

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade genética de populações de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell.
(Meliaceae)) no Centro-Sul do Brasil**

Flávio Bertin Gandara

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Recursos Florestais, com opção em
Conservação de Ecossistemas Florestais

**Piracicaba
2009**

Flávio Bertin Gandara
Engenheiro Agrônomo

Diversidade genética de populações de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)) no Centro-Sul do Brasil

Orientador:
Prof. Dr.: **PAULO YOSHIO KAGEYAMA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Recursos Florestais, com opção em Conservação de Ecossistemas Florestais

**Piracicaba
2009**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Mendes, Flávio Bertin Gandara

Diversidade genética de populações de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)) no Centro-Sul do Brasil / Flávio Bertin Gandara Mendes. - - Piracicaba, 2009.
87 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Cedro 2. Genética de populações vegetais 3. Marcador molecular 4. Variação genética em plantas I. Título

CDD 634.9756
G195d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

A todos que participaram e contribuíram
com esta fase da minha vida,
especialmente minha querida família

OFEREÇO

Aos que concebem o uso e a conservação da biodiversidade
como bases de uma sociedade mais sustentável.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que participaram e contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho. Muitos foram os que me ajudaram nesta caminhada da minha vida e que foram fundamentais para o meu desenvolvimento e possibilitaram eu estar aqui escrevendo estas linhas. Algumas pessoas talvez nem imaginem o quanto contribuíram e talvez eu também não imagine ainda o quanto algumas colaboraram.

Agradeço, em especial:

A Deus, que me guiou e permitiu esta caminhada e me apresentou seus ensinamentos!

Ao amigo e mestre Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama por me orientar, ensinar e me formar na ciência e por ser um exemplo de ética e dedicação ao ideal de termos uma sociedade mais justa e sustentável.

À minha família que amo muito e sempre me incentivou nos meus estudos. Vocês foram fundamentais na minha formação e no acolhimento nos momentos difíceis. À minha Mãe, Elydia, um exemplo de força e de amor à vida que me guia sempre. Aos meus irmãos, Fernando e Roberto, meus companheiros e amigos que tanto me apóiam. À Maria pelo incentivo e torcida. Aos meus sobrinhos queridos, João, Paula, Pedro e Carol que muito me orgulham.

Ao meu companheiro Aduino pela enorme paciência nos muitos momentos difíceis nestes anos e pelo seu olhar crítico e analítico que não se contenta com uma simples explicação. Agradeço seu olhar, sua compreensão, seu companheirismo!

Aos grandes amigos e colegas do laboratório LARGEA do Departamento de Ciências Florestais: uma grande equipe! Em especial à Elza e à Andréia pelo apoio incondicional no trabalho e grande amizade nos momentos bons e difíceis do nosso trabalho. Agradeço muito também à Beatriz (*in memoriam*), Lúcia Helena, Karina, Roberto, Carol, Sybelle, Gabi, Bruna.

Aos que me auxiliaram nas muitas coletas de campo: Gelson, Chico, Beatriz (*in memoriam*), Paulo Floss, Dodô, Klaus, Girlei, Nero.

Ao CENARGEN (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia) pelo apoio laboratorial e no desenvolvimento dos *primers* microssatélites, especialmente ao Dario Grattapaglia, Ana Ciampi, Rosana Brondani e Taciana Cavalcanti.

Aos queridos amigos nesta caminhada na ESALQ: Renata Oliveira, Calu, Karina Martins, João Dagoberto, Roberto Tarazi, Sybelle Barreira, Mário Moraes.

Aos colegas do NACE PTECA: Marina, André, Caron, Mariana, Karine, Lisandro, Dodô, Girlei, João, Nana, Luciana, Paula, Moira pelas grandes discussões e ideais.

Aos docentes do Departamento de Ciências Biológicas, meus companheiros de trabalho pelo apoio e coleguismo todos os dias, em especial ao Sergius e também à Beatriz, Jaime, Ricardo Rodrigues, Paulo Castro, Lindolpho e Helaine. Aos funcionários do Departamento de Ciências Biológicas, especialmente ao Chico.

Aos amigos do Departamento de Ciências Florestais pela acolhida e motivação, em especial: Tereza, Leonardo, Fernando, Demóstenes, Francides, Stape, Margarete, Catarina.

Aos meus queridos alunos, que me iluminam e me ensinam a cada dia e que são o motivo primeiro do trabalho de um professor. São muitos os responsáveis pelo meu trabalho, mas os represento pelos integrantes do PET Ecologia, com os quais aprendi muito mais que trabalhar.

À FAPESP e pelo apoio financeiro do projeto.

A natureza é o único livro que oferece um conteúdo valioso em todas as suas folhas.

Goethe

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 O Cedro (<i>Cedrela fissilis</i> Vellozo - Meliaceae)	15
1.2 Mata Atlântica	20
1.3 Diversidade Genética.....	21
1.4 Conservação de espécies arbóreas tropicais	22
1.5 Marcadores Microsatélites	25
1.6 Objetivos.....	27
Referências	28
2 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSATÉLITES PARA <i>Cedrela fissilis</i> Vell. (MELIACEAE)	35
2.1 Introdução.....	35
2.2 Material Métodos.....	36
2.3 Resultados e Discussão.....	38
Referências	43
3 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>Cedrela fissilis</i> Vell. NO CENTRO SUL DO BRASIL	45
3.1 Introdução.....	45
3.2 Objetivos.....	46
3.3 Material e Métodos	46
3.3.1 Populações analisadas e coleta	46
3.3.2 Extração de DNA e análise genética	50
3.3.3 Marcadores genéticos em <i>Cedrela fissilis</i>	50
3.3.4 Amplificação dos locos microsatélites.....	50
3.3.5 Análises estatísticas	51
3.3.6 Estrutura genética	51
3.3.7 Fluxo gênico	52
3.3.8 Teste do isolamento pela distância.....	52
3.3.9 Análise de agrupamento	53

3.3.10 Tamanho efetivo populacional.....	53
3.3.11 Número de populações a serem conservadas.....	53
3.4 Resultados e Discussão	54
Referências.....	63
4 ESTRUTURA GENÉTICA INTERNA DE POPULAÇÕES DE <i>Cedrela fissilis</i> Vell.	66
4.1 Introdução	66
4.2 Material e Métodos	68
4.2.1 Áreas de estudo	68
4.2.2 Coleta das amostras.....	69
4.2.3 Extração de DNA.....	70
4.2.4 Marcadores genéticos em <i>Cedrela fissilis</i>	70
4.2.5 Amplificação dos locos microsatélites	71
4.2.6 Análise estatística.....	71
4.2.6.1 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	71
4.2.6.2 Diversidade genética	72
4.2.6.3 Correlação espacial dos genótipos	72
4.3 Resultados e Discussão	73
Referências.....	80
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
6 CONCLUSÕES	87

RESUMO

Diversidade genética de populações de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)) no Centro-Sul do Brasil

Cedrela fissilis Vell. é árvore alta (10 a 30 m) por 40 a 50 cm de diâmetro. Tronco retilíneo com sapopemas pouco desenvolvidas ou ausentes, mas quando atacado pela broca do ponteiro, *Hypsipyla grandela*, é tortuoso. Casca grossa, dura, fissurada, de marrom a pardo - acinzentada. Folhas alternas com 8 a 24 pares de folíolos. Flores actinomorfas, unissexuadas, de 5 a 10 mm de comprimento reunidas em tirso axilares. Os frutos são cápsulas lenhosas deiscentes de 3 a 10 cm de comprimento, que encerram de 30 a 300 sementes aladas, com até 35 mm de comprimento por 15 mm de largura. A polinização é realizada por insetos, possivelmente mariposas e abelhas e a dispersão de sementes é anemocórica. *C. fissilis* é uma das espécies arbóreas mais ameaçadas pelo corte seletivo e destruição da Mata Atlântica no centro-sul do Brasil, sua principal área de ocorrência, tornando a conservação dos seus recursos genéticos extremamente ameaçada pela redução populacional que vem sofrendo. Por outro lado, esta espécie tem um grande potencial para produção de madeira de alta qualidade, principalmente em plantios mistos, que estão se tornando economicamente viáveis pela escassez de madeira no mercado nacional e internacional, bem como, está sendo também muito utilizada em projetos de restauração de florestas tropicais. Neste contexto, torna-se fundamental o estudo da diversidade genética das populações remanescentes desta espécie e da estruturação desta diversidade. Este trabalho analisou dez populações de *C. fissilis* em cinco estados da região centro-sul do Brasil, visando analisar sua estrutura genética e inferir estratégias para sua conservação, bem como estabelecer critérios para a utilização dos recursos genéticos existentes. Foram desenvolvidos nove locos microssatélites para a espécie revelando 130 alelos em todas as populações. A endogamia nas populações foi relativamente baixa. As populações apresentaram diferenciação genética segundo o modelo de isolamento pela distância. As populações tanto da floresta estacional semidecidual como da floresta ombrófila densa apresentaram maior similaridade entre si. A estrutura genética interna de duas populações (Parque Estadual Intervales – SP e Parque Estadual do Rio Doce - MG) mostrou uma distribuição aleatória dos genótipos. Já na população da Reserva Florestal do Matão – PR, a estruturação espacial foi significativa, revelando uma similaridade genética entre os indivíduos mais próximos (até 30m). Indivíduos jovens e adultos foram analisados em duas populações (Parque Estadual Intervales - SP e Reserva Florestal do Matão – PR) revelando uma diversidade gênica semelhante para os dois estádios nas duas populações. No entanto, observa-se uma tendência de aumento da diversidade gênica e diminuição de endogamia nos adultos em relação aos jovens. Estes dados permitem também inferir sobre outras espécies florestais similares, uma vez que não existem dados disponíveis sobre a diversidade genética em grandes regiões geográficas em espécies arbóreas da Mata Atlântica.

Palavras-chaves: Cedro; *Cedrela fissilis*; Diversidade Genética; Estrutura Genética; Marcadores Microssatélites

ABSTRACT

Genetic diversity of populations of Cedro (*Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)) in Southern-center Brazil

Cedrela fissilis Vell. is a high tree (10 a 30 m) with a DBH between 40 and 50 cm. Rectilinear trunk with little developed or absent sapopemas, but when attacked by the Cedar Shoot Borer is crooked. Thick, hard, brown to gray bark. Alternate leaves from 8 to 24 leaflet pairs. Actinomorphic unisexual flowers, from 5 to 10 mm length, produced in groups. Fruits are wood deiscent capsules from 3 to 10 cm length, with 30 to 300 winged seeds, till 35 mm length by 15 mm wide. Pollination is conducted by insects, probably moths and bees and seed dispersion is anemocoric. *Cedrela fissilis* is one of the most endangered tree species due to the selective logging and destruction of Atlantic Forest in southern-center Brazil, its main distribution region. On the other side, this species has a grate production potential of a high quality wood, mainly in mixed stands, what becomes economically viable because the lack of wood in national and international market, as well as it is being used in restoration projects of tropical forests. Besides these facts, the conservation of genetic resources of this species is very critical by the drastic population reduction that it is suffering. In this context, it becomes very important the study of the genetic diversity of the remnant populations of this species and the structure of this variation. This study analyzed ten natural populations of *C. fissilis* in five states in the southern-center region of Brazil, aiming to examine their genetic structure and infer strategies for genetic conservation, as well as, establishes criteria to use the genetic resources. Nine microsatellites loci were developed for this species and revealed 130 alleles in all populations. Populations inbreeding was relatively low. Populations presented genetic differentiation following the isolation by distance model. Populations from the seasonal semi deciduous forest, as well as from the evergreen forest presented higher similarity among them. Internal genetic structure of two populations (Intervales State Park – SP and Rio Doce State Park - MG) showed a random spatial distribution of genotypes. The population of Matão Forest Reserve – PR showed a significant spatial structure, revealing a genetic similarity among near trees (till 30 m). Juveniles and adult plants were analyzed in two populations (Intervales State Park - SP and Matão Forest Reserve – PR), showing similar genetic diversity for the two classes in both populations. But, we observe a tendency of increase in genetic diversity and decrease in inbreeding in adult plants in relation to juveniles. These data also allow inferring about other similar tree species, since there is no available data on the genetic diversity of Atlantic Forest tree species in large geographical regions.

Keywords: Cedar; *Cedrela fissilis*; Genetic diversity; Populations structure; Microsatellite markers

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Cedro (*Cedrela fissilis* Vell. - Meliaceae)

Cedrela fissilis Vell. é uma das espécies arbóreas mais ameaçadas pelo corte seletivo e destruição da Mata Atlântica no centro-sul do Brasil, sua principal área de ocorrência. Esta espécie tem um grande potencial para produção de madeira de alta qualidade, principalmente em plantios mistos, que estão se tornando economicamente viáveis pela escassez de madeira no mercado nacional e internacional.

As Meliáceas compreendem uma família amplamente distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais, sendo representada por 51 gêneros e cerca de 550 espécies, quase todas lenhosas, proporcionando madeiras de grande valor, como as do gênero *Swietenia*, que fornece a madeira mais valiosa das Antilhas e América Tropical, conhecida como mogno; e *Cedrela*, cuja madeira, conhecida comercialmente como cedro, possui reconhecida importância econômica.

Cedrela é um gênero de árvores da América Tropical e Subtropical (Smith; Earle, 1960). No Brasil, há três espécies, dotadas de lenhos muito semelhantes que recebem denominações populares de cedro, cedro branco, cedro rosa e cedro vermelho, conforme a região e espécie. As três espécies são: *Cedrela fissilis*, *Cedrela odorata* e *Cedrela lilloi*. *Cedrela fissilis* é árvore alta (10 a 30 m) por 40 a 50 cm de diâmetro. Tronco retilíneo com sapopemas pouco desenvolvidas ou ausentes, mas quando atacado pela broca do ponteiro, *Hypsipyla grandela*, é tortuoso. Casca grossa, dura, fissurada, de marrom a pardo - acinzentada. Folhas alternas com 8 a 24 pares de folíolos. Flores actinomorfas, unissexuadas, de 5 a 10 mm de comprimento reunidas em tirso axilares. Os frutos são cápsulas lenhosas deiscentes de 3 a 10 cm de comprimento, que encerram de 30 a 300 sementes aladas, com até 35 mm de comprimento por 15 mm de largura (Figura 1.1).

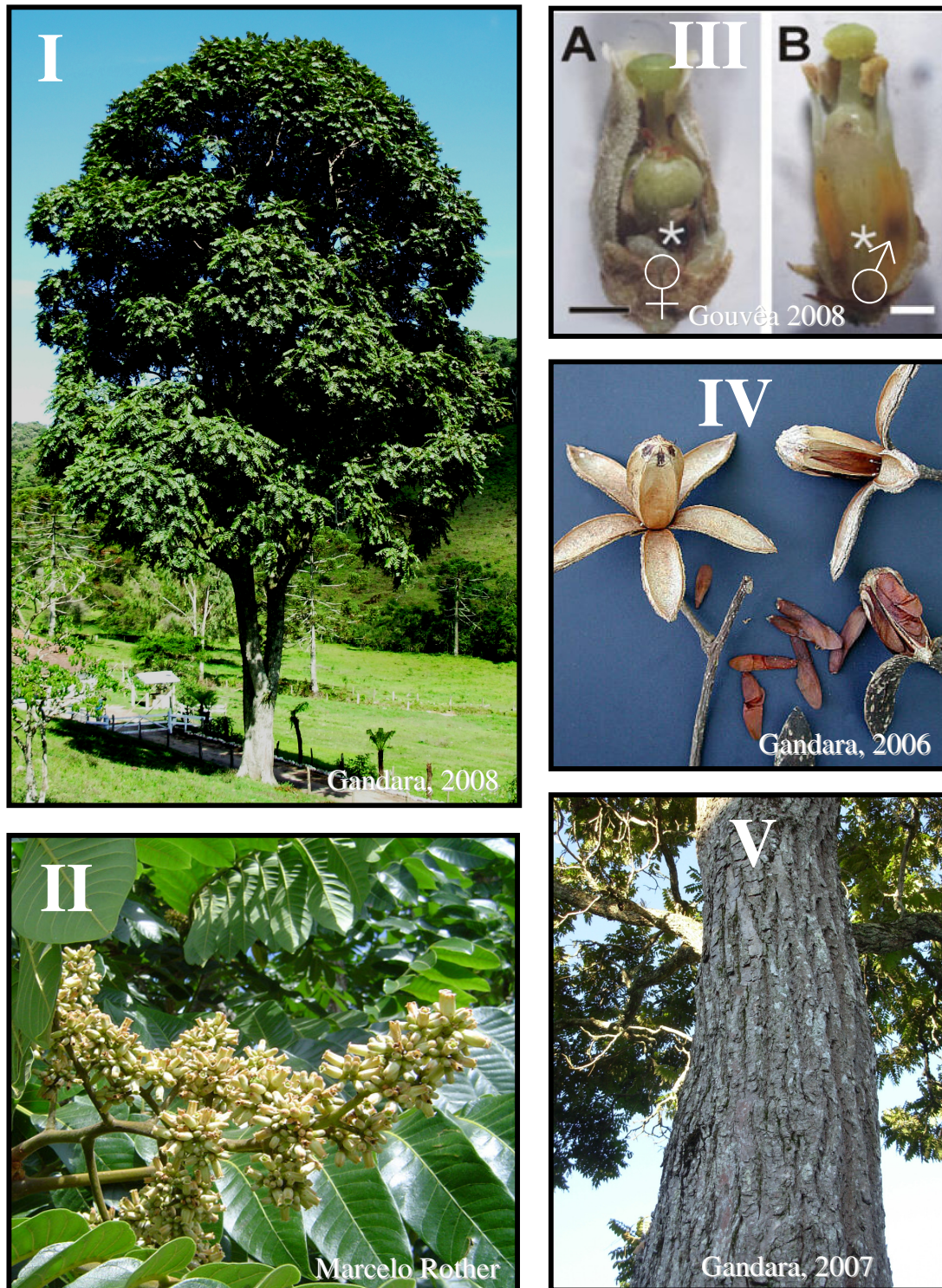


Figura 1.1 - *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae): I - indivíduo adulto, II - inflorescência, IIIA - flor feminina, IIIB - flor masculina, IV - frutos e sementes, e V - detalhe da casca e tronco

Espécies do gênero *Cedrela* e outras Meliaceae produzem limonóides que apresentam um largo espectro de atividades biológicas, especialmente ação inseticida (AMBROZIN et al., 2006). Estratos e frações de *C. fissilis* mostraram atividade contra operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (AMBROZIN, 2000, AMBROZIN et al., 2006).

C. fissilis é uma espécie com elevada dependência micorrízica (SAGGIN-JÚNIOR, 1997; ROCHA et al., 2006). Segundo Pouyu-Rojas, Siqueira e Santos (2006), *C. fissilis* apresenta altíssima responsividade à inoculação com micorrizas, no entanto, é seletiva em relação à susceptibilidade a diferentes espécies de fungos.

C. fissilis apresenta boa tolerância em ambientes multicontaminados, especialmente por metais pesados, sendo, portanto, considerado promissor para fitorremediação de ambientes contaminados por essas substâncias (MARQUES, 1996; PAIVA; CARVALHO; SIQUEIRA, 2002).

C. fissilis pode ser considerada uma espécie secundária inicial ou secundária tardia. Apresenta crescimento em florestas primárias, mas tem grande desenvolvimento em florestas secundárias.

Esta espécie tem a capacidade de adaptação a diferentes condições de luz (SANTOS et al., 2006). Sua germinação pode ocorrer tanto sob luz direta como também à sombra, mas seu crescimento é muito lento sob sombra, sendo que as plântulas em subosque permanecem “aguardando” a abertura de uma clareira para, assim, incrementar a taxa de crescimento.

Segundo Santos et al. (2006), plântulas de *C. fissilis* sob sombra mostraram fotossíntese líquida positiva mesmo em níveis de radiação iguais ao ponto de compensação luminoso para a maioria das espécies de plantas, mostrando uma estratégia de adaptação à sombra. No entanto, os mesmo autores relatam que as plantas em condições de luz apresentaram um grande crescimento, mostrando a capacidade de aproveitar os recursos disponíveis nestas condições.

Isso pode ser evidenciado pelo fato de que plântulas de *C. fissilis* são comumente encontradas em bordas de florestas e em clareiras, ambientes de alta luminosidade.

