

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

KARLA DANIELE ARAUJO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Anadenanthera colubrina* (Vell.)
Brenan. EM FRAGMENTOS DE FLORESTA ATLÂNTICA PARA A SELEÇÃO DE
MATRIZES**

ALEGRE-ES

2018

KARLA DANIELE ARAUJO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Anadenanthera colubrina* (Vell.)
Brenan. EM FRAGMENTOS DE FLORESTA ATLÂNTICA PARA A SELEÇÃO DE
MATRIZES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira.

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda.

ALEGRE-ES

2018

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

S586c Silva, Karla Daniele Araujo, 1988-
Caracterização molecular de *Anadenanthera colubrina* (VELL.) Brenan.
em fragmentos de Floresta Atlântica para a seleção de matrizes/ Karla
Daniele Araujo da Silva. – 2018.
75 f. : il.

Orientador: Marcos Vinicius Winckler Caldeira.

Coorientador: Fábio Demolinari de Miranda.

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

1. Marcadores genéticos. 2. Angico-de-caroco. 3. Florestas. 4. Biodiversidade –
Conservação. I. Caldeira, Marcos Vinicius Winckler. II. Miranda, Fábio
Demolinari de. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Agrárias e Engenharias.

CDU: 631.523

Elaborado por Cláudia Regina da Rocha Oliveira – CRB-6 ES-576/O

KARLA DANIELE ARAUJO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Anadenanthera colubrina* (Vell.)
Brenan. EM FRAGMENTOS DE FLORESTA ATLÂNTICA PARA A SELEÇÃO DE
MATRIZES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovada em 28 de setembro de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Vinicius Winckler Caldeira
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Profa. Dra. Taís Cristina Bastos Soares
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dra. Sustanis Horn Kunz
Universidade Federal do Espírito Santo

Ao meu irmão, que foi e sempre será o meu maior exemplo de superação, e a prova de que pra Deus tudo é possível.

Ao meu pai (in memoriam), minha mãe e minha irmã.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, proteção e por não me deixar desistir.

Ao meu pai, por estar sempre cuidando e olhando por nossa família.

A minha mãe e irmãos, pelo apoio incondicional, amor e dedicação de sempre.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade.

Ao meu orientador Marcos Vinicius Winckler Caldeira e a coordenadora do curso Milene Praça por toda confiança, ajuda, compreensão, orientação, cuidado e gentileza.

Ao meu professor e coorientador Fábio Demolinari de Miranda, por toda ajuda, apoio e pelos ensinamentos para realização da pesquisa.

À Sabrina Furtado, secretária do programa, por toda organização, disponibilidade, cuidado e gentileza de todos os dias.

A todos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (BqMol), pela convivência, amizade e valiosa colaboração em todos os momentos. Sou grata também a professora Taís Cristina Bastos Soares por conceder o espaço para o desenvolvimento desse projeto.

A todos que ajudaram na execução deste trabalho, nas coletas em campo, nas análises moleculares e análises dos dados. Meu eterno muito obrigada!

Aos colegas e amigos da Pós-Graduação pela agradável convivência.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, acreditaram que eu fosse capaz e que oram pela minha família nesse momento tão delicado, aos “anjos”, que chamo de amigos e dedicaram seu tempo em ajudar e participaram do desenvolvimento deste trabalho, o meu grande e eterno reconhecimento e gratidão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

Karla Daniele Araujo da Silva, filha de Antônio Carlos Soares da Silva, nascida na cidade de Teixeira de Freitas- BA, em 06 de agosto de 1988.

Concluiu o Ensino Médio, na Escola Média de Agropecuária Regional da CEPLAC - EMARC em Teixeira de Freitas – BA.

Ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Bahia (UNEB), Teixeira de Freitas-BA, em setembro de 2009, graduando-se em agosto de 2014. Em setembro de 2016 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, linha de pesquisa Melhoramento, na Universidade Federal do Espírito Santo (CCAUE-UFES), como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, obtendo o título de Mestre em 2018.

RESUMO

A fragmentação das áreas de vegetação nativa remanescentes e a crescente ação antrópica estão entre as principais ameaças para a conservação da biodiversidade e consequente redução da diversidade genética. Neste sentido, obtenção de informações que revelem os níveis de diversidade genética, bem como os processos que a mantêm, tornam-se necessárias quando se deseja praticar medidas conservacionistas. O uso de marcadores moleculares para o conhecimento da variabilidade genética em nível de DNA torna-se ferramenta de destaque para tais estudos. Dentre as espécies arbóreas que ocorrem na Floresta Atlântica, destaca-se a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan., por apresentar características relevantes de interesse econômico e em processos de recuperação de áreas degradadas. Assim, o presente estudo objetivou caracterizar a diversidade genética dentro e entre populações de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan., amostradas em quatro fragmentos de Floresta Atlântica no sul do estado do Espírito Santo - ES utilizando marcadores moleculares *Inter Single Sequence Repeats* (ISSR). Amostras de DNA de 120 indivíduos foram analisadas utilizando doze *primers* ISSR, gerando 241 fragmentos, dos quais, 196 foram polimórficos (81,32%). Obteve-se como resultados, o conteúdo de informação polimórfica (PIC), com média 0,32, caracterizando os marcadores como informativos. O número ótimo de *locus* foi de 176. A diversidade genética intrapopulacional fundamentada no índice de Nei (H') e índice de Shannon (I) é média se considerarmos as populações separadamente ($H' = 0,211$ a $0,272$ e $I = 0,320$ a $0,410$), e alta para a espécie considerando todos os locais ($H' = 0,363$ e $I = 0,535$). Constata-se através da análise de variância molecular (AMOVA) que existe diversidade genética entre e dentro das populações dos fragmentos estudados, sendo que a maior parte da variação genética (73,64%) é encontrada dentro dos grupos. Também foi constatada alta diferenciação genética entre as populações ($\Phi_{ST} = 0,26$), com pequenas taxas de fluxo gênico ($Nm = 1,88$), próximo do valor considerado limite para isolamento genético. Tais resultados confirmados pela abordagem bayesiana realizada pelo *software* STRUCTURE. Os dados obtidos permitiram identificar indivíduos adultos de *A. colubrina* nas áreas de estudo com potencial para serem utilizadas como matrizes em coleta de sementes, visto que apresentam significativa diversidade genética.

Palavras-chave: diversidade genética, ISSR, angico branco, floresta estacional semidecidual, conservação da biodiversidade.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Figuras ilustrativas de *Anadenanthera colubrina*: árvore adulta (a), flor e folhas (b), fruto (c), semente (d), casca (e) e madeira (f). Fonte: LORENZI, 2002.18
- Figura 2 - Mapa de localização da área de estudo, indicando o estado, os quatro fragmentos, a localização de cada indivíduo de *Anadenanthera colubrina* e tabela com descrição do clima, temperatura média, altitude, precipitação pluviométrica dos municípios. Fonte: A autora.233
- Figura 3 - Mapa de localização das quatro áreas de estudo, indicando área da rosal – Guaçuí (Fragmento 01), área em Jerônimo Monteiro (Fragmento 02), ARIE – Alegre (Fragmento 03), IFES - Alegre (Fragmento 04), onde a população de *Anadenanthera colubrina* está localizada. Fonte: A autora.27
- Figura 4 - Fragmentos provenientes da amplificação do DNA genômico de 29 indivíduos de *Anadenanthera colubrina* em gel de agarose 2% com a utilização do primer UBC 868. M - Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb).....388
- Figura 5- Coeficiente de correlação (r) e o número de fragmentos polimórficos obtidos para os indivíduos de *Anadenanthera colubrina*.411
- Figura 6 – Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 120 indivíduos de *Anadenanthera colubrina*, agrupados pelo método UPGMA, formando 17 grupos. Ponto de Corte (PC): 74,50%.444
- Figura 7- Dendrograma representativo da dissimilaridade genética na população do fragmento da Rosal - Guaçuí, representada por 40 indivíduos de *Anadenanthera colubrina*, agrupados pelo método UPGMA, formando 4 grupos. Ponto de Corte (Pc): 76%.455
- Figura 8- Dendrograma representativo da dissimilaridade genética na população da área em Jerônimo Monteiro, representada por 40 indivíduos de *Anadenanthera colubrina*, agrupados pelo método UPGMA, formando 5 grupos. Ponto de Corte (Pc): 79.54%.466
- Figura 9 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética na população do fragmento ARIE em Alegre, representada por 16 indivíduos de *Anadenanthera colubrina*, agrupados pelo método UPGMA, formando 3 grupos. Ponto de Corte (Pc): 85.36%477
- Figura 10 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética na população do fragmento IFES em Alegre, representada por 24 indivíduos de *Anadenanthera colubrina*, agrupados pelo método UPGMA, formando 5 grupos. Ponto de Corte (Pc): 76.08%.488
- Figura 11 - Gráfico dos valores de K (2), seguindo o critério proposto por Evanno; Regnaut; Goudet (2005) para definição do número de grupos, baseado na taxa de mudança no Ln(k).556
- Figura 12 - Gráfico de barras identificando o número de agrupamentos em relação as populações.567

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação taxonômica atual da <i>Anadenanthera colubrina</i> (VELL.) BRENAN.....	16
Tabela 2 - <i>Primers</i> ISSR (<i>University of British Columbia - UBC</i>), testados em amostras de DNA de cinco indivíduos da espécie <i>Anadenanthera colubrina</i> e suas respectivas sequências (5'-3').	300
Tabela 3 - <i>Primers</i> ISSR selecionados para <i>A. colubrina</i> apresentando número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP), variação de tamanho dos fragmentos gerados em pares de bases (TPB) estabelecido com base em marcador de 100pb e conteúdo de informação polimórfica (PIC)	366
Tabela 4 – Dissimilaridade entre os indivíduos de <i>A. colubrina</i> por fragmento e total (todos os fragmentos avaliados em conjunto) com a variação, média, maior e menor distância genética.	422
Tabela 5 - Estimativa de diversidade genética para cada população de <i>A. colubrina</i> calculadas com o auxílio do software POPGENE. Tamanho da amostra (n), Número de alelos observados (Na), Número de alelos efetivos (Ne), Índice de Nei (H'), Índice de Shannon (I). Valores de média.	500
Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) dentro e entre as quatro populações de <i>A. colubrina</i> com emprego de marcadores ISSR.....	523

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Fragmentação florestal e redução da variabilidade genética	14
2.2 Marcação de árvores matrizes	15
2.3 Caracterização, ocorrência e potencialidades da espécie <i>Anadenanthera colubrina</i>	16
2.4 Análise da diversidade genética com base no uso de marcadores moleculares ISSR.....	19
3 OBJETIVOS	222
3.1 Objetivo geral	222
3.2 Objetivos específicos.....	222
4 MATERIAL E MÉTODOS	233
4.1 Caracterização da área de estudo.....	233
4.2 Coleta de dados.....	277
4.3 Extração do DNA	29
4.4 Análise moleculares.....	300
4.5 Análises estatísticas	32
4.5.1 Análise intrapopulacional.....	333
4.5.2 Análise interpopulacional.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	366
5.1 Seleção de <i>primers</i>	366
5.2 Diversidade intrapopulacional	422
5.3 Diversidade interpopulacional	522
6 CONCLUSÕES.....	58
7 REFERÊNCIAS	590
APÊNDICE	701
ANEXO.....	756

1 INTRODUÇÃO

Considerado um bioma de importância global, a Floresta Atlântica é constituída por um conjunto de formações florestais e outros tipos de vegetação. Sua extensão original abrangia continuamente cerca de 130 milhões de hectares, que foram reduzidos a um mosaico de fragmentos (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2010).

A Fundação SOS Mata Atlântica em parceria do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) publicou em 2016 o estudo relativo à extensão da destruição do Bioma da Mata Atlântica no “Atlas da Mata Atlântica”, referentes ao período de 2015 a 2016 apontando um desmatamento de 29.075 hectares, o que representa um aumento significativo de 57,7% em relação ao período anterior (2014-2015). Dentre os estados sinalizados no contexto, o Espírito Santo aparece com aumento no desmatamento de cerca de 116%, evidenciando alto índice de interferência na área.

A grande fragmentação das áreas de vegetação nativa remanescentes e a perda de habitat estão entre as principais ameaças para a conservação da biodiversidade (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016). Este processo impõe uma série de efeitos deletérios, como subdivisão de populações, aumento da taxa de endogamia e consequente erosão genética, menor resistência a distúrbios e risco de extinção local (RIBEIRO et. al. 2009).

Diante desse contexto, estudos sobre diversidade genética em programas de melhoramento têm sido direcionados, com o objetivo de estabelecer medidas mitigadoras para a reversão do quadro de perda e manutenção de biodiversidade, visando servir de base na seleção de árvores matrizes potencialmente promissoras para gerar populações com elevada variabilidade e adaptação, expandindo o potencial de cobertura de coleta de sementes com finalidades de recuperação e restauração de áreas degradadas (HIGA; SILVA, 2006; NOGUEIRA, 2007; RODRIGUES et al., 2009).

Dentre as espécies arbóreas que ocorrem na Floresta Atlântica, destaca-se a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan., conhecida popularmente como angico branco, apresenta potencial apícola, medicinal, é utilizada na construção civil, na confecção de móveis, bem como para lenha e carvão (LORENZI, 2009). A espécie é amplamente distribuída (RODRIGUES; OSUNA, 2004; NEPOMUCENO, 2007).

Na região sul do Espírito Santo (ES), diante da drástica perda de áreas florestadas, devido ao extrativismo de madeiras, tem sido observado através de expedições a campo a elevada ocupação de espécie do gênero *Anadenanthera*. Embora espécies desse gênero ocupem naturalmente os biomas regionais, acredita-se que esta vasta ocorrência possa ter relação com a perda da biodiversidade em função das diferentes ações antrópicas, que por sua vez, pode favorecer espécies mais tolerantes, de fácil ocupação e alta capacidade de regeneração, tais como a *Anadenanthera colubrina*.

Portanto, para que programas de melhoramento ou de conservação possam ser bem-sucedidos, é essencial o conhecimento da diversidade genética intra e interpopulacional para o delineamento de estratégias de conservação, monitoramento, manejo, restauração de áreas degradadas e identificação de árvores matrizes para a coleta de sementes. Desta forma, o uso de marcadores moleculares para o conhecimento da variabilidade genética torna-se ferramenta eficiente (CRUZ et al., 2011; MARTINS, 2014).

Os marcadores moleculares do tipo *Inter Simple Sequence Repeat*-ISSR (MEYER et al., 1993; GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ; RAFALSKY; LABUDA, 1994), permitem quantificar a diversidade genética proporcionando um grande número de fragmentos polimórficos (GUIMARÃES, 2009). São considerados uma ferramenta importante para subsidiar estudos genéticos com espécies vegetais (CRUZ et al., 2011, IDREES; IRSHAD, 2014), pois apresentam alto índice de informação, sendo utilizados com bastante sucesso na determinação da variabilidade e diversidade genética, filogenia, mapeamento genômico e em estudos de biologia evolutiva (NG; TAN, 2015).

Neste sentido, o presente estudo objetivou caracterizar a diversidade genética dentro e entre populações de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan., amostradas em quatro fragmentos de Floresta Atlântica no sul do estado do Espírito Santo - ES por meio de marcadores moleculares ISSR, investigando as seguintes questões: i) quais são os níveis de diversidade genética e como a diversidade genética está distribuída entre e dentro das populações? ii) em função do tamanho dos fragmentos em estudo e tempo de regeneração, existe diferença nos índices de diversidade genética da população? iii) as atividades antrópicas exercidas em decorrência de corte seletivo na área, influenciaram na diversidade genética da população?

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fragmentação florestal e redução da variabilidade genética

A fragmentação florestal é definida como a subdivisão populacional de áreas contínuas em demes isolados, por exemplo, um fragmento florestal representado por qualquer área de vegetação natural contínua, interrompido por barreiras naturais ou antrópicas, caracterizando um processo de redução do tamanho populacional e a formação de um novo arranjo para a estrutura genética espacial das populações (EWERS; DIDHAM, 2006; TEMPLETON, 2011). Tal evento está entre as ameaças mais importantes para a conservação da biodiversidade, visto que exerce uma série de efeitos na estrutura genética da população, onde a população é submetida a redução do seu tamanho original (CONTE, 2004; CABALLERO *et al.*, 2010).

Nessas populações menores pode ocorrer a curto prazo, efeitos mais intensos da deriva genética, o que significa ter as frequências de seus genes afastadas daquelas da população original, inclusive chegando a perder alelos, ou seja, uma força evolutiva que promove mudanças aleatórias nas frequências alélicas de populações finitas. Devido ao isolamento das populações, a deriva atua de forma independente em cada subpopulação (RODRIGUESS; GANDOLFI, 2007; TEMPLETON, 2011).

Contrário a diferenciação genética entre as populações fragmentadas, o fluxo gênico pode ser definido como o mecanismo resultante do movimento de genes entre as populações e favorece o processo evolutivo por possibilitar a adaptação às condições locais e promover a evolução espalhando novos genes e combinações gênicas entre populações de uma determinada espécie. Assim, a variação genética entre as espécies resulta de um balanço entre forças evolutivas que tendem a produzir diferenciação local, no caso a deriva genética e a seleção natural, e a força que tende a produzir uma homogeneização genética entre as populações, o fluxo gênico (TEMPLETON, 2011).

Esses eventos podem ser diretamente influenciados por questões históricas, fatores ecológicos, genéticos e demográficos sofridos pelas populações, como por exemplo, a colonização recente, competições com espécies invasoras, sistema reprodutivo das plantas e

características históricas, como a variação no sistema de cruzamento e no modo de dispersão de sementes (BORN ET AL., 2008; COLLEVATTI ET AL., 2010).

