posição na paisagem de cada fragmento em particular (SAUNDERS et al., 1991).

As árvores tropicais são particularmente vulneráveis aos efeitos da fragmentação florestal por apresentar características reprodutivas e demográficas próprias. A maioria dos indivíduos das espécies arbóreas tropicais ocorre em baixa densidade, sendo que

estas espécies dependem de animais para realizar a polinização e dispersão de suas sementes, apresentam altas taxas de fecundação cruzada e sistemas reprodutivos que envolvem complexos mecanismos de auto-incompatibilidade (BAWA, 1974; HAMRICK; MURAWSKI, 1990).

A atuação de pássaros e mamíferos em fragmentos florestais geralmente é mais reduzida que de morcegos e de vento (SAUNDERS et al., 1991). A densidade e o tamanho populacional de animais, as atividades dos polinizadores e o arranjo de forrageamento dos mesmos também são afetados pela fragmentação (SHAFFER, 1981), atingindo potencialmente a polinização e o nível de produção de sementes nas plantas (MENGENS, 1991). A abundância e o comportamento dos agentes polinizadores podem alterar o fluxo gênico, refletindo diretamente na taxa de cruzamento e no tamanho da população de plantas (KARRON et al., 1995), levando a perda de diversidade genética nos fragmentos (MILLIGAN et al., 1994). A estrutura e diversidade genética são alteradas pela modificação nos padrões de dispersão de pólen e sementes (FORÉ et al., 1992).

A perda da diversidade genética tem implicações quanto a persistência de espécies e populações. Com baixos níveis de variação genética, elas se tornam vulneráveis a extinção devido a fatores estocásticos e a redução do valor adaptativo, que diminui a capacidade das espécies em responder às mudanças ambientais futuras (FALCONER, 1996). Com a diminuição no número de indivíduos, a população remanescente passa a ter tamanho menor que o mínimo adequado para que possa ter sua continuidade normal, de modo que o número de indivíduos reprodutivos seja suficiente para que não ocorra cruzamentos entre indivíduos aparentados, ou endogamia (ELLSTRAND; ELAM, 1993; MENGENS, 1991). De acordo com Sebben et al. (2000), o aumento da endogamia, pode afetar a conservação da diversidade genética da população.

A endogamia pode atuar expondo determinados alelos deletérios recessivos, diminuindo num curto espaço de tempo o valor adaptativo da população, nas quais ocorre redução de heterozigiosidade. Isto também resulta na perda da diversidade alélica (AVISE, 1994). Crow e Kimura (1970) relataram que a endogamia pode promover redução da produtividade, fertilidade, viabilidade das sementes, vigor e na adaptação. Quanto maior a ocorrência de endogamia, menor o número de heterozigotos observados. Isto pode proporcionar a perda de diversidade genética nas populações remascentes devido aos fatores associados a deriva genética (ELLSTRAND; ELAM, 1993).

A deriva genética é uma flutuação aleatória das frequências alélicas, que tem como consequência a perda e/ou a fixação de alelos (FUTUYMA, 1992). A deriva pode

promover a perda de alelos da população e, a longo prazo, gerar um aumento da endogamia, em função da maior probabilidade de autofecundação e cruzamento entre indivíduos aparentados (KAGEYAMA et al., 1998).

Populações de espécies que sofreram fragmentação ficam isoladas reprodutivamente, e apresentam apenas uma pequena amostra do conjunto gênico da população original (efeito de gargalo de garrafa) e, ao mesmo tempo, perda de alelos devido à deriva genética, caso a população remanescente permaneça isolada por várias gerações (SOUZA, 1997). O fluxo gênico é prejudicado, principalmente quando os agentes polinizadores são animais, levando a uma maior diferenciação genética entre populações (ROTMAN; BOYLE, 2000).

O isolamento age negativamente na riqueza ao diminuir a taxa ou o potencial de imigração ou de colonização, e depende das distâncias e das áreas de todos os fragmentos vizinhos, do arranjo espacial dos fragmentos de habitat, assim como das características do ambiente entre os fragmentos. A redução do fluxo gênico devido ao aumento do grau de isolamento entre populações provoca a divergência genética entre elas (HARTL; CLARK, 1997). Muitas espécies possuem meios efetivos de dispersão de genes e com isso mantêm altos níveis de variação genética dentro de populações com pouca diferenciação genética entre as mesmas (FORÉ et al., 1992).

Sendo assim, verifica-se a importância de fazer inferências sobre a estrutura genética de populações, medir a sua diversidade e verificar relações entre populações de diferentes locais, para que se possa chegar a conclusões mais claras sobre os efeitos da ação humana sobre as espécies vegetais.

2.4 FLUXO GÊNICO

O fluxo gênico é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos de movimentação gênica entre populações (TARAZI, 2009). Fluxo gênico geralmente é utilizado como sinônimo para migração e dispersão. O termo migração refere-se a qualquer movimento, incluindo os cíclicos que podem regularmente retornar o organismo ao seu local de origem. Enquanto que o termo dispersão é mais precisamente restrito para movimentos que aumentam a distância entre os organismos, gametas ou propágulos da fonte dispersora (NEIGEL, 1997). Segundo Levin e Kerster (1974), o fluxo gênico se dá de duas maneiras, a

primeira é o fluxo gênico potencial, que está relacionado com a deposição de pólen e sementes a partir de uma população fonte. Enquanto que 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. O fluxo gênico no tempo é devido à ocorrência de dormência das sementes de algumas espécies, gerando uma sobreposição de gerações sucessivas, podendo funcionar como mecanismo de fluxo gênico no tempo (LEVIN; KERSTER, 1974).

Em populações isoladas, o fluxo gênico tem importante efeito em uniformizar a composição genética destas, de modo que, na ausência de seleção, se a população for grande o suficiente para que a deriva genética possa ser ignorada, o fluxo gênico irá homogeneizar as frequências alélicas em todas as populações (PERECIN, 2000). Existe grande associação entre o fluxo gênico e a estrutura genética das populações das espécies arbóreas tropicais, de forma que a distância de vôo dos polinizadores e dispersores de sementes pode prever a variação genética das espécies em questão (KAGEYAMA; LEPSCH-CUNHA, 2001). Espécies com alta taxa de autofecundação (autogamia) com movimento a longa distância de liberação de pólen, podem ter menos fluxo gênico do que espécies predominantemente alógamas com liberação de pólen local (LEVIN; KERSTER, 1974).

2.5 MANUTENÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA

A variabilidade genética é a matéria-prima para o potencial evolutivo de uma espécie, e determina suas chances de sobrevivência a longo prazo (FLEISHMAN et al., 2001; JONES et al., 2001; MAMURIS et al., 2001; PITHER et al., 2003). A baixa variabilidade genética pode acarretar na incapacidade das populações em responder às mudanças ambientais (MATOCQ; VILLABLANCA, 2001; SHARMA et al., 2000), já que provoca a redução da adaptabilidade da população (BOUZAT, 2001; SHARMA, 2001), sendo uma das principais ameaças à existência de uma espécie (JAGGI et al., 2000).

Em populações naturais, a distribuição da variabilidade genética é influenciada pelo sistema de acasalamento, tamanho da população, distribuição geográfica, fluxo gênico e deriva genética (HAMRICK, 1982), além de ser estruturada no tempo e no espaço. Para a maioria das espécies arbóreas, a maior parte da diversidade gênica é

constituída pela variação genética dentro das populações (HAMRICK; GODT, 1989). A variabilidade genética interpopulacional é refletida, ao menos em parte, na ação de processos genéticos em nível populacional, como seleção para microhabitats, deriva genética e fluxo gênico restrito. Esses processos têm sido citados como as possíveis causas da distribuição não aleatória de genótipos em populações naturais (EPPERSON, 1990; LOVELESS; HAMRICK, 1984; SOKAL et al., 1989).

Os fatores que afetam a reprodução e fluxo gênico são particularmente determinantes da estrutura genética de populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Polinizadores como morcegos e beija flores, por exemplo, devido à sua capacidade de vôo, promovem o aumento da variabilidade dentro de populações, enquanto diminuem a divergência entre populações ao mantê-las ligadas por fluxo gênico. Da mesma forma, sementes dispersas pelo vento promovem o deslocamento de alelos dentro da população e eventualmente entre populações. O limitado fluxo gênico mesmo dentro de populações pode levar à formação de pequenos grupos de indivíduos geneticamente mais similares, de modo que uma população pode ser constituída de várias subpopulações geneticamente diferenciadas (FISCHER et al., 2000).

O sistema reprodutivo preferencial (autogamia ou alogamia), também contribui com a determinação da estrutura genética. Em espécies preferencialmente alógamas, espera-se encontrar alta diversidade dentro de populações e baixa diversidade entre elas. Já em espécies autógamas, as populações apresentam pouca diversidade de genótipos, mas são bastante divergentes entre si (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

2.6 MARCADORES MOLECULARES

Existem várias maneiras de se estimar a variabilidade de uma determinada população e verificar sua estrutura genética. O mais simples indicador de variabilidade genética é a própria variabilidade morfológica. Os marcadores morfológicos foram os primeiros a serem utilizados em estudos genéticos, e serviam para desenvolver as teorias de Mendel, teorias sobre ligações gênicas, identificação de espécies e cultivares e na construção dos primeiros mapas genéticos (STEINER; GREENE, 1996). Entretanto, esses caracteres constituem uma base ínfima para estudos de variabilidade genética, por ser uma medida

indireta da composição do DNA do material estudado e influenciados pelo ambiente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

O desenvolvimento de técnicas moleculares a partir da década de 1960 vieram a solucionar estes problemas e têm sido amplamente utilizadas para monitorar a variabilidade genética (PARKER et al., 1998). Os recentes avanços na biologia molecular abriram novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies e para os estudos de biologia populacional como um todo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; HAIG, 1998; ZUCCHI, 2002).