A distribuição do gênero *Cedrela* abrange desde altitudes perto do nível do mar até locais de 3000 m na Bolívia. Segundo Gonzáles (1976), *Cedrela fissilis* distribui-se pela América do Sul, no Peru, Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina. Segundo Pennington (1981), tem ampla distribuição pela América Latina, desde o norte da Argentina e Paraguai até Panamá e Costa Rica. No Brasil, é de ocorrência comum nas regiões leste e sul, podendo chegar às regiões centro-

oeste, norte a nordeste (Ramalho 1978), o que faz com que *C. fissilis* esteja amplamente distribuído nas formações florestais brasileiras.

As árvores de *C. fissilis* apresentaram comportamento fenológico sazonal (SANTOS; TAKAKI, 2005, FERRAZ et al., 1999), caracterizado pela forte deciduidade durante os meses mais secos e frios do ano. As brotações ocorrem intensamente no início das chuvas (de agosto a outubro) seguidas pela floração após o amadurecimento das folhas (de setembro a novembro). A dispersão de sementes ocorre nos meses de junho a agosto coincidindo com o período de deciduidade.

O período de maturação dos frutos é longo (cerca de 10 meses), permanecendo os frutos verdes nas árvores até o próximo período seco, quando ocorre a maturação e dispersão das sementes (SANTOS; TAKAKI, 2005).

Nos trabalhos de fenologia com a espécie, nota-se uma forte sincronia fenológica entre os indivíduos de uma mesma população, em particular das fases reprodutivas da espécie (SANTOS; TAKAKI, 2005, FERRAZ et al. 1999), o que contribui para a polinização cruzada.

Em *C. fissilis*, o padrão de florescimento pode ser considerado regular, pois a floração ocorre normalmente no mesmo período do ano e supra anual, porque não ocorrem todos os anos em todas as árvores (SANTOS; TAKAKI, 2005; FERRAZ et al., 1999).

A dispersão de sementes em *C. fissilis* é realizada pelo vento e favorecida pelo porte das árvores, que ocupam o dossel ou são emergentes; dessa forma, podem expor suas sementes aos ventos mais fortes da estação seca, quando ocorre a deiscência dos frutos (JUSTINIANO; FREDERICKSEN, 2000). As árvores de *C. fissilis* produzem grandes quantidades de sementes a cada dois anos.

Enquanto árvores de cedro podem ocorrer como indivíduos esparsos nas florestas não perturbadas, onde suas copas pertencem ao extrato superior, elas são mais numerosas em áreas de florestas secundárias (SMITH; EARLE, 1960; CARVALHO, 1994). Gandara (1996) encontrou uma densidade média de uma árvore a cada 8 ha em uma área de 270 ha de floresta primária. Nogueira (1977) também afirma que é uma árvore esparsa nas matas, sendo que na formação da floresta heterogênea, apenas as plantas isoladas se desenvolvem perfeitamente.

Segundo Carvalho (1994), *C. fissilis* ocorre a uma densidade variando de uma a três árvores por hectare nas florestas do sul do Brasil, e considera que esta baixa densidade é uma estratégia encontrada pela espécie para evitar o ataque da broca do cedro.

Hypsipyla grandella Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) é uma broca de lepdóptera que ataca brotos de plantas jovens e adultos quebrando a dominância apical, o que causa uma múltipla brotação levando a uma produção excessiva de ramos laterais. O hábito alimentar de *H. grandella* tem frustrado as tentativas de estabelecer plantações comerciais de cedro (*Cedrela* spp.) e outras meliáceas como o mogno (*Swietenia* spp.) na América Latina e Caribe (MAYHEW; NEWTON, 1998; GRIJPMAN; RAMALHO, 1973; LUKOP HILJE; CARBALLO, 2004).

C. fissilis é bastante freqüente na regeneração de áreas abandonadas. Nesses casos, apresentando alta densidade de indivíduos, podendo, no entanto, essas populações estarem geneticamente degradadas. Kageyama e Gandara (1998) mostraram que em uma população de *C. fissilis*, ocorrendo em uma floresta secundária, apesar da alta densidade populacional, havia maior endogamia se comparada com população em floresta primária e também havia uma estruturação genética espacial. Esta estruturação pode ser decorrente da recolonização da floresta a partir das poucas árvores que devem ter restado depois da exploração madeireira das árvores adultas.

Segundo Carvalho (1994) a alta densidade de indivíduos favorece o ataque da broca-do-cedro (*H. grandella*) comprometendo o valor comercial das árvores, pois esta se deforma após os ataques.

C. fissilis apresenta atualmente uma distribuição rarefeita e esparsa. Certamente os melhores fenótipos para a utilização madeireira já desapareceram, restando os indivíduos com pior forma silvicultural.

A espécie, em toda sua área de ocorrência, deve estar sofrendo uma severa erosão genética pela perda tanto de populações como de indivíduos (PATIÑO-VALERA, 1997).

A conservação dos recursos genéticos desta espécie, bem como de outras espécies de baixa densidade como esta, está muito ameaçada pela redução populacional que vem sofrendo. Neste contexto, torna-se fundamental o estudo da diversidade genética das populações remanescentes desta espécie e da estruturação desta diversidade.

Estes estudos permitirão elaborar uma estratégia para a conservação genética de *Cedrela fissilis* no centro-sul do Brasil, bem como estabelecer critérios para a utilização dos recursos genéticos existentes. Estes dados permitirão também inferir e gerar indicadores sobre uma série de outras espécies florestais similares (espécies secundárias com baixa densidade populacional como jequitibá (*Cariniana* spp.), peroba (*Aspidosperma polyneuron*), ipê roxo (*Tebebuia* spp.), jatobá (*Hymenaea courbaril*) e outras) uma vez que existem poucos dados disponíveis sobre a

diversidade genética em grandes regiões geográficas de espécies arbóreas tropicais (GANDARA et al., 1997).

1.2 Mata Atlântica

A Mata Atlântica, pela sua grande riqueza biológica e níveis de ameaça, foi escolhida como um dos *hotspots* mundiais, indicando ser uma das áreas mais prioritárias para a conservação da biodiversidade em todo o mundo (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2004). Ela está presente na Argentina e Paraguai além do Brasil e se estende por uma amplitude de 27° de latitude, apresentando grandes variações ambientais, como relevo e pluviosidade, dando origem a diferentes formações vegetais, contribuindo para a grande biodiversidade existente (PINTO et al., 2006; OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000; SILVA; CASTELETI, 2003).

Da área original da Mata Atlântica no Brasil, ou seja, 1.350.000 km², hoje restam menos de 8% de sua cobertura (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2002). A destruição da Mata Atlântica reflete a ocupação humana dessa região e a exploração irracional dos recursos naturais. Durante a história de ocupação, diferentes ciclos de exploração impactaram a cobertura florestal e hoje a área originalmente ocupada pela Mata Atlântica abrange grande concentração populacional e os maiores núcleos urbanos e industriais do país, além de importantes regiões agrícolas (CÂMARA, 2003; HIROTA, 2003; MITTERMEIER et al., 2004).

A conservação e recuperação desse Bioma constituem um grande desafio para o país, já que muitas ações e intervenções de diferentes naturezas são necessárias. No entanto, para que estas sejam implementadas, ainda falta conhecimento sobre o funcionamento dos seus ecossistemas e sua relação com os ambientes antrópicos (PINTO et al., 2006).

Apesar da grande perda de habitat já ocorrida, a Mata Atlântica ainda abriga uma grande diversidade biológica. Alguns estudos mostram que ela apresenta um dos maiores índices de riqueza de plantas arbóreas do mundo (THOMAS et al., 1998; THOMAS; MONTEIRO, 1997). O estabelecimento de estratégias de conservação eficientes para essas espécies passa pelo aumento no conhecimento sobre a biodiversidade. Informações sobre a distribuição geográfica, status taxonômico, interações bióticas, dinâmica populacional e diversidade genética são fundamentais (LEWINSOHN; PRADO, 2002).

1.3 Diversidade Genética

A diversidade genética, ou seja, as variações herdáveis encontradas dentro de indivíduos, populações e espécies, pode ser analisada em um loco gênico específico nesses três níveis. Nos indivíduos, a diversidade genética pode ser observada quando se encontram indivíduos homocigotos e heterocigotos. Já em populações, a diversidade está presente quando indivíduos diferentes apresentam alelos diferentes. Por exemplo, em uma espécie diplóide, quando ocorrem mais de dois alelos em determinado loco em uma população, nenhum indivíduo pode apresentar toda a diversidade presente. No nível específico, a diversidade pode ser verificada na variação das frequências alélicas entre populações (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2005).

O estudo da diversidade genética em populações naturais abrange a descrição dos níveis de variação genética dentro de populações, assim como, o modo como ela está distribuída entre as populações (HAMRICK, 1983).

Alguns índices são utilizados para caracterizar a diversidade genética intrapopulacional como: porcentagem de locos polimórficos (\hat{P}), número médio de alelos por loco (\hat{A}), heterocigosidade esperada ou diversidade gênica (\hat{H}_e) em equilíbrio de Hardy-Weinberg; heterocigosidade observada (\hat{H}_o) e índice de fixação (f) (BERG; HAMRICK, 1997).

Em espécies alógamas, como muitas espécies arbóreas tropicais, a maior parte da variação genética ocorre dentro das populações, sendo que a divergência entre populações será maior quanto menor for o fluxo gênico entre populações (LOVELESS; HAMRICK, 1987).

Vários fatores podem interferir na distribuição da variação genética como dispersão de pólen e sementes, status sucessional, longevidade e distribuição geográfica (HAMRICK, 1983). Essa distribuição não aleatória de alelos e genótipos em uma espécie é denominada estrutura genética. Ela é criada e se mantém devido à interação entre fatores evolutivos, como seleção, deriva, migração e mutação, com fatores ecológicos como distribuição espacial, tamanho efetivo, sistema reprodutivo, dispersão de pólen e sementes (HAMRICK, 1983). A caracterização da estrutura genética tem sido realizada por diferentes metodologias, destacando-se: a estatística F de Wright (WRIGHT, 1965); a análise da variância das frequências gênicas (COCKERHAM, 1969) e a análise da diversidade genética em populações subdivididas (NEI, 1973). Estas três

abordagens são similares quanto às bases genéticas, procurando verificar a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações.

As estatísticas F de Wright fornecem os níveis médios de fixação dos alelos para o total de populações, dentro das populações e a divergência genética entre as populações, baseados em medidas de probabilidade de identidade por descendência (WRIGHT, 1965; NEI, 1977). Já a análise de variância das frequências gênicas de Cockerham (1969) fornece a distribuição da variabilidade genética em diversos níveis e o erro associado à amostragem. Por último, a análise da diversidade genética em populações subdivididas de Nei (1973) fornece a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações e os níveis de heterozigidade esperados para o total e para a média das populações.

A diversidade genética é fundamental tanto para a manutenção do processo evolutivo como também para o melhoramento genético. O seu estudo em espécies arbóreas tropicais é essencial, pois estas espécies são as maiores responsáveis pela estrutura dos ecossistemas florestais e estão ameaçadas pelos processos de desmatamento e uso intensivo desses ecossistemas. Espécies ou populações que apresentarem baixos valores de diversidade genética podem ter sua capacidade de sobrevivência reduzida em face de mudanças ambientais, doenças, etc.

1.4 Conservação de espécies arbóreas tropicais

O rápido avanço da devastação de áreas naturais devido à ocupação por atividades humanas tem colocado em risco diversas espécies de animais e plantas, pois, ao reduzir as áreas de vida, populações e espécies tornam-se mais vulneráveis. Assim, nas ações de conservação, deve sempre haver a preocupação de avaliar o tamanho adequado de áreas para serem preservadas, bem como o tamanho mínimo viável das populações a serem mantidas (SCHAFFER, 1993).

Envolvida nessas questões, está o fato de que uma população ou espécie para poder sobreviver ao longo do tempo, ou seja, evoluir, necessita ter diversidade genética suficiente para permitir sua sobrevivência diante a mudanças ambientais (HAMRICK; GODT, 1990;

HAMRICK; NASON, 1996; WEIR, 1990). Existem vários casos relatados de espécies ameaçadas devido à perda de diversidade genética (HAMRICK; GODT, 1996).

No entanto, não há um consenso em relação à importância relativa da diversidade genética de populações e espécies e a dinâmica de populações com a conservação das mesmas (SCHEMSKE et al., 1994). Alguns autores questionam a importância da diversidade genética na sobrevivência de uma espécie ou população frente a fatores ecológicos como a destruição de habitats ou mudanças ambientais que podem levar à extinção de populações e espécies inteiras (LANDE, 1988; SCHEMSKE et al., 1994). Alterações em fecundidade, crescimento e sobrevivência em populações de plantas podem estar sendo mais influenciadas por fatores ambientais do que genéticos (ANTONOVICS; LEVIN, 1980).

A história de vida de espécies de plantas envolve tanto aspectos demográficos como genéticos. Características, como a forma de dispersão de pólen e sementes, são determinantes na estruturação da diversidade genética, assim sendo, essa capacidade de dispersão está relacionada à probabilidade de influenciar a variabilidade genética de outras populações. Características fisiológicas, que determinam a capacidade de sobrevivência em diferentes condições ambientais, são produtos do genótipo do indivíduo e das interações com o meio físico onde este se encontra (LEWONTIN, 2000).

Do ponto de vista genético, o número de indivíduos necessários para uma população ser viável deve levar em conta, além do número total de indivíduos na população, o número efetivo ou N_e (WRIGHT, 1931), ou seja, o número de indivíduos que estão contribuindo com gametas para a próxima geração. Normalmente o N_e é menor que o tamanho populacional, devido a flutuações do tamanho populacional ao longo do tempo, variações no número de descendentes por indivíduo da população ou a alterações da razão sexual de 1:1 (AVISE, 1994).

Há pouquíssimas informações disponíveis sobre a história de vida de espécies de plantas nativas, em parte devido à grande dificuldade de realizar estudos de dinâmica de populações com espécies perenes. Dessa forma, tem sido mais viável a utilização de informações sobre diversidade e estrutura genética para propor estratégias de conservação para as mesmas.

Frente à grande diversidade biológica e dificuldade de abranger todas as espécies em programas de conservação, têm sido apresentadas algumas estratégias para escolha de espécies alvo para propostas e ações de conservação. Uma delas sugere a escolha de espécies-bandeira, ou seja, espécies com um apelo carismático, que mobilizam o apoio da sociedade, valorizando o

trabalho de conservação (KAGEYAMA et al., 2001). Espécies que podem ser destacadas nesse âmbito estão o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*), a arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*), o pau-brasil (*Caesalpinia echinata*). Essas espécies são utilizadas como um mote ou tema para o marketing de programas de conservação e pesquisas e não se constituem um grupo com características ecológicas específicas e, portanto, não auxiliam a compreensão do ecossistema como um todo (STELLA, 2002).

Terborgh (1986) já sugere outra estratégia para seleção da espécie através de espécies-chave, que seriam espécies com grande importância ecológica nas comunidades por proverem recursos fundamentais para outras espécies. Gilbert (1980) denomina essas espécies de mutualistas-chave, que normalmente são plantas, e que provêm alimento aos chamados elos móveis (animais polinizadores, dispersores e predadores) em situações de deficiência alimentar dentro das comunidades. Essas seriam espécies mais valiosas para a conservação de toda a comunidade (STELLA, 2002).

Uma terceira estratégia para selecionar espécies como referência para a conservação é por meio da identificação de espécies-modelo. Essas espécies representariam grupos de espécies com características ecológicas semelhantes, e, portanto, com padrões genéticos e demográficos também semelhantes. Assim sendo, as características de uma espécie modelo podem ser extrapoláveis, até certo ponto, para todo o grupo (KAGEYAMA et al., 2001).

Namkoong et al., (2002) destacam que as espécies indicadoras devem ter representatividade biológica, ecológica e taxonômica, além de serem as mais susceptíveis aos efeitos dos impactos antrópicos. Assim sendo, diferentes espécies indicadoras devem refletir diferentes tipos de impactos antrópicos. A estratégia de utilizar espécies indicadoras pode contribuir para o acúmulo de informações, inclusive facilitando o acesso a indicadores genéticos com menores custos (NAMKOONG et al., 2002).

Kageyama e Lepsh-Cunha (2001) sugerem algumas características e grupos de espécies arbóreas tropicais que seriam importantes para a identificação de espécies modelo. Uma das características destacadas é a raridade (baixa densidade populacional) que cria uma vulnerabilidade à diminuição da área ocupada por populações (fragmentação) e por retirada de indivíduos da população (corte seletivo). Essas espécies raras são normalmente espécies secundárias no processo sucessional e podem se tornar mais comuns (aumentar a densidade

populacional) em áreas antropizadas, mas, nesses casos, podem apresentar alterações na estrutura e diversidade genética.

As perturbações antrópicas podem ser de diversas naturezas como a fragmentação de hábitat, as queimadas, a exploração dos recursos madeireiros e não madeireiros, que levam a alterações na diversidade e estrutura genética. Essas alterações estão relacionadas a quatro processos evolucionários: deriva genética, seleção, migração e reprodução (NAMKOONG et al., 2002). Como a manutenção da variabilidade genética em populações antropizadas depende da conservação dos processos evolucionários, é necessário definir indicadores para o monitoramento desses processos. Assim, Namkoong et al., (2002) propõem quatro indicadores para o monitoramento desses processos: nível de variação genética, mudança direcional nas frequências alélicas ou genotípicas, fluxo gênico entre populações, e processos do sistema de reprodução. Ao estudar esses indicadores em populações das espécies modelo, é possível avaliar o efeito dos diferentes tipos de perturbações antrópicas nos grupos representados por essas espécies e tecer inferências, conseqüentemente, para o restante da comunidade.

1.5 Marcadores Microssatélites

Há quase 50 anos começaram a ser estudadas as variações genéticas através de marcadores isoenzimáticos. Esses marcadores foram, e ainda continuam a ser utilizados em diversos grupos de organismos. No entanto, avanços da biologia molecular, como a descoberta das enzimas de restrição nos anos 60 e da reação em cadeia da polimerase (PCR) nos anos 80, permitiram a introdução de novos tipos de marcadores moleculares com detecção de polimorfismo diretamente no DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SCHLÖTTERER, 2004). Durante esse período, vários tipos diferentes de marcadores foram utilizados. Alguns desses foram sendo substituídos por outros mais informativos e baratos (SCHLÖTTERER, 2004). Análises comparativas entre os diferentes tipos de marcadores podem ser obtidas em Ferreira e Grattapaglia (1998), Glaubitz e Moran (2000) e Schlötterer (2004).

Dentre os marcadores mais utilizados atualmente, estão os marcadores microssatélites ou SSR (seqüências simples repetidas), que são seqüências de nucleotídeos repetidas em “tandem” cuja unidade de repetição varia de um a cinco pares de base. São encontrados em uma ampla

diversidade de espécies e também no genoma cloroplastidial de plantas (JARNE; LAGODA, 1996). São abundantes e com distribuição relativamente homogênea em regiões eucromáticas dos genomas (SCHLÖTTERER, 2004). Nas plantas, os microssatélites ocorrem em maior densidade em regiões de DNA de cópia única, especialmente em regiões que são transcritas, mas não são traduzidas.

Segundo Morgante, Hanafey e Powell (2002), a história da evolução do genoma e das forças seletivas determina a distribuição e a frequência dos microssatélites no genoma das diferentes espécies. A expansão do microssatélite em geral segue o modelo de mutação aos passos, com o aumento ou diminuição de repetições, resultantes de erros no processo de replicação do DNA, que resultam no deslizamento da polimerase. O modelo de mutação aos passos é considerado o mecanismo predominante de mutação no microssatélite (CHAMBERS; MACAVOY, 2000), porém a recombinação desigual pode gerar mutações de maior amplitude (JARNE; LAGODA, 1996).

As regiões que flanqueiam os microssatélites apresentam seqüências de DNA geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, o que permite a seleção de iniciadores específicos que amplificam por PCR os fragmentos contendo as seqüências repetitivas em todos os genótipos (OLIVEIRA et al., 2006). Um ensaio de marcadores microssatélites envolve a amplificação específica por PCR e posterior separação dos alelos de um loco por meio da migração diferencial em gel de eletroforese. As bandas podem ser visualizadas no gel por meio de coloração com brometo de etídio ou nitrato de prata, ou ainda, pela utilização de iniciadores fluorescentes em combinação com seqüenciador semiautomático de DNA (CAIXETA et al., 2006).