Nesse sentido, estimativas a respeito da diversidade genética e medidas diretas e indiretas de fluxo gênico são de grande importância para o manejo e conservação dos recursos genéticos florestais, pois funcionam como parâmetro para quantificar o grau de diferenciação genética dentro e entre as populações naturais presente nos fragmentos, caracterizar a estrutura genética espacial e fornecer parâmetros acentuados sobre o quanto a fragmentação está estruturando a composição genotípica de uma população (MELO, 2012).

2.2 Marcação de árvores matrizes

Para promover a restauração de áreas degradadas, é necessário atentar-se a importância da produção de mudas de boa qualidade. Entende-se por isso, plantas resultantes de sementes com a maior capacidade de adaptação a eventos catastróficos. Observa-se o uso de árvores matrizes para a coleta de sementes, sendo estas caracterizadas em virtude de apresentarem características fenotípicas superiores às demais da mesma espécie (NOGUEIRA, 2007; ROGALSKI et al., 2005).

As características sinalizadas para considerar uma árvore matriz, dependem da finalidade da seleção, porém algumas características são comuns a todas as finalidades: boa condição fitossanitária; ritmo de crescimento; porte; forma do tronco; forma da copa; ramificação; vigor; densidade da madeira; e produção de sementes (NOGUEIRA; MEDEIROS, 2007; SENA; GARIGLIO, 2008).

Ainda, torna-se importante destacar que para a marcação de determinada matriz se faz necessário considerar os objetivos a que se destina, pois caso a finalidade seja obtenção de madeira, a altura e o diâmetro do caule se tornam características imprescindíveis, entretanto, se for a produção de frutos, deve-se levar em consideração o tamanho e à forma da copa (SENA; GARIGLIO, 2008).

Para a marcação de matrizes com a finalidade de produção de mudas, auxílio à prática de coleta e permitir o monitoramento da qualidade das sementes de cada espécie deve-se eleger várias árvores como matrizes num mesmo ambiente e em ambientes distintos para garantir a diversidade genética das populações, visto que para um maior ganho genético, é

necessário garantir que os indivíduos superiores mantêm variabilidade genética para futuras gerações, portanto para se obter sucesso na coleta de sementes de alta qualidade, as árvores matrizes selecionadas devem ser representativas da diversidade genética da população, a fim de conservar o potencial das espécies (SEBBENN, 2002; MARTINS et al., 2009).

Para apontar números mínimos e distância entre as matrizes para posterior coleta de sementes, diferentes fontes literárias apresentam resultados variados. Higa & Silva (2006) apontam que, deve-se coletar sementes em pelo menos 30 árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. Nogueira e Medeiros (2007) indicam que a coleta deve ser feita entre 10 e 20 árvores matrizes ao acaso em cada população. Já Sena e Gariglio (2008) recomendam que a coleta seja feita em no mínimo, 15 árvores por espécie. Ainda que apresentem um número variável, é possível observar que o objetivo em todas as fontes é o mesmo, obter sementes que representam a variabilidade genética da população local.

Outras características devem ser observadas como: tipologia florestal, solos e clima e a identificação de localização das matrizes para posterior coleta de semente. Por fim, tais informações devem ser registradas e armazenadas para acesso dos demais pesquisadores. (HIGA; SILVA, 2006).

2.3 Caracterização, ocorrência e potencialidades da espécie *Anadenanthera colubrina*

A. colubrina pertence à família Fabaceae, é popularmente conhecida como “angico branco”, angico-branco-liso, angico cambuí, cambuí-angico, cambuí-vermelho, cauvi, curupai, jurema-preta. (LORENZI, 2009). Amplamente distribuída, desde o nordeste do Brasil até a Bolívia, Argentina, Paraguai e Peru (RODRIGUES; OSUNA, 2004; NEPOMUCENO, 2007).

De acordo com o sistema de classificação, a posição taxonômica da espécie obedece à seguinte hierarquia, exposto na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação taxonômica atual da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan.

(Continua)

Especialização	Taxonomia
Classe	Equisetopsida
SubClasse	Magnoliidae
Super ordem	Rosanae

(Conclusão)

Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Gênero	<i>Anadenanthera</i> Speg.
Espécie	<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan.

Fonte: Tropicos.org, Missouri Botanical Garden. Acesso 13 Abr. 2018.

É característica de floresta secundária, heliófita e em resposta as variações climáticas sazonais apresentam-se caducifólias (MONTEIRO et al., 2006). Possui entre 10 e 20m de altura e 30 e 60cm de diâmetro a altura do peito (DAP) (Figura 01a) (BORGES, 2012; MEDEIROS, et al. 2017).

Sua madeira é densa, de superfície lisa, clara e lustrosa, com caule reto ou tortuoso, mais ou menos cilíndrico (Figura 01f) (CARVALHO, 2002; FERNANDES; et al. 2016; MONTEIRO; et al. 2006). Fuste pode atingir cerca de 12m. As gemas apicais possuem ramificação dicotômica, tortuosa e irregular, que podem causar bifurcações no fuste, com engalhamento grosso. A casca é pouco espessa de (20mm), com textura externa lisa, áspera e provida de fendas finas longitudinais. (Figura 01e). As folhas são compostas bipinadas, a raque da folha possui 15 a 20 cm de comprimento, com 15 a 35 pares de pinas multifoliados (Figura 1b) (CARVALHO, 2002).

As flores estão organizadas em inflorescências, medindo até 40 cm de comprimento sendo que cada gema produz de duas a cinco inflorescências e coloração branca a creme levemente perfumadas (Figura 1b) (BORGES, 2010; CARVALHO, 2002). A sementes são estenospérmicas, com formato achatado e orbicular, é rugosa, coriácea, de coloração marrom, altamente polida dando um aspecto brilhante (Figura 1d). A dispersão de frutos e sementes é autocórica e, principalmente, barocórica (por ação da gravidade) (Figura 1c) (BARRETO & FERREIRA, 2011; CARVALHO, 2002).

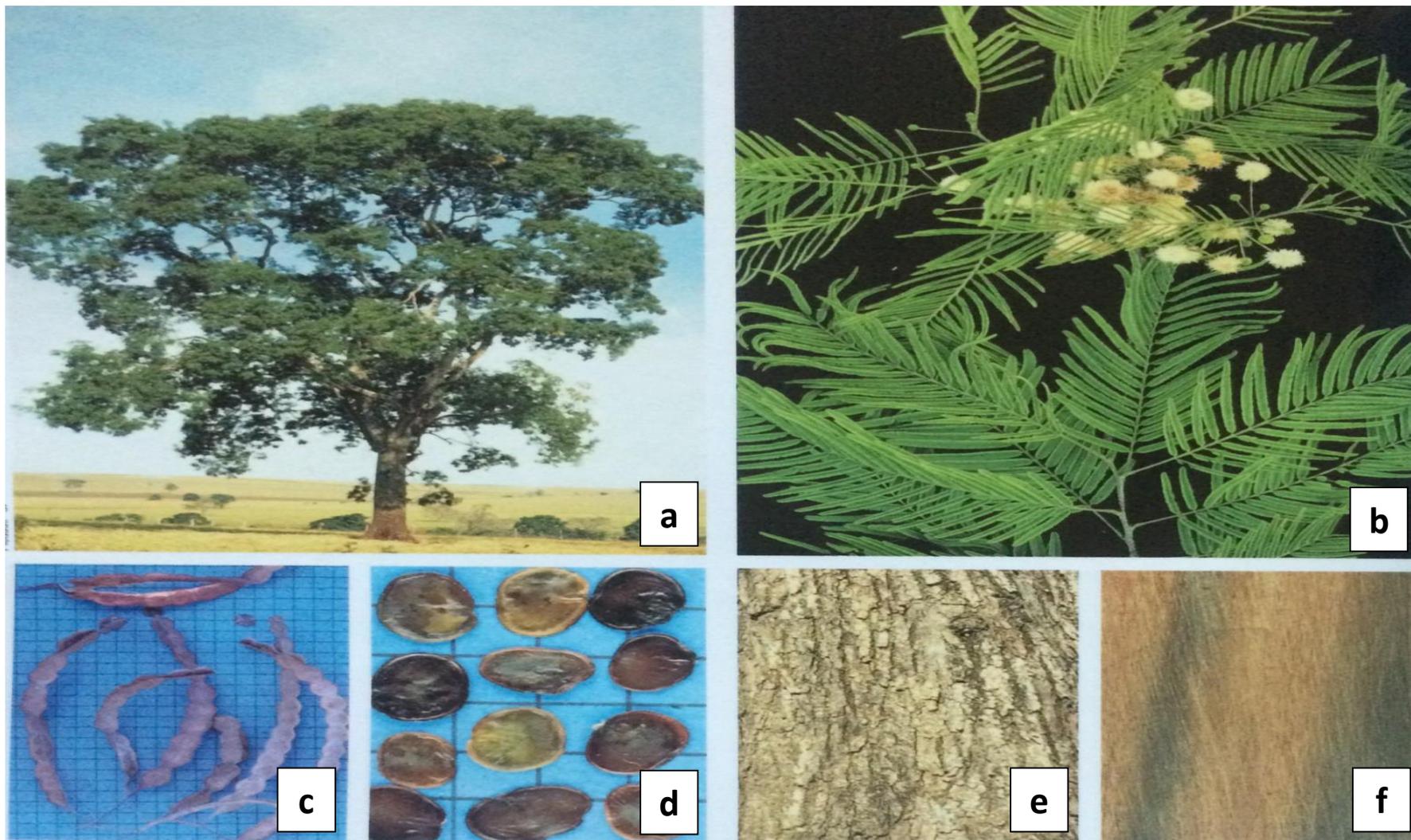


Figura 1- Figuras ilustrativas de *Anadenanthera colubrina*: árvore adulta (a), flor e folhas (b), fruto (c), semente (d), casca (e) e madeira (f).
Fonte: LORENZI, 2002.

Outra característica da espécie é o fato de ser andromonóica, ou seja, produz tanto flores hermafroditas quanto masculinas, sendo que cada glomérulo apresenta os dois tipos de flores. Na região superior da inflorescência encontra-se as flores hermafroditas, enquanto as masculinas estão dispostas na região inferior (BORGES, 2012). A espécie é de preferência alógama, devido a autoincompatibilidade, ou seja, a incapacidade da planta fértil formar sementes quando fertilizada por seu próprio pólen, com polinização realizada por abelhas e pequenos insetos, tendo seu período de floração variando de agosto a outubro dependendo da região (CARVALHO, 2003; COSTA et al., 1992).

Entre os seus principais usos, destaca-se a medicina popular, sendo indicado o uso para tratar de problemas respiratórios e inflamações (MONTEIRO, et al. 2006), a produção de tacos, marcenaria, desdobro, obras internas, ripas, embalagens, construção civil e naval, possui lenha e carvão de boa qualidade (CARVALHO, 2002). Apresenta características relevantes em processos de recuperação de áreas degradadas, tais como, capacidade de estabelecimento em condições limitadas, atração de fauna, rápido crescimento e grande deposição de serapilheira (BARBOSA, 2000).

2.4 Análise da diversidade genética com base no uso de marcadores moleculares ISSR

A diversidade genética em plantas pode ser estimada de várias maneiras. O mais simples indicador de variabilidade genética é a própria variabilidade morfológica. As características morfológicas, porém, podem ser influenciadas pelo ambiente, apresentando variação contínua e grande plasticidade. Portanto, faz-se necessário a utilização de características não influenciáveis pelo ambiente. As técnicas de biologia molecular permitem a observação de polimorfismo diretamente nas sequências do material genético dos organismos. Nesse sentido marcadores moleculares abrem novas perspectivas para pesquisas em conservação de espécies e têm sido amplamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998, TACUATIÁ, 2012).

Marcadores moleculares surgiram na década de 1980, e se destacam por serem evolutivamente neutros, aplicáveis a qualquer material vegetal e em qualquer estágio de desenvolvimento, permitindo obter um número quase ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma (FALEIRO, 2007; GUIMARÃES et al., 2009). Tal marca representa qualquer fenótipo molecular resultante da expressão de um

gene ou de um segmento específico de DNA, que pode ser detectado e a sua herança monitorada (RAJEEV et al., 2007).

Os marcadores moleculares referem-se a diferenças entre indivíduos nas suas sequências de nucleotídeos ao longo da fita de DNA e podem ser classificados em função de sua herança, como dominantes e codominantes. Em indivíduos diploides, marcadores codominantes permitem a distinção de ambos os alelos homólogos de um loco. Já os marcadores dominante não permitem distinguir o fenótipo heterozigoto do homozigoto dominante (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Fundamentado na técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou Reação em Cadeia da Polimerase, várias categorias de marcadores moleculares foram desenvolvidas. Destacam-se o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) (WILLIAMS et al., 1990); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) (VOS et al., 1995); SSR (*Simple Sequence Repeats* - Sequências Simples Repetidas) ou microssatélites (LITT; LUTY, 1989) e o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats* - Inter Repetições de Sequência Simples) (MEYER et al., 1993; GUPTA et al., 1994; ZIETKIEWICZ, RAFALSKY; LABUDA, 1994).

Tais marcadores são considerados as principais classes para estudos genéticos vegetais e diferem com respeito as características importantes como abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro (MALIK et al., 2014).

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

Esses marcadores permitem quantificar a diversidade genética proporcionando um grande número de fragmentos polimórficos (GEORGE, 2009) e são considerados uma ferramenta importante para subsidiar estudos genéticos com espécies vegetais (CRUZ et al., 2011, IDREES; IRSHAD, 2014), pois são altamente informativos, sendo utilizados com sucesso na determinação da variabilidade e diversidade genética, filogenia, mapeamento genômico e em estudos de biologia evolutiva (NG; TAN, 2015).

Por serem marcadores dominantes ISSRs produzem em uma única reação múltiplos fragmentos de DNA (considerados *locus*), sem a necessidade do conhecimento prévio da sequência de DNA das regiões alvo (NG; TAN, 2015), apresentam natureza hipervariável, alta transferibilidade e baixo custo (BORÉM; CAIXETA, 2009; SOUZA, 2015). Também têm sido utilizados com sucesso em análises de diversidade genética em espécies arbóreas tais como: *Bertholletia excelsa* (RAMALHO, 2016), *Hancornia speciosa* (SOARES et al., 2017), *Mimosa caesalpiniaefolia* (ARAÚJO et al., 2016), *Lecythis pisonis* Cambess (BORGES, 2016), *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (JUNIOR, 2017) e *Plathymenia reticulata*. (CRUZ, 2017). Em tais estudos, os marcadores ISSR demonstraram eficiência para revelar e quantificar a diversidade genética das espécies.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a diversidade genética dentro e entre populações de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan., amostradas em quatro fragmentos de Floresta Atlântica no sul do estado do Espírito Santo por meio de marcadores moleculares ISSR.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a distribuição da diversidade genética dos indivíduos demarcados utilizando marcadores moleculares *ISSR*;
- Selecionar as árvores de *Anadenanthera colubrina* como potencial para serem utilizadas como matrizes para coleta de sementes, presentes em quatro fragmentos florestais, área de Floresta Atlântica do Espírito Santo;
- Obter informações que contribuam para a conservação de *Anadenanthera colubrina* presentes nos locais de estudo;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da área de estudo

Para realização do estudo, os indivíduos foram marcados e coletados em quatro fragmentos de Floresta Atlântica no sul do estado do Espírito Santo – ES (Figura 2).

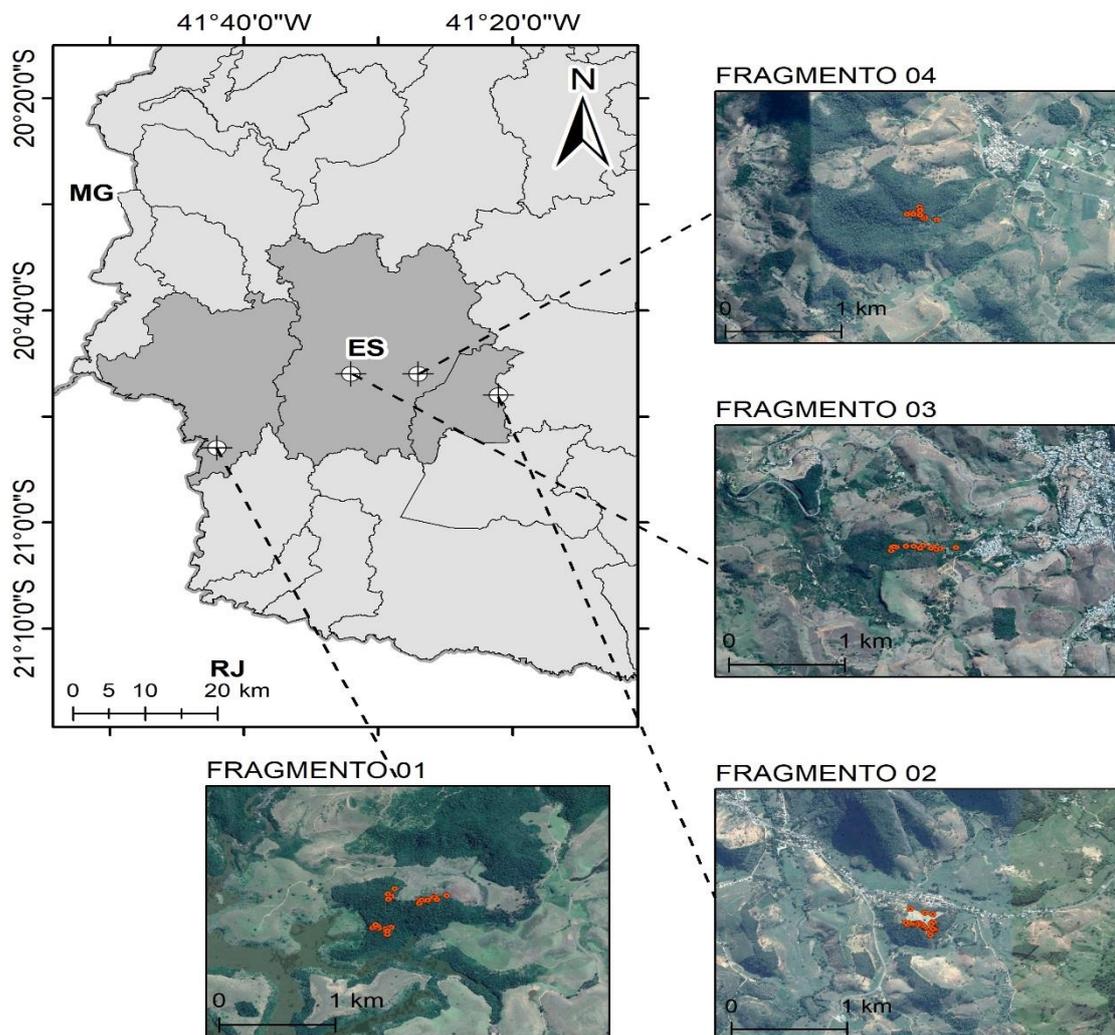


Figura 2 - Mapa de localização da área de estudo, indicando o estado, os quatro fragmentos, a localização de cada indivíduo de *Anadenanthera colubrina* (na cor vermelha). Fonte: A autora.