Os marcadores isoenzimáticos detectam o polimorfismo de isoenzimas. Mutações na sequência gênica alteram a carga elétrica de algumas proteínas com função enzimática (ZUCCHI, 2002). O polimorfismo é detectado a partir da eletroforese das amostras de proteína que permite a visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos. Os marcadores isoenzimáticos podem ser obtidos de uma maneira relativamente rápida, barata e são disponíveis para praticamente todas as espécies de plantas. (HOEBEE; YOUNG, 2001; NASSAR et al., 2001). Este tipo de marcador ainda é muito utilizado no estudo de genética de populações (HARDY et al., 2006; KAGEYAMA et al., 2003; MARTINS et al., 2008; MELO JÚNIOR et al., 2004; SEBEN, 2001).

Na década de 1970, surgiu o primeiro marcador que detecta o polimorfismo genético diretamente no DNA, eliminando a influência do ambiente (MILACH, 1998). A técnica, chamada de RFPL (Restriction Fragment Length Polymorphism), baseia-se no uso de enzimas de restrição que reconhecem sítios específicos na sequência de DNA, clivando-os e gerando fragmentos de tamanho e número variáveis (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). As variações decorrem de mutações pontuais, inserções e/ou deleções na molécula de DNA ou rearranjos nos sítios de clivagem. A detecção do polimorfismo é feita através de Southern blot. O marcador RFLP apresenta um grande número de marcadores disponíveis e herança codominante (CAIXETA et al., 2006; NEWBURY; FORD-LLOYD, 1993). Por se tratar de uma técnica de grande morosidade e a necessidade de aplicação em um grande número de indivíduos, este marcador não foi muito difundido em estudos de genéticas de populações (ZUCCHI, 2002).

O surgimento da reação de polimerização em cadeia (PCR - Polymerase Chain Reaction), em meados da década de 1980, causou uma verdadeira revolução na biologia porque permitiu significativo avanço no estudo do polimorfismo encontrado na molécula de DNA. A técnica baseia-se na síntese enzimática in vitro de milhões de cópias de

segmentos específicos de DNA (BORÉM, 2001; BRAMMER; MILACH, 2002). Dentre as técnicas que surgiram baseadas em PCR, destacam-se RAPD, AFLP e os microssatélites.

A técnica do RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) permite obter produtos genômicos amplificados via PCR. A técnica não requer conhecimento prévio da sequência de DNA alvo e utiliza primers de sequência arbitrária e que não precisam ser espécie-específicos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). A dominância dos marcadores RAPD dificulta estimar as frequências genotípicas, taxas de endogamia e diversidade genotípicas, limitando a análise da estrutura e diversidade genética de populações (MOURA, 2003). Apesar de demonstrar problemas, como baixa reprodutibilidade, a técnica se popularizou, pois permite gerar informação sobre a estrutura genética de populações nunca estudadas, uma vez que não é necessário o conhecimento da sequência alvo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Os marcadores RAPD já foram bastante usados para estimar a variabilidade genética em espécies arbóreas tropicais (ABEYSINGHE et al., 2000; DEGEN et al., 2001; MOSSI et al., 2009; RAINA et al., 2001).

O AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) oferece a oportunidade de realizar estudos genéticos detalhados em um grande número de organismos e espécies (THOMAS et al., 1995), sem a necessidade de conhecimento prévio do genoma da espécie estudada, tal como no RFLP. Comparado ao RFLP e RAPD, apresenta um número muito maior de polimorfismo. A metodologia é baseada na amplificação seletiva, pela PCR, de fragmentos de restrição do DNA genômico. A técnica envolve três passos: (i) digestão do DNA e ligação de adaptadores específicos; (ii) amplificação seletiva de conjuntos de fragmentos de restrição; (iii) análise em gel dos fragmentos amplificados. O número de etapas torna a técnica mais trabalhosa para se obter o resultado final (CAIXETA et al., 2006). Assim como o RAPD, os marcadores AFLP apresentam como desvantagem a característica dominante, que acarreta um baixo conteúdo de informação por loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

2.6.1 Marcadores Microssatélites

Marcadores do tipo microssatélite, também conhecidos como SSR (Simple Sequence Repeat) ou STR (Short Sequence Tandem Repeat), baseiam-se na detecção de variações em loci de sequências repetitivas (JEFFREYS et al., 1985). Estas sequências, ou

microssatélites, consistem numa subclasse de DNA repetitivo formado por pequenas sequências (2 a 6 nucleotídeos) repetidas várias vezes de maneira idêntica e adjacente (repetição em tandem), tais como (AT) n ou (ATT) n . Os microssatélites são abundantes e estão dispersos nos genomas eucariotos, em regiões codificadoras e não codificadoras. Devido a sua natureza repetitiva e o alto grau de variação no número de repetições em cada microssatélite, esses marcadores geram um modelo complexo de bandas (HANCOOK, 1999; LITT; LUTY, 1989; WEBER; MAY, 1989).

Sequências de DNA, de 20 a 30 pares de bases, flanqueiam os microssatélites e são altamente conservadas, o que permite sua seleção e amplificação via PCR. O par de pequenos fragmentos flanqueadores é denominado *primers* de microssatélite. O uso de marcadores microssatélites é limitado pelo alto custo, tempo e mão de obra especializada necessários para o desenvolvimento prévio dos primers, que requerem a construção de uma biblioteca genômica da espécie estudada, clonagens e sequenciamentos e também isolamento e caracterização dos microssatélites (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Além disso, é necessário adequar os protocolos de amplificação para cada primer, sendo muitas vezes necessários protocolos específicos para cada loco analisado (RUAS, 2009).

Entretanto, os marcadores microssatélites apresentam características desejáveis para serem utilizados em estudos de genética de populações. Possuem herança codominante, o que permite discriminar homozigotos de heterozigotos; são multialélicos, apresentando o maior conteúdo informativo por loco entre todas as classes de marcadores moleculares; são detectáveis por meio de PCR, altamente reproduzíveis e não requerem radioatividade. Todas essas características tornam a utilização deste marcador vantajosa, fazendo com que este possa ser considerado um marcador ideal para estudos de populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; HOSHINO et al., 2002; POWELL et al., 1996).

Os locos de microssatélite são frequentemente conservados entre espécies relacionadas. De acordo com Ciampi (1999) este é outro ponto positivo, pois indica que estes marcadores podem ser transferidos e uma vez desenvolvidos podem ser compartilhados entre diferentes laboratórios. Além disso, amplia a possibilidade de estudos em diferentes espécies arbóreas relacionadas com a mesma ferramenta molecular.

Por suas características vantajosas, os marcadores microssatélites têm sido utilizados em estudos de diversidade de populações naturais (LEFORT et al., 2002; LOPES et al., 2002; SOUZA, 2002; YAMAMOTO et al., 2002).

3 JUSTIFICATIVA

O Norte do Paraná apresenta um alto grau de degradação ambiental, principalmente pela expansão de campos de cultivo e pastagens e pelo desenvolvimento urbano e industrial. A redução da floresta a pequenos fragmentos pode ter modificado a estrutura genética e a dinâmica das populações vegetais ali existentes. O crescente interesse nesta área gerou estudos da estrutura e variabilidade genética de populações naturais ou de ambientes fragmentados, oferecendo subsídios para se planejar o seu manejo e conservação. Há, contudo, um número reduzido de estudos científicos com espécies arbóreas tropicais. O presente estudo com *Aegiphila sellowiana* Cham. (Lamiaceae) procura contribuir neste âmbito, visando à conservação de espécies arbóreas nativas do Brasil e servindo como representante para se entender a variabilidade genética de espécies pioneiras de sucessão florestal secundária.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a estrutura e variabilidade genética dentro e entre populações de *Aegiphila sellowiana* Cham. (Lamiaceae), utilizando marcadores microsatélites, e verificar se há relação com a paisagem fragmentada da bacia do rio Tibagi.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Quantificar a variabilidade genética intra e interpopulacional de cinco populações de *A. sellowiana* localizadas em fragmentos da porção médio-jusante do rio Tibagi.
2. Estimar a divergência genética entre estas populações em estudo, comparando com as distâncias geográficas dos diferentes fragmentos amostrados.
3. Verificar se ocorre fluxo gênico entre as populações de diferentes fragmentos.
4. Estabelecer uma relação entre os dados moleculares analisados, as áreas de coleta e o impacto do histórico de fragmentação que ocorreu na região de estudo.

ARTIGO A

Estrutura genética de cinco populações de *Aegiphila sellowiana* Cham. (Lamiaceae) da bacia do rio Tibagi utilizando marcadores microssatélites¹

¹ Este artigo será enviado para publicação na revista **Genetics and Molecular Biology**.

Estrutura genética de cinco populações de *Aegiphila sellowiana* Cham. (Lamiaceae) da bacia do rio Tibagi utilizando marcadores microssatélites

Raquel Barboza Reis de Oliveira¹, Eduardo Augusto Ruas¹, Juliana Oliveira Damasceno¹, Claudete de Fátima Ruas¹, Paulo Mauricio Ruas¹

¹Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral, Londrina, PR, Brasil.