Os microssatélites são codominantes e apresentam herança mendeliana simples. Também são considerados seletivamente neutros e, normalmente, são muito polimórficos em populações naturais. Por apresentarem grande poder de discriminação decorrente do elevado número de alelos, esses marcadores são amplamente utilizados em mapeamentos genéticos, em genética forense e em análises mais refinadas de genética populacional, tais como a estimação de coeficientes de parentesco e os testes de paternidade (CHAMBERS; MACAVOY, 2000; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; GLAUBITZ; MORAN, 2000; SCHLÖTTERER, 2004).

Segundo Goldstein e Pollock (1997), pode ocorrer homoplasia de tamanho em marcadores microssatélites, devido ao fato de apresentarem elevadas taxas de mutação, podendo

chegar à ordem de 10^{-3} . Dessa forma, alelos com o mesmo tamanho podem ser oriundos de linhagens distintas, ou seja, serem alelos idênticos por tamanho, mas não por descendência (ESTOUP; JARNE; CORNUET, 2002). Esse fato pode levar a consequências como a superestimação dos coeficientes de parentesco (CHAMBERS; MACAVOY, 2000) e o viés nas estimativas de divergência entre populações baseada em estatísticas que não consideram o modelo de mutações aos passos (JARNE; LAGODA, 1996).

Dessa forma, alguns autores (GOODMAN, 1997; SLATKIN, 1995), considerando o modelo de mutações aos passos, já propuseram abordagens estatísticas para estimação da divergência entre populações. Assim, a partir de dados gerados por marcadores moleculares e com uso dessas metodologias é possível calcular o fluxo gênico e migração entre populações naturais com razoável confiabilidade (CHAMBERS; MACAVOY, 2000).

Os marcadores microssatélites têm sido utilizados em estudos genéticos em algumas espécies da família Meliaceae (RAPOSO, 2007; CLOUTIER et al., 2007; DAYANANDAN et al., 1999; LEMES et al., 2003).

1.6 Objetivos

Este trabalho tem como objetivos principais:

- a) Desenvolver marcadores microssatélites específicos para *Cedrela fissilis*;
- b) Estudar a diversidade genética de 10 populações naturais de *Cedrela fissilis* no centro-sul do Brasil;
- c) Estudar a dinâmica da diversidade genética e estrutura demográfica de três populações da espécie; e,
- d) Sugerir estratégias para a conservação da espécie e uso adequado dos recursos genéticos disponíveis.

Referências

AMBROZIM, A.R.P. **Química e atividade inseticida do óleo de *Carapa guianensis* e das folhas de *Canavalia ensiformis***. 2000 p.87. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

AMBROZIM, A.R.P.; LEITE, A.C.; BUENO, F.C.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; BUENO, O.C.; SILVA, M.F.G.F.; PAGNOCCA, FC.; HEBLING, M.J.A.; BACCI Jr. M. Limonoids from Andiroba Oil and *Cedrela fissilis* and their Insecticidal Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.17, n.3, p. 542-547, 2006.

ANTONOVICS, J.; LEVIN, D.A. The ecological and genetic consequences of density-dependent regulation in plants. **Annual Review in Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 11, p. 411-452, 1980.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman and Hall, 1994. 511p.

BERG, E.E.; HAMRICK, J.L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal Forest Research**, Ottawa, v. 27, n.3, p.415-424, 1997.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A., CAIXETA, E.T. (Ed.) **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. p. 9-78.

CÂMARA, I.G. Brief History of conservation in the Atlantic Forest. In: GALINDO-LEAL, C.; GUSMÃO-CÂMARA, I. (Ed.) **State of the hotspots: the Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Center for Applied Biodiversity Sciences and Island Press. 2003. p. 31-42.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Florestas, PR. 1994. 640p.

CHAMBERS, G.K.; MACAVOY, E.S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 126, p. 455-476, 2000.

CLOUTIER, D.; KANBASHIRO, M; CIAMPI, A.Y.; SCHOEN, D.J. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, Oxford, v.16, p. 797-809, 2007.

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

DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, J.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (MELIACEAE). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 1585–1592, 1999.

ESTOUP, A.; JARNE, P.; CORNUET, J.M. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v 11, p.1591-1604, 2002.

FERRAZ, D.K.; ARTES, R.; MANTOVANI, W.; MAGALHÃES, L.M. Fenologia de árvores em fragmento de mata em São Paulo, SP. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 2, p. 305-317, 1999.

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

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE. 2001. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica e ecossistemas associados no período de 1995–2000**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica/INPE. 2001.

GANDARA, F.B. **Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. 1996. 83p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - IB/UNICAMP, Campinas. 1996.

GANDARA, F.B.; GRATTAPAGLIA, D.; KAGEYAMA, P.Y.; BATISTA, J.L.F.; CIAMPI, A.Y.; WALTER, B. M. T.; CAVALCANTI, T. B.; UDRY, C.; ABDALA, G. Towards the development of genetic and ecological parameters for in situ conservation of forest genetics resources. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS. 1997. Brasília **Proceedings...** Brasília: Ibama/Gtz, 1997. p. 105-111.

GILBERT, L.E. Food web organization and the conservation of neotropical diversity. In: SOULÉ, M.E.; WILCOX, B.A. (Ed.). **Conservation Biology: an evolutionary-ecological perspective**. Sunderland: Sinauer Associates. 1980. p.11-33.

GOLDSTEIN, D.B.; POLLOCK, D.D. Launching microsatellites A review of mutation processes and methods of phylogenetic inference, **Journal of Heredity**, Washington, v. 88, p. 335–342, 1997.

GOODMAN, M. F. Hydrogen bonding revisited: geometric selection as a principal determinant of DNA replication fidelity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 10493-10495, 1997.

GLOUBITZ, J.C.; MORAN, G.F. Genit tools: the use of biochemical and molecular markers: In: YOUNG, A., BOSHIER, D., BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Collingwood: CSIRO, 2000. p. 39-59.

GOUVÊA, C.S.; DORNELAS M.C.; RODRIGUEZ, A.P.M. Floral Development in the Tribe Cedreleae (Meliaceae, Sub-family Swietenioideae): *Cedrela* and *Toona*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 101, p. 39–48, 2008.

GRIJPMA, P.; RAMALHO, R. *Toona* spp., posibles alternativas para el problema del barrenador *Hypsipyla grandella* de las Meliaceae en América Latina. In: GRIJPMA, P. (Ed.). **Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller)**. Lep. Pyralidae, San José, v. 1, n. 101, Costa Rica, 1973. p. 3-17.

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

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWOLD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MAC-BRYDE, B.; THOMAS, W.L. (Ed.). **Genetics and conservation**. Menlo Park, C.A. 1983. p.335-348.

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

HAMRICK, J. L.; GODT, J.W. Conservation genetics of endemic plant species. In: AVISE, J. C.; HAMRICK, J. L. (Ed.). **Conservation genetics: case histories from nature**. New York: Chapman and Hall, 1996. p. 281 – 304.

HAMRICK, J.L.; NASON, J.D. Consequences of dispersal in plants. In: (RHODES JR., O.E.; CHESSER, R.K.; SMITH, M.H. (Ed.). **Population dynamics in ecological space and time**. Chicago: The University of Chicago Press, 1996. p. 203-236.

HAMRICK, J.L.; NASON, J.D. Gene flow in forest trees. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Ed.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Collingwood: CSIRO Publishing, 2000. p.81-89.

HIROTA, M.M. Monitoring the Brazilian Atlantic Forest cover. In: GALINDO-LEAL, C.; GUSMÃO-CÂMARA, I. (Ed.). **State of the hotspots: the Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Washington, DC.:Center for Applied Biodiversity Sciences and Island Press, 2003. p. 60-65.

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Evolution and Ecology**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 424-429, 1996.

JUSTINIANO, M.A.; FREDERICKSEN, T.S. Phenology of Tree Species in Bolivian dry forests. **Biotropica**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 276-281, 2000.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B. Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

- KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; VENCovsky, R. Conservação in situ de espécies arbóreas tropicais. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S DE; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 149-158.
- LANDE, R. Genetics and demography in biologic conservation. **Science**, Washington, v. 241, p. 1455-1459, 1988.
- LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, MELIACEAE) across the Brazilian Amazon, based on variation at macrosatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 2875–2883, 2003.
- LEPSCH-CUNHA, N.I. **Estrutura genética e fenologia de espécies raras de *Couratari* spp. (LACYTHIDACEAE) na Amazônia Central**. 1996. 147p. Dissertação (Mestrado na área de Recursos Florestais) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. 1996.
- LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. São Paulo: Editora Contexto, 2002. 176p.
- LEWONTIN, R. **The triple helix**. Cambridge: Harvard University Press, 2000. 129p.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Distribución de la variación en especies de árboles tropicales. **Revista Biología Tropicales**, San Jose, v. 35, p. 165-175, 1987.
- LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis, and application**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. 326p.
- LUKO HILJE, R.; CARBALLO, M. Development of *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Lepidoptera: PYRALIDAE) in response to constant temperatures. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 1, p.1-6, 2004.
- MARQUES, T.C.L.L.S.M. **Crescimento e absorção mineral de mudas de espécies arbóreas em material de solo contaminado com metais pesados**. 1996.116 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.
- MAYHEW, J.E.; NEWTON, A.C. **The silviculture of mahogany**. Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing. 1998. 226p.
- MITTERMEIER, R.A.; GIL, P.R.; HOFFMANN, E.; PILGRIM, J.; BROOKS, J.; MITTERMEIER, C.G.; LAMOURUX, J.; FONSECA, A.B. **Hotspots revisited: earth's biodiversity richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Washington, DC.: Cemex, 2004. p. 136-147.
- MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, New York, v. 30, p. 194–200, 1999.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservations priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, 2002.

NAMKOONG, G.; BOYLE, T.; EL-KASSABY, Y.A.; PALMBERG-LERCHE, C.; ERIKSSON, G.; GREGORIUS, H.R.; JOLY, H.; KREMER, J.A.; SAVOLAINEN, O.; WICKNESWARI, R.; YOUNG, A.; ZEH-NLO, M.; PRABHU, R. **Criteria and indicators sustainable forest management: assessment and monitoring of genetic variation**. Roma: FAO, 2002. 29p.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, Chicago, v. 106, n. 949, p. 283-292. 1972.

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

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, London, v.41, p.225-233, 1977.

NOGUEIRA, J.C.B. Reflorestamento heterogêneo com essências indígenas. **Boletim Técnico do Instituto Florestal**, São Paulo, n. 24, p. 1-74, 1977.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; FONTES, M.A.L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, Oxford, v. 32, n. 4b, p. 793-810, 2000.

OLIVEIRA, V.B.V.; BENTES-GAMA, M.M.; VIEIRA, A.; RODRIGUES, V.G.S.; LOCATELLI, M. Organização e sensibilização para o manejo florestal comunitário em assentamento rural. In: ENCONTRO DA ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA EM AMBIENTE E SOCIEDADE - ANPPAS, 3.,2006. **Papéis...** Brasília: ANPPAS, 2006. (GT 7 - Manejo Comunitário de Recursos Naturais).

PAIVA, H.N.; CARVALHO, J.G.; SIQUEIRA, J.O. Teor de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) submetidas a doses crescentes de níquel, em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 279-284, 2002.

PATIÑO-VALERA, F. Genetic resources of *Swietenia* and *Cedrela* in the neotropics. Rome: United Nations Food and Agriculture Organization, 1997. 58 p.

PENNINGTON, T.D.; STYLES, B.T. **Meliaceae**. New York: New York Botanical Garden, 1981. 470p. (Flora Neotropica, Monograph, 28)

PINTO, L.P.; BRITO, W. Dynamics of biodiversity loss in the Brazilian Atlantic Forest: na introduction. In: GALINDO-LEAL, C.; GUSMÃO-CÂMARA, I. (Ed.). **State of the hotspots: the Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Washington: Center for applied biodiversity sciences and island press,. 2003. p. 27-30.

PINTO, L.P.; BEDÊ, L.; PAESE, A.; FONSECA, M.; PAGLIA, A.; LAMAS, I. Mata Atlântica Brasileira: os desafios para conservação da biodiversidade de um Hot Spot Mundial. In: ROCHA, C.F.D.; BERGALLO, H.G.; SLUYS, M.V.; ALVES, M.A.S.(Ed.). **Biologia da Conservação: Essências**. São Carlos, SP. : RiMa Editora. 2006. p. 91-118.

POUYU-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J.O.; SANTOS, J.G.D. Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 413-424, 2006.

RAMALHO, R.S. **Dendrologia**. Viçosa:Imprensa Universitária, UFV. 1978. 123p.

ROCHA, F.S.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R.; LIMA, W.L. Dependência e resposta de mudas de cedro a fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p.77-84, 2006.

SANTOS, D.L.; TAKAKI, M. Fenologia de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae) na região rural de Itirapina. **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 19, n. 3, p. 625-632, 2005.

SANTOS, D.L.; RAKOCEVIC, M.; TAKAKI, M.; RIBASKI, J. Morphological and Physiological Responses of *Cedrela fissilis* Vellozo (MELIACEAE) Seedlings to Light. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 49, n. 1 p. 171-182, 2006.

SAGGIN-JÚNIOR, O.J. **Micorrizas arbusculares de espécies arbóreas do Sudeste brasileiro**. 1997. 120p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

SCHEMSKE, D.W.; HUSBAND, B.C.; RUCKELSHAUS, M.H.; GOODWILLIE, C.; PARKER, I.M.; BISHOP, J.G. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. **Ecology**, Washington, v. 75, p. 584-606, 1994.

SCHLOTTERER, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, p. 63-69, 2004.

SILVA, J.M.C.; CASTELETI, C.H.M. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: GALINDO-LEAL, C.; GUSMÃO-CÂMARA, I. (Ed.). **State of the hotspots: the Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Washington, DC.: Center for Applied Biodiversity Sciences and Island Press, 2003. p. 43-59.

SLATKIN, M.A measure of population subdivision based on microsatellite allele of frequencies. **Genetics**, Austin, v. 139, p. 457-462, 1995.

SMITH, J.; EARLE, C. A revision of *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **Fieldiana**, Chicago, v. 29, n. 5, p. 295-341, 1960.

STELLA, A. **Seleção de espécies arbóreas tropicais prioritárias para a conservação: a caso da Estação Ecológica de Caetetus**. 94p. 2002. Dissertação (Mestrado na área de Recursos Florestais.) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2002.

TERBORGH, J. Keystone plant resources in the tropical forest. In: SOULÉ, M.E. (Ed.) **Conservation Biology: the science of scarcity and diversity**. Sunderland: Sinauer Associates. 1986. p.330-344.

THOMAS, W.W.; CARVALHO, A.M.V.; AMORIM, A.M.A.; GARRISON, J.; ARBELÁEZ, A.L. Plant endemism in two forests in southern Bahia, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 7, p. 311-322, 1998.

THOMAZ, L.D.; MONTEIRO, R. Composição florística da Mata Atlântica de encontra da Estação Biológica de Santa Lúcia, município de Santa Teresa, ES. **Boletim do Museu Biológico Mello Leitão**, Santa Teresa, v. 7, p. 3-48, 1997.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data**. Sunderland, Massachusetts North Caroline State University; Sinauer Associates IPub., 1990. 377p.

WRIGHT, S. Systems of mating. **Genetics**, Austin, v.6, p.111-178, 1931.

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

2 DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *Cedrela fissilis* Vell. (MELIACEAE)

2.1 Introdução

Os marcadores microsatélites ou SSR (seqüências simples repetitivas) se baseiam em pequenas seqüências repetidas em “tandem”, com um a quatro nucleotídios de comprimento, distribuídos uniformemente ao longo de todo o genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Estes marcadores apresentam diversas vantagens na utilização em genética de populações. São os marcadores que apresentam o maior conteúdo informativo por loco gênico, pois além de serem co-dominantes, possibilitando a identificação de indivíduos homozigotos e heterozigotos, apresentam alta diversidade alélica.

Microsatélites são marcadores relativamente novos baseados em repetições curtas (um a seis pb) de certas bases (LITT; LUTTY, 1989) e são muito polimórficos por apresentarem variações no número de repetições causadas por mutações (STRAND et al., 1993; CONDIT; HUBBELL, 1991). Os microsatélites são suficientemente estáveis para serem utilizados como marcadores em análises genéticas. Diferentes alelos podem ser detectados em um loco por PCR, utilizando-se seqüências flangeadoras conservadas para sítios de anelamento de iniciadores (*primers*). Eles são bons marcadores de DNA, pois são altamente informativos em plantas (AKKAYA et al., 1992) e podem ser eficientemente analisados por um ensaio rápido e simples de PCR, além de serem abundantes e uniformemente distribuídos no genoma (JARNE; LAGODA, 1996).

Este marcador é ideal para aplicação em genética de populações e evolução em populações naturais (QUELLER; STRASMAN; HUGHES, 1993; SLATKIN, 1995), especialmente em espécies arbóreas com alta heterozigosidade como já vem sendo demonstrado, tanto para espécies tropicais (CHASE et al., 1996; CONDIT; HUBBELL, 1991; WHITE; POWELL, 1997; CIAMPI, 1999; COLLEVATTI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 1999; GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; BRONDANI, 2000; LEMES et al., 2003) como temperadas (STEINKELLNER et al., 1997). Microsatélites são encontrados em alta freqüência e com ampla distribuição nos genomas de eucariotos, codominantes e multialélicos, com uma heterozigosidade

esperada normalmente acima de 0,7 (TOTH, 2000; OLIVEIRA et al., 2006). Esses marcadores apresentam o maior conteúdo informativo por loco gênico se compararmos a todas as outras classes de marcadores moleculares (GOLDSTEIN, 2001).

O desenvolvimento de microssatélites tem se tornado mais acessível, principalmente devido a novas estratégias de enriquecimento de bibliotecas e métodos rápidos de seqüenciamento automático baseados em fluorescência, apesar do custo de desenvolvimento ser ainda alto.

Neste trabalho, foram desenvolvidos marcadores microssatélites para *Cedrela fissilis*, espécie de grande interesse comercial e conservacionista e, por isto mesmo, prioritária para estudos genéticos, tanto para fins de conservação, como de melhoramento. Populações desta espécie no Brasil e em outros países sul americanos estão muito ameaçadas pelo desmatamento extensivo e pela exploração seletiva. Neste caso, os marcadores microssatélites podem ser uma ferramenta eficiente para gerar informações sobre os padrões de diversidade genética de populações remanescentes, assim como, fluxo gênico e sistema reprodutivo, que podem subsidiar estratégias de conservação e uso dos recursos genéticos da espécie.

2.2 Material e métodos

A partir do DNA foliar de um indivíduo de *C. fissilis*, localizado no parque do Campus “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo em Piracicaba – SP, foi construída uma biblioteca genômica. Todo o desenvolvimento dos microssatélites foi realizado no Laboratório de Genética de Plantas do CENARGEN (EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia). Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo de CTAB 2% descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998).

No desenvolvimento de microssatélites foi utilizado protocolo descrito por Brondani et al. (1998). Para a construção da biblioteca genômica, o DNA total foi digerido com a enzima Sau3A. Os fragmentos entre 280 e 600 pares de bases foram recuperados em uma membrana de celulose (NA-45) durante eletroforese em agarose.

Esta biblioteca genômica foi enriquecida para seqüências poli AG, utilizando-se contas magnéticas e oligonucleotídeos (AG/TC)₁₃ ligados à biotina. Estes fragmentos foram

amplificados por PCR, e em seguida ligados ao vetor plasmidial pGEM^T e transformados por eletroporação em células de *E. coli* linhagem JM9.

Após eletroporação, as células foram cultivadas em meio de cultura seletivo com ampicilina, X-gal e IPTG. As colônias positivas foram transferidas para uma membrana de nylon e hibridizadas com sonda AG/TC. A identificação dos clones com microsatélites foi feita por marcação por quimioluminescência (sistema DIG-digoxigenina).