O fragmento 01, conhecido como Floresta da Rosal, está localizado no município de Guaçuí – ES, na Área de Preservação Permanente

(APP) as margens da represa da Usina Hidrelétrica Rosal, que pertence a empresa CEMIG (Companhia Energética de Minas Gerais), distante do centro urbano cerca de 19,4 km (20° 53' latitude Sul e 41° 42' de longitude Oeste).

A usina possui uma área de espelho d'água de 170 hectares e é limitada pelos municípios de Guaçuí/ES, São José do Calçado/ES e Bom Jesus do Itabapoana/ RJ (REZENDE et al., 2009; CURTO, 2011). O local possui o relevo acidentado, com altitude média de 550 metros, ocorrência de chuvas entre os períodos de novembro a fevereiro, apresentando período mais seco de julho a setembro. Segundo a classificação de Köppen o clima da região se apresenta no tipo Cfa (subtropical, com verão quente), e com temperatura média anual de 19°C, com precipitação anual em torno de 1.246 mm (ALVARES et al., 2013).

Para a instalação da usina, por volta de 1990, toda a área passou por um grande processo de exploração de seus recursos madeireiros, em virtude de cortes seletivos de madeiras para utilização comercial e também para o desenvolvimento de atividades pecuárias na região. Em razão do seu potencial comercial, a *Anadenanthera colubrina* esteve dentre as espécies que teve sua madeira utilizada na fazenda e região, na produção de cercas, currais, produção de móveis, construção civil, lenha e carvão (LAGE, 2012).

Ainda que tenha sofrido intensa exploração em seu entorno, a área possui aproximadamente 93 hectares de floresta preservada que constituem um dos remanescentes de Floresta Atlântica mais importantes da região (SANSEVERO; PIRES; PEZZOPANE, 2006; CURTO et al., 2013).

O fragmento 02, localizado no município de Jerônimo Monteiro – ES, na Rodovia S482, possui uma área de aproximadamente 2 hectares, com coordenadas geográficas de 20°48' latitude Sul e 41°21' longitude Oeste. Possui altitude média de 168 m. A temperatura média é de 23°C, a precipitação pluviométrica de 1.200mm/ano e clima quente e úmido (ALVARES et. al, 2013). O solo que predominante nesta área é classificado como Latossolo Vermelho Amarelo (EMBRAPA, 2018).

A área de estudo sofreu acentuada interferência no passado, sem qualquer preocupação com práticas de conservação, em especial com a manipulação da cultura do café e pastagens, técnicas antigas muito comuns utilizadas pioneiramente, com significativas derrubadas das matas e posterior queima da madeira, ocasionando um grande impacto de erosão no solo. A região está em processo de regeneração natural, porém o local sofre com

ação antrópica em função da proximidade das ruas, casas e áreas urbanas em geral, interferindo diretamente na sua recomposição florística.

O fragmento 03 localiza-se na Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) Laerth Paiva Gama, antigo Horto Florestal Municipal, em Alegre – ES, situado próximo a rodovia ES 482, nas coordenadas 20°46' latitude Sul 41°32' de longitude Oeste, com altitude média 345 m e área de 27,54 hectares aproximadamente, próximo ao perímetro urbano de Alegre. O solo que predominante nesta área é classificado como Latossolo Vermelho Amarelo (EMBRAPA, 2018) e o clima é caracterizado como Cwa, tropical quente úmido, apresentando inverno frio e seco (KÖPPEN, 1948), com inverno seco e o verão chuvoso, temperatura média de 23,1°C e a precipitação total anual média de 1341 mm (ALVARES et al., 2013).

A transformação de Horto Florestal para ARIE Laerth Paiva, aconteceu no dia 28 de dezembro de 2005, através da Lei Municipal 2.693/2005. O Horto Florestal Municipal de Alegre - ES, foi criado após um período de exploração agrícola, em 1992, de acordo com a Lei Municipal nº. 1942/91, e inicialmente atendia ao Programa Estadual de Criação de Hortos Florestais.

Com a intenção de propiciar maior proteção, o local foi enquadrado em uma das modalidades de Unidades de Conservação da Lei Federal N° 9.985 que instituiu o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza – SNUC, a modalidade Área de Relevante Interesse Ecológico, ficando estabelecido que se chamaria Área de Relevante Interesse Ecológico Laerth Paiva Gama, que visa primordialmente à conservação da porção da Floresta Estacional Semidecidual Montana, que fora devastada no município de Alegre, (COUTO, 2013).

A Área de Relevante Interesse Ecológico é uma Unidade de Conservação de Uso Sustentável, caracterizada como uma área em geral de pequena extensão, com pouca ou nenhuma ocupação humana, com características naturais extraordinárias ou que abriga exemplares raros da biota regional, preferencialmente declarada pela União, Estados e municípios quando tiver extensão inferior a cinco mil hectares (SEMA, 2013).

O estudo foi realizado em um trecho de floresta secundária em estágio médio de regeneração, importante por abrigar diversas espécies da fauna e da flora nativa, que sofre com ações antrópicas da comunidade que reside no entorno, principalmente de agricultores,

evidenciado por clareiras e trilhas no interior do fragmento. Isso mostra a fundamental importância de preservar e conservar a área de mata nativa.

A área é um centro de produção de mudas de essências florestais, unidade de sustentabilidade e um espaço destinado à prática contínua de educação ambiental, estudo e preservação do meio ambiente. Além disso, possui um bosque reflorestado, apropriado para o lazer e o contato com a natureza.

O fragmento 04 está localizado em área do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Espírito Santo que compõe o Polo de Educação Ambiental - PEAMA (IFES, Campus de Alegre), no município de Alegre –ES, na rodovia ES 482 (20°46' de latitude Sul e 41°27' de longitude Oeste), com altitude média de 254 m. O clima da região é caracterizado como Cwa segundo a classificação de Köppen, tropical quente úmido, apresentando inverno frio e seco. A temperatura anual média é de 23,1°C e a precipitação total anual média é de 1341 mm (ALVARES et al., 2013). O relevo presente na região é constituído por áreas onduladas e montanhosas e topografia acidentada, intercaladas por pequenas áreas planas. O solo é classificado como Latossolo Vermelho Amarelo (MENDONÇA, 2007).

O IFES, Campus de Alegre foi criado em 1992, abrange uma área aproximada de 70 hectares, sendo 40 hectares composto por mata preservada secundária e capoeira. Em meados da década de 60 em virtude da exploração, a área sofreu com corte seletivo de madeira, cafezais e pastagem, o que resultou em um mosaico com fases sucessionais distintas em virtude dos diferentes estágios de regeneração, onde árvores mais antigas ocorrem adjacentes às mais jovens (LORENZONI, 2013). Atualmente vem se destacando também na formação, pois passou a ser procurado por muitos estudantes, pesquisadores e produtores rurais para pesquisas que podem contribuir para o conhecimento e preservação da biodiversidade local.

4.2 Coleta de dados

Foram amostrados 120 indivíduos adultos de *Anadenanthera colubrina*, sendo representados na figura:

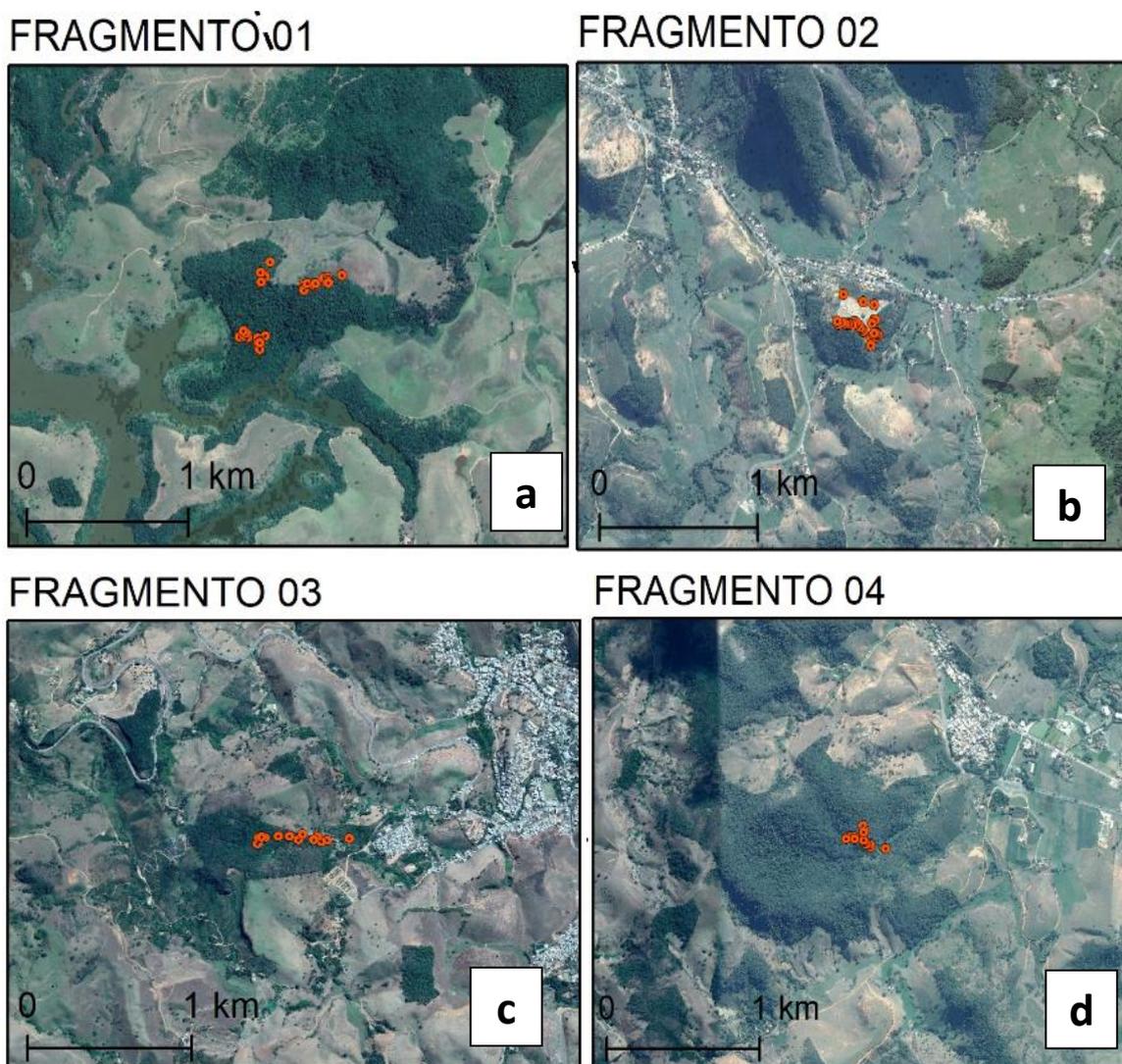


Figura 3 - Mapa de localização das quatro áreas de estudo, indicando área da Rosal – Guaçuí (Fragmento 01), área em Jerônimo Monteiro (Fragmento 02), ARIE – Alegre (Fragmento 03), IFES - Alegre (Fragmento 04), onde os indivíduos das populações de *Anadenanthera colubrina* estão representados pela cor vermelha. Fonte: A autora.

Os indivíduos foram selecionados por meio do método de busca, que consistiu em caminhadas por toda a área, numerados com tinta spray vermelha, suas coordenadas geográficas e altitudes demarcadas utilizando Sistema de Posicionamento Global – GPS (GPSmap 60CSx), a caracterização dendrométrica foi realizada com o auxílio da fita diamétrica afim de verificar o diâmetro a altura do peito, cerca de 1,30 m da base (DAP) e a altura aproximada constatada utilizando uma haste de 2,00m estimando visualmente o ponto de medição da árvore, descrito conforme ficha de caracterização de árvores matrizes (Anexo 1).

No fragmento 01, área da Rosal em Guaçuí, foram encontradas 40 árvores com altura entre 12 a 28 m e DAP de 16 a 76,5 cm, numeradas de 01 a 40, amostradas no interior da Área de Preservação Permanente - APP pertencente a CEMIG. O fragmento 02, possui 40 árvores com altura entre 7,5 a 36 m e DAP entre 19 a 65,3 cm e refere-se a uma área de aproximadamente 2 hectares, que sofre com ação antrópica ao longo dos anos, localizada no município de Jerônimo Monteiro – ES, na Rodovia S482, numerados de 41 a 80. O fragmento 03 é uma área de floresta mista, composta por regenerantes em diferentes estágios, chamada de Área de Relevante Interesse Ecológico (ARIE) Laerth Paiva Gama, conhecida popularmente como antigo Horto Florestal Municipal, Alegre – ES, situado próximo a rodovia ES 48, com área de 27,54 hectares, apresenta árvores com altura de 09 a 32 m e DAP 09 a 27,1 cm, que foram numeradas de 81 a 96. Fragmento 04, área de aproximadamente 40 hectares preservado, localizado em área do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, no município de Alegre –ES com árvores com altura de 12 a 32 m e DAP 12,6 a 34,5 cm, numeradas de 97 a 120. (Apêndice 1)

Se comparadas, as áreas possuem tamanhos e estágios de regeneração, números de indivíduos adultos de *Anadenanthera colubrina* e acessibilidade para coletas diferentes. Foram coletadas um total de 120 indivíduos adultos (Apêndice 1), totalizando 120 amostras para as análises moleculares.

Amostras foliares foram coletadas com uso de carabina de pressão CBC jade 5.5mm e estilingue para retirada de pequenas porções, e armazenadas no campo em sacos de papel contendo sílica para minimizar o processo de oxidação, que pode iniciar logo após a coleta.

Após as amostras foram transferidas para sacos de alumínio e armazenadas em freezer -30 °C. Posteriormente, foram liofilizadas no Liofilizador L108 da Liobras.

4.3 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo.

Utilizou-se o protocolo de Doyle e Doyle (1990) com modificações propostas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), adequado para espécies vegetais com altas concentrações de polissacarídeos.

Adicionar 700µL de tampão de extração (2% CTAB, 1,4 mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA pH8; 100 mmol/L Tris-HCl pH 8,0; 1% PVP; 0,2% β-mercaptoetanol) em cerca de 300 mg de tecido vegetal macerado e incubar a 65°C por 30 minutos.

Diferentemente do protocolo tradicional de Doyle e Doyle (1990), após a retirada do banho-maria adiciona-se 650 µL Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1) e homogeneizar a cada 10 minutos. Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos. Transferir a fase aquosa e adicionar 200 µL de tampão de extração juntamente com 650 µL Clorofórmio-Álcool Isoamílico (CIA) e homogeneizar novamente. Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos. Após esse passo transferir a fase aquosa para um novo eppendorf e novamente foi adicionar 650 µL CIA centrifugando outra vez a 12000 rpm por 10 minutos.

Para precipitar o DNA adiciona 1 volume de isopropanol gelado e 230 µL de acetato de amônio (solução não presente no protocolo tradicional). Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos. Lavar 3 vezes com 250 µL de etanol 70%. Ao final, após secar o DNA ressuspender em 40 µL de TE + 40 µg/mL de RNase, colocar em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Após a extração, as concentrações e pureza de DNA das amostras foram estimadas usando espectrofotômetro Nanodrop (*Thermo Scientific* 2000C).

4.4 Análises moleculares

As análises moleculares foram inicialmente realizadas em testes com amostras de DNA de cinco indivíduos, utilizando 20 *primers* ISSR da *University of British Columbia - UBC* para seleção dos mais informativos (Tabela 2). Os marcadores que geraram ampliações com bandas bem definidas e de fácil visualização foram utilizados para os estudos de diversidade e estrutura genética em todos os indivíduos amostrados.