Autor para correspondência: Paulo Mauricio Ruas. Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral, Rodovia Celso Garcia Cid, s/n, Caixa Postal 6001, 86051-980 Londrina, PR, Brasil. E-mail: ruas@sercomtel.com.br. Telefone: 55-43-3371-4417/Fax: 55-43-33284440

Resumo

Aegiphila sellowiana é uma espécie pioneira, geralmente encontrada em florestas ombrófilas e semidecíduais, e é considerada de grande importância ecológica, por ser utilizada na recuperação de áreas degradadas. Para investigar a estrutura genética de *A. sellowiana* em fragmentos de mata foram amostradas cinco populações localizadas na bacia do rio Tibagi, no estado do Paraná-Brasil. Nove locos polimórficos de microssatélites foram utilizados para analisar 150 indivíduos adultos. Os dados revelaram que o número de alelos e o número de alelos efetivos variaram de $2,22 \pm 0,97$ até $2,56 \pm 0,53$ e de $1,62 \pm 0,51$ até $1,85 \pm 0,45$, respectivamente. As populações Médio Tibagi 1, Médio Tibagi 2 e Baixo Tibagi 2 apresentaram heterozigosidade observada maior do que a esperada. As populações apresentaram-se moderadamente diferenciadas ($F_{ST} = 0,1970$), indicando que a maior parte da variabilidade encontra-se dentro das populações. Os valores de F_{ST} entre pares de população foram altos e significativos, porém as distâncias genéticas e geográficas não estão correlacionadas. A análise bayesiana evidenciou migrantes entre as populações Baixo Tibagi 1, Baixo Tibagi 2 e Médio Tibagi 1. Os dados indicaram que as populações passaram por um leve efeito de gargalo de garrafa, possivelmente associados ao processo de fragmentação que tem ocorrido na bacia do rio Tibagi. Os dados genéticos obtidos sugerem uma pequena perda de variabilidade nas populações, com a manutenção de diversidade dentro de populações pelo fluxo de sementes.

Palavras-chave: árvore tropical, variabilidade genética, conservação, Lamiaceae, SSR.

Introdução

Aegiphila sellowiana Cham. (Lamiaceae), conhecida popularmente como tamanqueiro, papagaio ou pau-de-tamanco, é uma espécie arbórea tropical pioneira. A árvore alcança de 4 a 7 m de altura e tronco de 20 a 30 cm de diâmetro. Apresenta folhas simples e opostas, com 18 a 28 cm de comprimento (Lorenzi, 2002). As flores são melíferas de cor branca. O fruto é do tipo drupa obovóide, com coloração amarelada e uma única semente (Pizo, 2004; Alves, 2008). A espécie ocorre naturalmente nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. É comum em remanescentes florestais envoltos por uma área muito explorada pelo homem (Soares-Silva *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2006).

Devido seu comportamento pioneiro, *A. sellowiana* tem se restabelecido com relativa facilidade em algumas áreas agrícolas abandonadas. Este processo de recolonização, associada ao fluxo gênico via pólen e sementes, pode reduzir a diferenciação entre populações (Bertagna, 2007). Entretanto, há poucos estudos envolvendo espécies arbóreas tropicais pioneiras, principalmente no que se refere às espécies de plantas da Bacia do Rio Tibagi, que poderiam fornecer informações sobre os efeitos da ação humana sobre estas espécies vegetais. O manejo e a conservação de espécies arbóreas florestais dependem da correta avaliação da diversidade genética de modo a revelar relação genética entre os indivíduos, os níveis de variação genética e a estrutura genética das populações. Estes fatos nos permitem estabelecer um histórico das mudanças evolutivas que caracterizam a espécie e prever como as populações responderão a eventos futuros de origem natural e artificial (Wallace, 2002).

Nos últimos anos, várias técnicas e diferentes marcadores moleculares têm sido utilizados em estudos de genética de populações naturais ou fragmentadas (Cardoso *et al.*, 2000; Degen *et al.*, 2001; Hardy *et al.*, 2006; La Torre *et al.*, 2008, Mossi *et al.*, 2009;

Moura *et al.*, 2009). Em relação às outras técnicas moleculares, marcadores microsatélites apresentam maior conteúdo genético informativo (Li *et al.*, 2004). Além disso, este marcador apresenta codominância que permite distinguir o genótipo heterozigoto do homozigoto, e a partir destes dados, detectar todos os alelos de um dado loco, possibilitando o cálculo das suas freqüências (Hoshino *et al.*, 2002).

Neste trabalho foram empregados marcadores microsatélites a fim de estimar a variabilidade genética entre populações de *A. sellowiana* em áreas fragmentadas, verificar se há relação entre os dados moleculares e a ação antrópica que ocorreu na região estudada. Esta espécie foi escolhida para este estudo por ser geralmente recomendada para recuperação de áreas degradadas.

Material e Métodos

Área de estudo

A bacia do rio Tibagi apresenta uma área de aproximadamente 25.000 km², correspondendo a 13% da superfície do estado do Paraná. A nascente do rio Tibagi está localizada no sul do Estado, e corre 550 km em direção ao norte. Esta bacia destaca-se pelo seu potencial hidráulico e por possuir solos com características próprias para a agricultura e pecuária (Stipp, 2000; Medri *et al.*, 2002).

Ao longo de toda sua extensão, a bacia apresenta variações climáticas, topográficas e edáficas, resultando numa heterogeneidade ambiental (Tabelas 1 e 2) que reflete na diversificação da vegetação ao longo de toda a sua área, o que permite dividi-la em três regiões: alto, médio e baixo Tibagi (Medri *et al.*, 2002). A região do alto Tibagi possui clima do tipo Cfb, caracterizado por verões amenos e invernos severos, com geadas

frequentes. A pluviosidade é menor do que nas outras regiões, com uma média de 1.550mm. A formação predominante nesta área é a estepe (campo), mas em algumas áreas ocorrem fisionomias da floresta ombrófila mista, com agrupamentos de *Araucária angustifolia* (pinheiro-do-paraná ou araucária) (Torezan, 2002). O médio Tibagi apresenta clima intermediário entre Cfa e Cfb, com uma pluviosidade de 1.700 mm por ano (Mendonça e Danni-Oliveira, 2002). A vegetação do médio Tibagi é de transição entre a floresta ombrófila mista e a floresta estacional semidecidual, sendo possível observar *Araucária angustifolia* em alguns remanescentes. A região do baixo Tibagi é caracterizada por um clima tipo Cfa, com verões quentes, invernos amenos e baixa frequência de geadas (Mendonça e Danni-Oliveira, 2002). Nesta região, a pluviosidade anual é de 1.600 mm. Inicialmente, esta era recoberta por uma exuberante floresta estacional semidecidual (Torezan, 2002), que sofreu um intenso processo de fragmentação com a cultura intensiva do café, a partir de meados de 1930 (Maack, 2002) (Tabela 1).

Tabela 1 - Tipos de vegetação e características climáticas e pedológicas das três regiões da bacia do rio Tibagi onde houve amostragem de indivíduos das populações de *Aegiphila sellowiana*.

Região	Clima ¹ Vegetação ²	Temperatura média anual ¹	Pluviosidade ¹	Geadas	Solo ³
Alto	Cfb campos sulinos/floresta ombrófila mista	18 °C	1.550 mm	frequente	neossolo/ cambissolo/ latossolo
Médio	Cfa/Cfb floresta ombrófila mista/estacional semidecidual	19,5 °C	1.700 mm	moderada	neossolo/ argissolo/ latossolo
Baixo	Cfa floresta estacional semidecidual	21 °C	1.600 mm	rara	latossolo/ nitossolo

¹ Mendonça & Danni-Oliveira (2002)

² Torezan (2002)

³ Stipp (2002)

A. sellowiana está distribuída em toda a bacia do rio Tibagi (Dias *et al.*, 2002), sendo encontrada principalmente em fragmentos florestais pequenos e em bordas de plantações ou pastagens, onde apenas algumas dezenas de indivíduos podem ser encontradas distribuídas em conjunto.

Amostragem

Cinco populações de *A. sellowiana* foram amostradas, sendo duas na porção inferior da bacia do rio Tibagi (B1 e B2) e três na média (M1, M2 e M3) (Tabela 2). O critério para a escolha destas populações foi a quantidade de árvores individuais em número suficiente para permitir a amostragem. Para as análises genéticas, folhas jovens de 30 indivíduos de cada população foram coletadas, de modo a cobrir toda a área de distribuição do fragmento florestal. A distância mínima entre plantas individuais foi de 10 metros, evitando-se assim coletar plantas com a mesma composição genética, pois em *A. sellowiana* pode ocorrer rebrota a partir das raízes (Souza *et al.*, 2002). As amostras foram coletadas em gelo e posteriormente foram transferidas para um freezer (-20 °C), até a extração do DNA.

Tabela 2 - Localização geográfica e altitude das áreas de amostragem de indivíduos de populações de *Aegiphila sellowiana* na bacia do rio Tibagi.

Populações	Município	Latitude	Longitude	Altitude ¹
Médio Tibagi 1 (M1)	Tamarana	23°49'27"S	51°10'00"O	831
Médio Tibagi 2 (M2)	Tamarana	23°50'33.7"S	51°09'82.4"O	879
Médio Tibagi 3 (M3)	Ortigueira	24°34'99.8"S	50°40'91.4"O	768
Baixo Tibagi 1 (B1)	Nova Sta. Bárbara	23°39'27"S	50°45'57"O	736
Baixo Tibagi 2 (B2)	Londrina	23°20'45"S	51°11'51"O	721

¹ Altitude em metros (m)

Procedimentos de laboratório

O DNA genômico foi extraído utilizando o método CTAB, como descrito por Doyle e Doyle (1987), exceto que o CTAB foi substituído por MATAB (Mixed Ayltrimethylammonium Bromide, Sigma) no tampão de extração. A concentração de DNA foi estimada utilizando um fluorímetro (DyNA Quant 200, Höfer-Pharmacia), segundo as instruções do fabricante. A concentração das amostras de DNA foi ajustada para $2 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ para uso nas amplificações de PCR.

Foram utilizados nove primers microssatélites descritos por Ruas et al. (2010) nas amplificações (Tabela 3). As reações foram realizadas em um volume final de $10 \mu\text{l}$ contendo $2,5 \mu\text{l}$ água MiliQ; $3,5 \mu\text{l}$ da enzima Max Mix (Prodimol Biotecnologia), $0,75 \mu\text{l}$ de cada primer (direito e reverso) e $2,5 \mu\text{l}$ DNA molde. Para cada par de primer, um controle de reação sem DNA, mas contendo os demais reagentes, foi incluído. As reações foram colocadas em termociclador PTC200 da MJ Research. O programa para amplificação de cada um dos pares de primers está de acordo com o protocolo estabelecido por Ruas et al. (2009).