Os clones positivos foram cultivados por 18 horas em meio líquido, com posterior extração do DNA plasmidial por meio do sistema Wizard Minipreps (Promega). O seqüenciamento do DNA plasmidial foi feito pelo método “Dye Deoxy Terminator” e os produtos foram detectados no equipamento ABI377 (Applied Biosystems). Finalmente, *primers* complementares às seqüências flanqueadoras foram desenhados utilizando-se o programa “Primer” (LINCOLN; DALY; LANDER, 1991).

Os fragmentos obtidos a partir desses *primers* foram analisados para oito indivíduos em gel denaturante de poliacrilamida a 4% corados com nitrato de prata. Para amplificar os marcadores microsatélites, foram utilizadas reações de 13µl, contendo 0,3µM de cada primer, uma unidade de *Taq* DNA polimerase, 0,2mM de cada dNTP, 10mM Tris-CCl pH 8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 1µg/µl de DMSO 50% e 9 ng de DNA. As reações foram montadas em placa Elisa de 96 poços e amplificadas em aparelho termociclador MJ Reserch PT-100 nas seguintes condições: 5 minutos a 96°C seguidos por 29 ciclos de 1minuto a 94°C, 1 minuto à temperatura específica de anelamento de cada *primer* e 1 minuto a 72°C, e finalmente 7 minutos a 72°C.

Nas análises de polimorfismo, foram utilizados 150 indivíduos adultos de *C. fissilis* provenientes do estado de São Paulo. Foram calculados: a heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), número de alelos por loco e teste de desequilíbrio de ligação utilizando-se o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 1998).

2.3 Resultados e discussão

De um total de 884 colônias recombinantes, 168 (19%) foram identificadas como positivas, mostrando a eficiência do enriquecimento da biblioteca. Na maior parte delas, foram encontradas seqüências AG repetidas. Dessas, algumas foram descartadas por não apresentarem condições para desenho de *primers*, por apresentarem tamanho insuficiente e/ou posição da seqüência repetitiva inadequada.

Foram desenhados 83 pares de *primers* específicos e complementares a regiões que flanqueiam as seqüências repetitivas (49,4% dos fragmentos seqüenciados). Os microsatélites foram classificados como perfeitos. Os 83 pares de *primers* obtidos foram testados utilizando-se oito indivíduos de *C. fissilis*, testando-se a temperatura de anelamento sugerida pelo programa “Primer” mais um acréscimo em torno de 4°C. Desses, oito *primers* foram selecionados para análises populacionais, sendo a escolha baseada na alta variação alélica, baixa ocorrência de “*stutter*” e robustez na interpretação (Tabela 2.1). Na Figura 2.1, são apresentados exemplos dos locos microsatélites analisados, onde se pode observar o alto nível de polimorfismo.

Tabela 2.1 - Informações sobre nove locos microssatélites de *Cedrela fissilis*. As seqüências dos *primers* são apresentadas com a Amplitude alélica em pares de base, as Temperaturas de anelamento em graus Celsius (T_a), número total de alelos por loco (A), heterozigiosidade esperada (H_e), heterozigiosidade observada (H_o), baseado nos genótipos de 150 indivíduos

<i>Loco SSR</i>	<i>Seqüências do primer</i>	<i>Amplitude alélica (pb)</i>	T_a ($^{\circ}C$)	A	H_e	H_o
CF 9	for 5'-TTgTCCACggTCTAAATTCCTT-3' rev 5'-TCCATAACCCgACCCATgA-3'	248-258	54	4	0,36	0,10
CF 26	for 5'-CCAAATTCcAgAggAgAg-3' rev 5'-gTTCTgCTTCATCgAAgg-3'	146-194	56	22	0,93	0,68
CF 32	for 5'-gTACACTgCCTTAgTCCA-3' rev 5'-ATTgAAAgACATCAggC-3'	136-144	46	3	0,22	0,19
CF 34	for 5'-gTTggCAgCATgATTACC-3' rev 5'-gAAgACTgTgTCTCTgAgTgg-3'	128-168	56	17	0,89	0,88
CF 63	for 5'-CCCACAAATTAACATCCCAA-3' rev 5'-CAgCCTAgAgCCgAATTCA-3'	128-172	54	18	0,89	0,76
CF 66A	for 5'-CAgCAgTTCTgAAACAgtAA-3' rev 5'-ATTCAgCAACTTgAgAgC-3'	118-170	56	25	0,93	0,89
CF66B	for 5'-CAgCAgTTCTgAAACAgtAA-3' rev 5'-ATTCAgCAACTTgAgAgC-3'	202-254	56	15	0,57	0,42
CF 78	for 5'-gCCACAATATCTACTCTCAg-3' rev 5'-gTTTCCTCTCTTgggTTT-3'	122-168	56	22	0,91	0,86
CF 83	for 5'-ACCATTCgAgCCCCACTACA-3' rev 5'-gCCAaggCAACCgAATCA-3'	312-328	54	4	0,53	0,28

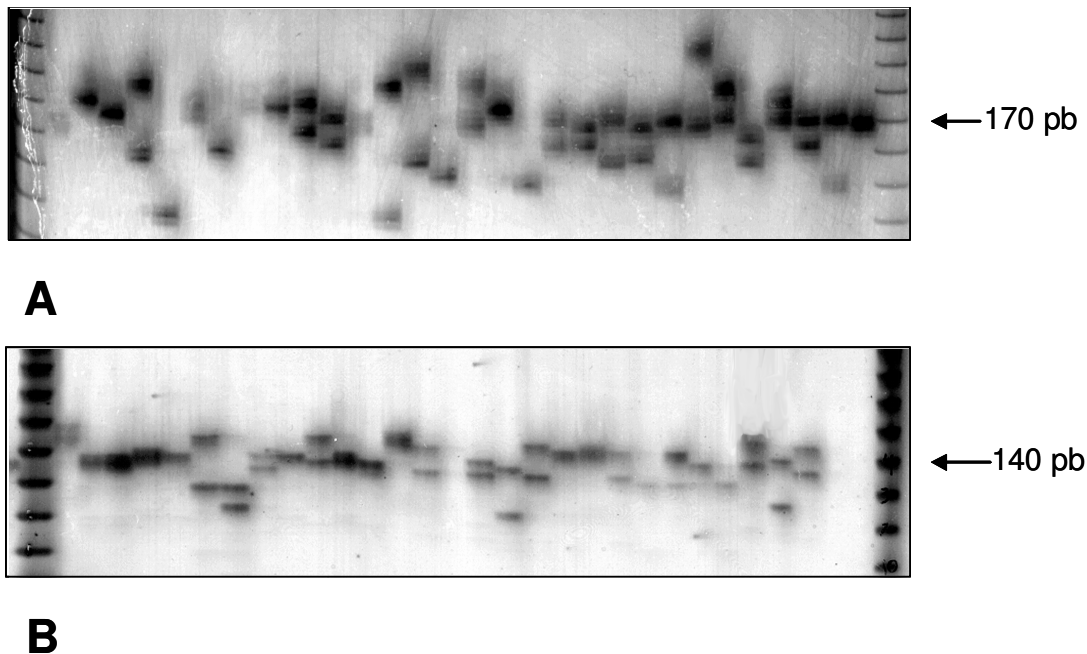


Figura 2.1 - Perfis de locos microssatélites nucleares de *Cedrela fissilis*. Géis de poliacrilamida corados com nitrato de prata. Estão representados: **A**- loco CF 26 mostrando alelos entre 142 e 194 pb; **B**- loco CF 78 mostrando alelos entre 124 e 148 pb

Os locos CF 66A e CF 66B foram revelados pelo mesmo par de *primers*, mas revelaram alelos de amplitudes de tamanho diferentes. O loco CF 66A apresentou alelos entre 118 e 170 pb e o loco CF 66B apresentou alelos entre 202 e 254 pb.

Por fim, esses locos foram analisados quanto aos níveis de variabilidade genética com 150 indivíduos de *C. fissilis*. Todos os locos apresentaram-se multialélicos. O número de alelos por loco foi alto, com uma média de 14,4 alelos nos nove locos analisados.

Os locos CF 9, 32 e 83 apresentaram as menores diversidades alélicas ($A= 4, 3$ e 4 respectivamente) contribuindo para baixos valores de heterozigosidade esperada ($H_e= 0,36, 0,22$ e $0,53$ respectivamente). Os demais locos apresentaram maiores números de alelos por loco e heterozigosidade esperada, atingindo valores de $A=25$ e $H_e=0,93$ para o loco CF 66A (Tabela 2.1). O tamanho dos alelos variou de 118 pb no loco CF 66A até 328 pb no loco CF 83.

A distribuição de freqüências alélicas aproximou-se de uma distribuição normal ou bimodal como no loco CF 66A (Figura 2.2). Muitos alelos foram raros apresentando freqüências abaixo de 0,1.

A heterozigosidade esperada média foi de 0,69 e a heterozigosidade observada média foi de 0,56. Para todos os locos foram encontradas heterozigosidades esperadas maiores que heterozigosidades observadas, o que deve ser decorrente do efeito de Wahlund, ou seja, da distribuição não homogênia de alelos entre indivíduos, pois estes são oriundos de regiões diferentes do estado de São Paulo (Campinas, Pindamonhangaba, Sete Barras, Gália e Teodoro Sampaio), ou então a ocorrência de endogamia.

Nenhum desequilíbrio de ligação em locos ($P > 0,05$) foi observado, o que sugere que esses locos podem ser bons marcadores para genética de populações e análises de parentesco em *Cedrela fissilis*.

Esses dados mostram a ocorrência de seqüências simples repetitivas AG no genoma de *Cedrela fissilis* com grande riqueza alélica, o que representa um alto conteúdo de informações genéticas nesses locos. Estes sistemas permitem estudos genéticos com detalhamento suficiente para análises populacionais, identificação individual, caracterização de parentesco e fluxo gênico.

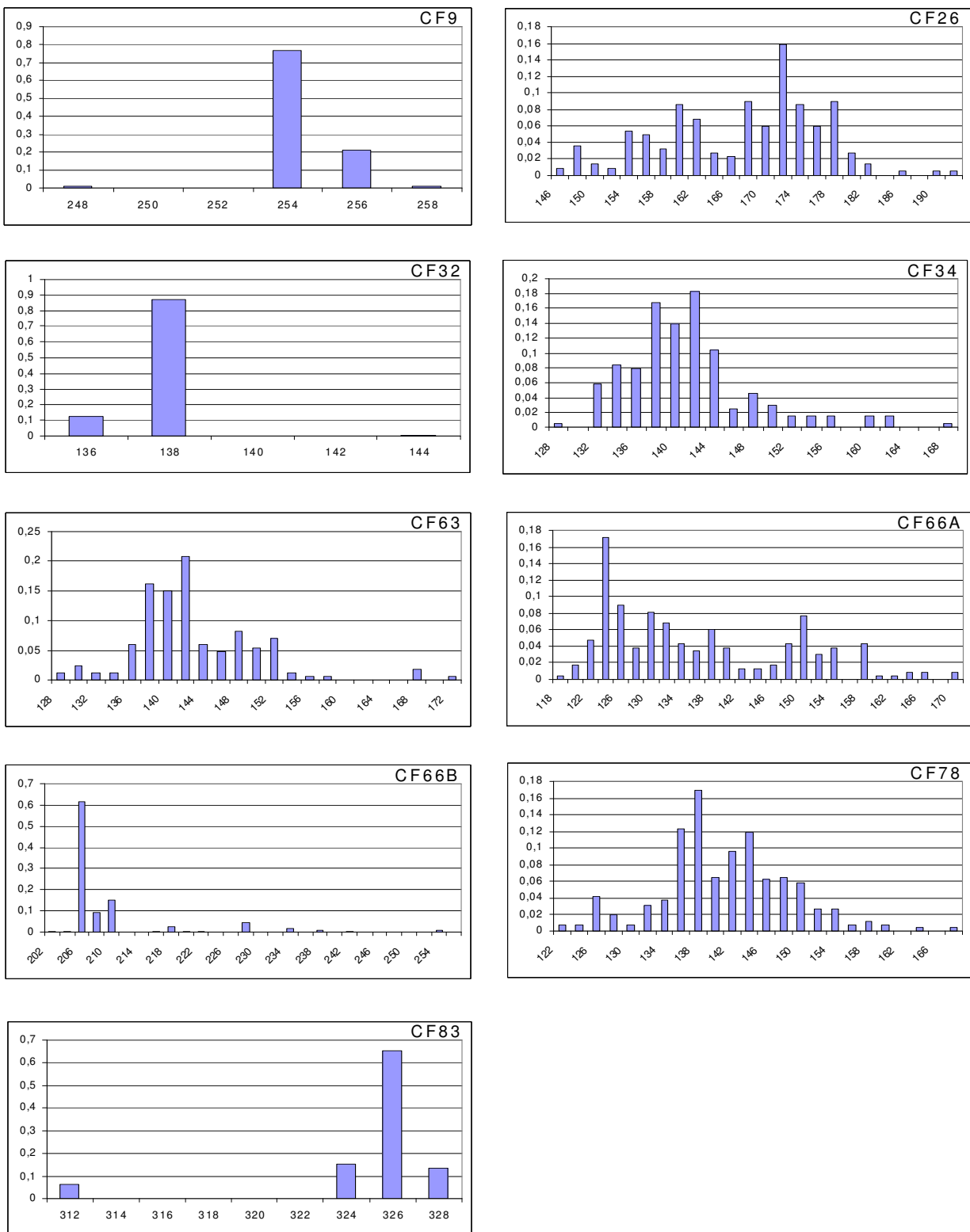


Figura 2.2 - Histogramas das frequências alélicas dos nove locos microsatélites de *Cedrela fissilis*, estimadas para 150 indivíduos

Referências

- AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, Austin, v.132, p. 1131-1139, 1992.
- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical Applied Genetics**, New York, v. 97, p.816-827, 1998.
- CHASE, M.R.; MOLLER, R.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. Distant gene flow in tropical trees. **Science**, Washington, v.383, p.398-399, 1996.
- CIAMPI, A.Y. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microsatélites, AFLP e seqüenciamento de cpDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado**. 1999. 204p. Tese (Doutorado na área de Biologia Vegetal) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, 1999.
- COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.A.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, Cary, n.83, p.748-756, 1999.
- CONDIT, R.; HUBBELL, S.P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. **Genome**, Ottawa, v.34, p. 66-71, 1991.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: CENARGEN-EMBRAPA-Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1998. 220p.
- GAIOTTO, F.A.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R.P.V. Microsatellite markers for Heart of Palm – *Euterpe edulis* and *E. oleraceae* (Palmae). **Molecular Ecology**, Oxford, v.1, n.1/2, p.86, 2000.
- GOLDSTEIN, B.D.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford: University Press, 2001. 352p.
- JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.11, p.424-429, 1996.
- LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, *Meliaceae*) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: Implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v.12, p.2875-2883, 2003.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. Acesso em: 18 Dez. 1998.

LINCOLN, S.E.; DALY, M.J.; LANDER, E.S. “Primer” software. Available from E. Lander. Cambridge, MA: Whitehead Institute,. 1991. 32p.

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**, Chicago, v. 44, p. 397-401, 1989.

OLIVEIRA, J.E.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

QUELLER, D.C.; STRASMAN, J.E.; HUGHES, C.R. Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.8, p.285-288, 1993.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Austin, v.130, p.457-462, 1995.

STEINKELLNER, H.; LEXER, C.; TURETSCHKEK, E.; GLOSSL, J. Conservation of (GA)(n) microsatellite loci between *Quercus* species. **Molecular Ecology**, Oxford, v.6, p.1189-1194. 1997.

STRAND, M.; PROLLA, T.A.; LISKAY, R.M.; PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, London, v.365, p. 274-276, 1993.

TOTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukariotic genomes survey and analysis. **Genome**, Ottawa, v.10, p. 967-981, 2000.

WHITE, G.; POWELL, W. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. **Molecular Ecology**, Oxford, v.6, n.12, p.1195-1197, 1997.

3 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Cedrela fissilis* Vell. NO CENTRO SUL DO BRASIL

3.1 Introdução

As populações de plantas mostram, em muitos casos, uma estruturação da diversidade genética, decorrente da restrição do fluxo de genes com o aumento da distância (WRIGHT, 1943). Nesses casos, as populações de uma espécie podem se diferenciar pelo processo conhecido como “isolamento pela distância”. Dessa forma, as populações mais distantes devem ser mais diferenciadas do que populações mais próximas.

Atualmente, com o avanço da conversão de áreas naturais em outros usos pelo homem, o isolamento das populações de plantas remanescentes tem se tornado cada vez maior (LAURANCE; BIERREGAARD, 1997). Estas populações isoladas apresentam uma redução do fluxo gênico entre as mesmas, aumentando o isolamento genético. Normalmente, essas populações remanescentes também enfrentam um declínio demográfico, o que leva a uma redução da variabilidade genética pelo efeito de gargalo de garrafa e conseqüente deriva genética, aumentando ainda mais a diferenciação entre populações (GILPIN; SOULÉ, 1986; YOUNG; BOYLE; BROWN, 1996). Além disso, pode ocorrer um aumento da endogamia e a fixação de alelos deletérios, diminuindo a possibilidade de persistência dessas populações.

Os trabalhos analisando a estrutura genética de populações de espécies arbóreas tropicais têm aumentado em número nos últimos anos, porém, são raros os estudos que avaliam grande número de populações ou, então, uma abrangência geográfica significativa da espécie. Esses dados são fundamentais para se observar a estruturação genética de uma espécie e entender os fatores que podem contribuir para a sua formação. Tais informações são fundamentais para embasar tanto os esforços de conservação como também para os programas de melhoramento genético das espécies com uso econômico.

Por outro lado, o rápido avanço dos impactos antrópicos sobre as florestas tropicais vem alterando a estrutura genética natural das espécies, fazendo com que essas informações não possam ser obtidas ou resgatadas. Ou ainda, confundem os fatores naturais com os antrópicos na formação da estrutura genética.

Desta forma, procuramos, neste estudo, analisar a estrutura genética de populações naturais de *C. fissilis* em bom estado de conservação que ocorrem em grandes unidades de conservação, ou outras áreas naturais particulares, procurando, assim, minimizar possíveis efeitos antrópicos sobre sua estrutura genética.

Essas populações foram distribuídas ao longo de cinco estados brasileiros, abrangendo as regiões sul, sudeste e centro-oeste, que correspondem à principal área de ocorrência da espécie no Brasil. Com essas análises, inferimos também sobre as possíveis conseqüências na conservação genética da espécie no Brasil.

3.2 Objetivos

- a) Analisar a estrutura genética de 10 populações de *Cedrela fissilis* Vell. distribuídas em cinco estados brasileiros.
- b) Sugerir estratégias para a conservação da espécie e uso adequado dos recursos genéticos disponíveis.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Populações analisadas e coleta

A diversidade genética de *Cedrela fissilis* foi estudada em uma grande extensão geográfica de sua principal área de ocorrência - o centro-sul do Brasil, abrangendo cinco estados: Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e Santa Catarina. Foram amostradas dez áreas grandes e em bom estado de conservação, onde ocorrem significativas populações naturais de *Cedrela fissilis* (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Locais de coleta das populações de *C. fissilis* analisadas, município, localização geográfica, altitude, formação vegetal (FOD – floresta ombrófila densa, FES – floresta estacional semidecidual, FOM – floresta ombrófila mista), área da reserva e número de indivíduos analisados (N_i)

Local	Município/ Estado	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude	Formação vegetal	Área	N_i
Parque Estadual do Rio Doce	Timóteo/MG	19°46'	42°33'	284	FES	36970	20
Margem do Paraná	Anaurilândia/MS	22°19'	52°54'	286	FES	*	30
Estação Ecológica de Caetetus	Gália/SP	22°26'	49°41'	544	FES	2178	30
Parque Estadual Morro do Diabo	Teodoro Sampaio SP	22°35'	52°12'	325	FES	33845	30
Fazenda São Sebastião do Ribeirão Grande	Pindamonhangaba/SP	22°46'	45°27'	789	FOD	1200	30
Mata de Santa Genebra	Campinas/SP	22°49'	47°06'	670	FES	251	30
Reserva Florestal do Matão	Arapoti/SP	24°06'	50°01'	712	FES	2000	30
Parque Estadual Intervales	Sete Barras/SP	24°14'	48° 04'	115	FOD	41704	30
Parque Botânico do Morro do Baú	Ilhota/SC	26°35'	48°48'	236	FOD	750	30
Reserva Genética de Caçador	Caçador/SC	26°51'	50°57'	984	FOM	1157	30

* Coleta realizada na área que foi alagada pelo reservatório da UHE Sérgio Motta no Rio Paraná

As populações acima relacionadas ocorrem em diferentes formações vegetais, compreendendo a floresta ombrófila densa (floresta pluvial tropical), floresta estacional semidecidual (floresta tropical subcaducifólia) e floresta ombrófila mista (floresta de araucária) (Tabela 3.1, Figura 3.1).