Tabela 2 - Primers ISSR (*University of British Columbia - UBC*), testados em amostras de DNA de cinco indivíduos da espécie *Anadenanthera colubrina* e suas respectivas sequências (5'-3').

(Continua)

<i>Primers</i>	<i>Sequências (5'-3')*</i>
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC 813	CTC TCT CTC TCT CTC TT
UBC 814	CTC TCT CTC TCT CTC TA
UBC 815	CTC TCT CTC TCT CTC TG
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG
UBC 822	TCT CTC TCT CTC TCT CA
UBC 824	TCT CTC TCT CTC TCT CG
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
UBC 829	TGT GTG TGT GTG TGT GC
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT

(Conclusão)

UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG
UBC 849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA TCC A
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
UBC 868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA

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

Para cada PCR com volume final de 20 µL, utilizou-se tampão 1X (10 mmol/L de Tris-HCl pH 8,5 e 50 mmol/L de KCl), 2,5 mmol/L de MgCl₂, 0,25 mmol/L de cada dNTP, 0,2 µmol/L de *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase e cerca de 50ng de DNA genômico. As amplificações foram realizadas em termociclador *Veriti 96 Thermal cycler*, com etapas de desnaturação a 94 °C, por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C, por 45 s, anelamento de 52 °C, por 45 s, e 72 °C, por 90 s, com extensão final de 72 °C, por 7 minutos.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, com tampão TBE 1X (Tris - 0,089 mol/L, Ácido bórico – 0,089 mol/L e EDTA- 0,002 mol/L e água ultra-pura) numa voltagem de 100 Volts, por aproximadamente 4 horas.

Após a corrida, os géis foram corados por imersão em solução de brometo de etídio (0,50 µg/mL) por aproximadamente 20 minutos e fotografados sob luz ultravioleta e os fragmentos de DNA visualizados com o sistema de fotodocumentação *Image Lab™* (*Bio-Rad, Brasil*), permitindo a distinção entre presença e ausência de bandas, além do tamanho dos fragmentos com auxílio do marcador de peso molecular *Ladder* 100 pares de bases (bp).

4.5 Análises estatísticas

Os géis foram analisados a fim de verificar a relação entre número e tamanho de fragmentos observados para detecção de polimorfismos, o que permitiu interpretar para cada *primer* o padrão de bandas exibidas, onde cada banda ISSR foi considerado um loco independente e as bandas que apresentavam a mesma posição para os indivíduos indicavam amplificação do mesmo fragmento de DNA, desse modo, uma banda monomórfica para aquele loco gênico, e bandas em posições distintas eram de locos diferentes e portanto polimórficas.

A partir da observação das imagens dos géis foi gerada uma matriz de codificação dos genótipos individuais, envolvendo os 120 indivíduos amostrados, atribuindo valor igual a 1 para a presença de banda e 0 para ausência, considerando o tamanho dos alelos em cada loco. Inicialmente foi realizada uma análise descritiva dos dados, envolvendo número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP) por *primer* e a variação de tamanho dos fragmentos gerados em pares de bases (TPB).

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

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

Em que:

PIC_i = O conteúdo de informação polimórfica do marcador i ;

f_i = A frequência dos fragmentos presentes na amostra;

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

A matriz binária foi submetida a análises estatísticas para estimativas dentro e entre os grupos.

A similaridade foi estimada para cada par de indivíduos, a partir de simulações de reamostragens de diferentes tamanhos, com 2.000 permutações, obtendo a correlação (r) entre a matriz original e a simulada. O valor que indica o ajuste dessas matrizes, denominado valor de estresse (E), foi calculado e considerado satisfatório quando inferior a 0,05 e a correlação mais próxima de 1. (KRUSKAL, 1964). Através da análise de *bootstrap* utilizando

o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2013), foi indicado o número ótimo de fragmentos polimórficos para o estudo.

4.5.1 Análise intrapopulacional

O cálculo de comparação de variação genética entre genótipos dos indivíduos foi efetuado com base nos índices de dissimilaridade. A comparação foi realizada par a par, considerando todos os indivíduos coletados e para cada unidade amostral individualmente. Inicialmente, para análise, estimou-se os coeficientes de similaridade (S) entre os pares de indivíduos com base no coeficiente de Jaccard (JACCARD, 1901), que compara o número de presença de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas (MEYER et al., 2004). Os valores encontrados, para Jaccard, se enquadram na escala de 0 a 1, assim, quanto mais próximo de 1 maior será a similaridade conforme expresso abaixo:

$$S_j = \frac{a}{a + b + c}$$

Em que:

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

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

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

A partir dos resultados obtidos de medidas de similaridades, encontrou-se os índices de dissimilaridade entre os pares de indivíduos pela expressão:

$$D = 1 - S$$

Em que: o D= representa a Dissimilaridade, e o S a Similaridade entre os indivíduos par a par.

Estes resultados, determinam a distância entre dois pontos, indicando que quanto maior este valor, maior será a dissimilaridade.

A partir da matriz de dissimilaridade, utilizou-se o método de ligação de média não ponderada entre os grupos (Unweighted Pair-Group Method Average - UPGMA), determinando o número de agrupamentos genéticos entre os indivíduos e o seu resultado apresentado na forma de cinco dendrogramas, caracterizando as distâncias. Sua forma faz

referência a uma árvore composta por várias ramificações, onde nas extremidades estão alocadas as variáveis em investigação. Cada valor ordenado no eixo das abscissas (x), expressa a relação de similaridade ou dissimilaridade a partir das porcentagens de informação, obtendo um parecer de quanto determinados indivíduos de cada local são semelhantes ou divergentes molecularmente (SNEATH & SOKAL, 1973).

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

$$Pc = m + kdp$$

Em que: “m” representa a média dos valores de distância dos níveis de junção correspondentes aos estádios; k = 1,25 estabelecido conforme Milligan; Cooper, 1985; e dp o desvio padrão.

O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi estimado a fim de verificar a confiabilidade dos dados e a consistência dos agrupamentos, verificando os ajuste entre as médias de dissimilaridades originais e as geradas graficamente (SOKAL; ROHLF, 1962).

As análises acima foram estimadas por meio do programa GENES (CRUZ, 2013).

Por meio do programa POPGENE 1.32 (YEH; BOYLE, 1997), foi estimada a diversidade genética molecular, pressupondo que os cálculos do locos estavam em Equilíbrio de Hardy-Weiberg. Assim, estimou-se os parâmetros de diversidade genética contida em cada um dos fragmentos amostrados considerando todos os indivíduos: número de alelos observados (Na), número de alelos efetivos (Ne), diversidade genética de Nei (H') (NEI, 1978) e índice de Shannon (I) (SHANNON; WIEVER, 1949).

4.5.2 Análise interpopulacional

Para a análise interpopulacional, calculou-se a análise de variância molecular (AMOVA), para revelar a diferenciação genética dentro e entre os fragmentos amostrados, por meio do programa Arlequin versão 3.11 (LAURENT EXCOFFIER, 1998).

A análise de fluxo gênico foi estimada indiretamente entre os indivíduos das populações amostradas a partir das estimativas de divergência genética entre grupos (G_{ST}), em função de Nm, pela fórmula $Nm = 0,5 (1-G_{ST}) / G_{ST}$ (McDERMOTT; McDONALD,

1993). A distância genética entre as populações foi realizada usando o modelo proposto por Nei (1978). Essas análises foram realizadas com o programa POPGENE 1.32 (YEH; BOYLE, 1997).

Por fim, foi realizada inferência Bayesiana entre todos os indivíduos, obtida pelo Structure 2.3.4 (PRITCHARD, STEPHENS e DONNELLY, 2000), fornecendo uma inferência do número de grupos genéticos (K) em que os genótipos estão estruturados. A análise foi realizada sob o modelo de mistura assumindo frequências alélicas independentes com um período “burn-in” de 2500 a 7500 corridas de repetições e 20 interações para cada K. O número de grupos genéticos foi determinado pela metodologia ΔK proposto por Evanno; Regnaut e Goudet (2005) usando o software STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de *primers*

O DNA obtido a partir do método de extração, possibilitou a amplificação nos ensaios de PCR, demonstrando polimorfismos entre os indivíduos.

Foram testados 20 *primers*, destes foram selecionados 12 (Tabela 3) por apresentarem perfil de amplificação satisfatório, número considerável de fragmentos bem definidos e de boa visualização (Figura 4) proporcionando um total de 241 bandas. O número de bandas por iniciador variou de 15 (UBC 809) a 26 (UBC 815), apresentando uma média de 20,08 bandas por *primers* com uma variação de 230 a 1500 pb. Do total de 241 bandas, 196 foram polimórficas, resultando em um percentual de 81,32% de polimorfismo. O *primer* que revelou o maior número de bandas polimórficas foi o UBC 827 com 100% de banda polimórficas enquanto o UBC 868 foi o menos informativo, apresentando 52,17%.

O valor médio do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi de 0,32, variando entre 0,43 (UBC 834) a 0,12 (UBC 868).

Tabela 3 - *Primers* ISSR selecionados para *A. colubrina* apresentando número total de bandas (NTB), número de bandas polimórficas (NBP), porcentagem de bandas polimórficas (PBP), variação de tamanho dos fragmentos gerados em pares de bases (TPB) estabelecido com base em marcador de 100pb e conteúdo de informação polimórfica (PIC).

(Continua)

<i>Primer</i>	NTB	NBP	PBP (%)	TPB (Máx – Min.)	PIC
UBC 807	22	17	77,27%	1160 – 320	0,29
UBC 809	15	14	93,33%	1300 – 480	0,36
UBC 810	21	19	90,47%	1200 – 320	0,34
UBC 812	20	15	75%	1100 – 420	0,32
UBC 815	26	20	76,92%	1500 – 520	0,32

UBC 822	21	17	80,95%	1200 – 620	0,25 (Conclusão)
UBC 827	22	22	100%	1200 – 490	0,33
UBC 834	20	17	85%	1220 – 340	0,43
UBC 836	20	14	70%	1180 – 460	0,32
UBC 840	15	14	93,33%	1200 – 340	0,31
UBC 842	16	15	93,75%	1100 – 230	0,36
UBC 868	23	12	52,17%	1080 – 380	0,12
TOTAL	241	196	81,32 %	-	-

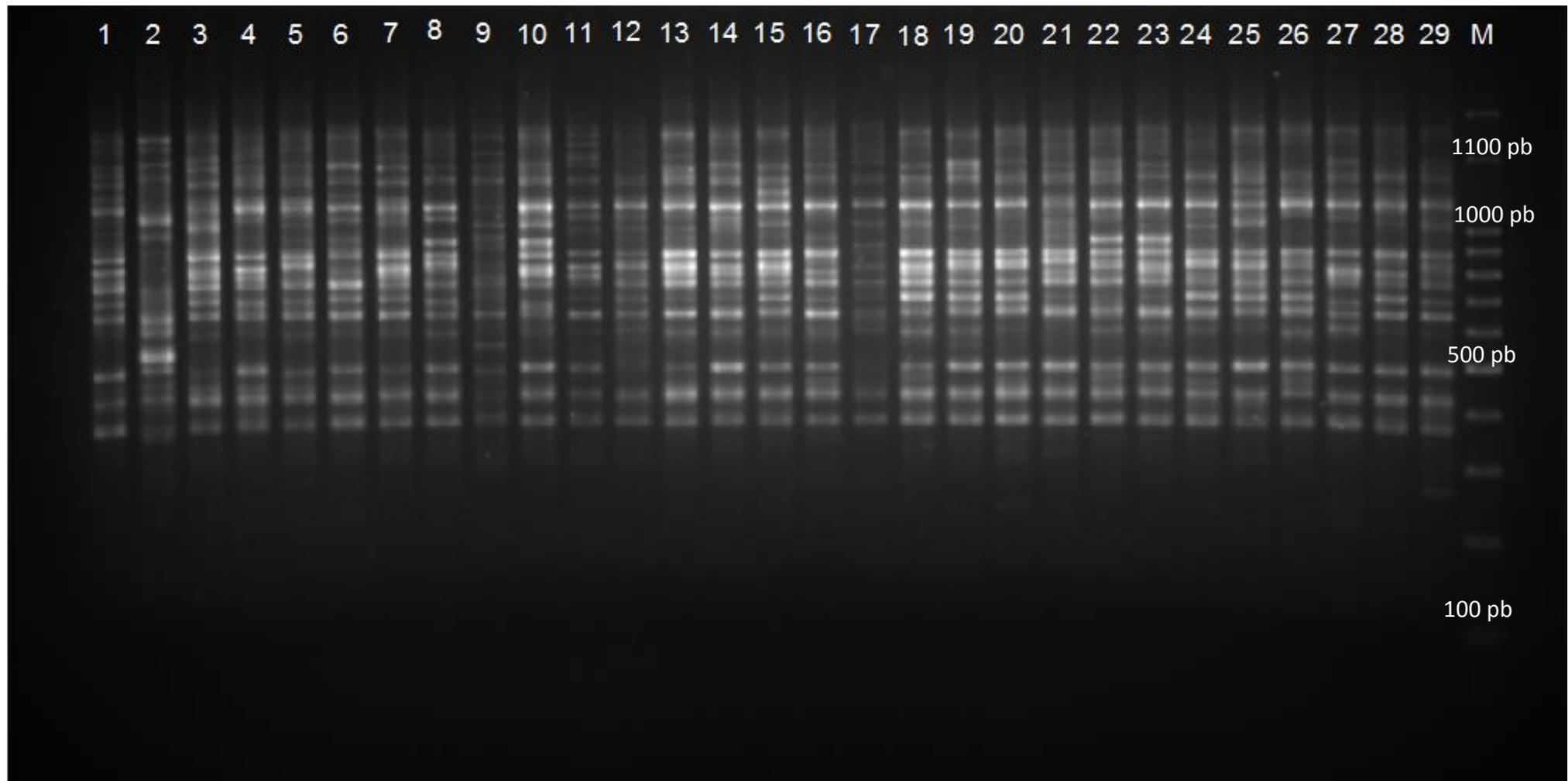


Figura 4 - Fragmentos provenientes da amplificação do DNA genômico de 29 indivíduos de *A. colubrina* em gel de agarose 2% com a utilização do *primer* UBC 868. M - Marcador de peso molecular (Ladder 100 pb).

A diversidade genética pode ser acessada revelando polimorfismo de DNA sem qualquer influência ambiental (KUMAR et al., 2009; SANTANA et al., 2016). Marcadores dominantes, como os ISSR, são ferramentas úteis para analisar a diversidade genética, principalmente, em organismos não modelo ou pouco estudados (VELEZ et al., 2016), como é o caso da *A. colubrina*.

Tais marcadores têm-se mostrado eficientes em diversos estudos de análise da diversidade genética, pois permitem inferir como a diversidade genética está distribuída dentro e entre os grupos e, com isso, fundamentam-se como um valioso instrumento em programas de melhoramento e estudos de diversidade (ROCHA et al., 2012).

As 196 bandas polimórficas geradas a partir dos 12 *primers* utilizados no presente estudo estão dentro do esperado para esses marcadores. Colombo et al. (1998), trata sobre a necessidade de uma quantidade média aproximada ou superior de 50 a 100 bandas polimórficas para a obtenção de uma estimativa confiável das relações genéticas entre populações através de marcadores dominantes. Lira Neto (2011) utilizaram 17 *primers* de ISSR em três espécies de *Croton*, sendo detectados 317 bandas polimórficas de um total de 327 bandas, indicando que esses marcadores são de fato muito úteis na detecção da diversidade genética no grupo.

O valor percentual de polimorfismo é um parâmetro utilizado para aferir a eficiência dos marcadores moleculares ao estimar a variabilidade genética de populações (GRATIVOL et al., 2011). Os dados obtidos neste estudo, demonstram que a partir dos 12 *primers* ISSR utilizados, obteve-se um total de 241 bandas, das quais 196 (81,32%) foram polimórficas, possibilitando afirmar, desse modo, que os marcadores ISSR foram eficientes na caracterização e discriminação da diversidade genética de *A. colubrina*.

Os resultados corroboram com os apresentados por outros autores em estudos com metodologias similares. No trabalho de Dias et al. (2015) a diversidade genética de *Vigna unguiculata*, foi avaliada por nove iniciadores ISSR, onde obteve-se 62 fragmentos, sendo 47 (75,81%) bandas polimórficas. A diversidade genética em *Zabrotes subfasciatus* utilizando marcadores ISSR, apresentou uma média de polimorfismo de 83,20%, indicando altos níveis de polimorfismo e de diversidade genética (SOUSA et al., 2008). No trabalho de Souza Sobreira et al. (2015) a diversidade genética entre os genótipos de *Pitcairnia flammea* foi estimada com 18 marcadores que geraram 180 bandas, das quais 159 (88%) foram polimórficas.

No presente estudo, observou-se um número alto de fragmentos polimórficos e um baixo percentual de bandas monomórficas, evidenciando a grande variabilidade genética e, também, mostrou a validação dos iniciadores ISSR testados, os quais poderão ser utilizados na caracterização de genótipos e em estudos de estrutura de populações, a fim de direcionar o programas de conservação, manejo e melhoramento da espécie.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) revela a capacidade do iniciador em detectar a variabilidade existente entre os indivíduos, sendo que quanto maior essa capacidade, maior o seu valor (PRECZENHAK, 2013). O PIC é classificado conforme estabelecido por Botstein et al. (1980), onde marcadores com PIC superior a 0,5 são satisfatórios em conteúdo informativo, valores entre 0,25 e 0,50 como mediantemente informativos e valores inferiores a 0,25 pouco informativos. O valor médio do PIC do estudo foi de 0,32, variando entre 0,43 (UBC 834) a 0,12 (UBC 868). Os iniciadores mais informativos, com PIC acima de 0,3 foram UBC 809, 810, 812, 815, 827, 834, 836, 840, 842, podendo assim melhor capturar a variabilidade entre os indivíduos e apenas um dos iniciadores, e o UBC 868 foi considerado pouco informativo apresentando valor de 0,12.