Após as amplificações, os fragmentos de DNA foram separados em géis de 7% de acrilamida:bisacrilamida (29:1), durante 3 horas a 200 V e corados com nitrato de prata 20%. O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular padrão de 50 pb (Ludwig Biotecnologia). Fragmentos amplificados de diferentes tamanhos foram considerados alelos diferentes.

Tabela 3 - Sequências dos pares de primers desenvolvidos por Ruas et al. (2010) para *Aegiphila sellowiana* utilizados nas reações de amplificação, com as respectivas temperaturas de anelamento (T_A) e as amplitudes alélicas.

Loco	Sequência dos pares de primer 5'-3'	Sequência do motif	T_A ($^{\circ}$ C)	Amplitude alélica (pb)
As18F-1	F: 5' ACT GCC ACA AGC TCT CCA AG 3' R: 5' AGC CCA TTA ACA AAA ACA GG 3'	(CG) ₁ (CG) ₄ C	60 ⁰	170-260
As 87-1	F: 5' TTC ATG GGA AGG TTC TGC AC 3' R: 5' TCA AAC TTG TTG CCG AAG AA 3'	(TA) ₄	60 ⁰	180-250
As 73	F: 5' GGG GAT TGA CTT CAA CGA GA 3' R: 5' TTG TTC AAC CTG CAA ACC AA 3'	(GAA) ₃	60 ⁰	170-200
As 9F-1	F: 5' GAT TTT TGG GGA TAG CAG GA 3' R: 5' ATG GGC AAC TGT ACG TGT GA 3'	(TG) ₇ (TA) ₆ TGTA(TG) ₃	59 ⁰	160-180
As 18F-2	F: 5' CCG CAG ACT TAC ATG GTG AA 3' R: 5' AGC CCA TTC ACA AAA ACA GG 3'	(TG) ₇	60 ⁰	190-220
As 25F	F: 5' CCG AAT AAA GAG AAA GCA GCA 3' R: 5' GGC ATC TTG TCC CTT CTT GT 3'	(CA) ₄ CC(A) ₁₁ C(CA) ₃ (TACACA) ₂ (CA) ₄	60 ⁰	250-300
As 68	F: 5' TCT TCA GGG AGG TGG TGA TT 3' R: 5' AGA TCC AAT GGC TCA TCG TT 3'	(GT) ₇	60 ⁰	210-230
As 84	F: 5' TCC CGG AAG ACA TCA TTA GC 3' R: 5' TCC AAT AGT CCG ACC CAA TC 3'	(TG) ₄	60 ⁰	220-260
As 93-1	F: 5' GAT TCC GGC ATA CAC CAA AG 3' R: 5' AAT TTT TGG CCG GGT TTT AC 3'	(GT) ₅	60 ⁰	170-200

Análise dos dados

A diversidade genética foi estimada para todos os locos de microssatélites por população. A porcentagem de locos polimórficos (P_P), número de alelos por loco (A), número de alelos efetivos por loco (A_e), heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) foram calculadas para todas as subpopulações utilizando o software POPGENE v. 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). Os coeficientes de endogamia (F_{IS}) para cada população foram testados para o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando testes de probabilidade que foram calculados com o programa FSTAT (Goudet, 2001). Foi aplicada uma correção de Bonferroni para comparações múltiplas a fim de determinar a significância estatística a 5% de probabilidade.

A variação genética dentro e entre populações foi estimada pela análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o programa ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) e a divergência genética entre pares de populações (F_{ST}) foi calculada usando o programa FSTAT (Goudet, 2001).

Foi realizada uma análise bayesiana para detectar os padrões da estrutura genética e se ocorreu migração recente entre as populações de *A. sellowiana*, e para isso utilizou-se o software STRUCTURE 2.0 (Pritchard *et al.*, 2000) e BAYESASS (Wilson e Rannala, 2003). Simulações para cada valor de K foram repetidos 1.000 vezes para fornecer a maior probabilidade.

As distâncias genéticas de Nei (1978) entre as populações estudadas foram estimadas utilizando-se o programa TFPGA (Miller, 1997), e também para construção de um dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA. As distâncias geográficas entre as populações foram calculadas utilizando o programa GOOGLE EARTH (<http://earth.google.com/>). Para verificar uma possível relação entre distância geográfica e

genética, foi realizado um teste de regressão linear de Spearman utilizando o programa BIOESTAT 2.0 (Ayres *et al.*, 2005).

Para verificar se as populações estudadas passaram por um efeito de gargalo de garrafa recente devido ao histórico de distúrbios ambientais da região, utilizou-se o programa BOTTLENECK (Cornuet e Luikart, 1996; Piry *et al.*, 1998). Esta avaliação permite detectar um excesso de heterozigotos em relação ao número de heterozigotos de uma população em equilíbrio (Piry *et al.*, 1998). Se as populações sofreram um efeito de gargalo de garrafa recente, é possível que a diversidade alélica tenha sido perdida mais rapidamente do que a heterozigosidade esperada (Maruyama e Fuerst, 1985). Seguindo recomendações de Luikart e Cornuet (1998), dois modelos de dinâmica evolucionária foram considerados, o Infinite Mutation Model (IMM) e o Stepwise Mutation Model (SMM). Esta abordagem compara as diversidades gênicas observadas e esperadas baseadas no número de alelos observados que estariam em um equilíbrio entre a deriva e a mutação (Omondi *et al.*, 2009). Para tanto, foi realizado um teste de sinal (Cournuet e Luikart, 1996) que determina se o desvio no excesso de heterozigosidade em todos os locos dentro de cada população é significativo, o que pode indicar se a população passou por um efeito de gargalo de garrafa recente.

Resultados

Diversidade Genética

As estimativas de variação genética de nove locos microssatélites em *A. sellowiana* mostraram que as populações B1, B2 e M3, apresentaram iguais valores de porcentagem de locos polimórficos (100%), enquanto que as populações M1 e M2

apresentaram 77,78% e 88,89%, respectivamente (Tabela 4). A média do número de alelos por loco ($2,31 \pm 0,68$) foi maior em relação ao valor médio de alelos efetivos ($1,72 \pm 0,49$).

Tabela 4 - Estimativas de variação genética de nove locos microssatélites de cinco populações de *Aegiphila sellowiana*. N, número de indivíduos por população; Pp, porcentagem de locos polimórficos; A, número de alelos por loco; A_E, número de alelos efetivos por loco; H_O, heterozigosidade observada; H_E, heterozigosidade esperada; F_{IS} por população para todos os locos. Desvio padrão (SD) é incluído para A, A_E, H_O e H_E.

Populações	N	Pp	A(SD)	A _E (SD)	H _O (SD)	H _E (SD)	F _{IS}
M1	30	77,78	2,22±0,97	1,62±0,51	0,41±0,43	0,32±0,23	-0,277*
M2	30	88,89	2,33±1,00	1,68±0,66	0,32±0,38	0,33±0,24	0,026
M3	30	100	2,22±0,44	1,78±0,41	0,46±0,48	0,41±0,19	-0,117*
B1	30	100	2,56±0,53	1,85±0,45	0,43±0,38	0,43±0,17	0,009
B2	30	100	2,22±0,44	1,66±0,39	0,48±0,48	0,37±0,18	-0,329*
Média	30	93,33	2,31±0,68	1,72±0,49	0,42±0,43	0,37±0,20	

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

A heterozigosidade média observada ($H_O = 0,42 \pm 0,43$) foi maior do que a heterozigosidade média esperada ($H_E = 0,37 \pm 0,20$), sugerindo excesso de heterozigotos em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os valores de heterozigosidade observados foram maiores do que a heterozigosidade esperada para as populações M1, M3 e B2. Enquanto que as populações B1 e M2 mostraram valores de heterozigosidade observada próximos do esperado (Tabela 4). Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram encontrados para as populações M1 ($F_{IS} = -0,277$; $P < 0,05$), M3 ($F_{IS} = -0,117$; $P < 0,05$) e B2 ($F_{IS} = -0,329$; $P < 0,05$). Para as populações, M2 e B1, os índices de fixação foram positivos, baixos e não significativos ($F_{IS} = 0,026$ e $0,009$, respectivamente).

Estrutura Genética e Migração

As diferenças genéticas entre as populações foram avaliadas utilizando valores de F_{ST}. A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que 19,70% da

variação genética foi entre populações, e 80,30% dentro de populações (Tabela 5), o que é característico de uma espécie arbórea alógama que apresenta variabilidade genética maior dentro de populações (Hamrick *et al.*, 1992; Omondi *et al.*, 2009).

Tabela 5 - Análise de variância molecular (AMOVA) de cinco populações de *Aegiphila sellowiana* da bacia do rio Tibagi.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de Variância	% de Variação
Entre Populações	4	103,317	0,403	19,7**
Dentro Populações	295	484,650	1,643	80,3
Total	299	587,967		

Índice de Fixação (F_{ST}) = 0,197

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

Os resultados de F_{ST} entre pares de populações estão apresentados na Tabela 6. A menor diferença genética observada foi entre as populações M1 e B1 ($F_{ST} = 0,0818$), enquanto que as populações M1 e B2 apresentaram as maiores diferenças genéticas ($F_{ST} = 0,2612$).

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

População	M1	M2	M3	B1	B2
M1	-----	1,18	84,10	66,39	31,77
M2	0,2344	-----	83,06	66,40	32,95
M3	0,2509	0,2162	-----	78,53	111,61
B1	0,0818	0,1962	0,1387	-----	70,20
B2	0,2612	0,2290	0,1692	0,1834	-----

As distâncias genéticas de Nei (1978) entre populações variaram de 0,0520 (M1 e B1) a 0,2207 (M1 e M3) (Tabela 7) e são semelhantes aos valores de F_{ST} entre pares de populações.

Tabela 7 – Distância genética de Nei (1978) entre as populações de *Aegiphila sellowiana* amostradas na bacia do rio Tibagi.