As áreas de coleta foram eleitas para este trabalho pela sua representatividade regional, distribuição geográfica, estado de conservação, possibilidade de acesso e infra-estrutura disponível. Todas estas áreas apresentam formações vegetais que estão inseridas dentro do Bioma Mata Atlântica e representam as fisionomias vegetais mais ameaçadas no Brasil.

Nesses locais foram levantados indivíduos adultos de *C. fissilis*, ou seja, árvores que ocupavam o dossel e/ou apresentavam indícios de reprodução. Foram analisadas 30 árvores por população (com exceção do Parque Estadual do Rio Doce com 20 árvores) localizadas em área contínua dentro da reserva.

Dessas árvores, foram coletadas amostras de folhas expandidas para extração de DNA. As folhas foram armazenadas em recipientes herméticos com sílica gel à temperatura ambiente. A sílica foi trocada diariamente nos primeiros dias até dessecação das folhas.

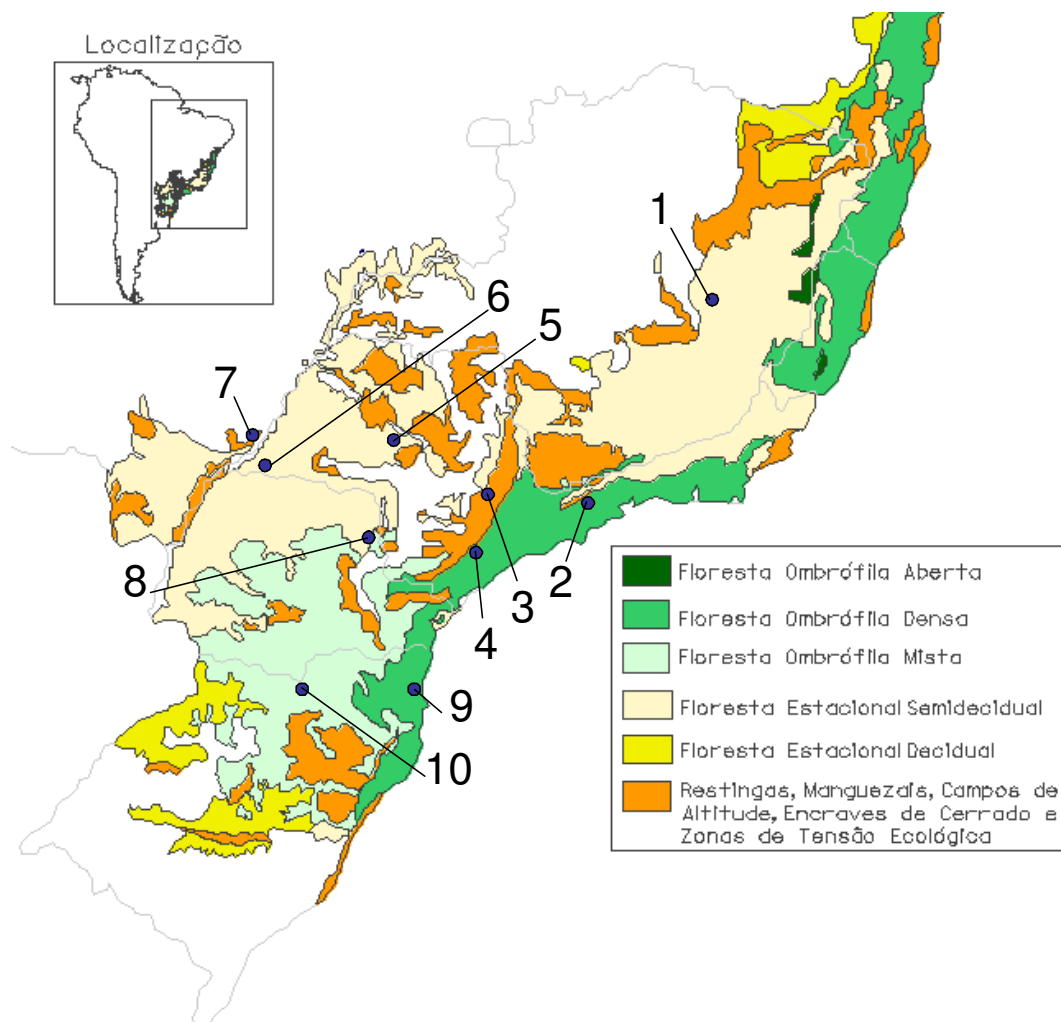


Figura 3.1 - Localização das 10 áreas de estudo, divisas estaduais e formações vegetais da região de abrangência do estudo (Minas Gerais: 1- Parque Estadual do Rio Doce; São Paulo: 2- Fazenda São Sebastião do Ribeirão Grande, 3- Mata de Santa Genebra, 4- Parque Estadual Intervales, 5- Estação Ecológica de Caetetus, 6- Parque Estadual Morro do Diabo; Mato Grosso do Sul: 7- Anaurilândia; Paraná: 8- Reserva Florestal do Matão; Santa Catarina: 9- Reserva Ecológica do Morro do Baú, 10- Reserva Genética de Caçador)

3.3.2 Extração de DNA e análise genética

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), localizado no Departamento de Ciências Florestais da ESALQ-USP, em Piracicaba - SP. A extração do DNA genômico total das amostras foi realizada seguindo o protocolo CTAB descrito por Ferreira; Grattapaglia (1998). Após a quantificação de DNA, as amostras foram diluídas em água MiliQ a 3ng/μl.

3.3.3 Marcadores genéticos em *Cedrela fissilis*

Neste estudo, foram utilizados microssatélites como marcadores para análises de genética de populações. Esses marcadores são muito indicados na estimativa de parâmetros genéticos e na descrição da estrutura genética de populações e fluxo gênico (MORGANTE; OLIVIERI, 1993; OLIVEIRA et al., 2006).

Oito locos microssatélites foram desenvolvidos e otimizados para *C. fissilis* e utilizados para genotipar os indivíduos analisados. Os locos microssatélites foram desenvolvidos a partir de uma biblioteca genômica enriquecida para seqüências repetitivas de nucleotídeos poli AG/TC.

3.3.4 Amplificação dos locos microssatélites

Foi utilizado um coquetel (13μl) para a realização da PCR, composto por 9ng de DNA genômico, 250μM de dNTPs, 0,5μM de MgCl₂, tampão para PCR 1X (10mM de Tris-HCl, 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, pH 8.3), 2,5μg/ml de BSA, 0,2μM de cada iniciador e 1U de Taq DNA polimerase (Phoneutria). As amplificações foram realizadas em termociclador do tipo MJ Research PTC-100 através do seguinte protocolo: 96°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridação específica de cada par de primers por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e, por fim, 72°C por 7 minutos.

Depois da amplificação, os fragmentos de DNA foram segregados em gel denaturante de poliacrilamida a 4%, em corridas com cerca de uma hora em tampão TBE 1X em cuba vertical. Os géis foram coloridos com nitrato de prata, seguindo o protocolo desenvolvido por Creste; Tulmann-Neto; Figueira (2001) o que permitiu que os fragmentos fossem observados na forma de bandas. O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular padrão (10-pb “ladder” – Invitrogen®). Os fragmentos amplificados que apresentassem diferentes tamanhos foram considerados alelos diferentes.

3.3.5 Análises estatísticas

Os locos microssatélites foram caracterizados pelo número de alelos por loco (\hat{A}), e heterozigosidade observada (\hat{H}_o) e esperada (\hat{H}_e) segundo o equilíbrio de Hardy–Weinberg para cada população e índice de fixação de Wright (\hat{f}). Como os locos utilizados são multialélicos, os desvios das proporções de Hardy-Weinberg em cada loco microssatélite em todas as populações foram avaliados por meio do teste exato de Fisher com uso do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001), como descrito por Weir (1996). As frequências alélicas foram estimadas com uso do programa FSTAT (GOUDET, 1995).

3.3.6 Estrutura genética

A estrutura genética foi analisada pela variância das frequências alélicas (Weir, 1996). Foram estimados os seguintes parâmetros: índice médio de fixação dentro das populações (\hat{f}); índice de fixação total das populações (\hat{F}) e divergência genética entre populações ($\hat{\theta}_p$). Através do método de reamostragem “bootstrap”, foi estimado o intervalo de confiança a 99% de probabilidade, utilizando-se 10.000 repetições sobre locos. Estes parâmetros foram estimados com o auxílio do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001). A estimativa do parâmetro \hat{R}_{ST} , que é o mais recomendado para estimação da divergência genética entre as populações quando se

utilizam marcadores microsatélites, foi feita com uso do programa R_{ST}Calc (GOODMAN, 1997).

3.3.7 Fluxo gênico

O fluxo gênico (Nm) foi calculado a partir dos valores estimados de \hat{F}_{ST} (diversidade genética entre populações), de acordo com o modelo proposto por Wright (1951).

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{\hat{F}_{ST}} - 1 \right)$$

No entanto, substituiu-se \hat{F}_{ST} por $\hat{\theta}_p$ nesta equação, como sugerido por Cockerham e Weir (1993), para obter uma estimação de fluxo gênico não enviesada.

3.3.8 Teste do isolamento pela distância

Com a finalidade de avaliar se o fluxo gênico resulta em um padrão de isolamento pela distância foi utilizada a abordagem descrita por Slatkin (1993). Esta metodologia está baseada na relação linear entre os logaritmos de fluxo gênico (Nm) e distância geográfica entre populações.

Segundo Strand, Milligan e Pruitt (1996), uma correlação negativa entre estas variáveis indica que a diferenciação genética entre as populações aumenta com a distância geográfica, levando a um isolamento pela distância e criando um modelo de alpondras (“stepping-stone”) de fluxo gênico. Se não houver correlação, sugere-se que a indicação de fluxo gênico resulta mais da associação histórica entre as populações do que do fluxo gênico interpopulacional presente.

O cálculo do fluxo gênico entre pares de populações (\hat{M}) foi feito a partir das estimativas de \hat{F}_{ST} , obtidas pelo programa F_{STAT} (GOUDET, 1995).

A análise da significância da correlação entre o logaritmo da distância geográfica entre pares de populações e o logaritmo do fluxo gênico entre elas foi feita através da estatística Z de

Mantel (1967), utilizando-se 1.000 permutações, com uso do programa NTSYS-pc (ROHLF, 1997).

3.3.9 Análise de agrupamento

Para analisar os padrões da estrutura genética entre populações com mais detalhes, foi estimada a distância genética de Nei (1972) entre os pares delas. Com estas distâncias foi feita uma análise de agrupamento, através do critério UPGMA, com posterior visualização por meio de dendrograma.

3.3.10 Tamanho efetivo populacional

O cálculo do tamanho efetivo populacional (\hat{N}_e) foi feito a partir do índice de fixação (\hat{f}), estimado para cada população, conforme a equação proposta por Vencovsky e Crossa (1999):

$$\hat{N}_e = \frac{n}{1 + \hat{f}}$$

Onde, n é o número de indivíduos amostrados.

3.3.11 Número de populações a serem conservadas

Foi calculado o número de populações que devem ser conservadas para manter um tamanho efetivo (\hat{N}_e) de 500, conforme sugerido por Vencovsky e Crossa (1999), assumindo como infinito o número de populações da região estudada. Neste caso, o número de populações a

serem conservadas (S) depende somente do valor de $\hat{\theta}_p$, ou seja, da divergência genética entre as populações.

O cálculo foi feito a partir da seguinte fórmula:

$$N_{e(ref)} = \frac{S}{2 \times \hat{\theta}_p}$$

3.4 Resultados e discussão

Todos os locos microssatélites estudados apresentaram altos níveis de polimorfismo nas 10 populações amostradas (Tabela 3.2). As estimativas do número de alelos por loco, heterozigosidade esperada e observada foram comparáveis aos níveis encontrados para outras espécies arbóreas. O número médio de alelos por loco foi de 16,67 (3 a 27) (Tabela 3.3) e o número médio de alelos por população foi de 7,56 (7,00 a 9,56) (Tabela 3.2).

A heterozigosidade média esperada foi geralmente maior que a heterozigosidade observada com apenas uma população mostrando uma situação inversa (Tabela 3.2). Das 10 populações, somente três apresentaram aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3.2). Nos casos onde os valores de \hat{f} foram significativos, isto sempre se deu por excesso de homozigotos.

Tabela 3.2 - Estimativas de índices de diversidade genética para microssatélites nucleares. (n = tamanho amostral; \hat{A} = número médio de alelos por loco; \hat{A}_e = número efetivo de alelos por loco; \hat{H}_e = diversidade gênica; \hat{H}_o = heterozigosidade observada; \hat{f} = índice de fixação)

População	n	\hat{A}	\hat{H}_e	\hat{H}_o	\hat{f}
Parque Estadual do Rio Doce - MG	20	7,67	0,710	0,718	-0,013
Margem do Rio Paraná - MS	30	4,14	0,485	0,461	0,050
Estação Ecológica de Caetetus - SP	30	8,56	0,616	0,549	0,110**
Parque Estadual Morro do Diabo - SP	30	9,56	0,699	0,550	0,217**
Fazenda São Sebastião do Ribeirão Grande - SP	30	7,50	0,673	0,644	0,044
Mata de Santa Genebra - SP	30	7,00	0,594	0,530	0,117**
Reserva Florestal do Matão - PR	30	8,71	0,741	0,630	0,154**
Parque Estadual Intervales - SP	30	8,25	0,679	0,553	0,186**
Parque Botânico do Morro do Baú - SC	30	8,33	0,566	0,491	0,137**
Reserva Genética de Caçador - SC	30	9,00	0,691	0,533	0,230**
Média		7,56	0,646	0,566	0,126**

** significância a 99% de probabilidade, usando 10.000 reamostragens "bootstrap" sobre locos

Tabela 3.3 - Caracterização de oito locos microssatélite para os indivíduos de 10 populações de *C. fissilis* do centro-sul do Brasil

Locus	<i>N</i>	\hat{A}	\hat{H}_e	Amplitude \hat{H}_e	\hat{H}_o	Amplitude \hat{H}_o
CF09	282	6	0,368	0,216 - 0,549	0,243	0,125 - 0,611
CF26	284	25	0,869	0,649 - 0,937	0,659	0,500 - 0,840
CF32	286	3	0,155	0,037 - 0,371	0,156	0,037 - 0,333
CF34	283	19	0,867	0,724 - 0,913	0,761	0,667 - 0,958
CF63	282	22	0,790	0,653 - 0,903	0,698	0,533 - 0,857
CF66A	287	27	0,870	0,692 - 0,956	0,857	0,700 - 0,937
CF66B	286	21	0,540	0,090 - 0,821	0,462	0,091 - 0,750
CF78	289	23	0,830	0,779 - 0,919	0,824	0,567 - 0,908
CF83	282	4	0,379	0,273 - 0,651	0,223	0,136 - 0,434
Média		16,67	0,646	0,155 - 0,870	0,566	0,156 - 0,857

O valor de *F*, ou seja, a endogamia considerando os efeitos de acasalamento não aleatório tanto dentro como entre populações, diferiu significativamente de zero (Tabela 3.4), o que evidencia a formação de estrutura.

Os parâmetros de diferenciação populacional, $\hat{\theta}_p$ e \hat{R}_{ST} , foram significativamente diferentes de zero (Tabela 3.4), mostrando uma diferenciação genética entre as populações de *C. fissilis* no centro sul do Brasil.

A partir do agrupamento UPGMA das distâncias genéticas de Nei, observou-se a formação de alguns grupos distintos (Figura 3.2). As populações do Parque Estadual do Morro do Diabo, Estação Ecológica de Caetetus e Mata de Santa Genebra, representantes das Florestas Estacionais Semidecíduais do interior de São Paulo formaram um mesmo grupo. As populações mais próximas do litoral (Fazenda São Sebastião do Ribeirão Grande, Parque Estadual Intervales,

Reserva Ecológica do Morro do Baú) com floresta ombrófila densa mais a população da Reserva Genética de Caçador com floresta ombrófila mista formaram um segundo grupo.

Tabela 3.4 - Estatísticas de estrutura genética em dez populações naturais de *C. fissilis*. \hat{f} =índice de fixação médio dentro das populações; \hat{F} =índice de fixação total das populações; $\hat{\theta}_p$ =divergência genética entre populações; \hat{R}_{ST} = divergência genética entre populações (Goodman, 1997)

Loco	\hat{f}	\hat{F}	$\hat{\theta}_p$	\hat{R}_{ST}
CF09	0.502	0.664	0.326	0,299
CF26	0.265	0.323	0.079	0,179
CF32	0.184	0.225	0.051	0,029
CF34	0.010	0.061	0.051	-0,009
CF63	0.155	0.220	0.076	0,024
CF66A	0.022	0.090	0.069	0,055
CF66B	0.168	0.327	0.191	0,020
CF78	0.009	0.118	0.110	0,007
CF83	0.523	0.537	0.030	0,076
Média	0.164	0.250	0.102	0,082
(I.C.)*	(0,047 a 0,337)	(0,125 a 0,428)	(0,058 a 0,176)	(0,061 a 0,147)

* Intervalo de confiança a 99% obtido por 10.000 reamostragens “bootstrap” sobre locos

As demais populações apresentaram uma maior divergência em relação às anteriores. A população da Reserva Florestal do Matão – PR foi a primeira a se unir às demais e ocorre em uma área de ecótono entre três formações vegetais distintas (floresta estacional semidecidual, floresta ombrófila densa e cerrado). A população do Parque Estadual do Rio Doce - MG, em floresta estacional semidecidual, apresentou-se um pouco mais diferenciada, sendo uma população distante geograficamente das demais. A população que se apresentou mais distinta foi a de Anaurilândia – MS. Esta população ocorre em área de transição entre floresta estacional semidecidual e cerrado, e além da diferenciação genética evidenciada no correlograma, também

apresentou valores distintos de número médio de alelos (\hat{A}), heterozigosidade esperada (\hat{H}_e) e heterozigosidade observada (\hat{H}_o) (Tabela 3.2).

A grande diferenciação desta população em relação às demais não apresenta uma razão clara, porém pode estar relacionada a um isolamento reprodutivo causado por diferenças fenológicas por ocupar uma fisionomia distinta das demais populações, ou por estar sujeita a um processo de introgressão com *Cedrela odorata*, que ocorre também nessa região e não nas demais. Estas duas espécies são filogeneticamente muito próximas e possivelmente podem hibridizar.