A estimativa do número ótimo de fragmentos por bootstrap é importante, pois na realização de estudos genéticos, essa indicação do número mínimo de locos que devem ser utilizados nas análises contribui para a otimização do uso dos recursos e tempo, traduzidos em menor número de locos representativos da amostragem para caracterização da diversidade genética (GONÇALVES et al., 2014; VIEIRA et al., 2015).

Para o estudo, a estimativa foi de 176 locos, com valor de estresse (E) de 0,02 e correlação (r) de 0,99 (Figura 5). Os valores encontrados são considerados representativos para o número de *primes* utilizados e o de fragmentos amostrados, visto que autores como Kruskal (1964) relatam uma precisão excelente, onde valor de $E \leq 0,05$ é indicativo de uma excelente precisão nas estimativas.

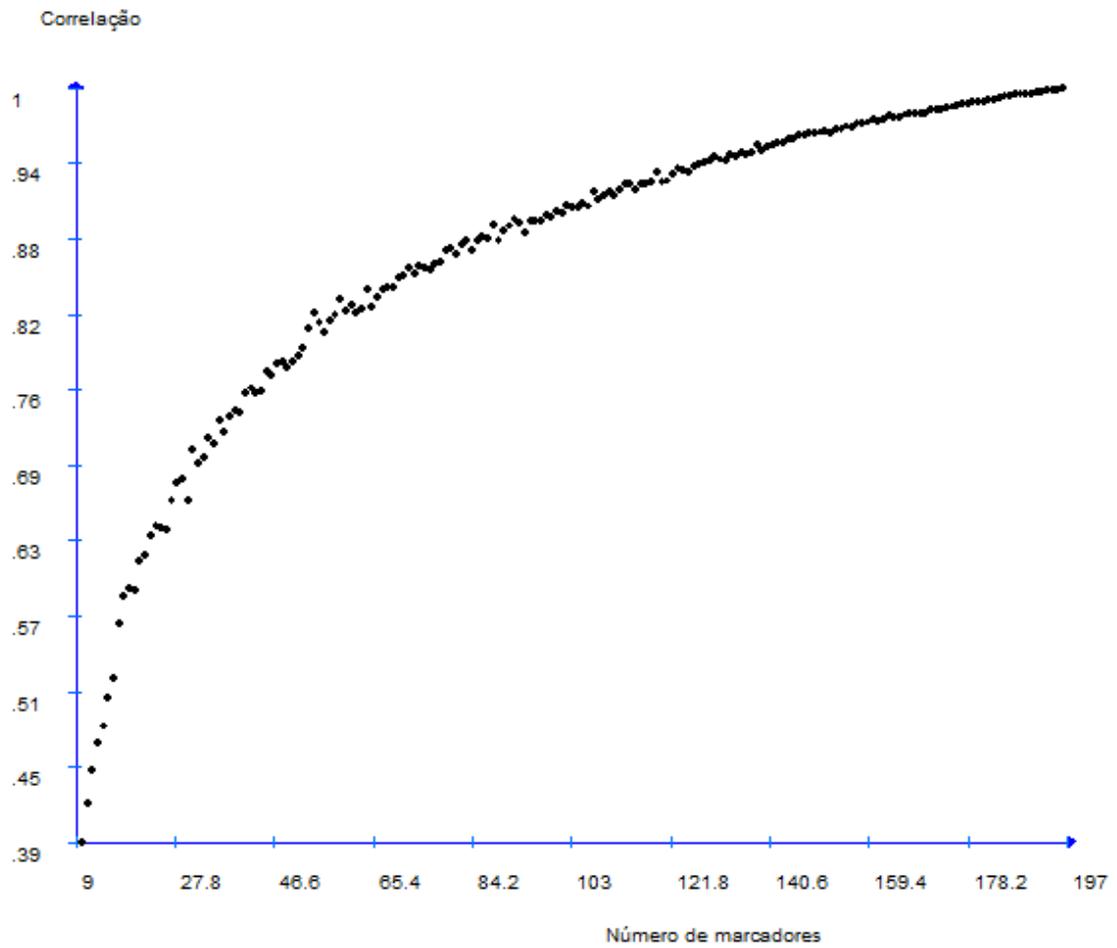


Figura 5- Coeficiente de correlação (r) e o número de fragmentos polimórficos obtidos para os indivíduos de *Anadenanthera colubrina*.

5.2 Diversidade intrapopulacional

Os índices de dissimilaridade verificam o grau de divergência e semelhança genética entre os pares de indivíduos de uma espécie adquiridos através da complementaridade do coeficiente de Jaccard, e foram utilizados para a comparação genética entre as árvores de *A. colubrina*, considerando todos os fragmentos e cada fragmento individualmente.

Considerando todos os indivíduos da população de *A. colubrina* analisados conjuntamente nos fragmentos (Tabela 4), os valores de dissimilaridade variaram de 0,06 a 0,68, com média de 0,37, sendo as menores distância entre os genótipos 100 e 101 e maiores distâncias genéticas os genótipos 41 e 109. Utilizando o método de Mojema (1977) com $k = 1,25$, o ponto de corte estabelecido foi de 74,50% e o coeficiente de correlação cofenética que verifica a consistência do agrupamento foi de 78,92% ($CCC=0,7892$). A representação gráfica dos agrupamentos obtida pelo método UPGMA revelou a presença de 17 grupos no dendrograma (Figura 6).

Tabela 4 – Dissimilaridade entre os indivíduos de *A. colubrina* por fragmento e todas as populações avaliadas em conjunto, com a variação, média, maior e menor distância genética.

FRAGMENTO	VARIÇÃO	MÉDIA	DISTÂNCIA GENÉTICA	
			MENOR	MAIOR
01 - Rosal – Guaçuí	0,08 - 0,57	0,32	32 e 33	2 e 32
02 – Área em Jeronimo Monteiro	0,15 - 0,56	0,35	51 e 52	41 e 44
03 – ARIE – Alegre	0,14 - 0,47	0,30	95 e 96	84 e 96
04 – IFES – Alegre	0,06 – 0,54	0,30	100 e 5	2 e 11
Todas as populações	0,06 – 0,68	0,37	100 e 101	41 e 109

Para as populações avaliadas nos fragmentos separadamente, os resultados variam (Tabela 4). Para comparação entre os indivíduos da Rosal - Guaçuí os valores de dissimilaridade variaram de 0,08 a 0,57 com média de 0,32. A menor distância genética foi entre o par 32 e 33 e a maior distância entre 2 e 32. O agrupamento, revelou quatro grupos

(Figura 7). O ponto de corte estabelecido foi de 76% e o coeficiente de correlação cofenética foi de 84,93% (CCC= 0,8493).

Entre os indivíduos da população da área em Jerônimo Monteiro (Tabela 4), a dissimilaridade variou de 0,15 a 0,56 com média de 0,35. A menor distância genética foi entre os indivíduos 12 e 13 e a maior distância entre as árvores 4 e 16. Quatro grupos foram observados (Figura 8). Foi estabelecido o ponto de corte de 79,54% e a correlação cofenética foi de 84% (CCC= 0,8492).

Na avaliação entre os indivíduos da ARIE- Alegre (Tabela 4) os valores de dissimilaridade variaram de 0,14 a 0,47, com média de 0,40, sendo as menores distâncias entre os indivíduos 15 e 16 e as maiores entre os indivíduos 04 e 16, respectivamente. No dendrograma foram observados três grupos (Figura 9). O ponto de corte estabelecido foi de 85,36% e o coeficiente de correlação cofenética foi de 87,38% (CCC= 0,8738).

E para as comparações entre os indivíduos da população IFES- Alegre (Tabela 4) a variação da dissimilaridade foi de 0,06 a 0,54 com média de 0,30. A menor distância genética foi entre o par 4 e 5 e a maior distância entre 2 e 11. O agrupamento apresentado no dendrograma demonstrou cinco grupos (Figura 10). O ponto de corte estabelecido foi de 76,08% e o coeficiente de correlação cofenética foi de 95,88% (CCC= 0,9588).

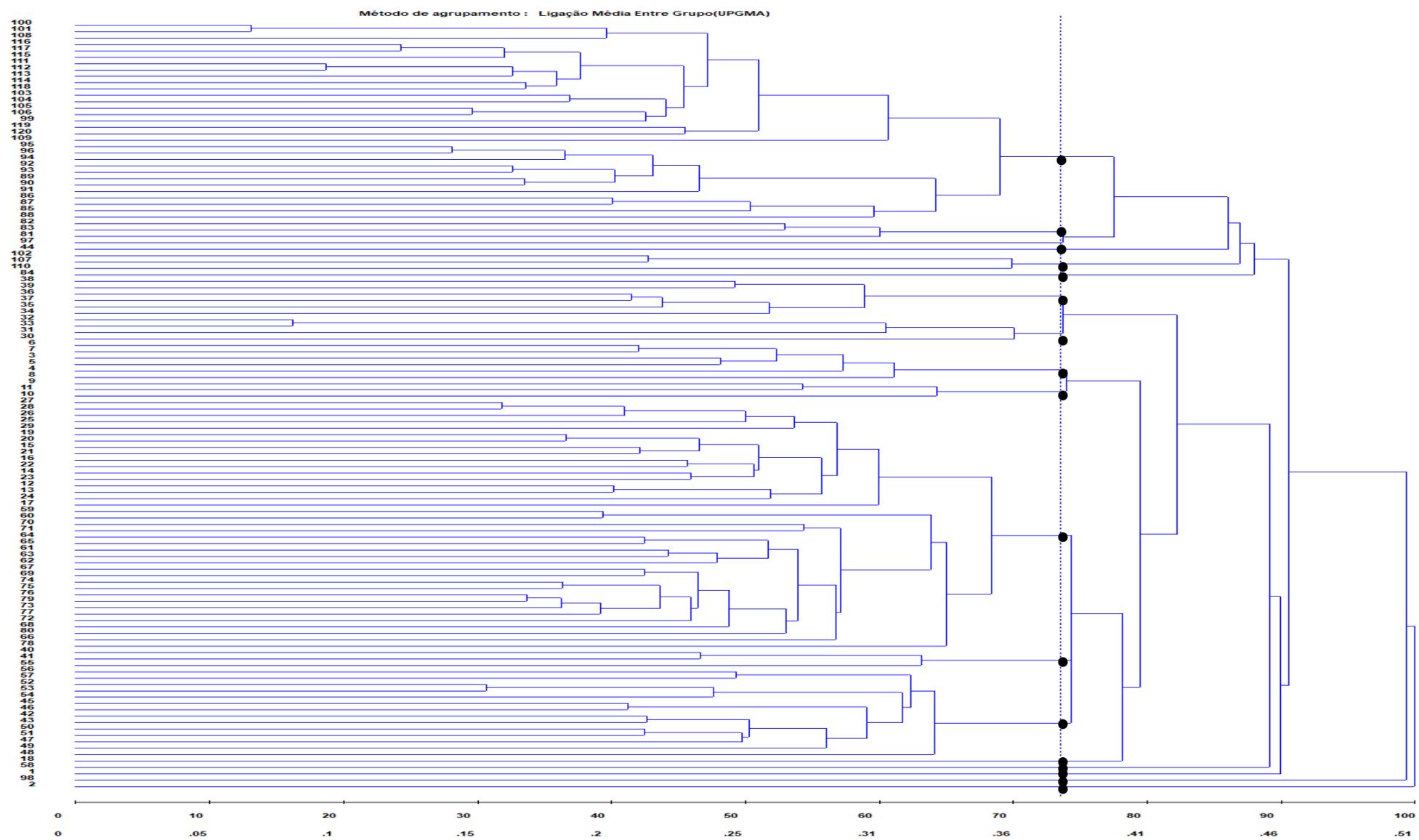


Figura 6 – Dendrograma representativo da dissimilaridade genética entre os 120 indivíduos de *A. colubrina*, agrupados pelo método UPGMA, formando 17 grupos. Ponto de Corte (PC): 74,50%.

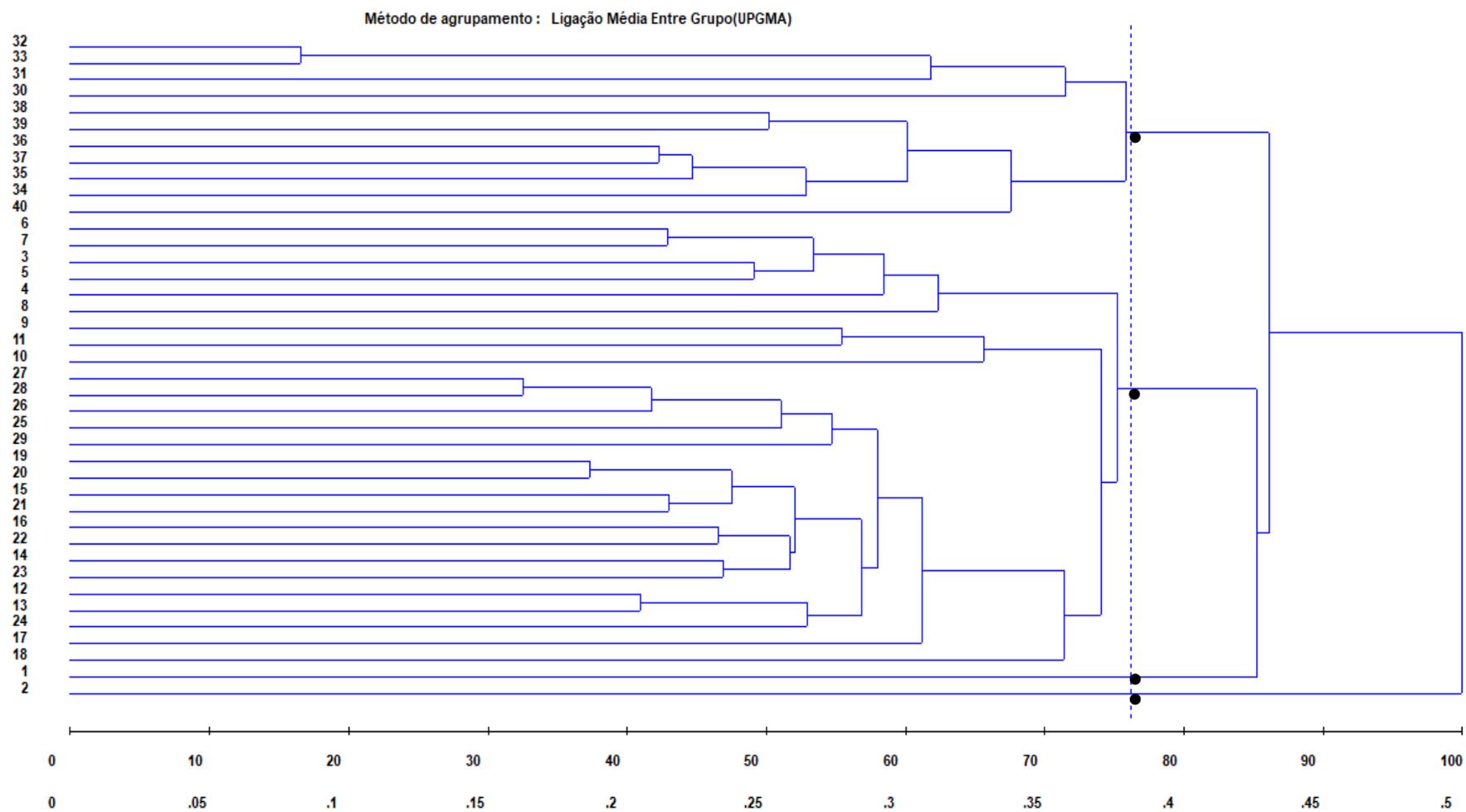


Figura 7- Dendrograma representativo da dissimilaridade genética na população do fragmento da Rosal - Guaçuí, representada por 40 indivíduos de *A. colubrina*, agrupados pelo método UPGMA, formando 4 grupos. Ponto de Corte (Pc): 76%.