População	M1 (1)	M2 (3)	M3 (4)	B1 (2)
M1 (1)	-----			
M2 (3)	0,1848	-----		
M3 (4)	0,2207	0,1837	-----	
B1 (2)	0,0520	0,1605	0,1341	-----
B2 (5)	0,2149	0,1820	0,1429	0,1698

As estimativas de distância genética de Nei foram utilizadas para a construção de um dendrograma (Figura 1) em que se pôde evidenciar a formação de dois grupos. Um agrupamento é composto pelas populações M1 e B1 e o outro grupo é composto pelas populações M3 e B2. A população M2 agrupou-se com as populações M1 e B2. O teste de regressão linear para verificar se há correlação entre as distâncias geográficas e os valores de F_{ST} entre pares de populações não foram significativas.

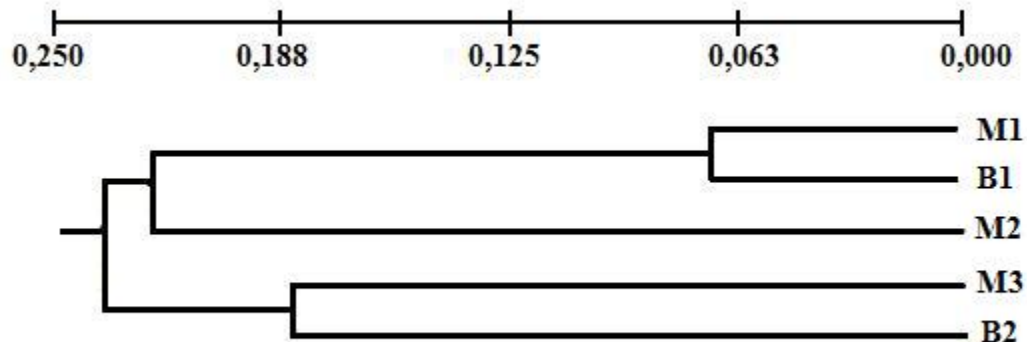


Figura 1 - Dendrograma UPGMA apresentando as distâncias genéticas de Nei (1978) entre cinco populações de *Aegiphila sellowiana* amostradas nas porções baixa (B1 e B2) e média (M1, M2 e M3) da bacia do rio Tibagi.

A análise bayesiana mostrou que os dados analisados estão estruturados em cinco grupos ($K = 5$) com uma probabilidade de 83%. Isto indica que estes grupos formam populações diferenciadas, porém não estão totalmente isoladas, pois três populações (B1, B2 e

M1) mostraram evidências de migrantes a partir de outras populações. A população B1 apresentou migrantes a partir de M1 e B2, e estas populações apresentaram migrantes a partir de B1. As populações M2 e M3 não apresentaram migrantes (Tabela 8).

Tabela 8 - Médias e intervalo de confiança a 95% (IC) das distribuições *a posteriori* das proporções de indivíduos não-migrantes e migrantes para as cinco populações de *Aegiphila sellowiana*, baseado no método de atribuição bayesiana de Wilson e Rannala (2003) em BAYESASS. Os migrantes são indicados pela população de origem e pelas taxas de migração (N/M ausência de migrantes).

Populações	Não-migrantes (95% IC)	Migrantes (95% IC)
M1	0,677 (0,667, 0,705)	B1 0,303 (0,262, 0,328)
M2	0,988 (0,955, 1,000)	N/M
M3	0,984 (0,947, 1,000)	N/M
B1	0,677 (0,667, 0,702)	M1 0,157 (0,096, 0,217); B2 0,149 (0,090, 0,208)
B2	0,677 (0,667, 0,701)	B1 0,305 (0,267, 0,329)

O teste de sinal para excesso de heterozigidade mostrou que para a maioria das populações, com exceção de B2, ocorreu um leve efeito de gargalo de garrafa pois, nestas populações, tanto pelo modelo SMM quanto pelo IAM observou-se um excesso de heterozigidade (Tabela 4 e 9).

Tabela 9 - Teste de sinal para excesso de heterozigotos para nove locos microssatélites em cinco populações de *Aegiphila sellowiana*.

Populações	Nº de indivíduos por população	SMM ^a		IAM ^b	
		H _e /H _d	P	H _e /H _d	P
M1	30	5/2	0,27	5/2	0,18
M2	30	5/3	0,38	6/2	0,09
M3	30	6/3	0,26	7/2	0,05 ^c
B1	30	6/3	0,35	7/2	0,07
B2	30	5/4	0,51	5/4	0,36

^a Stepwise Mutation Model

^b Infinite Mutation Model

H_e/H_d representa a razão entre o número de loco com excesso de heterozigotos e o número de loco com deficiência de heterocigotos. A razão H_e/H_d é esperada em aproximadamente 1:1 para populações que não sofreram efeito gargalo de garrafa. H_e é esperado ser maior do que H_d para populações que recentemente sofreram um gargalo de garrafa (Luikart e Cornuet, 1998).

^c P ≤ 0,05 significância do excesso de heterozigotos.

Discussão

Diversidade Genética

A. sellowiana mostrou uma variabilidade genética menor em relação a outras espécies tropicais. Assim, *Acacia senegal* mostrou um $H_O = 0,709$ (Omondi *et al.*, 2009), *Tabebuia serratifolia* e *Cedrela odorata* mostraram valores de H_O iguais a 0,417 e 0,773, respectivamente (Martins *et al.*, 2008). Raposo *et al.* (2007) trabalhando com a espécie arbórea *Carapa guianensis* encontrou valor de $H_O = 0,578$. O baixo valor de H_O constatado neste trabalho em relação a estas outras espécies arbóreas deve-se ao fato destas populações serem pouco comprometidas pela ação antrópica, ao contrário das populações de *A. sellowiana* estudadas neste trabalho. Segundo Moura *et al.* (2009), populações de árvores tropicais que sofreram ação antrópica mostraram um número médio de alelos por loco nas populações inferiores às populações naturais. Em estudo realizado por Moura *et al.* (2009), com população perturbada pela ação do homem e população natural de *Solanum lycocarpum*, foi verificado que na primeira o número efetivo de alelos por loco e a heterozigosidade observada e esperada foram menores do que na segunda população. Os valores encontrados por aqueles autores, para a população perturbada ($A_E = 1,69$; $H_O = 0,357$; $H_E = 0,328$) foram similares aos observados no presente estudo ($A_E = 1,72$; $H_O = 0,42$ e $H_E = 0,37$). Assim a perda de variabilidade genética em *A. sellowiana* pode estar associada a perturbação antrópica devido ao corte e queimadas recorrentes que são comuns na região da bacia do rio Tibagi.

As estimativas de heterozigosidade esperada para as populações B2, M1 e M3 foram menores do que as observadas, resultando em valores elevados, negativos e significativos para o coeficiente de endogamia F_{IS} . Este excesso de heterozigosidade provavelmente reflete o fato de ter ocorrido um efeito de deriva genética recente associado a perda de alelos raros. Isto vem de encontro com a história de ocupação da bacia do rio Tibagi

que sofreu uma intensa ação antrópica nos últimos 50 anos, e resultou na remoção de praticamente quase toda a vegetação original. Assim, as populações estudadas não são as originais, mas o resultado do restabelecimento gradual da vegetação em algumas áreas (Medri, 2008). De acordo com Martins *et al.* (2008), o sucesso de colonização de ambientes antrópicos dependerá principalmente da capacidade da semente em germinar em ambientes com intensa luminosidade. Por se tratar de uma espécie heliófita, *A. sellowiana* é altamente resistente às condições de grande luminosidade, tanto para germinação quanto para o crescimento e desenvolvimento (Pinto *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2009), favorecendo a sua propagação em áreas degradadas.

Em populações pequenas pode ocorrer, a curto prazo, deriva genética, o que significa ter as frequências de seus genes diferenciadas daquelas da população original, inclusive chegando a perder alelos. A mais longo prazo, ainda pode haver um aumento da endogamia, decorrente da maior probabilidade de acasalamento entre indivíduos aparentados (Kageyama *et al.*, 1998). Isto pode ser observado nas populações M1, M2 e B2 que mostraram valores de heterozigosidade observados maiores do que os esperados. Enquanto que para B1 e M2 as estimativas de H_O e H_E foram semelhantes, conseqüentemente os valores de F_{IS} não foram significativos, mostrando que nestas populações principalmente o efeito de deriva genética foi menor do que nas três populações discutidas anteriormente.

Divergência e Estrutura Genética

A diferenciação entre as populações estudadas foi de média a alta ($F_{ST} = 0,1970$). Este valor é próximo do encontrado por Ruas (2006) estudando *Schinus terebinthifolius* na bacia do rio Tibagi, em que se observou um F_{ST} igual a 0,193. Ainda assim, o valor de F_{ST} detectado no presente estudo foi maior do que o observado em estudos

com populações de áreas fragmentadas de plantas arbóreas tropicais, como os realizados por Yao *et al.* (2007) com *Changiosyrax dolichocarpa* ($F_{ST} = 0,064$) e por Hanson *et al.* (2008), com *Dipteryx panamensis* ($G_{ST} = 0,056$). Em contraste, populações naturais de espécies arbóreas tropicais, como *Acacia senegal* estudada por Omondi *et al.* (2009), mostrou valor de $F_{ST} = 0,045$. Raposo *et al.* (2007) trabalhando com populações naturais de *Carapa guianensis* observou um valor de $R_{ST} = 0,093$. Os valores de F_{ST} entre pares de populações e as distâncias genéticas de Nei (1978) foram numericamente similares e indicam que o processo de fragmentação florestal na bacia do rio Tibagi contribuiu para o aumento da divergência genética entre as populações de *A. sellowiana*. Isto fica mais evidenciado quando comparamos populações dentro de uma mesma região, por exemplo, M1 e M3 (0,2509) e M1 e M2 (0,2344), e também pelo fato da correlação entre os valores de F_{ST} e distância geográfica serem não significativos. Todos estes dados mostram que a maior parte da diferenciação genética encontrada entre as populações de *A. sellowiana* é dada pela ação antrópica.