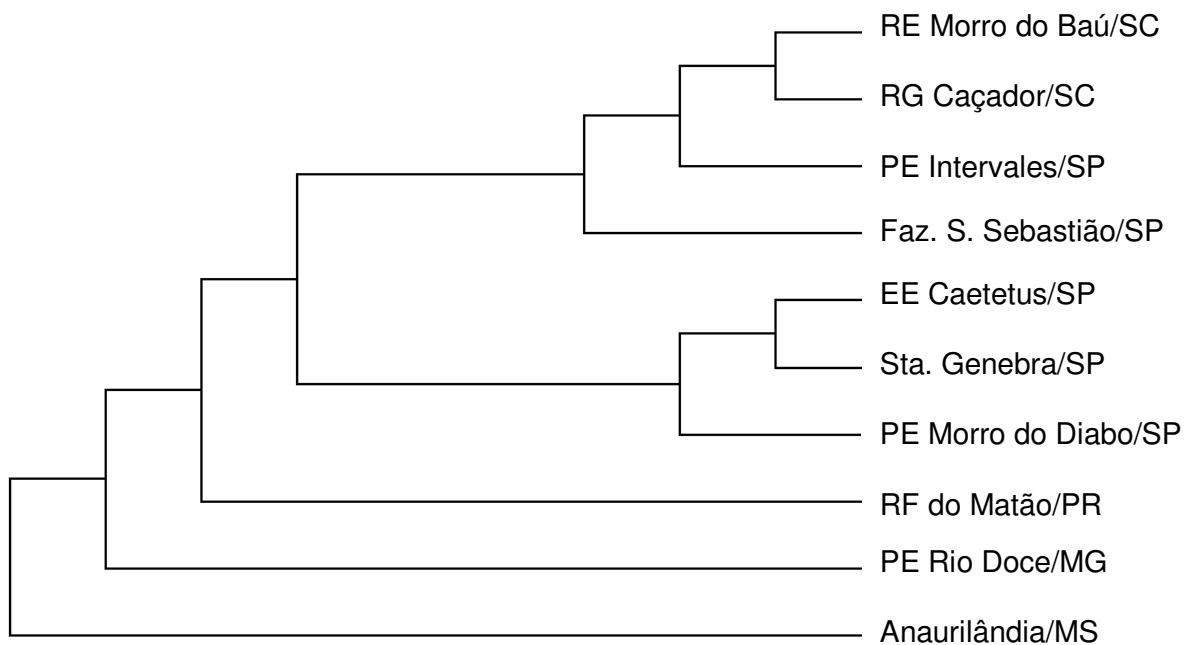


Figura 3.2 - Padrão de divergência genética entre dez populações (Minas Gerais: 1- Parque Estadual do Rio Doce; São Paulo: 2- Fazenda São Sebastião do Ribeirão Grande, 3- Mata de Santa Genebra, 4- Parque Estadual Intervalles, 5- Estação Ecológica de Caetetus, 6- Parque Estadual Morro do Diabo; Mato Grosso do Sul: 7- Anaurilândia; Paraná: 8- Reserva Florestal do Matão; Santa Catarina: 9- Reserva Ecológica do Morro do Baú, 10-Reserva Genética de Caçador) naturais de *C. fissilis*. Dendrograma definido pelo método de agrupamento UPGMA e baseado na distância genética de Nei (1972)

A análise de isolamento pela distância mostrou uma correlação negativa, mas não significativa entre fluxo gênico e distância geográfica entre pares de populações ($r=-0,323$ $p=0,0683$) (Figura 3.3).

Pelo fato da população de Anaurilândia apresentar grande diferenciação genética das demais e, ainda, por estar próxima geograficamente de algumas populações (por exemplo, Parque

Estadual do Morro do Diabo), esta foi retirada e a análise foi novamente realizada. Com esse conjunto de dados (nove populações), o teste do isolamento pela distância mostrou uma correlação mais fortemente negativa e estatisticamente significativa entre os logaritmos do fluxo gênico e das distâncias geográficas entre pares de populações (Figura 3.3).

A correlação indica que essas populações estão em equilíbrio entre deriva e fluxo gênico e que o fluxo gênico atual resulta em um padrão de isolamento pela distância, em que a diferenciação genética entre as populações aumenta com a distância geográfica.

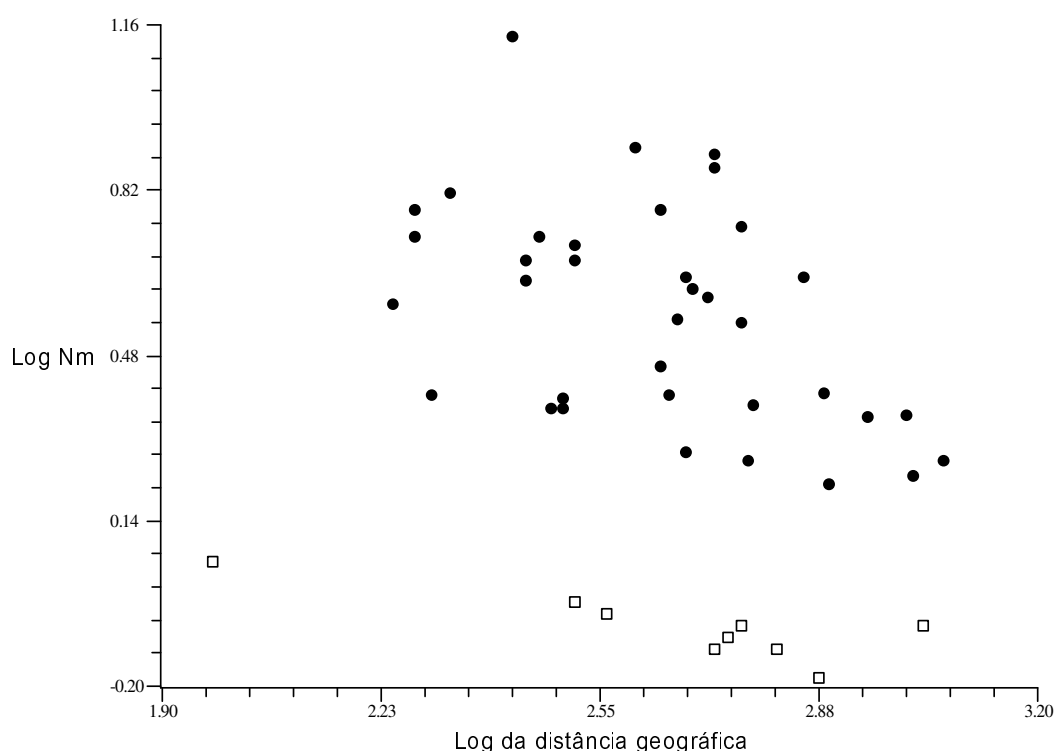


Figura 3.3 – Correlação entre os logaritmos de fluxo gênico (Nm) e distância geográfica para 10 populações de *C. fissilis*. Os pontos representados por quadrados referem-se às distâncias ente a população de Aneurilândia e as demais (teste de correlação de Mantel para todas as populações $r=-0,323$ e $p=0,683$; e sem a população de Aneurilândia $r=-0,475$ e $p=0,020$)

Como em geral os níveis de endogamia foram relativamente baixos o tamanho efetivo populacional (\hat{N}_e) foi muito próximo ao tamanho amostral (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Estimativas populacionais para conservação *in situ* para dez populações de *C. fissilis* (n = tamanho amostral; \hat{f} = endogamia \hat{N}_e = Tamanho efetivo populacional)

População	n	\hat{f}	\hat{N}_e
Parque Estadual do Rio Doce – MG	20	-0,013	20,26
Margem do Rio Paraná – MS	30	0,050	28,57
Estação Ecológica de Caetetus – SP	30	0,110	27,03
Parque Estadual Morro do Diabo – SP	30	0,217	24,65
Fazenda São Sebastião do Ribeirão Grande –SP	30	0,044	28,74
Mata de Santa Genebra – SP	30	0,117	26,86
Reserva Florestal do Matão – PR	30	0,154	26,00
Parque Estadual Intervales – SP	30	0,186	25,30
Parque Botânico do Morro do Baú – SC	30	0,137	26,39
Reserva Genética de Caçador – SC	30	0,230	24,39

Como apresentado por Vencovsky e Crossa (1999) é possível determinar o número de populações que devem ser conservadas para reter um tamanho efetivo de 500. Assumindo que *C. fissilis* ocorre em uma área muito grande, consideramos que o número de populações na região também seja muito elevado. Desta forma, o número de populações que devem ser conservadas é dependente apenas do valor do $\hat{\theta}_p$, ou seja, da divergência genética entre as populações ($N_e = S / (2 \times \hat{\theta}_p)$) em que S é o número de populações. Desta forma, devem ser conservadas 102 populações para manter um tamanho efetivo de 500 na região do estudo (centro-sul do Brasil). Muito embora ainda haja populações em bom estado de conservação, provavelmente elas não atingem o número obtido por esta estimativa, e, portanto, não temos um tamanho efetivo de 500 nessa importante área de ocorrência de *C. fissilis*.

Os altos níveis de diversidade genética encontrados para *C. fissilis* são comparáveis aos padrões encontrados em outras espécies arbóreas tropicais (ALDRICH et al., 1998; DAYNANDAN; BAWA; KESSELI, 1997; WHITE; BOSHIER; POWELL, 1999; COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001, LEMES et al., 2003).

As estimativas de diferenciação genética indicam um grau moderado, mas significativo, de diferenciação entre as populações de *C. fissilis* no centro-sul do Brasil. No caso de marcadores microssatélites, a análise de diferenciação é mais bem estimada pelo R_{st} , pois esta medida leva em conta as altas taxas de mutação desses marcadores (HEDRICK, 1999). Neste estudo encontrou-se um valor semelhante ou inferior a outros trabalhos com espécies arbóreas tropicais em grandes extensões (LEMES et al., 2003, COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001, NOVICK et al., 2003). O valor encontrado aqui para R_{st} (0,082) é muito semelhante ao valor encontrado por Loveless (1984) para 37 espécies arbóreas tropicais avaliadas por isoenzimas. No entanto, devem-se ressaltar as diferenças com este estudo em termos de escala geográfica, história de vida e tipo de marcador.

Poucos estudos analisaram a variação genética em populações de espécies arbóreas tropicais utilizando microssatélites (CHASE et al., 1996; ALDRICH et al., 1998; DAYNANDAN; BAWA; KESSELI, 1997; WHITE; BOSHIER; POWELL, 1999; COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001, LEMES et al., 2003; NOVICK et al., 2003). Destes, somente alguns abrangeram uma dimensão geográfica semelhante à abordada neste trabalho (COLLEVATTI; GRATTAPAGLIA; HAY, 2001, LEMES et al., 2003, NOVICK et al., 2003).

Outros quatro estudos envolveram espécies de Meliaceae neotropicais. Em dois deles: *Carapa guianensis* na Costa Rica (DAYNANDAN; BAWA; KESSELI, 1997), e *Swietenia humilis* em Honduras (WHITE; BOSHIER; POWELL, 1999), foram encontrados níveis muito mais baixos de diferenciação genética ($R_{st} = 0,041$ e $0,032$, respectivamente) entre populações. No entanto, a escala geográfica desses estudos é muito menor, atingindo um máximo de 44 km. Nos outros estudos: *S. macrophylla* na Amazônia Brasileira (LEMES et al., 2003) e na América Central (NOVICK et al., 2003), foram encontrados níveis mais altos de diferenciação genética ($R_{st} = 0,147$ e $0,177$, respectivamente). Já estes estudos abrangem uma região geográfica muito maior, de cerca de 2.100 km (LEMES et al., 2003), semelhante à deste trabalho com 1.250 km entre as populações mais distantes.

As populações de *C. fissilis* analisadas aqui apresentaram correlação entre a diferenciação genética e sua distância geográfica. A diferenciação genética entre as populações de *C. fissilis* provavelmente é decorrente de fatores ecológicos, evolutivos e biogeográficos, tais como

mecanismos de dispersão de pólen e sementes, padrões fenológicos, história de vida das populações e barreiras ao fluxo gênico (ALVAREZ-BUYLLA et al., 1996).

Considerando a abrangência geográfica deste estudo, a diferenciação genética entre populações foi relativamente pequena. Ainda mais se considerarmos que esta espécie tem dispersão de sementes pelo vento e provavelmente apresenta pequenos insetos como principais polinizadores, já que essas formas de dispersão não são das que atingem as maiores distâncias.

Os padrões fitogeográficos da região de abrangência desses estudos mostram relação com a diferenciação genética das populações. Apesar de *C. fissilis* ocorrer em diferentes tipos de vegetação, populações em fisionomias vegetais semelhantes foram também mais semelhantes geneticamente. No entanto, outros padrões geográficos como relevo e altitude podem também ter influenciado na criação deste padrão.

C. fissilis está ameaçada em toda a região do estudo, como decorrência da exploração seletiva e do desmatamento em geral. As principais formações vegetais onde esta espécie ocorria estão entre as mais ameaçadas do país. Atualmente, a maior parte das populações é pequena e podem já estar comprometida por depressão endogâmica e deriva genética. São poucas as áreas de conservação com tamanho suficiente para abranger populações grandes e em bom estado de conservação dessa espécie.

Dessa forma, as ações voltadas para a conservação dessa espécie devem envolver uma ação integrada em toda sua área de ocorrência, abrangendo tanto as diferentes formações vegetais como também as áreas de tensão ecológica (ecótono). Nesse contexto, as Unidades de Conservação, onde essa espécie ocorre, desempenham um papel importantíssimo para a conservação da espécie, como pode ser observado neste trabalho. Bem como, devem também contribuir para a restauração das populações de *C. fissilis* onde a espécie foi eliminada, especialmente nas Áreas de Preservação Permanente e Reservas Legais no centro sul do Brasil.

Referências

ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J.L.; CHAVARRIAGE, P.; KOCHERT, G. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p.933-944, 1998.

ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; GARCIA-BARRIOS, R.; LARA-MORENO, C.; MARTINEZ-RAMOS, M. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo alto, v. 27, p.387-421, 1996.

CHASE, M.R.; MOLLER, R.; KESSELI, R.; BAWA, K.S. Distant gene flow in tropical trees. **Science**, Washington, v.383, p.398-399, 1996.

COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Estimation of gene flow from *F*-statistics. **Evolution**, Lancaster, v. 47, p.855-863. 1993.

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

CRESTE, C.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Oxford, v.19, p.299-306, 2001.

DAYNANDAN, S.; BAWA, K.S.; KESSELI, R. Conservation of microsatellite among tropical tree (Leguminosae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 84, p.1658-1663, 1997.

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

GILPIN M.E.; SOULÉ M.E. Minimum viable populations: process of species extinction. In: Soulé, M.E. (Ed.). **Conservation Biology, the Science of Scarcity and Diversity**. Sunderlands, MA: Sinauer Associates, 1986. p. 19 – 34.

GOODMAN, S.J. RSTCalc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. **Molecular Ecology**, Oxford, v.6, p.881-885, 1997.

GOUDET, J. FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, Washington, v.86, p. 485-486, 1995.

HEDRICK, P.W. Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, Lancaster, v.53, p.313-318, 1999.

LAURANCE, W.F.; BIERREGAARD, R.O. **Tropical forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities.** Chicago: The University of Chicago Press, 1997. 616p.

LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, *Meliaceae*) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: Implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v.12, p.2875-2883, 2003.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Disponível em: <<http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>>. Acesso em: 09 Jun. 2002.

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

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Chestnut, v. 27, p. 209-220, 1967.

MORGANTE M.; OLIVIERI A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Gainesville, v.3, p.175-182, 1993.

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

NOVICK, R.R.; DICK, C.W.; LEMES, M.R.; NAVARRO, C.; CACCONE, A.; BERMINGHAM, E. Genetic structure of Mesoamerica populations of big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v.12, p. 2885-2893, 2003.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 294-307, 2006.

ROHLF, F.J. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Department of ecology and evolution, State University of New York, Exeter Software. New York, 1997. Disponível em: <<http://www.exetersoftware.com>>. Acesso em: 05 abril 2003.

SLATKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. **Evolution**, Lancaster, v. 47, p. 264-279, 1993.

STRAND, A.E.; MILLIGAN, B.G.; PRUITT, C.M. Are populations islands? Analysis of chloroplast DNA variation in *Aquilegia*. **Evolution**, Lancaster, v. 50, p.1822-1829, 1996.

VENCOVSKY, R.; CROSSA J. Measures of representative ness. In: BORÉM, A.; GIÚDICE, M.P.; SAKIYAMA, N.S. (Ed.) **Plant Breeding in the turn of the millennium.** Viçosa: UFV, 1999, p.335-354.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis II.** Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.

WHITE, G.M.; BOSCHER, D.H.; POWELL, W. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, Oxford, v.8, p.1899-1909, 1999.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, Austin, v. 28, p. 139-156, 1943.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals Eugenics**, New York, v. 15, n. 4, p. 313-354, 1951.

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

4 ESTRUTURA GENÉTICA INTERNA DE POPULAÇÕES DE *Cedrela fissilis* Vell.

4.1 Introdução

As florestas tropicais têm passado por um processo continuado de degradação principalmente devido à conversão dessas florestas em áreas agrícolas e urbanas ou pela exploração de produtos madeireiros. Esses impactos ameaçam a manutenção da biodiversidade e de muitos processos biológicos nestes ambientes, ocasionando sérias conseqüências, em longo prazo, na manutenção da diversidade genética de populações naturais. Essa diversidade é a responsável pela adaptação das populações e espécies, sendo também a base para o melhoramento genético. Ela também é a responsável por parte das diferenças de produtividade e reprodução entre os indivíduos de uma espécie (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2005). Portanto, o seu estudo e análise em espécies arbóreas são de grande relevância já que estas são fundamentais na estrutura e dinâmica dos ecossistemas florestais.

A maior parte da diversidade genética de espécies arbóreas tropicais já estudadas está representada dentro de populações (HAMRICK, 1983; HAMRICK; LOVELESS, 1989). Essa distribuição é reflexo da ação de processos genéticos como seleção, fluxo gênico e deriva que são responsáveis pela distribuição não aleatória de genótipos em populações naturais (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2005; SOKAL; JAQUEZ; WOOTEN, 1989; EPPERSON, 1990; LOVELESS; HAMRICK, 1984). Portanto, o entendimento desses processos que mantêm a diversidade genética dentro de populações é fundamental para a compreensão da dinâmica da diversidade genética de uma espécie como um todo.

Assim como em outras espécies arbóreas tropicais, os estudos feitos em *C. fissilis* mostram que a maior parte da diversidade genética encontra-se dentro de populações (GANDARA, 1996; KAGEYAMA et al., 2004).

A estruturação genética dentro de populações pode interferir nos processos de reprodução, gerando cruzamentos biparentais e depressão por endogamia (EPPERSON, 1993), já que a probabilidade de troca de pólen é inversamente proporcional à distância entre plantas. Se árvores próximas são mais aparentadas pela limitação da dispersão de sementes, os cruzamentos

mais prováveis, ou seja, entre indivíduos próximos, poderá gerar maior endogamia (COLES; FOWLER, 1976). Portanto, compreender a estrutura genética dentro de populações é de grande importância para embasar ações de conservação, manejo e coleta de sementes.

Por outro lado, para se entender as pressões evolutivas na formação da estrutura genética dentro de populações, é também importante conhecer a distribuição da diversidade genética nos diferentes estádios de vida dos indivíduos de uma população.

Para se analisar como que ocorre a distribuição da variabilidade genética entre indivíduos de diferentes gerações de uma única população, pode-se amostrar diferentes classes de tamanho. Em muitas espécies já estudadas, observa-se que a heterozigosidade observada aumenta com as classes de tamanho ou idade (ALDRICH et al., 1998; DOLIGEZ; JOLY, 1997; EGUIARTE; PEREZ-NASSER; PIÑERO, 1992; GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; VENCOVSKY, 2003; LEPSCH-CUNHA; KAGEYAMA; VENCOVSKY, 1999; RIBAS; KAGEYAMA et al., 2004; SEBBENN et al., 2000). Pode-se entender este fato através da seleção natural que eliminaria os indivíduos mais endogâmicos, selecionando, ao longo do processo de regeneração, os heterozigotos que apresentariam maior aptidão.

Dessa forma, saber como a variabilidade genética está distribuída dentro das populações, tanto espacialmente como também entre os diferentes estádios de vida, é urgente face à grande redução demográfica que muitas espécies arbóreas da Mata Atlântica têm sofrido, especialmente as espécies com baixa densidade populacional, como *C. fissilis*. Esta redução provavelmente está levando muitas populações a atingir tamanhos populacionais abaixo do mínimo viável, o que pode comprometer importantes populações do ponto de vista genético, ou até mesmo a espécie como um todo.

Dessa forma, procuramos, neste estudo, analisar a estrutura genética interna de três populações naturais de *C. fissilis*. Bem como a distribuição da diversidade genética em diferentes estádios de vida (jovens e adultos) em duas populações.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Áreas de estudo

O estudo foi conduzido em três populações naturais de *C. fissilis*: Parque Estadual Intervales (PE Intervales), Reserva Florestal do Matão (RF Matão) e Parque Estadual do Rio Doce (PE Rio Doce).

O Parque Estadual Intervales, com uma área de 41.704 ha, está localizado no Vale do Ribeira no estado de São Paulo e pertence ao Instituto Florestal do Estado de São Paulo. Sua vegetação é predominantemente constituída de floresta ombrófila densa e, em grande parte, em estado avançado de sucessão. O levantamento foi realizado na base de Saibadela (24°14' S e 48°04' W), em Sete Barras – SP, que apresenta uma altitude média de 115 m.