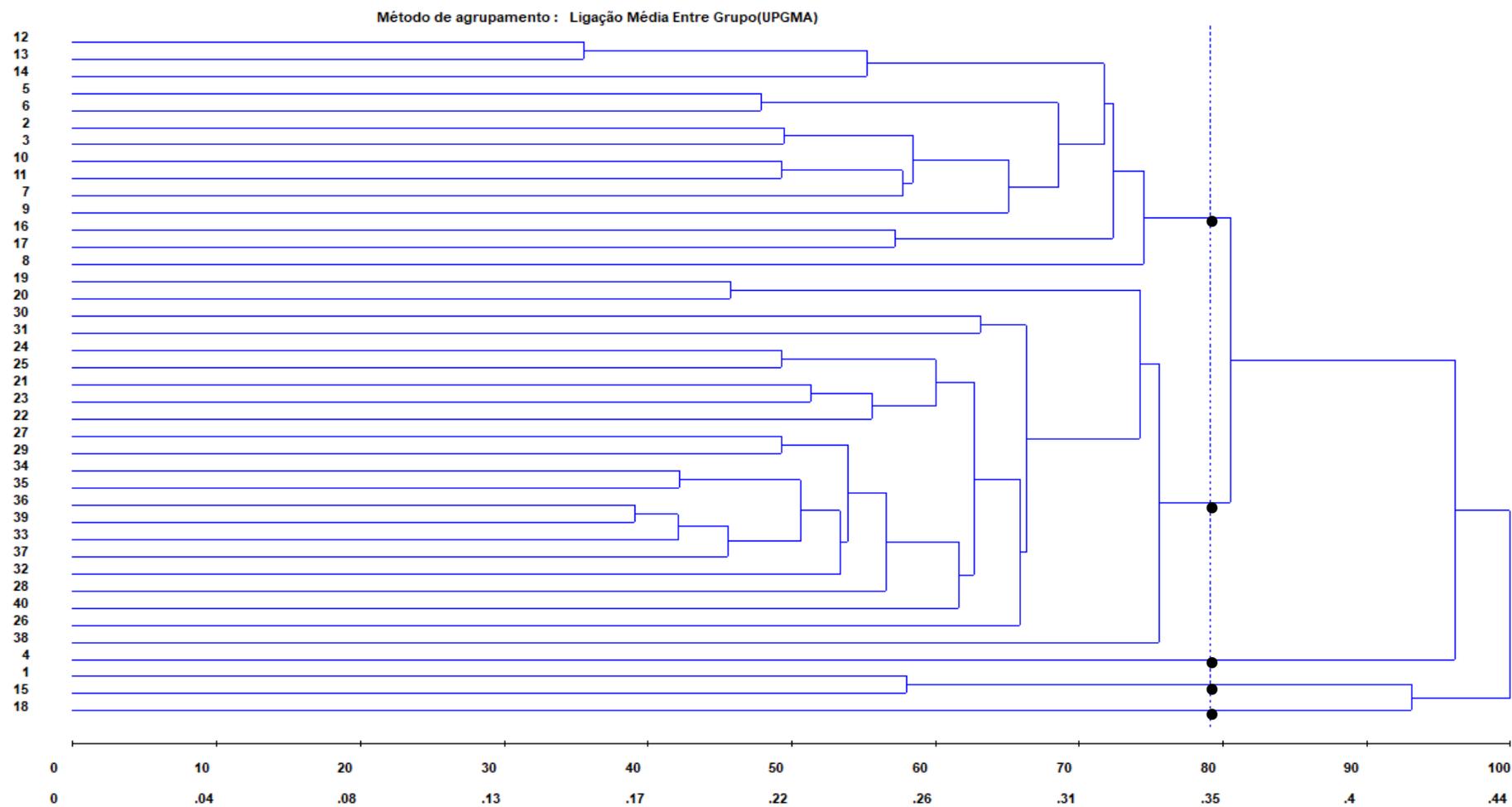


Figura 8- Dendrograma representativo da dissimilaridade genética na população da área em Jeronimo Monteiro, representada por 40 indivíduos de *A. colubrina*, agrupados pelo método UPGMA, formando 5 grupos. Ponto de Corte (Pc): 79.54%.

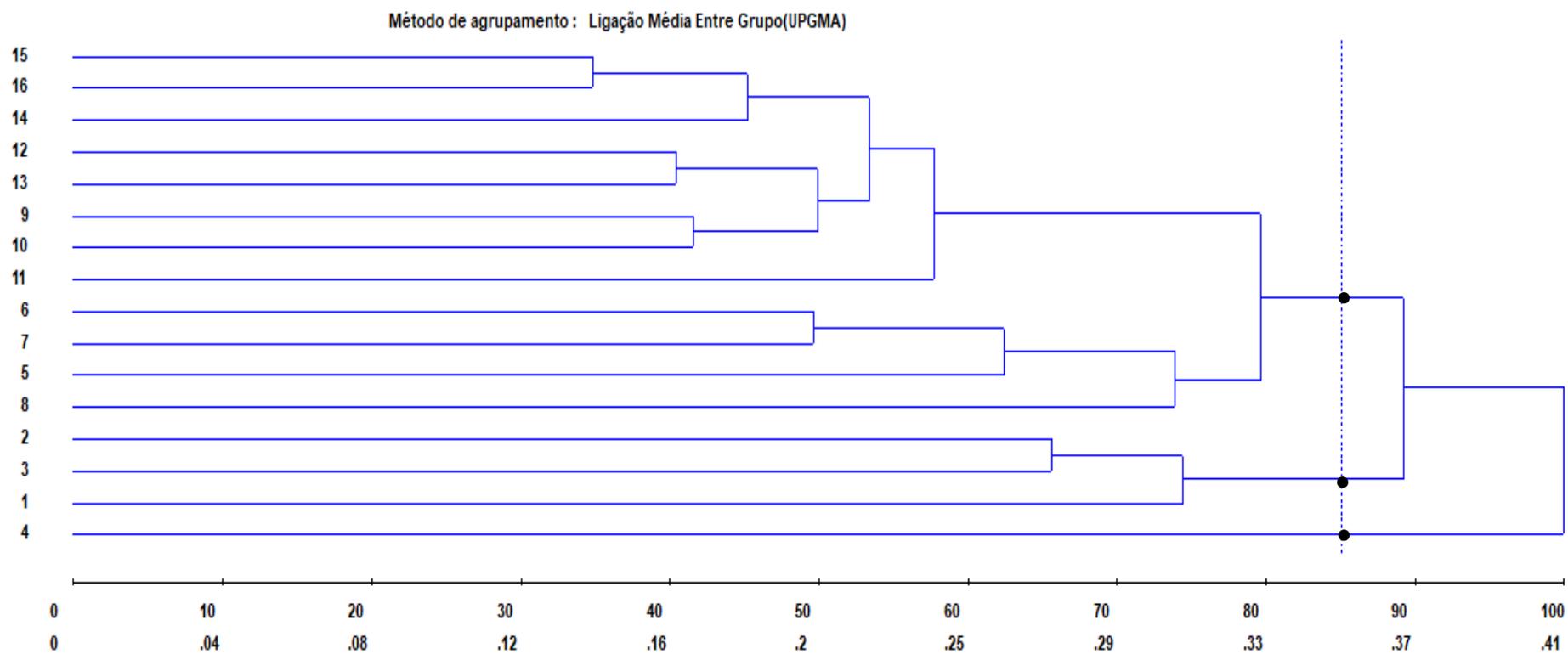


Figura 9 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética na população do fragmento ARIE em Alegre, representada por 16 indivíduos de *A. colubrina*, agrupados pelo método UPGMA, formando 3 grupos. Ponto de Corte (Pc): 85.36%

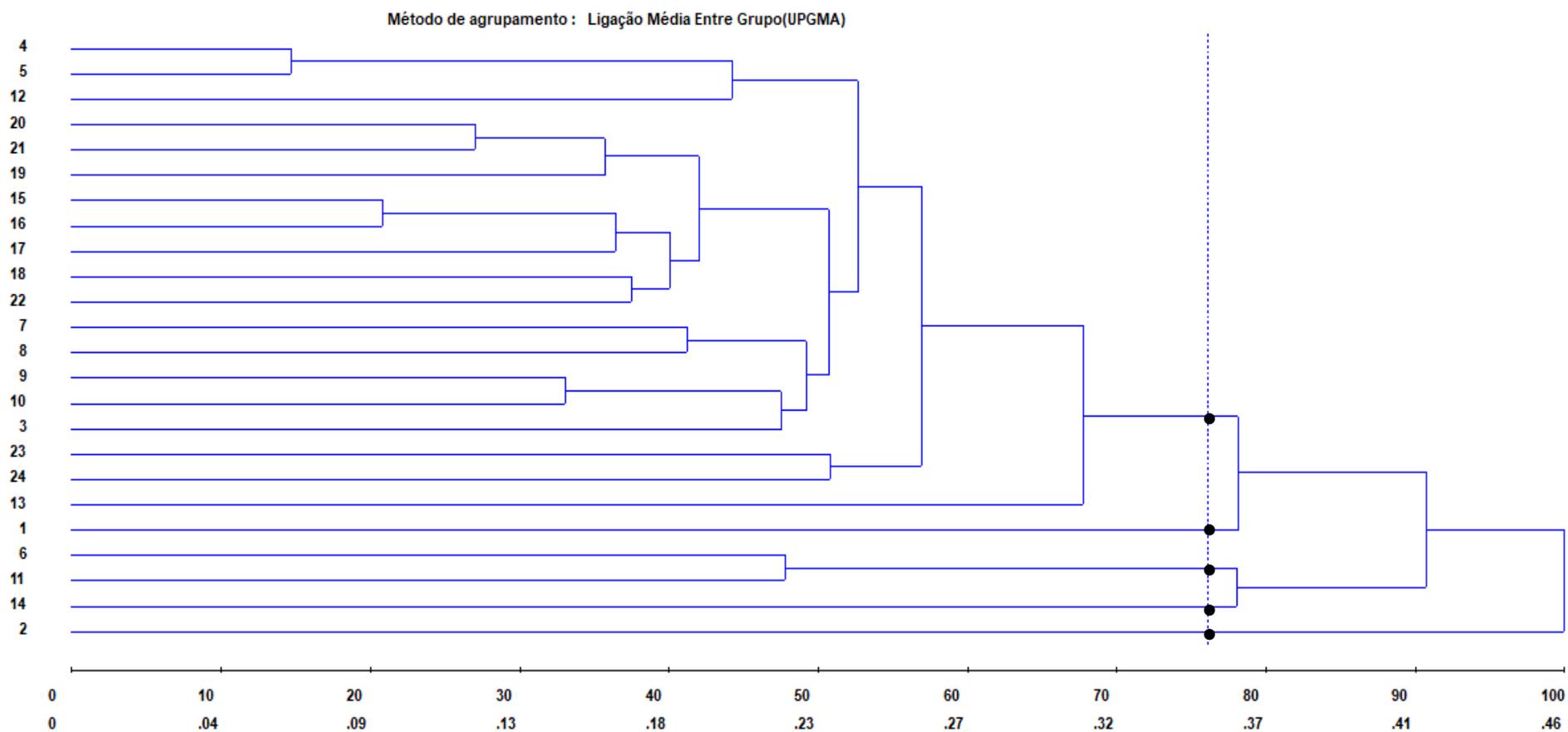


Figura 10 - Dendrograma representativo da dissimilaridade genética na população do fragmento IFES em Alegre, representada por 24 indivíduos de *A. colubrina*, agrupados pelo método UPGMA, formando 5 grupos. Ponto de Corte (Pc): 76.08%.

O coeficiente de correlação cofenética (CCC) entre a matriz de de valores da dissimilaridades genéticas e as figuras dos dendrogramas, verificou a consistência do agrupamento. Valores confirmados a partir dos valores de CCC apresentados, aproximado ou acima de 0,8 indicando boa representatividade entre as distâncias (BUSSAD et al., 1990), demonstrando que os resultados são aceitáveis e revelam a conformidade entre as representações gráficas das distâncias e a suas matrizes originais.

Ao observar os valores de dissimilaridade total, considerando todas as populações analisadas em conjunto e das populações avaliadas separadamente conforme tabela 4, foram verificados distâncias genéticas variando de 0,06 a 0,68, constatando um nível significativo de variabilidade genética nos genótipos de *A. colubrina* avaliados no presente trabalho, o que pode ser validado, a partir dos dendrogramas para cada grupo (Figura 6,7,8, 9 e 10). Os dados obtidos neste estudo, corroboram com os resultados encontrados por outros autores. Cruz et. al (2017), em estudo para caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações de *Plathymenia reticulata*, na área da Rosal município de Gaçuí/ES, variaram de 0,15 a 0,64 com a formação de 09 grupos, sem nenhuma evidência de indivíduos idênticos em termos genéticos. Um resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Dias et. al. (2015), em que foi observada distâncias genéticas variando de 0,09 a 0,31 apresentando um bom nível de variabilidade genética nos genótipos de *Vigna unguiculata*, com a formação de 10 grupos divergentes. Oliveira et al. (2007), estudou a diversidade genética de açaizeiro encontrando valores de dissimilaridade variando de 0,06 a 0,67, também apresentando alta diversidade genética.

As matrizes número 01 e 02 (Rosal - Guaçuí), 58 (Área em Jeronimo Monteiro), 98 (IFES – Alegre) apresentaram-se como mais divergentes entre todos os genótipos avaliados, formando grupos isolados com apenas um único genótipo. Ao verificar estimativas de dissimilaridade entre os pares de indivíduos é possível aferir a respeito da heterogeneidade das amostras, tornando a estratégia adequada para iniciar um programa de melhoramento onde deseja-se obter lotes de sementes com ampla variabilidade genética para fins de recuperação ou restauração florestal (LINDEN, 2009; CRUZ, 2011; GUPTA,2014).

Dessa forma, é possível constatar que houve ampla distribuição genética nos grupos, revelando significativa variabilidade genética entre os indivíduos avaliados, sem nenhuma evidência de indivíduos geneticamente idênticos, indicando que todos podem ser usados para obter lotes de sementes.

Os parâmetros de diversidade genética avaliados para *A. colubrina*, estão descritos na Tabela 5. As análises foram calculadas para as populações em todos os fragmentos em conjunto, a população do fragmento da Rosal – Guaçuí, Área em Jeronimo Monteiro, IFES e ARIE – Alegre.

Tabela 5 - Estimativa de diversidade genética para cada população de *A. colubrina* calculadas com o auxílio do software POPGENE. Tamanho da amostra (n), Número de alelos observados (Na), Número de alelos efetivos (Ne), Índice de Nei (H'), Índice de Shannon (I). Valores de média.

POPULAÇÕES	n	Na	Ne	H'	I
01 - Rosal – Guaçuí	40	1,840	1,464	0,272	0,410
02 – Área em Jeronimo Monteiro	40	1,836	1,426	0,257	0,393
03 – ARIE – Alegre	16	1,642	1,358	0,211	0,320
04 – IFES – Alegre	24	1,345	1,345	0,219	0,344
Todas as populações	120	1,994	1,647	0,363	0,535

O número de alelos observados (Na) considerando a espécie em todos os fragmentos analisados em conjunto, e as populações em cada fragmento separadamente obteve uma variação da média, conforme tabela 5, entre 1,65 a 1,99 e número de alelos efetivos (Ne) de 1,345 a 1,464. Valores semelhantes estão de acordo com estudos realizados com populações de *Copernicia prunifera* e *Hancornia speciosa*, utilizando marcador dominante, com valores médios de aproximados 2,00 para alelos observados e 1,40 para alelos efetivos (COSTA et al., 2015, VIEIRA et al., 2015).

As estimativas de diversidade de Nei (H') obteve valores médios variando entre 0,211 a 0,363 e o índice de Shannon (I) variou 0,320 a 0,535 (Tabela 5). Estudos corroboram com os resultados encontrados para espécies arbóreas em que foram utilizadas metodologias similares. Análises da diversidade genética com *Prosopis cineraria* (Fabaceae) apresentou valores similares para o índice de Nei 0,301 e índice de Shannon 0,438 (SHARMA et al., 2011). A espécie *Magnolia officinalis*, obteve valores médios de 0,342 para o índice de diversidade de Nei e 0,496 para o índice de Shannon (YU et al., 2010). Abordagens realizadas

por Ferreira (2011) na análise da diversidade genética de *Annona crassiflora*, os valores obtidos foram baixos quanto a diversidade genética ($H' = 0,19$ e $I = 0,24$) fato que pode ser considerado devido a esses locais ainda sofrerem com o extrativismo. Em estudo com *Cornus mas* L. foram encontrados valores de $H' = 0,416$ e $I = 0,595$, considerados como alta diversidade genética (HASSANPOUR; HAMIDOGHLI; SAMIZADEH, 2013).

Índice de Shannon varia de 0 – 1, sendo 1 o máximo de diversidade genética de uma população (LEWONTIN, 1972). Os índices de Shannon (I) e Nei (H') indicam a quantidade de diversidade genética existente na população. Assim, quanto menor a estimativa do índice, menor diversidade ocorre entre as plantas. Os resultados obtidos, no presente estudo foram considerados de médio a altos, indicando alta diversidade genética entre os indivíduos de *A. colubrina* dentro do grupo e média, se considerarmos a população do fragmento separadamente.

Os valores para esses índices se avaliados separadamente em cada fragmento, apresentam números superiores na área da Rosal - Guaçuí ($I = 0,410$ e $H' = 0,272$) quando comparados aos obtidos dentro das populações dos demais fragmentos (Tabela 5), porém estudo desenvolvido no mesmo local, apresentou variação de valores diferenciados ($I = 0,380$ e $H' = 0,548$) encontrados por Cruz et. al (2017) em unidades amostrais de *Plathymenia reticulata*.

O valor superior apresentado, quando comparado aos das demais áreas, pode-se justificar, visto que o fragmento, na floresta da Rosal - Guaçuí apesar de ter passado por um grande processo de exploração de seus recursos madeireiros (LAGE, 2012), é uma Área de Preservação Permanente (APP) e tem uma maior extensão, com aproximadamente 93 hectares, possuindo um vasto número de indivíduos adultos e saudáveis de *A. colubrina*. Porém, o valor significativo de diversidade para a espécie encontrado na região, não é compatível com o padrão elevado de *Plathymenia reticulata* apresentado por Cruz et. al (2017) no mesmo local.

Apesar de as áreas preservadas serem utilizadas como principais estratégias para a conservação de recursos genéticos de espécies arbóreas, nem sempre são capazes de proteger todas as espécies com a mesma intensidade (KATI et al., 2004), este pode ser o caso da *A. colubrina* se comparada ao estudo sinalizado anteriormente.