A presença de maior variação genética dentro do que entre populações está relacionada a alta taxa de fecundação cruzada da espécie, e está de acordo com estudos realizados com espécies tropicais. As espécies arbóreas tropicais normalmente se reproduzem por alogamia ou por sistema misto, com dispersão de sementes a longas distâncias, apresentando uma baixa diferenciação populacional, mantendo a maior parte de sua variabilidade genética dentro das populações (Hamrick e Godt, 1990). *A. sellowiana* é uma espécie polinizada por abelhas (Yamamoto *et al.*, 2007) e a distância geográfica entre as populações amostradas provavelmente limita a dispersão de pólen entre as populações.

A. sellowiana produz uma grande quantidade de frutos consumidos e amplamente disseminados por várias espécies de pássaros (Lorenzi, 2002). Espécies do primeiro estágio sucessional possuem características ecológicas próprias resultantes da

existência de banco de sementes e da longa distância de dispersão de suas sementes (Ribas e Kageyama, 2004). Esse processo pode ter contribuído na formação das populações estudadas ao longo da bacia do rio Tibagi (Medri, 2008), e estar associado a presença de migrantes verificada pela análise bayesiana nas populações B1, B2 e M1. A presença de migrantes indica que as populações estudadas não estão geneticamente isoladas e que a migração contribui para a manutenção da variabilidade genética destas populações. A presença de migrantes também pode estar associada a menor diferenciação genética entre estas populações, como verificado entre B1 e M1 ($F_{ST} = 0,0818$). Além disso, o fluxo gênico pode estar contribuindo com o fato da heterozigosidade observada na população B1 não diferir dos valor esperado e também não ter sofrido efeito de endogamia. Já a população M2, apesar de não ter sido detectado presença de migrantes, apresenta um valor de F_{IS} baixo e não significativo o que explica o fato de H_O não ser diferente de H_E . Além disso, estes resultados mostram que a dispersão de sementes não foi completamente afetada pela fragmentação, mas pode ter alterado o padrão de fluxo de sementes entre populações mais próximas geograficamente.

A população M3 mostrou-se mais isolada geneticamente em relação as outras populações, como evidenciado pelos valores de distância genética e F_{ST} . Isto deve ter ocorrido pelo fato de não ter sido verificada a presença de migrantes nesta população e ocorrência de efeito de deriva genética mais acentuado em relação às outras populações como mostrado pelo teste de sinal. Ainda assim, o fluxo de genes via sementes e pólen contribui na manutenção da variação genética dentro das populações. Este fato é a razão pela qual não se constatou significância no teste de sinal, tanto para SMM quanto para IAM, para as populações B1, B2, M1 e M2. Isto não quer dizer que estas populações não tenham passado por um leve efeito de deriva genética, mas que o fluxo gênico pode estar camuflando a ação recente do efeito de gargalo de garrafa (Omondi *et al.*, 2009).

Os resultados deste trabalho mostram que SSR são mais informativos e possibilitam fazer inferências mais concretas sobre os processos evolutivos pelos quais as populações de *A. sellowiana* passaram, e isto implica no desenvolvimento de estratégias para a conservação das mesmas. É interessante notar que uma população de uma região da bacia contribui para variabilidade de uma outra população situada em região diferente da bacia do rio Tibagi. Isto indica que para *A. sellowiana* um eventual esforço de conservação e manejo não teria sucesso se fosse realizada a seleção de populações de apenas uma única região da bacia do rio Tibagi, já que não seria suficiente para a manutenção dos recursos genéticos da espécie, principalmente considerando a baixa densidade demográfica das populações estudadas.

Agradecimentos

R. B. R. de Oliveira agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado. P. M. Ruas agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (Processo nº 478179/06-5) e a Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Referências

Alves EM (2008) Identificação da flora e caracterização do mel orgânico de abelhas africanizadas das ilhas floresta e laranjeira, do alto rio Paraná. Tese, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Araújo BS, Ricarte CC, Araújo WS, Lima NGA, Costa CB, Santos ML, Ramos MVV (2006) Composição florística e aspectos estruturais de um remanescente florestal no *campus* da Universidade Estadual de Goiás. In: Seminário de Iniciação Científica, Anápolis. Disponível em: <http://www.prp.ueg.br/06v1/conteudo/pesquisa/inic-cien/eventos/sic2006/sic2006Flash/sic2006Flash.html>.

Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AS (2005) Bioestat: 2.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológica e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém.

Bertagna M (2007) Variabilidade genética de *Cróton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) em seis fragmentos de mata Atlântica do município de Campinas, SP. Tese, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Cardoso SRS, Eloy NB, Provan J, Cardoso MA, Ferreira PCG (2000) Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. Populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology* 9:1753-1760.

Cornuet JM e Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.

Degen B, Caron H, Bandou E, Maggia L, Chevallier MH, Leveau A, Kremer A (2001) Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. *Heredity* 87:497-507.

Dias MC, Vieira AOS and Paiva MRC (2002) Florística e fitossociologia de espécies arbóreas das florestas da bacia do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA (eds) A bacia do Rio Tibagi. Londrina, pp 109-124.

Doyle JJ e Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Photochemistry Bulletin* 19:11-15.

Excoffier L, Laval G e Schneider S (1993) Arlequin vers. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics Online* 1:47-50.

Goudet J (2002) FSTAT: a program to estimate and test diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>. Acesso: 28 dez. 2009.

Kageyama PY, Gandara FB e Souza LMI (1998) Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *Série Técnica IPEF* 12(32):65-70. Disponível em: <http://www.ipef.br/publicacoes/tecnica/nr32/cap05.pdf>.

Hardy OJ, Maggia L, Bandou E, Breyne P, Caron H, Chevallier MH, Doligez A, Dutech C, Kremer A, Latouche-Hallé C *et al.* (2006) Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology* 15:559-571.

Hamrick JL e Godt MJW (1990) Allozyme diversity in plant species. In: Brow AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS (eds) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland: Sinauer Associates, pp.43-63.

Hamrick JL, Godt MJW e Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6:95–124.

Hanson TR, Brunsfeld SJ, Finegan B, Waits LP (2008) Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. *Molecular Ecology* 17:2060-2073.

Hoshino AA, Palmieri DA, Bravo JP, Pereira TEB, Lopes CR (2002) Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 29: 145-150.

La Torre A, López C, Yglesias E, Cornelius JP (2008) Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian. *Amazon Forest Ecology and Management* 255:334–339

Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E (2004) Microsatellites within genes: structure, function and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21(6):991-1007.

Lima JA, Santana DG, Nappo ME (2009) Comportamento inicial de espécies na revegetação da mata de galeria na fazenda Mandaguari, em Indianópolis, MG. *Revista Árvore* 33(4):685-694.

Lorenzi H (2002) *Árvores brasileira: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 4th edition. Instituto Plantarum, Nova Odessa, pp 357.

Luikart G e Cornuet J M (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv Genet* 12:228-237.

Maack R (2002) *Geografia física do Estado do Paraná*. 3rd edition. Ed. Imprensa Oficial, Curitiba, 440 pp.

Martins K, Ribas LA, Moreno M A, Wadt LHO (2008) Consequências genéticas da regeneração natural de espécies arbóreas em área antrópica, AC, Brasil. *Acta bot bras* 22(3): 897-904.

Maruyama T e Fuerst PA (1985) Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genet* 111: 675-689.

Medri C (2008) Tolerância à hipoxia: aspectos morfoanatômicos de raiz, caule e folha, ecofisiologia e variabilidade genética de *Aegiphila sellowiana* Cham. (Verbenaceae). Tese, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA (2002) A bacia do Rio Tibagi. Londrina, pp 17-18.

Mendonça FA e Danni-Oliveira IM (2002) Dinâmica atmosférica e tipos climáticos predominantes da bacia do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA (eds) A bacia do Rio Tibagi. Londrina, pp 63-68.

Miller M (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA 1.3): A windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data.

Mossi AJ, Cansian RL, Leontiev-Orlov O, Cechet JL, Carvalho AZ, Toniazzo G, Echeverrigaray S (2009) Genetic diversity and conservation of native populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Braz. J. Biol.* 69(2):447-453.

Moura TM, Sebbenn AM, Chaves LJ, Coelho ASG, Oliveira GCX, Kageyama PY (2009) Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. *Sci. For.* 37(82):143-150.

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

Omondi SF, Kireger E, Dangasuk OG, Chikamai B, Odee DW, Cavers S, Khasa DP (2009) Genetic diversity and population structure of *Acacia Senegal* (L) Willd. in Kenya. *Tropical Plant Biology*.

Pinto LVA, Davide AC, Botelho SA, Oliveira Filho, AT, Machado ELM (2005) Distribuição das espécies arbóreo-arbustivas ao longo do gradiente de umidade do solo de nascentes pontuais da bacia hidrográfica do Ribeirão Santa Cruz, Lavras, MG. *Cerne* 11(3):294-305.

Pizo MA (2004) Frugivory and habitat use by fruit-eating birds in a fragmented landscape of southeast Brazil. *Ornitologia neotropical*, 15 (Suppl.), pp 117–126.

Piry S, Luikart G e Cornuet JM (1999) Bottleneck: a program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data. *Journal of Heredity* 90(4):502-503.

Pritchard JK, Stephens M e Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.

Raposo A, Martins K, Ciampi AY, Wadt LHO, Veasy EM (2007) Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(9):1291-1298.

Ribas LA, Kageyama PY (2004) Estrutura genética em uma população de *Trema micrantha* (L.) B. considerando diferentes estádios de vida. *Scientia Forestalis* 65:176-187.

Ruas EA (2006) Estudos de diversidade genética e anatomia ecológica de populações da espécie arbórea ciliar da Bacia do Rio Tibagi *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anarcadiaceae). Dissertação, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

Ruas EA, Conson ARO, Costa BF, Damasceno JO, Rodrigues LA, Reck M, Vieira AOS, Ruas PM, Ruas CF (2009) Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) and intergeneric transferability. *Conservation Genet Resour* 1:245–248.