A Reserva Florestal do Matão (24°06' S e 50°01' W), com uma área de 2.000 ha está localizada em Arapoti, nordeste do Paraná, com uma altitude média de 712 m, e pertence à Inpacel / International Paper, com uma vegetação predominantemente constituída de floresta estacional semidecidual. Esta área sofreu exploração seletiva de madeira há cerca de 40 anos e, portanto se constitui em uma floresta secundária e está, em sua maior parte, em estado avançado de sucessão e, em alguns trechos, em estado intermediário.

O Parque Estadual do Rio Doce apresenta uma área de 36.970 ha e está localizado nos municípios de Timóteo e Marliéria, no estado de Minas Gerais (19°46' S e 42°33' W). O parque, sob administração do Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais, apresenta uma altitude média de 284 m e é composto, predominantemente, por floresta estacional semidecidual, sendo uma das maiores áreas com este tipo de formação vegetal.

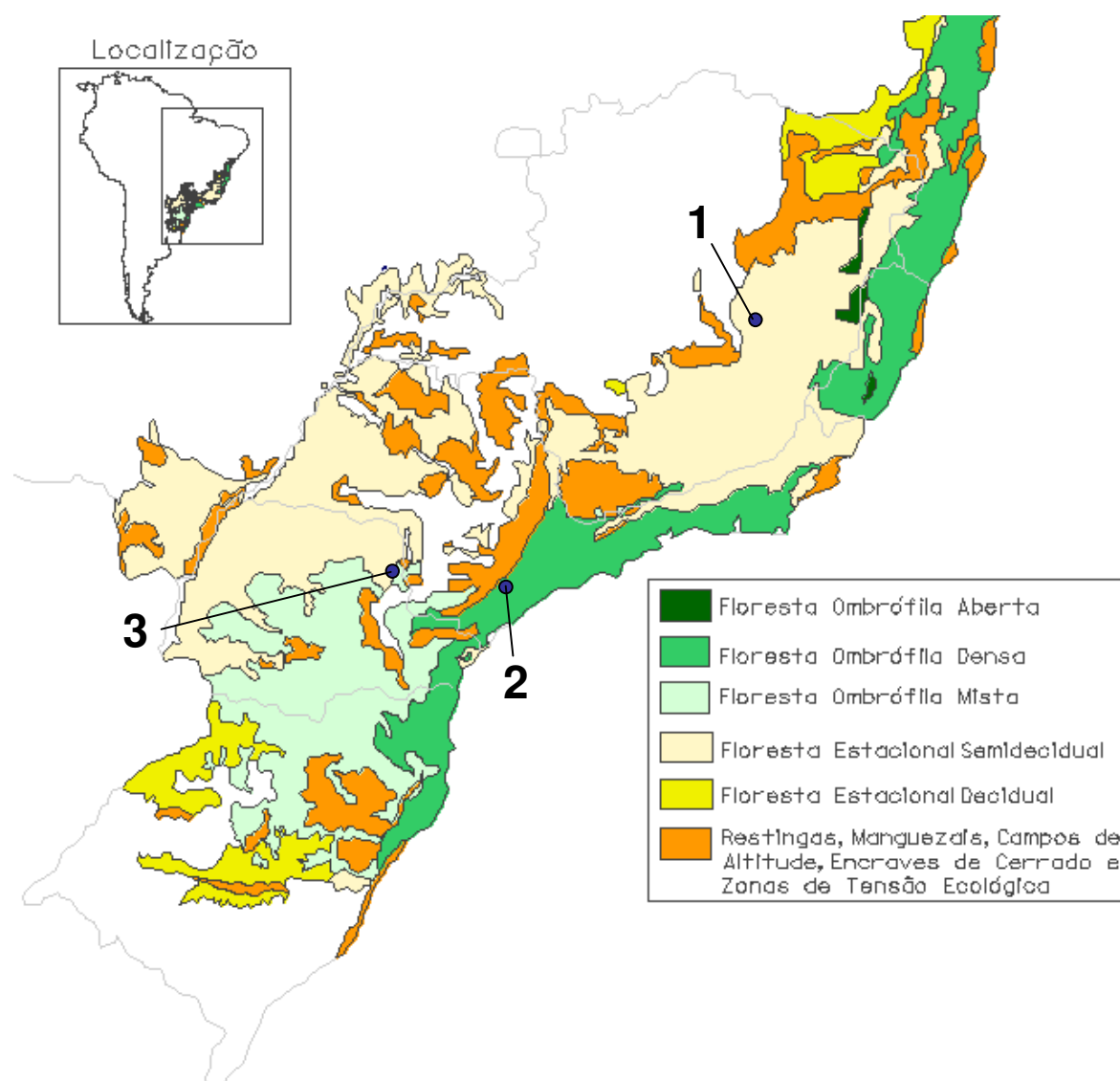


Figura 4.1 - Localização das três áreas de estudo, divisas estaduais e formações vegetais da região de abrangência do estudo (1- Parque Estadual do Rio Doce - Minas Gerais, 2- Parque Estadual Interales - São Paulo, 3 - Reserva Florestal do Matão- Paraná)

4.2.2 Coleta das amostras

Nos locais estudados, todas as árvores adultas (indivíduos do dossel com presença de estruturas reprodutivas) foram mapeadas em uma área contínua. No Parque Estadual Interales, a área de estudo apresentou 270 ha, onde foram encontradas 33 árvores adultas de *C. fissilis*.

Na Reserva Florestal do Matão, a área de estudo apresentou 4,4 ha, onde foram encontradas 29 árvores adultas de *C. fissilis*. E no Parque Estadual do Rio Doce, a área de estudo contou com 21 ha com a presença de 20 indivíduos adultos de *C. fissilis*.

No Parque Estadual Intervales e na Reserva Florestal do Matão, também foram feitos levantamentos de jovens em transectos de 2 m de largura, onde foram contadas todas as plantas acima de 30 cm de altura e não reprodutivas.

No Parque Estadual Intervales, os transectos perfizeram um comprimento total de 4.800m, totalizando uma área de 9.600 m², onde foram encontrados 23 indivíduos jovens de *C. fissilis*.

Na Reserva Florestal do Matão, os transectos totalizaram 2.200 m de comprimento, com uma área de 4.400 m², onde foram encontrados 27 indivíduos jovens de *C. fissilis*.

De todas as plantas encontradas (adultos e jovens) também foram coletadas folhas para a extração de DNA. As amostras foram secas imediatamente após a coleta em recipientes herméticos contendo sílica-gel.

4.2.3 Extração de DNA

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Reprodução e Genética de Espécies Arbóreas (LARGEA), localizado no Departamento de Ciências Florestais da ESALQ-USP, em Piracicaba - SP. A extração do DNA genômico total das amostras foi realizada seguindo o protocolo CTAB descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998). Após a quantificação de DNA as amostras foram diluídas em água MiliQ a 3ng/μl.

4.2.4 Marcadores genéticos em *Cedrela fissilis*

Neste estudo foram utilizados locos microssatélites como marcadores para as análises de genética de populações. Esses marcadores são muito indicados na estimativa de parâmetros genéticos e na descrição da estrutura genética de populações e fluxo gênico (MORGANTE; OLIVIERI, 1993; OLIVEIRA et al., 2006).

Oito locos microssatélites foram desenvolvidos e otimizados para *C. fissilis* e utilizados para genotipar os indivíduos analisados. Os locos microssatélites foram desenvolvidos a partir de uma biblioteca genômica enriquecida para seqüências repetitivas de nucleotídeos poli AG/TC.

4.2.5 Amplificação dos locos microssatélites

Foi utilizado um coquetel (13 μ l) para a realização da PCR que era composto por 9ng de DNA genômico, 250 μ M de dNTPs, 0,5 μ M de MgCl₂, tampão para PCR 1X (10mM de Tris-HCl, 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, pH 8.3), 2,5 μ g/ml de BSA, 0,2 μ M de cada iniciador e 1U de Taq DNA polimerase (Phoneutria). As amplificações foram realizadas em termociclador do tipo MJ Research PTC-100 através do seguinte protocolo: 96°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridação específica de cada par de primers por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e, por fim, 72°C por 7 minutos.

Depois da amplificação, os fragmentos de DNA foram segregados em gel denaturante de poli(acrilamida) a 4%, em corridas com cerca de uma hora em tampão TBE 1X em cuba vertical. Os géis foram coloridos com nitrato de prata, seguindo o protocolo desenvolvido por Creste, Tulmann-Neto e Figueira (2001) o que permitiu que os fragmentos fossem observados na forma de bandas. O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular padrão (10-pb “ladder” – Invitrogen®). Os fragmentos amplificados que apresentassem diferentes tamanhos foram considerados alelos distintos.

4.2.6 Análise estatística

4.2.6.1 Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A aderência das freqüências alélicas e genotípicas de cada loco às proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificada através do teste exato de Fisher, segundo Weir (1996), com a utilização do programa GDA (LEWIS; ZAIKIN, 2001).

4.2.6.2 Diversidade genética

Nas populações do Parque Estadual Intervales e da Reserva Florestal do Matão, os níveis de diversidade genética para jovens e adultos, foram descritos em termos de número de alelos por loco (\hat{A}), heterozigosidade observada (\hat{H}_o), diversidade gênica (\hat{H}_e) e índice de fixação (\hat{f}). As estimativas desses parâmetros foram obtidas a partir do programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001).

4.2.6.3 Correlação espacial dos genótipos

Foi realizada a análise da autocorrelação espacial multialélica nas três populações analisadas. Foram calculadas as distâncias genéticas entre pares de indivíduos segundo Smouse e Peakall (1999). Adotou-se o procedimento de manter constante o número de indivíduos conectados por classe de distância, tornando as correlações em cada classe de distância comparáveis, e com erros de estimativa semelhantes.

Estabeleceram-se dez (10) classes de distância, sendo o tamanho de cada classe variável e determinado conforme o número de pares de indivíduos conectados em cada classe. Desta forma, obteve-se uma análise mais adequada quando os indivíduos estão distribuídos de forma irregular na área.

Foi calculado o coeficiente de correlação que apresenta interpretação análoga ao coeficiente de correlação de Pearson, ou seja, varia entre $-1,0$ e $+1,0$ (máximos valores para autocorrelação negativa e positiva) e quando igual a zero indica que não há autocorrelação. Os intervalos de confiança a 95% foram obtidos por 999 permutações. Quando os valores de correlação estiverem fora do intervalo de confiança são considerados estatisticamente significativos.

Foi também analisada a significância do correlograma a 5%. Para tanto, pelo menos uma das correlações deve ser significativa no nível de $0,05/k$, onde k é número de classes de distância (DINIZ-FILHO, 1998).

As análises de autocorrelação espacial multialélica foram realizadas com uso do programa GenAIEx V6 (PEAKALL; SMOUSE, 2001).

4.3 Resultados e discussão

A densidade de indivíduos adultos nas populações foi variável. O Parque Estadual Intervales apresentou a densidade mais baixa com 0,12 indivíduos adultos por ha (33 árvores), ou uma árvore a cada 8,18 ha. No Parque Estadual do Rio Doce a densidade foi de 0,95 indivíduos adultos por ha (20 árvores) ou uma árvore a cada 1,05 ha. Já na Reserva Florestal do Matão, a densidade observada foi de 6,59 indivíduos adultos por ha (29 árvores).

No PE Intervales, o levantamento dos indivíduos jovens indicou uma densidade de 23,96 plantas por ha. E na RF Matão, a densidade de indivíduos jovens foi de 61,36 indivíduos por ha.

Nos oito locos microssatélites analisados foram encontrados 79 alelos nas populações do PE Intervales e RF Matão, variando de 52 a 76 alelos para cada classe em cada população (Tabela 4.1). O loco CF 66A foi o mais polimórfico, apresentando 20 alelos. Já os locos CF9, CF32 e CF83 foram os menos polimórficos, com 3, 2 e 4 alelos respectivamente (Tabela 4.1).

Observou-se que ocorreram desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg na maioria dos locos (Tabela 4.2). No entanto, predominaram os casos onde a aderência ao EHW foi observada. Os desvios nas proporções de EHW podem ser causados por fatores como deriva genética, seleção, mutação, migração e também pelo sistema misto de reprodução.

Tabela 4.1 - Número de alelos por loco em duas populações de *C. fissilis*, localizadas na Reserva Florestal do Matão em Arapoti/PR e no Parque Estadual Intervales em Sete Barras/SP

Locus	RF Matão		PE Intervales	
	Jovens	Adultos	Jovens	Adultos
CF09	2	3	1	2
CF26	7	9	9	9
CF32	2	2	2	2
CF34	9	8	9	10
CF63	6	7	7	10
CF66A	8	13	12	20
CF66B	6	8	7	7
CF78	8	13	7	12
CF83	4	3	4	4
Total	52	66	58	76

Tabela 4.2 - Estimativas dos índices de fixação (\hat{f}) e aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, por loco, para jovens e adultos de *C. fissilis* em duas populações, localizadas na Reserva Florestal do Matão em Arapoti/PR e no Parque Estadual Intervales em Sete Barras/SP

Locus	RF Matão		PE Intervales	
	Jovens	Adultos	Jovens	Adultos
CF09	0,168 ^{ns}	0,210 ^{ns}	0,271 ^{ns}	0,214 ^{ns}
CF26	0,318 ^{ns}	0,372	0,311 ^{ns}	0,204 ^{ns}
CF32	-0,072 ^{ns}	-0,087 ^{ns}	0,154 ^{ns}	0,166 ^{ns}
CF34	0,121	-0,218 ^{ns}	-0,061 ^{ns}	0,004 ^{ns}
CF63	0,216 ^{ns}	0,201 ^{ns}	0,099 ^{ns}	0,194
CF66A	0,302	0,158 ^{ns}	0,357	0,037 ^{ns}
CF66B	0,387	0,301 ^{ns}	0,427	0,298
CF78	0,275 ^{ns}	0,110 ^{ns}	0,246 ^{ns}	0,063 ^{ns}
CF83	0,239 ^{ns}	0,322 ^{ns}	0,323 ^{ns}	0,458

(^{ns}) valores não significativos a 5% de probabilidade.

Observou-se que o número médio de alelos por loco foi um pouco maior nos adultos do que nos jovens, tanto no PE Intervales como na RF Matão (Tabela 4.3). Já adultos e jovens da RF Matão também apresentaram o número médio de alelos por loco ligeiramente maior em relação à população do PE Intervales. No entanto, observa-se que, o número médio de indivíduos analisados nesses dois estádios foi diferente, sendo que os jovens apresentaram menos indivíduos do que os adultos. Essa diferença no tamanho amostral pode ter influenciado no número de alelos encontrados.

Nas duas populações, os valores médios de \hat{H}_e foram maiores nos adultos em relação aos jovens (Tabela 4.3), mas observa-se que os intervalos de confiança se sobrepõem, mostrando que as diferenças não são significativas. Também se pode observar que os valores de \hat{H}_e encontrados foram maiores que os valores de \hat{H}_o nas duas populações, tanto para jovens como para adultos.

Tabela 4.3 - Estimativas dos índices de diversidade genética para jovens e adultos de duas populações de *C. fissilis*, localizadas na Reserva Florestal do Matão em Arapoti/PR e no Parque Estadual Intervales em Sete Barras/SP. (n = tamanho amostral; \hat{A} = número médio de alelos por loco; \hat{H}_e = diversidade gênica; \hat{H}_o = heterozigosidade observada; \hat{f} = índice de fixação)

População	n	\hat{A}	\hat{H}_e	\hat{H}_o	\hat{f}	IC (99%)
Parque Estadual Intervales						
Jovens	23	7,14	0,679	0,553	0,245	-0,055 a 0,489
Adultos	33	8,25	0,726	0,559	0,186	-0,090 a 0,406
Reserva Florestal do Matão						
Jovens	27	7,86	0,602	0,484	0,196	0,050 a 0,449
Adultos	29	8,71	0,741	0,630	0,154	-0,044 a 0,314

As estimativas médias do índice de fixação (\hat{f}) mostraram valores baixos e positivos (Tabela 4.3) para jovens e adultos, não sendo significativamente diferentes de zero. No entanto, ao analisarmos cada loco observamos que alguns locos apresentaram valores significativos, em pelo menos um dos estádios de desenvolvimento (Tabela 4.2).

A análise de autocorrelação espacial dos genótipos foi realizada para três populações de *C. fissilis* (PE Intervales, RF Matão e PE Rio Doce) (Figura 4.2). Observando os correlogramas

obtidos, vemos que apenas na população da RF Matão a autocorrelação espacial foi significativa a 95% até uma distância de cerca de 30m e também acima de uma distância de cerca de 180m. Nas outras duas populações, os valores encontrados nas diversas classes de distância foram baixos e não diferiram significativamente de zero.

Esses padrões encontrados devem refletir com precisão a estruturação interna das populações estudadas, uma vez que, todos os indivíduos adultos foram estudados dentro da área de levantamento.

O correlograma da população da RF Matão foi significativo como um todo, pois pelo menos uma das correlações que foi significativa a 0,05 também foi significativa a $\alpha/10 = 0,005$. Isto mostra que o fato dos indivíduos até 30 m de distância serem geneticamente mais semelhantes e que os indivíduos acima de 180 m serem mais dessemelhantes reflete o padrão da população como um todo.

A autocorrelação espacial nessa população deve ser decorrente de uma dispersão de sementes restrita.

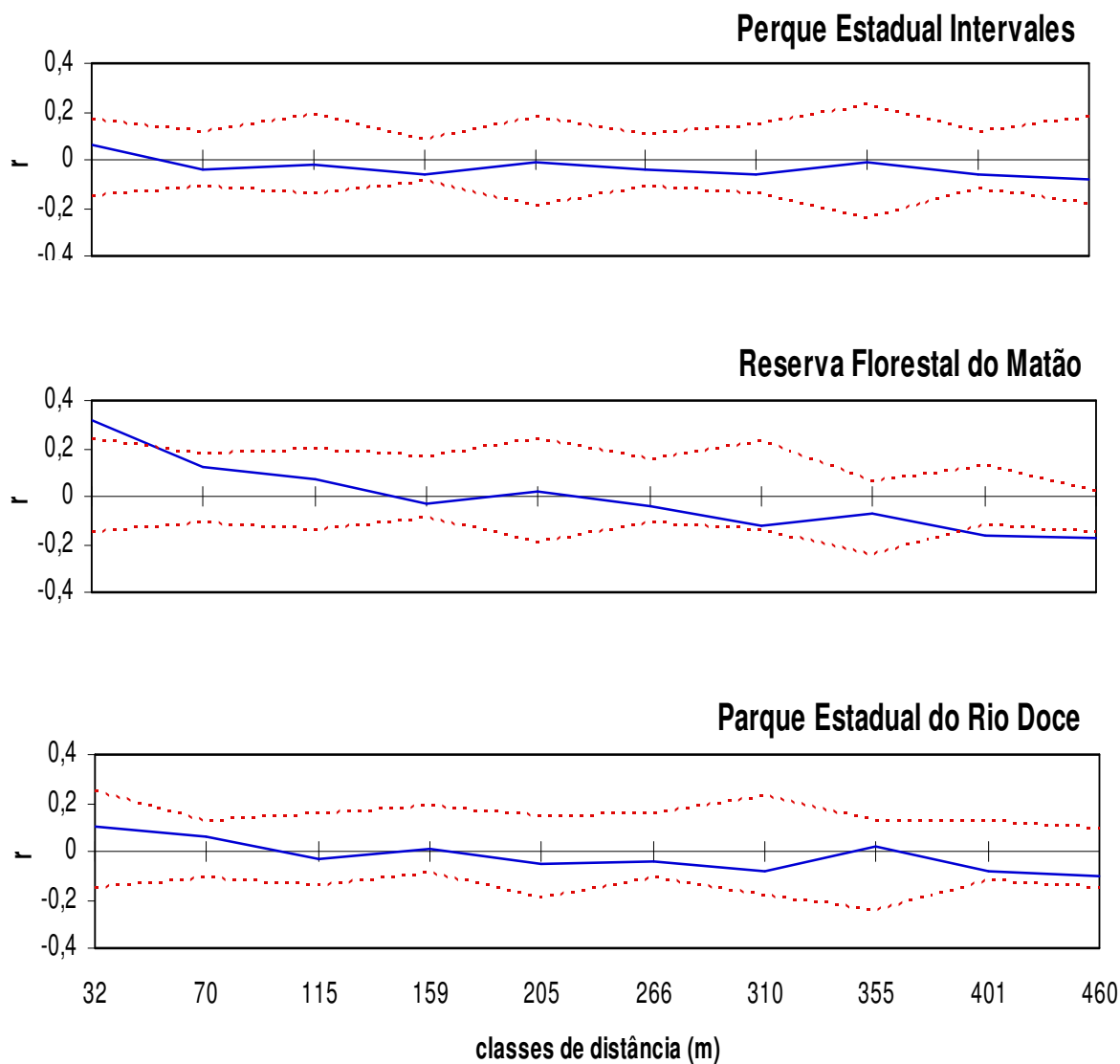


Figura 4.2 - Autocorrelação espacial multialélica de três populações de *C. fissilis* em dez classes de distância. A linha contínua indica a correlação (r) e as linhas tracejadas indicam os limites inferior e superior do intervalo de confiança a 95% obtido por 1000 permutações

Observou-se um alto nível de polimorfismo nos nove locos analisados, o que confirma o alto conteúdo informativo esperado para esses marcadores em populações de espécies arbóreas. Também foram observadas pequenas variações nos parâmetros genéticos entre jovens e adultos tanto no PE Intervalles como na RF Matão.