A variação genética intrapopulacional mediana apresentada entre os indivíduos dos fragmentos pode ser explicada considerando o sistema reprodutivo, pois a espécie é de

preferência alógama, o fato dessas espécies possuírem polinização realizada por abelhas e pequenos insetos, (CARVALHO, 2003; COSTA ET AL., 1992) não favorecem a dispersão em longas distâncias, propiciando a diminuição da diversidade genética.

Deve-se considerar também a relação do tamanho da população e os indivíduos adultos saudáveis em cada local, já que as dimensões são diferentes - a área da Rosal em Guaçuí e a área em Jerônimo Monteiro, apesar de possuírem uma diferença significativa de tamanho, conforme citado no material e métodos, possuem um número equivalente de indivíduos adultos e saudáveis acessíveis e com facilidade para coletas.

Outro fator de relevante destaque para o estudo é a ação antrópica local, visto que apesar de todos os fragmentos terem sofrido com as atividades antrópicas exercidas, em decorrência de corte na área, em diferentes períodos, os índices de diversidade no local não fizeram relação com o tempo ou o tamanho do fragmento em estudo.

5.3 Diversidade interpopulacional

Por meio da Análise de Variância Molecular (AMOVA), foi realizada a partição da variação genética em dois níveis: dentro e entre as populações, a fim verificar a estrutura genética.

Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) dentro e entre as quatro populações de *A. colubrina* com emprego de marcadores ISSR.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Varição (%)
Entre fragmentos	829,77	9,02	26,36
Dentro dos fragmentos	2802,72	25,21	73,64
Total	3632,50	34,24	
Φ_{ST}	0,26356		

Os valores obtidos nas análises realizadas, revelam que a maior parte da variação está dentro dos grupos com percentual de 73,64%, e 26,35% entre eles (Tabela 6).

A diversidade genética dentro e entre as populações está relacionada a dispersão de pólen e sementes, ao tipo de reprodução que a espécie apresenta e a distribuição dos indivíduos na população, onde constata-se que arbóreas preferencialmente alógamas apresentam uma elevada diversidade genética dentro das populações e menor entre elas (EPPERSON, 2003; SEBBENN et al., 2011). Da mesma forma, resultados similares foram descritos por diferentes autores em espécies arbóreas (OCELÁK et al. 2015; SAFAEI et al. 2016; RAMALHO et al., 2016).

As estimativas de Φ_{ST} são equivalentes a estatística F proposta por Wright (1978) quantificando a diferenciação genética entre grupos de indivíduos em que valores de F_{ST} com amplitude de 0 a 0,05 representam pequena diferenciação genética, de 0,05 a 0,15 moderada diferenciação, de 0,15 a 0,25 grande diferenciação e valores acima de 0,25 indicam uma diferenciação genética muito grande.

Apesar da diversidade genética dentro das populações apresentar valor maior, a estimativa de diferenciação genética entre as localidades foi considerada muito alta ($\Phi_{ST} = 0,26$), houve diferenciação genética significativa entre as populações.

A considerável diversidade genética encontrada dentro dos grupos e a elevada diferenciação entre os grupos estudados, pode fazer referência a colonização da espécie, que formam numerosos angicais, fortemente influenciados por um possível efeito fundador, onde poucos indivíduos colonizam uma nova área, e tais indivíduos possuem uma amostra limitada da variação genética presente no local (MAYR, 1963), associado a dispersão de frutos e sementes, autocórica, principalmente, barocórica (CARVALHO, 2002). Em consequência, a espécie apresenta um padrão de distribuição agregado. Estudo de diversidade genética realizados por Lima et al. (2015) com *Theobroma subincanum*, utilizando metodologia semelhante, revela diferenciação genética menor entre indivíduos mais próximos geograficamente.

Também relacionado ao possível efeito fundador está a fragmentação, pois em virtude das expansões urbanas e comerciais, no processo de extração, determinadas áreas são poupadas, normalmente por apresentarem solo de baixa qualidade, com pouca água onde as culturas comerciais não conseguem se estabelecer. A espécie *A. colubrina* apresenta dentre outras características relevantes a capacidade de estabelecimento em condições limitadas (BARBOSA, 2000), porém embora seja favorecido no processo de sobrevivência nas áreas fragmentadas, sofre com a perda da diversidade genética.

Uma outra questão de destaque já citada anteriormente, é o fato de que aliado a estrutura genética e tamanho das populações, estão os agentes polinizadores, onde espécies que são polinizadas por pequenos insetos e abelhas, como é o caso da *A. colubrina*, apresentam menor diversidade devido ao movimento limitado dos agentes e a estruturação nas populações é observada (LOVELESS e HAMRICK, 1984). A mesma argumentação foi realizada por Gois (2014) em seu estudo com *Ziziphus joazeiro*, destacando que a alta variação observada entre as populações pode ser resultado não apenas da distância geográfica e tamanho entre elas, como também pelas características ecológicas da espécie.

Os elevados níveis de diferenciação encontrados entre as populações no presente estudo, referem-se ao fluxo gênico histórico entre populações, que podem ser de níveis elevados a moderados e que conseqüentemente podem estar associados à migração entre regiões (FUCHS; HAMRICK, 2010).

O fluxo gênico histórico (Nm) foi calculado indiretamente, a partir do estimador de divergência genética entre grupos ($G_{ST} = 0,2108$), exibiu Nm igual a 1,88. De acordo com Wright (1931), valores de fluxo gênico inferiores a 1 indicam isolamento genético. Esse mesmo autor, em 1951, afirmou que valor de fluxo gênico superior a 1 é suficiente para impedir perdas aleatórias de alelos dentro de populações, ou seja, efeitos de deriva, onde possivelmente tal evento teria a tendência a causar diferenciação das frequências alélicas das populações, enquanto que o fluxo gênico causará a homogeneização (HARTL & CLARCK, 2010).

O valor de Nm estimado foi próximo do valor considerado limite pelo autor citado acima como fator que indica isolamento genético, fato relevante a ser destacado quando se pensa em estratégias de conservação da espécie.

Em outras espécies arbóreas foram encontrados valores similares. Moura (2005) verificou, em cinco populações de *Eremanthus erytropappus*, que 87,62% da variabilidade se encontra dentro das populações e entre as populações apenas 12,38%. Dario et. al (2008) em estudo realizado *Dimorphandra mollis* exibem consideráveis níveis de variabilidade genética dentro de suas populações (89,7%) e níveis altos de divergência entre elas (10,3%).

Por fim, realizou-se uma avaliação da estrutura genética da população com a abordagem bayesiana aplicada a todas as populações (figuras 11 e 12) a fim de avaliar o número significativo de grupos genéticos.

A análise obtida pelo método de estatística ΔK (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005), mostrou que a população está estruturada em dois grupos genéticos, $K=2$. (Figura 12).

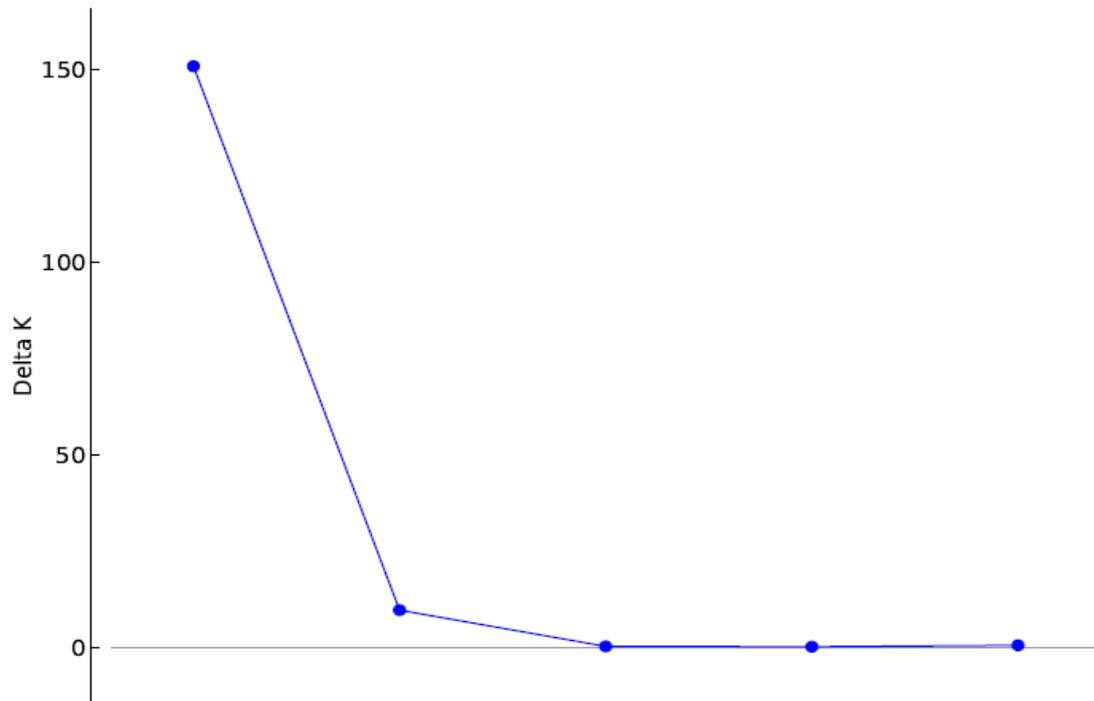


Figura 11 - Gráfico dos valores de K (2), seguindo o critério proposto por Evanno; Regnaut; Goudet (2005) para definição do número de grupos, baseado na taxa de mudança no $\ln(k)$.

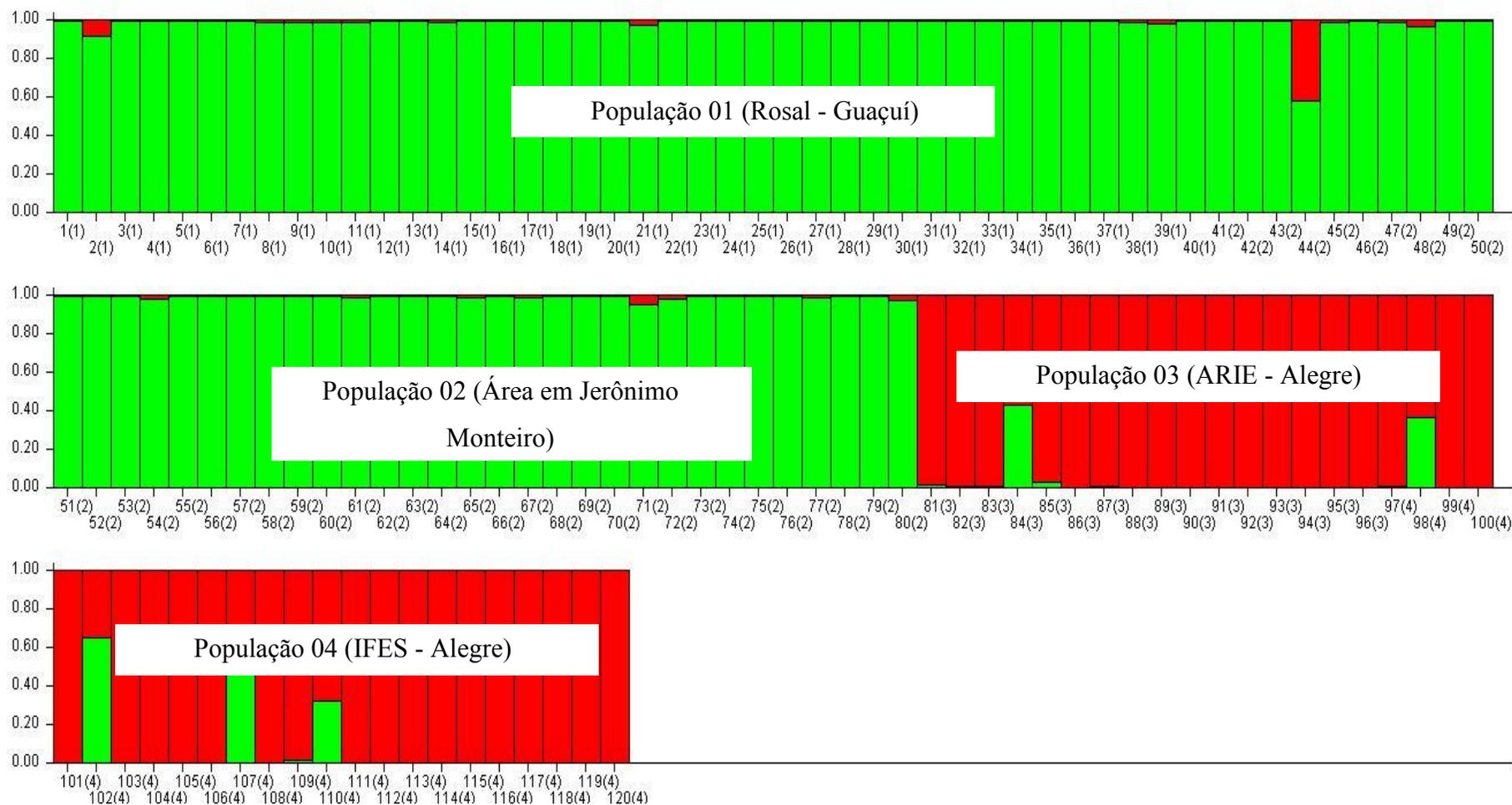


Figura 12 - Gráfico de barras identificando o número de agrupamentos em relação as populações. Números entre parênteses referem se às populações amostradas: (1) Guaçuí, (2) Jerônimo Monteiro, (3) ARIE/Alegre, (4) IFES/Alegre.

É possível observar em termos de genéticos que a área referente a população 1 (Rosal - Guaçuí) e população 02 (Área em Jerônimo Monteiro) possuem maior contribuição, com o grupo representado pela cor verde e as áreas da população 03 e 04 (ARIE e IFES – Alegre, respectivamente) pelo grupo com a cor vermelha. Conforme discutido acima, é possível verificar possível efeito fundador, a fragmentação no local favorecendo a espécie em detrimento da diversidade genética e diferenciação significativa entre os grupos.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo afirmam que a diversidade genética intrapopulacional é média se considerarmos as populações separadamente, e alta em nível da espécie considerando todos os locais. Os dados obtidos permitiram identificar indivíduos adultos de *A. colubrina* remanescentes nas áreas de estudo com potencial para serem utilizadas como matrizes em coleta de sementes, visto que apresentam uma significativa diversidade genética, bem como permitiu estimar que não há diferença significativa da diversidade genética da população relacionada diretamente em função do tamanho, tempo de regeneração e atividades antrópicas exercidas.

Entre as populações, é possível observar que o valor de do fluxo gênico estimado foi próximo do valor considerado limite para isolamento genético.

6 CONCLUSÕES

- A diversidade genética intrapopulacional é média se considerarmos as populações separadamente, e alta para a espécie considerando todos os locais;
- Existe diversidade genética entre e dentro das populações dos fragmentos estudados, sendo que a maior parte da variação genética é encontrada dentro dos grupos e alta diferenciação genética foi detectada entre as populações amostradas;
- Não há diferença significativa da diversidade genética das populações relacionadas diretamente em função do tamanho, tempo de regeneração e atividades antrópicas exercidas.
- Os resultados obtidos permitiram identificar indivíduos adultos de *A. colubrina* nas áreas de estudo com potencial para serem utilizadas como matrizes em coleta de sementes, visto que apresentam uma significativa diversidade genética;
- O valor de do fluxo gênico estimado foi próximo do valor considerado limite para isolamento genético, fato relevante deve ser considerado em possíveis estratégias de conservação da espécie.

7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA C. G.; MORO R. S. Análise da cobertura florestal no Parque do Campo Gerais, PR, como subsídio ao seu plano de manejo. Revista **Terr@plural**, v. 1, n 1, p. 115-122, 2007.

ARAUJO, F. S.; MARTINS, S. V.; MEIRA, J. A. A.; LANIS J. L. L.; PIRES I. E. Estrutura da vegetação arbustivo arbórea colonizadora de uma área degradada por mineração de caulim, Brás Pires, MG. **Revista Árvore**, v. 30, n 1, p.107-116, 2006.

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

ALVARES, C.A., STAPE, J.L., SENTELHAS, P.C., GONÇALVES, J.L.M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

BARBOSA, L. M. Considerações gerais e modelos de recuperação de formações ciliares. Matas ciliares: conservação e recuperação. São Paulo: **EDUSP**. 2000.

BARRETO, S. S. B.; FERREIRA, R. A. Aspectos morfológicos de frutos, sementes, plântulas e mudas de leguminosae mimosoideae: *Anadenanthera colubrina* (vellozo) brenan e *enterolobium contortisiliquum* (vellozo) morong. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n 2, p. 223-232, 2011.

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

BORGES, L. A. A. P. **Biologia reprodutiva de espécies lenhosas de leguminosae na caatinga**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia Vegetal, 2012.

BORGES R.C. Investigating genetic diversity in sapucaia using inter simple sequence repeat markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016.

BORN, C.; HARDY, O. J.; CHEVALLIER, M. H.; OSSARI, S.; ATTÉKÉ, C.; WICKINGS, E. J.; HOSSAERT-MCKEY, M. Small-scale spatial genetic structure in the 76 Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*: a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. **Molecular Ecology**, Oxford, v.17, p. 2041-2050, 2008.

BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no sul de Minas Gerais.** 2008. 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BOSCOLO, D.; GALLARDO C. C.; AWADE, M.; METZGER, P. J. Importance of Interhabitat Gaps and Stepping-Stones for Lesser Woodcreepers (*Xiphorhynchus fuscus*) in the Atlantic Forest, Brazil. **Biotropica**. Whashington. v. 40, n. 3, p. 273-276, 2008.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetic**, v. 32, p. 314–331. 1980.