Ruas EA, Damasceno JO, Conson ARO, Costa BF, Rodrigues LA, Reck M, Vieira AOS, Ruas CF, Medri, C, Ruas PM (2010) Isolation and characterization of eleven microsatellite loci for the tree species *Aegiphila sellowiana* Cham. (Lamiaceae) and intergeneric transferability. Em análise para publicação na revista *Biologia Plantarum*.

Soares-Silva LH, Silva FC, Cavalheiro AL (2001) Inventário florístico e revitalização do bosque da Associação dos Funcionários Municipais de Londrina. *Brasil Florestal* 70:22-31.

Souza PA, Peixoto GL, Nunes LAPL, Martins SV (2002) Rebrotas de espécies arbóreas em fragmento florestal por fogo em Viçosa, MG. In: V Simpósio Nacional sobre Recuperação de Áreas Degradadas: Água e Biodiversidade. Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas, pp. 75-77.

Stipp NAF (2000) Macrozoneamento ambiental da bacia hidrográfica do rio Tibagi (PR). Londrina. 222 pp.

Stipp NAF (2002) Principais tipos de solos da bacia do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA (eds) *A bacia do Rio Tibagi*. Londrina, pp.39-43.

Torezan JMD (2002) Nota sobre a vegetação da bacia do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA (eds) *A bacia do Rio Tibagi*. Londrina, pp.103-108.

Wallace LE (2002) Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae): inferences from allozyme and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Species Biol* 17:37-49.

Wilson GA e Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163:1177-1191.

Yao X, Ye Q, Kang M, Huang H (2007) Microsatellite analysis reveals interpopulation differentiation and gene flow in the endangered tree *Changiostyrax dolichocarpa* (Styracaceae) with fragmented distribution in central China. *New phytologist* 176:472-480.

Yeh FC, Boyle T, Rongcai Y, Ye Z, Xizyan JM (1997) Popgene 1.31, a software for the analysis of genetic variation among and within populations using co-dominant and dominant markers.

Yamamoto LF, Kinoshita LS e Martins FR (2007) Síndromes de polinização e de dispersão em fragmentos da Floresta Estacional Semidecídua Montana, SP, Brasil *Acta bot. bras.* 21(3): 553-573.

CONCLUSÕES

O elevado grau de desmatamento da bacia do rio Tibagi pode ter contribuído com a baixa variabilidade genética observada, embora as populações tenham apresentado bom nível de estruturação genética. Ainda assim, mais estudos envolvendo *A. sellowiana* em toda a bacia do rio Tibagi são necessários para melhor compreender os processos evolutivos que estão agindo sobre esta espécie em áreas com forte ação antrópica. Isto auxiliaria na determinação de quais populações podem servir como fonte de sementes para reflorestamento de áreas degradadas, uma vez que este trabalho observou que há fluxo gênico entre as populações, e que este processo estaria contribuindo para diminuir o efeito da deriva genética sobre a variabilidade das populações estudadas.

REFERÊNCIAS

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

ALVES, E. M. **Identificação da flora e caracterização do mel orgânico de abelhas africanizadas das ilhas floresta e laranjeira, do alto rio Paraná**. 2008. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

APPROBATO, A. U.; GODOY, S. A. P. Levantamento de diásporos em áreas de Cerrado no Município de Luiz Antônio, SP. **Hoehnea**, v. 33, n. 3, p. 385-401, 2006.

ARAÚJO, B. de S.; RICARTE, C. C.; ARAÚJO, W. S.; LIMA, N. G. A.; COSTA, C. B.; SANTOS, M. L.; RAMOS, M. V. V. Composição florística e aspectos estruturais de um remanescente florestal no *campus* da Universidade Estadual de Goiás. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 4., 2006, Anápolis. **Resumos...** Disponível em: <<http://www.prp.ueg.br/06v1/conteudo/pesquisa/inic-cien/eventos/sic2006/sic2006Flash/sic2006Flash.html>>. Acesso em: 28 dez. 2009.

AVISE, J. C. **Molecular markers: natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994.

BARROS, M. V. F.; MENDONÇA, F. de A. Uso e ocupação do solo. In: STIPP, N. A. F. (Org.). **Macrozoneamento ambiental da bacia hidrográfica do rio Tibagi (PR)**. Londrina, 2000. p. 83-96.

BAWA, K. S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution**, v. 28, p. 85-92, 1974.

BERTAGNA, M. **Variabilidade genética de *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) em seis fragmentos de mata Atlântica do município de Campinas, SP**. 2007. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBEN, A. M. Pollen movement and spatial genetic structure in a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics**, Arlington, v. 9, p. 855-868, 2008.

BORÉM, A. Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 3. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2001.

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

BRAMMER, S. P.; MILACH, S. C. K. Marcadores genéticos usados em plantas. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). **Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 2002. p.167-182.

CAIXETA, E. T.; OLIVIERA, A. C. B.; BRITO, G. G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.) **Marcadores moleculares**. Viçosa, 2006. p. 9-77.

CIAMPI, A. Y. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites, AFLP e seqüenciamento de cpDNA no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria do Cerrado**. 1999. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

COATES, D. J.; ATKINS, K. A. Priority setting and the conservation of Western Australia's diverse and highly endemic flora. **Biological Conservation**, v. 97, p. 251-263. 2001.

CROW, J. F.; KIMURA, M. **An introduction to population genetics theory**. Harper and Row, New York. 1970.

DEGEN, B.; CARON, H.; BANDO, E.; MAGGIA, L.; CHEVALLIER, M. H.; LEVEAU, A.; KREMER, A. Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analyzed by RAPDs. **Heredity**, v. 87, p. 497-507, 2001.

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

EPPERSON, B. K. Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. **Genetics**, Bethesda, v. 124, p. 757-771, 1990.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. Longman: Harlow, 1996.

FERREIRA, W. C.; BOTELHO, S. A.; DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R. Estabelecimento de mata ciliar às margens do reservatório da usina hidrelétrica de CAMARGOS, MG. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 19, n. 1, p. 69-81, 2009.

FERREIRA, E. M.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRPA-CENARGEN, 1995.

FISCHER, M.; HUSI, R.; PRATI, D. et al. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**, v. 87, p. 1128-1137, 2000.

FLEISHMAN, E.; LAUNER, A. E.; SWITKY, K. R. et al. Rules and exceptions in conservation genetics: genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implication for management planning. **Biological Conservation**, v. 98, p. 45-53. 2001.

FORÉ, S. A.; HICKEY, R. J.; VANKAT, J. L. et al. Genetic structure after forest fragmentation: a landscape ecology perspective on *Acer saccharum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, p. 165-168, 1992.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Atlas dos remanescentes florestais e ecossistemas associados do domínio da Mata Atlântica no período 1995-2000**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica/Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais e Instituto Socioambiental, 2002.

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

GAIOTTO, F. A.; GRATTAPAGLIA, D.; VENCOVSKY, R. Genetic structure, mating system and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, Cary, v. 94, p. 399-406, 2003.

GANDOLFI, S.; LEITÃO FILHO, H. F.; BEZERRA, C. L. F. Levantamento florístico e caráter sucessional das espécies arbustivo-arbóreas de uma floresta mesófila semidecídua no Município de Guarulhos, SP. **Revista Brasileira de Biologia**, v.55, n.4, p.753-767, 1995.

GOULART, S. L. **Anatomia comparada do lenho de raiz e caule de *Lippia salviaefolia* Cham. e *Aegiphila sellowiana* Cham. (Verbenaceae) de área de cerrado do estado de São Paulo**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

HAIG, S. M. **Molecular contributions to conservation**. *Ecology*, v. 79, n. 2, p. 413-425, 1998.

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

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. Allozyme diversity in plants. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L., WEIR, B. S. (Ed.). **Population genetics, breeding and germplasm resources in crop improvement**. Sunderland: Sinauer Press, v. 1 p. 43-63. 1989.

HAMRICK, J. L.; MURAWSKI, D. A. The breeding structure of tropical tree populations. **Plant Species Biology**, v. 5, p. 157-165, 1990.

HANCOOK, J. M. Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutation mechanisms. In: GOLDSTEIN, D. B.; SCHLOTTERER, C. (Ed.) **Microsatellite: evolution and implications**. Oxford: Oxford University Press, 1999. p. 1-9.

HARDY, O. J.; MAGGIA, L.; BANDOU, E.; BREYNE, P.; CARON, H.; CHEVALLIER, M. H.; DOLIGEZ, A.; DUTECH, C.; KREMER, A.; LATOUCHE-HALLÉ, C.; TROISPOUX, V.; VERON, V.; DEGEN, B. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. **Molecular Ecology**, v. 15, p. 559-571, 2006.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997.

HOEBEE, S. E.; YOUNG, A. G. Low neighbourhood size and high interpopulation differentiation in the endangered shrub *Grevillea iaspicula* McGill (Proteaceae). **Heredity**, Oxford, v. 86, n. 4, p. 489-496, 2001.

HOSHINO, A. A.; PALMIERI, D. A.; BRAVO, J. P. PEREIRA, T. E. B.; LOPES, C. R. Marcador microssatélite na conservação de germoplasma vegetal. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 145-150, 2002.

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

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73, 1985.