Neste trabalho, observou-se que a maioria dos locos não está em EHW, em pelo menos um dos estádios de desenvolvimento. Na maior parte dos casos, os locos apresentaram um número maior de homozigotos do que o esperado sob as pressuposições do EHW, o que indica que os desvios podem ter sido causados pelo sistema reprodutivo e/ou pelo efeito Wahlund (FUTUYMA, 1992; HARTL; CLARK, 1997).

Os parâmetros genéticos analisados nas duas populações mostraram a presença de alta variabilidade genética, em especial para a riqueza alélica e diversidade gênica. Esses dados indicam que as duas populações têm grandes possibilidades de manutenção da variabilidade genética nas próximas gerações. Esta suposição também é apoiada pelo fato que as duas reservas são grandes e devem abrigar populações com grande número de indivíduos, pelas estimativas de densidade obtidas neste trabalho.

Em vários trabalhos conduzidos com espécies arbóreas tropicais foram observados valores altos para diversidade gênica (RAPOSO, 2007; ALDRICH et al., 1998; CONTE et al., 2003; GAIOTTO; GRATTAPAGLIA; VENCOVSKY, 2003; KAGEYAMA et al., 2004; KAGEYAMA; GANDARA; VENCOVSKY, 2001; LEMES et al., 2003; LEPSCH-CUNHA; KAGEYAMA; VENCOVSKY, 1999; NOVICK et al., 2003). Esta alta diversidade pode ser mantida nessas espécies devido a algumas características como dispersão de sementes e/ou frutos a longa distância, alta taxa de cruzamento, grande longevidade, dentre outras.

Já foi relatada também, em muitos casos, a seleção em favor de indivíduos heterozigóticos em espécies arbóreas (EGUIARTE; PEREZ-NASSER; PIÑERO, 1992; GAIOTTO, GRATTAPAGLIA; VENCOVSKY, 2003; LEPSCH-CUNHA; KAGEYAMA; VENCOVSKY, 1999; RIBAS; KAGEYAMA et al., 2004; SEBBENN et al., 2000). Nesses estudos foi observado o aumento da heterozigosidade observada conforme aumenta o tamanho e/ou idade dos indivíduos.

No presente trabalho, também se observou um pequeno aumento da heterozigosidade observada nos adultos em relação aos indivíduos jovens. Isto também reflete em uma maior endogamia (\hat{f}) nos indivíduos jovens, no entanto, estes valores não foram significativos.

A autocorrelação espacial mostrou que as populações do PE Intervalles e do PE Rio Doce não apresentaram estruturação. No entanto, a população da RF Matão apresentou estruturação positiva entre os indivíduos mais próximos e negativa entre os indivíduos mais distantes.

Alguns estudos sobre a estrutura genética já foram realizados com espécies arbóreas tropicais. Os níveis de estruturação genética são variáveis e provavelmente devem refletir a capacidade de dispersão de sementes e pólen.

Em alguns casos, foi encontrada uma estrutura genética significativa, como em *Carapa guianensis* (RAPOSO, 2007), *Solanum lycocarpum* (MARTINS et al., 2006) *Cryptocaria moschata* (MORAES; MONTEIRO; VENCOVSKY, 2004) e *Hymenaea courbaril* (CASTELLEN, 2005), o que deve ser decorrente de um fluxo gênico restrito nessas populações. Por outro lado, outros estudos mostraram ausência de estrutura genética, ou seja, uma distribuição aleatória dos genótipos como em *Cedrela fissilis* (GANDARA, 1996; POVOA, 2002), *Carapa procera* (DOLIGEZ; JOLY, 1997) e *Platipodium elegans* (HAMRICK; MURAWSKI; NASON, 1993).

O padrão de distribuição espacial em espécies arbóreas pode ser influenciado por diversos fatores, como densidade populacional, dispersão de pólen e sementes, sobreposição de gerações e sistema reprodutivo (DOLIGEZ; BARIL; JOLY, 1998).

Comparando a estrutura espacial de *C. fissilis* nas três populações, observamos que as duas populações em melhor estado de conservação (PE Intervalles e PE Rio Doce) não apresentaram estruturação significativa. Essas populações também apresentaram densidades populacionais mais baixas.

A população da RF Matão apresentou uma estruturação significativa e também uma densidade populacional mais elevada se comparada com as anteriores. Uma hipótese para explicar essa situação pode ser levantada pelo fato dessa área ter sido explorada até cerca de 40 anos atrás. Com a exploração madeireira e corte das melhores árvores, a população de *C. fissilis* deve ter diminuído. Após o término da exploração, a população voltou a se restabelecer com a dispersão de sementes dos indivíduos remanescentes. Essa reocupação da área a partir de alguns pontos determinados e a alta densidade populacional, provavelmente favorecida pela abertura de clareiras durante o processo de exploração madeireira, deve ter sido responsável pela criação da estrutura espacial atual dessa população.

Alguns trabalhos com espécies arbóreas mostram que indivíduos mais jovens tendem a apresentar uma estruturação espacial maior que indivíduos adultos, que se aproximam de uma distribuição aleatória (NG; LEE; KOH, 2004; HAMRICK; MURAWSKI; NASON, 1993; CHUNG; EPPERSON; CHUNG, 2003; ALVAREZ-BUYLLA et al., 1996). Ao longo do

processo de recrutamento, quando muitas plântulas e jovens morrem, especialmente os que se encontram mais próximos aos adultos, deve ocorrer a diminuição da estruturação genética espacial.

Este processo deve ter ocorrido mais sutilmente na RF Matão pela interferência do corte madeireiro seletivo levando à formação da estrutura espacial atual.

Referências

- ALDRICH, P.R.; HAMRICK, J. L.; CHAVARRIAGA, P.; KOCHERT, G. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, p. 933-944, 1998.
- ALVAREZ-BUYLLA, E.R.; CHAOS, A.C.; PINERO, D.; GARAY, A.A. Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal, and seed banks. **Evolution**, Lancaster, v. 50, p. 1155-1166, 1996.
- CASTELLEN, M. da S. **Avaliação do estado de conservação de populações naturais de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por meio de análises de estrutura genética e autocorrelação espacial**. 2005. 104 p. Tese (Doutorado em Ecologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- CHUNG, M.Y.; EPPERSON, B.K.; CHUNG, M.G. Genetics structure of age classes in *Camellia japonica* (Theaceae). **Evolution**, Lancaster, v.57, p.62-73, 2003.
- COLES, J.F.; FOWLER, D.P. Inbreeding in neighboring trees in two White Spruce populations. **Silvae Genetica**, Forstgenetik., v. 25, p. 29-34, 1976.
- CONTE, R.; NODARI, R.O.; VENCOVSKY, R.; REIS, M.S. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, London, v. 91, p. 401-406, 2003.
- DINIZ-FILHO, J.A.F. **Análise de autocorrelação espacial: Inferências microevolutivas e aplicações em genética de populações**. Ribeirão Preto :Sociedade Brasileira de Genética,. 1998. p. 83-145. (Séries Monográficas. v. 6,)
- DOLIGEZ, A.; BARIL, C.; JOLY, H.I. Fine-scale spatial genetic structure with non uniform distribution of individuals. **Genetics**, Austin, v. 148, p. 905-920, 1998.
- DOLIGEZ, A.; JOLY, H.I. Genetic diversity and spatial structure within a natural stand of a tropical forest tree species, *Carapa procera* (Meliaceae), in French Guiana. **Heredity**, London, v., 79, p. 72-82, 1997.

- EGUIARTE, L.E.; PEREZ-NASSER, L.; PIÑERO, D. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity**, London, v. 69, p. 217-228, 1992.
- EPPERSON, B.K. Recent advances in correlation analysis of spatial patterns of genetic variation. **Evolutionary Biology**, New York, v. 27, p. 95-155, 1993.
- EPPERSON, B.K. Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: BROWN, A.H.D.; CLEG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (Ed.) **Plant population Genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland, Massachusetts :Sinauer, 1990. p.229-253.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 631p.
- GAJOTTO, F.A.; GRATAPAGLIA, D.; VENCOSKY, R. Genetic structure, mating system, and log-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). **Journal of Heredity**, London, v. 94, p. 399-406, 2003.
- GANDARA, F.B. **Diversidade genética, taxa de cruzamento e estrutura espacial dos genótipos em uma população de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)**. 1996. 69p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade de Campinas. Campinas, 1996.
- HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among plant populations. Appendix 4. In: CHAMBERS; SCHONEWALD-COX (Ed.). **Genetics and Wild Population Management**. New York: Addison-Wesley, 1983. p. 500-508.
- HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. The genetic structure of tropical tree populations: Associations with reproductive biology. In: BOCK, J. H.; LINHART, Y.B. (Ed.) **Plant Evolutionary Ecology**. Boulder: Westview Press, 1989. chap. 2 p. 131-146.
- HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A.; NASON J.D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 107/108, p. 281-297, 1993.
- HARTL, D.L.; CLARK, AG. **Principles of population genetics**. 3rd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1997. p.542.
- KAGEYAMA, P.Y.; CARON, D.; GANDARA, F.B.; MARTINS, K.; WADT, L.H.O.; LACERDA, C.M.B.; BOUFLEUER, N.T.; RIBAS, L.A.; MORENO, M. A.; FERRAZ, E.M. Genetic and ecological aspects of nonwood forest product exploitation in two western Amazonian settlements. In: VINCETI, B., AMARAL, W., MEILLEUR, B. (Org.). **Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil**. Roma: IPGRI, 2004. p. 149-217.
- KAGEYAMA, PY.; GANDARA, F.B; VENCOSKY, R. Conservação *in situ* de espécies arbóreas tropicais. In: NASS, L.L., VALOIS, A.C.C., MELO, I.S DE; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.) **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.149-158.

- LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 2875-2883, 2003.
- LEPSCH-CUNHA, N.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOVSKY, R. Genetic diversity of *Couratari multiflora* and *Couratari guianensis* (Lecythidaceae); consequences of two types of rarity in central Amazônia. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 8, p. 1205-1218, 1999.
- LEWIS, P.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis: computer computer programme for the analyse of allelic data (software) 2002. version 1.0(d2). Disponível em: <<http://alleun.eeb.uconn.edu/gda>>. Acesso em: 20 nov. 2003.
- LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.H. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p. 65-95, 1984.
- LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics**: design, analysis, and application. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. 326p.
- MARTINS, K.; CHAVES, L.J.; BUSSO, G.S.C.; KAGEYAMA, P.Y. Mating system and fine-scale genetic structure of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) in Brazilian Cerrado. **Conservation Genetics**, Arlington, v. 7, p. 957-969, 2006.
- MORAES, P.L.R.; MONTEIRO, R.; VENCOVSKY, R. Estrutura genética intrapopulacional em *Cryptocarya moschat, a* Nees (Lauraceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 27, p. 475-487, 2004.
- MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, New York, v. 30, p. 194-200, 2002.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Gainesville, v. 3, p. 175-182, 1993.
- NG, K.K.S.; LEE, S.L.; KOH, C.L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 657-669, 2004.
- NOVICK, R.R.; DICK, C.W.; LEMES, M.R.; NAVARRO, C.; CACCONE, A.; BERMINGHAM, E. Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 2885-2893, 2003.
- OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 294-307, 2006.

- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E.; GenALEx v5: Genetic Analysis in Excel. 2001. Population genetic software for teaching and research. Australia National University, Canberra, Australia. Disponível em: <<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenALEx/>>. Acesso em: 10 nov. 2003.
- PÓVOA, J.S.R. **Distribuição da variação genética de *Cedrela fissilis* Vell. em fragmentos florestais no sul de Minas Gerais, por meio de isoenzimas.** 2002. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2002.
- RAPOSO, A. 2007. **Estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) visando o manejo e a conservação da espécie.** 2007. 152p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2007.
- RIBAS, L.A.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética em uma população de *Trema micrantha* (L.) considerando diferentes estádios de vida. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 65, p.176-187, 2004.
- SEBBENN, A.M., SEOANE, C.E.S., KAGEYAMA, P. Y., VENCOVSKY, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 58, p. 127-143, 2000.
- SMOUSE, P.E.; PEAKALL, R. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. **Heredity**, London, 82:561-573. 1999.
- SOKAL, R.R.; JAQUEZ, G.M. WOOTEN, M.C. Spatial autocorrelation analysis of migration and selection. **Genetics**, Austin, v. 121, p. 845-855, 1989.
- WEIR, B.S. **Genetic data analysis II.** Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho pudemos observar dados inéditos sobre a distribuição geográfica da diversidade genética de uma espécie arbórea tropical da Mata Atlântica abrangendo distâncias superiores a 1.100 km. Dados com essa abrangência são fundamentais para o entendimento da distribuição e dinâmica da diversidade genética em espécies de ampla distribuição, bem como para subsidiar programas e ações de conservação genética *in situ* desta espécie, bem como do seu uso sustentável através da coleta de sementes para plantios e manejo.

Dados sobre a diversidade genética em amplas áreas geográficas em espécies arbóreas tropicais são escassos, no entanto, algumas considerações podem ser extrapoladas para outras espécies que apresentam características ecológicas similares, principalmente grupo sucessional (espécies secundárias) e baixa densidade populacional.

Nessas espécies, espera-se também que o modelo de isolamento pela distância seja válido, apesar de que outros fatores que afetam a estrutura genética e a restrição ao fluxo gênico, como diferenças fenológicas, variações nas formações vegetais e origem geográfica das espécies, devem ainda ser mais bem analisados.

As informações de ecologia e genética de populações das espécies arbóreas da floresta tropical são incipientes na literatura, em função da alta diversidade e complexidade de espécies, trazendo dificuldades de amostragem de espécies e de disponibilidades de metodologias apropriadas para estudos genéticos das mesmas. No entanto, esse conhecimento é fundamental para o entendimento da estrutura das populações das espécies e importante para proposições de uso adequado das mesmas (definição de tamanho de reservas, manejo adequado das populações, recuperação de áreas degradadas e coleta de sementes para plantios).

Esta abordagem é de grande importância para *Cedrela fissilis*, por ser uma espécie de baixa densidade e muito procurada pelo corte seletivo.

As informações geradas são estratégicas para a conservação da Mata Atlântica, e mesmo para aplicação na Floresta Amazônica, gerando indicadores para estabelecimento e manejo das reservas genéticas *in situ*, assim como, para a implantação de corredores gênicos entre pequenos fragmentos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as populações de *Cedrela fissilis* estudadas apresentam alta diversidade genética em toda a abrangência geográfica estudada. Também foi possível analisar que as populações não alteradas apresentam uma distribuição espacial aleatória de genótipos. Apesar da baixa densidade populacional dessa espécie em populações não alteradas, ela não deve apresentar restrições ao fluxo gênico, nem por sementes, nem por pólen.

Assim, em *Cedrela fissilis*, supõe-se que a baixa densidade não é um fator que afeta consideravelmente a estrutura genética de suas populações, ou seja, esta espécie apresenta características ecológicas como dispersão de pólen e sementes, mecanismos de polinização, e regeneração compatíveis com a baixa densidade. Desta forma, uma espécie rara com estas características não seria formada por populações com um tamanho efetivo pequeno, mas, pelo contrário, teria populações com um número muito grande de indivíduos ocupando extensas áreas.

É de se esperar também que espécies que apresentem características ecológicas semelhantes a *Cedrela fissilis* também possuam estruturas genéticas semelhantes. Desta forma, espécies secundárias ou de clareira pequena, anemocóricas, com polinização por animais, e com populações com baixa densidade de indivíduos também devem apresentar extenso fluxo gênico, ausência de estruturação espacial, altas taxas de cruzamento e populações com tamanho efetivo grande.

Porém, com o processo de fragmentação da Mata Atlântica, restaram muitos fragmentos pequenos, mas poucas áreas grandes e bem conservadas. Além disso, as áreas remanescentes estão mal distribuídas, concentrando-se ao longo do litoral da região sul e sudeste.

A maior parte das grandes áreas remanescentes de Mata Atlântica se constitui de unidades de conservação federais e estaduais. No entanto, como foi observado em *C. fissilis*, para a conservação genética em longo prazo é fundamental a manutenção de um grande número de populações.

Ao se pensar na manutenção do potencial evolutivo desta espécie e, portanto, na conservação de populações naturais da forma mais original possível, deve-se imaginar áreas na ordem de vários milhares de hectares, como o Parque Estadual Intervales (41.704 ha), o Parque Estadual do Rio Doce (36.970 ha) ou o Parque Estadual do Morro do Diabo (33.845 ha). Áreas desse tamanho compreenderiam uma população de *C. fissilis* que teria grandes chances de manter suas características genéticas inalteradas. No entanto, áreas de Mata Atlântica com este tamanho

e em bom estado de conservação são escassas. Na região centro-sul do Brasil, predominam, em sua maioria, pequenos fragmentos já bastante alterados pela ação antrópica, especialmente para espécies de alto valor madeireiro como *C. fissilis*, que ainda estão sujeitas ao corte seletivo.

Dessa forma, as estratégias de conservação *in situ* para esta espécie devem levar em conta tanto grandes áreas de conservação como também os demais fragmentos, que assim, podem compreender uma maior abrangência geográfica e genética.

As áreas remanescentes apresentam ainda a condição de estarem muito isoladas na paisagem, o que dificulta a ocorrência de fluxo gênico entre fragmentos. Portanto, para a conservação de *C. fissilis* ser mais efetiva, é necessária uma ação coordenada entre os diversos órgãos responsáveis tanto pelas unidades de conservação como também pelas ações de restauração e utilização de recursos genéticos.

Para a coleta de sementes de *C. fissilis* com a finalidade de conservação genética e melhoramento ou utilização em projetos de restauração, há, além da necessidade de se coletar sementes de um número grande de indivíduos em uma população natural, também a necessidade de regionalização na utilização dessas sementes, especialmente levando-se em conta a formação vegetal da área de coleta.

Os dados sobre diversidade genética gerados em populações naturais são muito importantes principalmente pelo fato de serem referenciais para a conservação de áreas primárias e para a restauração da diversidade em áreas antropizadas.

6 CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites desenvolvidos para *C. fissilis* apresentaram-se altamente discriminantes e adequados para estudos populacionais na espécie.

A diversidade genética apresentada pelas populações estudadas de *Cedrela fissilis* está na média das populações de espécies arbóreas tropicais já estudadas com o mesmo tipo de marcador.

A diferenciação genética entre populações mostrou ser relacionada à distância geográfica. No entanto, outros fatores também devem estar relacionados à estruturação como fenologia, história evolutiva das populações e formação vegetal.

Entre os indivíduos jovens há uma tendência de ocorrer menor diversidade gênica e maior endogamia em relação aos indivíduos adultos, o que evidencia a ocorrência de seleção em favor dos heterozigotos ao longo do processo de regeneração.

As populações não perturbadas de *Cedrela fissilis* não apresentaram estruturação genética, o que mostra que o fluxo gênico é suficientemente amplo para prevenir a formação de estrutura a partir da deriva genética e/ou da seleção local. Contudo, a estruturação espacial ocorreu em uma população alterada pelo corte seletivo, evidenciando que mudanças na dinâmica populacional (causadas por corte seletivo ou outras) podem afetar a distribuição espacial dos genótipos.