- JONES, B.; GLIDDON, C.; GOOD, J. E. G. The conservation of variation in geographically peripheral populations: *Lloydia serotina* (Liliaceae) in Britain. **Biological Conservation**, v. 101, p. 147-156. 2001.
- KAGEYAMA, P.; LEPSCH-CUNHA, N. M. Singularidade da biodiversidade nos trópicos. In: GARAY, I.; DIAS, B. (Org.). **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais**. Petrópolis: Vozes. p. 199-214, 2001.
- KAGEYAMA, P. Y.; SEBBEN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F. B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, n. 64, p. 93-107, 2003.
- KARRON, J. D.; THUMSER, N. N.; TUCKER, R.; HESSENAUER, A. J. The influence of population density on outcrossing rates in *Mimulus ringens*. **Heredity**, v. 75, p. 175-180, 1995.
- LEFORT, F.; KYVELOU, J.; ZERVOU, M.; EDWARDS, K. J.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. Characterization of new microsatellite loci from *Vitis vinifera* and their conservation in some *Vitis* species and hybrids. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 1, p. 20-21, 2002.
- LEVIN, D. A.; KESTER, H. W. Gene flow in seed plants. **Evolutionary Biology**, v.7, p.139-220, 1974.
- LI, Y. C.; KOROL, A. B.; FAAHIMA, T.; NVO, E. Microsatellites within genes: structure, function and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, n. 6, p. 991-1007, 2004.
- LIMA, J. A.; SANTANA, D. G.; NAPPO, M. E. Comportamento inicial de espécies na revegetação da mata de galeria na fazenda Mandaguari, em Indianópolis, MG. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 685-694, 2009.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 398-401, 1989.
- LOPES, M. S.; SEFC, K. M.; LAIMER, M.; MACHADO, C. A. Identification of microsatellite loci in apricot. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 1, p. 24-26, 2002.

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

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, p. 65-95. 1984.

MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. 3. ed. Curitiba: Ed. Imprensa Oficial, 2002.

MACHADO, W. S. **Avaliação comparativa do processo de ocupação e degradação das terras das microbacias hidrográficas dos Ribeirões Três Bocas e apertados no Norte do Paraná**. 2005. Dissertação (Mestrado em Geografia, Meio Ambiente e Desenvolvimento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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

MARTINS, K.; RIBAS, L. A.; MORENO, M. A.; WADT, L. H. O. Consequências genéticas da regeneração natural de espécies arbóreas em área antrópica, AC. Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 897-904, 2008.

MARTINS, S. V.; RIBEIRO, G. A.; SILVA JUNIOR, W. M. da; NAPPO, M. E. Regeneração o pós-fogo em um fragmento de floresta estacional semidecidual no município de Viçosa, MG **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 12, n. 1, p. 11-19, 2002.

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

MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina: Ed. do autor, 2002.

MELO JÚNIOR, A. F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J. S.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forstalis**, n. 66, p. 56-65, 2004.

MENDONÇA, F. A. A tipologia climática: gênese, características e tendências. In: STIPP, N. A. F. (Org.). **Macrozoneamento ambiental da bacia hidrográfica do rio Tibagi (PR)**. Londrina, 2000. p. 21-62.

MENDONÇA, F. A.; DANNI-OLIVEIRA, I. M. Dinâmica atmosférica e tipos climáticos predominantes da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Ed.). **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina, 2002. p. 65.

MENGES, E. S. Seed germination percentage increases with population size in a fragmented prairie species. **Conservation Biology**, v. 5, p. 158-164, 1991.

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

MILLIGAN, B. G.; LEEBENS-MACK, J.; STRAND, A. E. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. **Molecular Ecology**, v.3, p. 423-435, 1994.

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

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

NASCIMENTO, H. E. M.; DIAS, A. da S.; TABANEZ, A. A. J.; VIANA, V. M. Estrutura e dinâmica de populações arbóreas de um fragmento de floresta estacional semidecidual na região de piracicaba, SP. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59 n. 2 p.329-342, 1999.

NASSAR, J. M.; HAMRICK, J. L.; FLEMING, T. H. Genetic variation and population structure of the mixed-mating cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). **Heredity**, Oxford, v. 87, n. 1, p. 69-79, 2001.

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

NEWBURY, H. J.; FORD-LLOYD, B. V. The use of RAPD for assessing variation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 12, p. 43-51, 1993.

PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUG, M. D.; BOOTON, G. C.; FUERST, P. A. What molecules can tell us about populations: choosing and using molecular markers. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 361-382, 1998.

PERECIN, M. B. **Diversidade genética em populações naturais de espécies de Espinheira-Santa, *Maytenus aquifolia* Mart. e *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss.** 2000. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

PERINI, A. **Gestão das águas urbanas:** delineamento da natureza e ações antrópicas, raízes históricas e sócio-culturais. 2004. Dissertação (Mestrado em Geografia, Meio Ambiente e Desenvolvimento) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

PINESE, J. P. P. Síntese geológica da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Ed.) **A bacia do Rio Tibagi.** Londrina, 2002. p. 5.

PINHEIRO, M. H. O.; MONTEIRO, R. Contribution of forest species to the floristic composition of a forested savanna in southeastern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 763-774, 2006.

PINTO, L. V. A.; DAVIDE, A. C.; BOTELHO, S. A.; OLIVEIRA FILHO, A. T.; MACHADO, E. L. M. Distribuição das espécies arbóreo-arbustivas ao longo do gradiente de umidade do solo de nascentes pontuais da bacia hidrográfica do Ribeirão Santa Cruz, Lavras, MG. **Cerne**, Lavras, v. 11, n. 3, p. 294-305, 2005.

PITHER, R.; SHORE, J. S.; KELLMAN, M. Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. **Heredity**, v. 91, p. 307-313, 2003.

PIZO, M. A. Frugivory and habitat use by fruit-eating birds in a fragmented landscape of southeast Brazil. **Ornitologia Neotropical**, 15 (suppl.), p. 117–126, 2004.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends of Plant Science**, v.1, p.215-222, 1996.

RAINA, S. N.; RANI, V.; KOJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K. P.; DEVARUMATH, R. M. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. **Genome**, v. 44, p. 763–772, 2001.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? **Biological Conservation**, Beijing, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

ROTMAN, W.; BOYLE, T. J. Effects of logging and other forms of harvesting in humid tropical forests. In: YOUNG, A.; BOSCHER, D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics, principles and practice**. Australia: CSIRO, 2000. p. 115-122.

RUAS, E. A. **Estudos de diversidade genética e anatomia ecológica de populações da espécie arbórea ciliar da Bacia do Rio Tibagi *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

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

SÁ, C. F. C. de. Regeneração de um trecho de floresta de restinga na Reserva Ecológica Estadual de Jacarepiá, Saquarema, Estado do Rio de Janeiro: II - Estrato arbustivo. **Rodriguésia**, v. 53, n. 82, p. 5-23, 2002.

SANTOS, A. B.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. da S.; SANTOS, L. A.; SCHMIDT, T. M.; BAFFA, O. Antioxidant properties of plant extracts: an EPR and DFT comparative study of the reaction with DPPH, TEMPOL and Spin Trap DMPO. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, 1483-1492, 2009.

SAUNDERS, D. A.; HOBBS, R. J.; MARGULES, C. R. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. **Conservation Biology**, v.5, p.18-32. 1991.

SEBBEN, A. M. **Estrutura genética de populações de jequitibá-rosa *Carina legalis* (Mart.) O. Ktze por caracteres quantitativos e isoenzimas**. Piracicaba. 2001. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

SEBBEN, A.M.; SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VENKOVSKY, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia Forestalis**, n. 58, p.127-143, 2000.

SHAFFER, M. Minimum populations sizes for species conservation. **Bioscience**, v.31, p.131-134, 1981.

SHARMA, I. K. Understanding clonal diversity patterns through allozymes polymorphism in as endangered and geographically restricted Australian shrub, *Zieria baeuerlnii*, and

implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 681-695, 2001.

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

SOKAL, R. R.; JACQUEZ, G. M.; WOOTEN, M. C. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection. **Genetics**, v. 121, p. 845-855. 1989.

SOARES-SILVA, L. H.; SILVA, F. das C.; CAVALHEIRO, A. L. Inventário florístico e revitalização do bosque da Associação dos Funcionários Municipais de Londrina. **Brasil Florestal**, n. 70, p. 22-31, 2001.

SOUZA, L. M. F. I. **Estrutura genética de populações naturais de *Chorisia speciosa* St. Hill (Bombacaceae) em fragmentos florestais na região de Bauru (SP) - Brasil**. 1997. Tese (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

SOUZA, S. A. C. D. **Avaliação da variabilidade genética em *Musa spp* utilizando marcadores microssatélites**. 2002. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

STEINER, J. J.; GREENE, S. L. Proposed ecological descriptors and their utility for plant germplasm collections. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 2, p. 439-451, 1996.

STIPP, N. A. F. **Sociedade, natureza e meio ambiente no norte do Paraná: a porção inferior da bacia hidrográfica do rio Tibagi**. Londrina: Ed. UEL, 2000a.

_____. **Macrozoneamento ambiental da bacia hidrográfica do rio Tibagi (PR)**. Londrina, 2000b.

TARAZI, R. **Diversidade genética estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. no cerrado**. 2009. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

THOMAS, C. M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; JONES, D. A.; NORCOTT, K. A.; CHARWICK, B. P.; JONES, J. D. G. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium*. **Plant Journal**, v. 8, p. 785-794, 1995.

TOREZAN, J. M. D. Nota sobre a vegetação da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. (Ed.). **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina, 2002. p.103-108.

VIEIRA, M. V.; OLIFIERS, N.; DELCIELLOS, A. C.; ANTUNES, V. Z.; BERNARDO, L. R.; GRELLE, C. E. B.; CERQUEIRA, R. Land use vs. fragment size and isolation as determinants of small mammal composition and richness in Atlantic Florest remnants. **Biological Conservation**, Beijing, v. 142, p. 1191-1200, 2009.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain-reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, n. 3, p. 388-396, 1989.

YAMAMOTO, T.; KIMURA, T.; SHODA, M.; BAN, Y.; HAYASHI, T.; MATSUTA, N. Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 1, p. 14-16, 2002.

YAMAMOTO, L. F.; KINOSHITA, L. S.; MARTINS, F. R. Síndromes de polinização e de dispersão em fragmentos da Floresta Estacional Semidecídua Montana, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 3, p. 553-573, 2007.

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

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.