BUSSAD, W. de O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. Introdução à análise de agrupamentos. São Paulo: **ABE**, 1990. 105 p.

CABALLERO, A.; RODRÍGUEZ-RAMILO, S. T.; ÁVILA, V.; FERNÁNDEZ, J. Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 11, p. 409 – 419, 2010.

CARVALHO, P. E. R. Angico Branco. Ministério Da Agricultura Pecuária E Abastecimento. **EMBRAPA**. Circular Técnica, 56. Colombo. PR. Novembro, 2002.

COLOMBO C, SECOND G, VALLE TL, CHARRIER A. Genetic diversity characterization of cassava cultivars *Manihot esculenta* Crantz. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p. 105-113, 1998.

COLLEVATTI, R. G.; LIMA, J. S.; SOARES, T. N.; TELLES, M. P. C. Spatial Genetic Structure and life history traits in Cerrado tree species: Inferences for conservation. **Natureza & Conservação**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 54-59, 2010.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites.** Tese (Doutorado Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP, 2004.

COSTA, D. F. et al. Genetic diversity and ISSR initiators selection in a natural population of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 4, p. 970-976, 2015.

COSTA, R.B.; KAGEYAMA, P.Y.; MARIANAO, G. 1992. Estudo do sistema de cruzamento de *Anadenanthera falcata* Benth., *Vochysia tucanorum* Mart. e *Xylopia aromática* Baill. Em área de cerrado. **Revista Brasileira de Sementes** 14 (1) 93-96.

COUTO, D. R. **Plano de Manejo da Área de Relevante Interesse Ecológico, Laerth Paiva Gama**. p. 252, 2013.

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

SOUZA, L.C.; JÚNIOR, A.L. SILVA; SOUZA, M.C; KUNZ, S.H.; MIRANDA, F.D.. Genetic diversity of *Plathymenia reticulata* Benth. in fragments of Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Genetics and molecular research**, v. 16, p. 1, 2017.

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

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

DARIO, A. O.; PAULA, M. F. B.; PIMENTA, M. A. S.; BRAGA, R. F.; FERREIRA, M. F. M.; RODRIGUES, L. A. **Variabilidade genética de populações de fava d'anta**. R. **Árvore**. Viçosa-MG, v.32, n.2, p.355-363, 2008.

DIAS, F. T. C.; BERTINI, C. H. C. M.; SILVA, A. P. M.; CAVALCANTE, J. J. V. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR, Fortaleza, CE. **Revista Ciência Agronômica**, v. 46, n. 3, p. 563-572, 2015.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/solos/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094003/sistema-brasileiro-de-classificacao-de-solos> >. Acesso: 09 Set. 2018.

EPPERSON, B. K. **Geographical Genetics**. Princeton University Press, New Jersey. 2003.

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

EWERS, R. M.; DIDHAM, R. K. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biological Reviews**. Oxford, v. 81, p. 117-142, 2006.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.** v. 34, p. 487-515, 2003.

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

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

FERREIRA, M. F. M. **Análises genéticas de *Annona crassiflora* (Annonaceae): implicações para conservação da espécie**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2011.

FERNANDES, J. P. P.; HOLANDA, A. C.; ALVES, A. R.; SILVA, L. G. C.; BEZERRA, M. R. **Desenvolvimento inicial de *Anadenanthera colubrina* (vell) em diferentes tamanhos de recipientes**. Apresentado no Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia 29 de agosto a 1 de setembro de 2016 – Foz do Iguaçu, Brasil. CONTECC. 2016.

FUCHS, E. J.; HAMRICK, J. L. Spatial genetic structure within size classes of the endangered tropical tree *Guaiacum sanctum* (Zygophyllaceae). **American Journal of Botany**, v. 97, n. 7, p. 1200-1207, 2010.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE. Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica / Período 2015-2016. Relatório Final, **Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais**, São Paulo, 2016.

GRATIVOL, C.; MEDEIROS, C. F. L.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Reports**, v. 38, p. 4245-4256, 2011.

GEORGE, S.; SHARMA, J.; YADON, Y.L. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. **American Journal of Botany**, v. 96, p.2022–2030, 2009.

GIMENES, M. R.; ANJOS, L. Efeitos da fragmentação florestal sobre as comunidades de aves. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, Maringá, v. 25, n. 2, p.391-402. 2003.

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

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

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

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

GUPTA, S. K.; BANSAL, R.; GOPALAKRISHNA, T. Development and characterization of genic SSR markers for mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Euphytica**, v. 195, n. 2, p. 245-258, 2014.

HARTL, D. L.; CLARCK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. Artmed. 4^a ed, p. 660, 2010.

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

HASSANPOUR, H.; HAMIDOGHLI, Y.; SAMIZADEH, H. Estimation of genetic diversity in some Iranian cornelian cherries (*Cornus mas* L.) accessions using ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 48, p. 257-262, 2013.

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

KATI, V. et al. Hotspots, complementarity or representativeness? Designing optimal small-scale reserves for biodiversity conservation. **Biological Conservation**, v. 120, p.471-480, 2004.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **IPEF**. v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

KÖPPEN, W. Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra. **Fondo de Cultura Econômica**. México. p. 479, 1948.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. **Psychometrika**, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964.

KUMAR, P., GUPTA, V, K., MISRA, A. K., D. R. MODI, D. R.; PANDEY, B. K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. **Plant Omics**, v. 2, n. 4, p.141- 162, 2009.

LAGE, C. **Estrutura e florística do estrato lenhoso do gradiente borda interior de um fragmento florestal no Município de Guaçuí-ES.** 2012. 59f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2012.

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

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

LIRA NETO A. C. **Caracterização genética de espécies de Croton (Euphorbiaceae) ocorrentes no Nordeste Brasileiro.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2011.

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

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasi, 4 ed. Nova Odessa. **Instituto Pantarum**. 2002.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4 ed. São Paulo: **Instituto Plantarum**. 384 p. v.2.2009.

LORENZONI, L. S. **Estrutura do compartimento arbóreo da Reserva Legal do Pólo de Educação Ambiental do Ifes Campus de Alegre.** Monografia (Ciências Biológicas) – Instituto Federal do Espírito Santo. Alegre – ES. Orientador: Jéferson Luiz Ferrari. 2013.

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.

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

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

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

MEDEIROS, R. L. S; et al. Fenologia de *Anadenanthera colubrina* (vell.) brenan em fragmento de floresta ombrófila aberta na paraíba. **ACSA**, Patos-PB, v. 13, n. 1, p. 35-40, 2017.

MENDONÇA, G.S. Uso de SIG no zoneamento agroecológico de pequena escala para *Araucaria angustifolia*, *Hymenaea courbaril* e *Myrcarpus frondosus* para a Bacia Hidrográfica do Rio Itapemirim - ES. In: **XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**. INPE Anais, p. 1741-1748. 2007.

MELO, A. T. O. **Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica**. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás; Goiânia, 2012

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

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E.M.F. Use and traditional management of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan in the semi-arid region off northwestern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. v.2, n. 6, 2006.

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

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal). Mata Atlântica: patrimônio nacional dos brasileiros. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Brasília: **MMA**, p. 13-25, 2010.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal). **O desafio da mata atlântica**. 2016. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/component/k2/item/10694-o-desafio>>. Acesso 15 abril de 2018.

NEPOMUCENO, C. F.; RIOS, A.P.S.; QUEIROZ, S. R. O. D. Controle da Abscisão foliar e morfogênese In Vitro em Culturas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, vol 31, p. 967-975, 2007.

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

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

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

OCELÁK M., HLÁSNÁ C. P., VIEHMANNOVÁ I., DVORAKAVÁ Z., HUANI D.C. Genetic diversity of *Plukenetia Volubilis* L. assessed by ISSR markers. *Scientia Agriculturae Bohemica*. v. 46 n.4. p. 145–153, 2015.

OLIVEIRA, M.S.P.; AMORIM, E.P.; SANTOS, J.B. dos; FERREIRA, D.F. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 6, p.1.645-1.653, 2007.

OUSÁ, G. A. et al. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

PRECZENHAK, A. P. **Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate**. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

RAJEEV, K; VARSHNEY, B; THUDI, M.; RAMEH, K. A.; ANDREA, B. Genic molecular markers in plants-development and applications. **International Crops Research Institute for the Semi- Arid Tropics (ICRISAT)**, Patancheru, v. 2, p. 13-29, 2007.

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

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, v. 128, p. 9-17, 2002.

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

RODRIGUES, A. C. C.; OSUNA J. T. A. Mudanças morfológicas em sementes na espécie de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan), em diferentes condições ambientais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 14, p. 35-36, 2004.

ROCHA, A.; SALOMÃO, L.C.C.; SALOMÃO, T.M.F.; CRUZ, C.D.; SIQUEIRA, D.L. Genetic Diversity of ‘Ubá’ Mango Tree Using ISSR Markers. *Molecular Biotechnology*, Totowa, v. 50, n. 2, p. 108- 113, 2012.

RODRIGUES, R. R.; MARTINS, S. V.; GANDOLFI, S. (Eds.). High diversity forest restoration in degraded areas: methods and projects in Brazil. New York: **Nova Science Publishers**. p. 286, 2007.

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

ROGALSKI, J. M.; BERKENBROCK, I. S.; REIS, A.; REIS, M. S. Sucessão e diversidade como fundamentos básicos na restauração ambiental. In: VI Simpósio Nacional e Congresso Latino-americano de Recuperação de Áreas Degradadas. Curitiba. Anais do VI Simpósio Nacional e Congresso Latino americano de Recuperação de Áreas Degradadas. Curitiba: **SOBRADE**, p. 433-439. 2005.

SAFAEI M.; SHEIDAI M.; ALIJANPOOR B.; NOORMOHAMMDI Z. Species delimitation and genetic diversity analysis in *Salvia* with the use of ISSR molecular markers. **Acta Bot. Croat.** v. 75, p. 45–52, 2016.

SANTANA, J. G. S.; NASCIMENTO, A. L. S.; COSTA, T. S.; ALMEIDA, T. M. B.; RABBANI, A. R. C.; SILVA, A. V. C. Estimation of genetic diversity in a natural population of Cambuí tree (*Myrciaria tenella* O. Berg) using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1-11, 2016.

SANSEVERO, J. B. B.; PIRES, J. P. A.; PEZZOPANE, J. E. M. Caracterização ambiental e enriquecimento da vegetação de áreas em diferentes estágios sucessionais (pasto, borda, clareira e floresta). **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**. Ano IV, n. 07, 2006.

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

SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low level of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**. v. 106, n. 1, p. 134-145, 2011.

SEMA. **Secretaria do Meio Ambiente. Mata Atlântica**. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br/>. Acesso em: 23 maio. 2017.

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

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

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

SOARES, F. S. et al. Diversity and genetic structure of mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), a fruit species from Cerrado. **Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal**, v. 38, n. 4, p. 2479, 2017.

SOUZA-SOBREIRA, F. B. et al. Genetic diversity in three natural populations of *Pitcairnia flammaea* (L.) John (Bromeliaceae) estimated by ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p.15892-15901, 2015.

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

TACUATIÁ, L. O.; EGGERS, L.; KALTCHUK-SANTOS, E.; SOUZA-CHIES, T. T.; Population genetic structure of *Sisyrinchium micrathum* Cav. (Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v.1, n.35, p.99-105, 2012.

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

TROPICOS.ORG. **Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/13015659>>. Acesso em: 13 Abr. 2018.

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

VELEZ, P.; QUINTERO, C. A.; MERINO, G.; GASCA-PINEDA, J.; GONZÁLEZ, M. C. An ISSR-based approach to assess genetic diversity in the marine arenicolous fungus *Corollospora maritime* sensu lato. **Mycoscience**, v. 57, p. 187-195, 2016.

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

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

YU, H. H. et al. Genetic diversity and relationship of endangered plant *Magnolia officinalis* (Magnoliaceae) assessed with ISSR polymorphisms. **Biochemical Systematics and Ecology**, China, v. 39, p. 71-78, 2010.

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

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, v.16, p.97-159, 1931.

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

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

APÊNDICE - Descrição das 120 árvores matrizes selecionadas para as análises moleculares. Número da Matriz; H: Altura; DAP: Diâmetro à altura do peito; Estado Reprodutivo; Posição da Paisagem; Condição de Luminosidade; Coordenadas; Altitude. Indivíduos coletados na área da Rosal – Guaçuí referem-se as sequências de 1 a 40, indivíduos coletados em área particular em Jerônimo Monteiro 41 a 80, os coletados em ARIE– Alegre representam-se do 81 ao 96 e os coletados na área do IFES - ALEGRE são representados pelos números de 97 a 120.

(Continua)

Nº Matriz	H (m)	DAP (cm)	Est. Reprodutivo	P. Paisagem	C. Luminosidade	Coord.	Alt. (m)
1	22	76,5	Fruto dispersado	Terço Inferior	Interior da Floresta	S 20 45' 38.5" / W 041 32' 03.6"	462
2	18	34	Fruto dispersado	Terço Superior	Interior da Floresta	S 20 53' 36.2" / W 041 42' 39.1"	607
3	22	36	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 24.7" / W 041 42' 22.6"	480
4	17	59	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 36.4" / W 041 42' 38.0"	539
5	24	55,5	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 36.5" / W 041 42' 38.1"	545
6	22	35	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 35.9" / W 041 42' 38.0"	550
7	20	54	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 36.3" / W 041 42' 39.5"	562
8	22	68	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 37.0" / W 041 42' 39.2"	565
9	18	46	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 37.1" / W 041 42' 39.2"	569
10	12	24	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 37.3" / W 041 42' 39.6"	573
11	13	43	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 37.4" / W 041 42' 39.3"	577
12	16	47	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 38.4" / W 041 42' 39.2"	580
13	19	59	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 36.2" / W 041 42' 41.6"	592
14	18	16	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 36.0" / W 041 42' 42.4"	595
15	23	78	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 36.0" / W 041 42' 43.2"	590
16	24	16	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20 53' 35.7" / W 041 42' 42.4"	599
17	24	50,5	Fruto Dispersado	Terço Superior	Interior da Floresta	S 20 53' 35.8" / W 041 42' 42.3"	600
18	16	20	Fruto Dispersado	Terço Superior	Interior da Floresta	S 20 53' 35.3" / W 041 42' 41.9"	604
19	22	59	Fruto Dispersado	Terço Superior	Interior da Floresta	S 20 53' 34.9" / W 041 42' 42.4"	605
20	27	48	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 24.5" / W 041 42' 38.1"	549
21	27	54	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 24.7" / W 041 42' 38.6"	551

(Continuação)

22	24	73	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 25.0" / W 041 42' 38.0"	550
23	18	37	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 22.2" / W 041 42' 37.1"	562
24	20	41	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 24.1" / W 041 42' 39.0"	568
25	20	19	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 25.9" / W 041 42' 38.9"	581
26	28	50	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 26.4" / W 041 42' 30.2"	589
27	12	39	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 27.0" / W 041 42' 30.1"	594
28	25	45	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 27.1" / W 041 42' 30.2"	596
29	24	62	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da Floresta	S 20 53' 37.1" / W 041 42' 39.2"	569
30	22	23	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 27.4" / W 041 42' 30.2"	605
31	26	66	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 26.2" / W 041 42' 29.6"	610
32	26	52	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 26.2" / W 041 42' 28.0"	616
33	23	45	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 26.7" / W 041 42' 28.1"	641
34	22	43	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 26.5" / W 041 42' 28.2"	643
35	26	62	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 26.2" / W 041 42' 27.9"	618
36	24	37	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 25.2" / W 041 42' 26.2"	619
37	27	52	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 25.1" / W 041 42' 25.5"	624
38	24	51	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 25.7" / W 041 42' 25.5"	624
39	24	52	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 26.0" / W 041 42' 25.6"	625
40	22	48	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da Floresta	S 20 53' 26.1" / W 041 42' 25.3"	627
41	8	37,1	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da clareira	S 20° 47' 23.4" / W 041° 23' 19.8"	117
42	7,5	48,8	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da clareira	S 20° 48' 14.3" / W 041° 21' 53.5"	124
43	7,5	28	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da clareira	S 20° 48' 14.3" / W 041° 21' 53.4"	128
44	9	28,8	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da clareira	S 20° 48' 14.0" / W 041° 21' 53.5"	134
45	8	22,4	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da clareira	S 20° 48' 14.0" / W 041° 21' 53.3"	145
46	9	31	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da clareira	S 20° 48' 14.7" / W 041° 21' 53.9"	153
47	14	43,6	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da floresta	S 20° 48' 17.2" / W 041° 21' 54.3"	163
48	20	42,3	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da floresta	S 20° 48' 16.7" / W 041° 21' 53.7"	166
49	22	33	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da floresta	S 20° 48' 16.8" / W 041° 21' 53.7"	167
50	22	40.2	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da floresta	S 20° 48' 17.2" / W 041° 21' 53.1"	166

(Continuação)

51	19	22	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da floresta	S 20° 48' 16.6" / W 041° 21' 52.8"	167
52	19	26	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da floresta	S 20° 48' 16.7" / W 041° 21' 52.8"	169
53	19	46	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da floresta	S 20° 48' 16.3" / W 041° 21' 53.1"	169
54	22	19	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da floresta	S 20° 48' 16.6" / W 041° 21' 53.2"	173
55	24	38,5	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da floresta	S 20° 48' 16.4" / W 041° 21' 53.2"	193
56	24	56	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da floresta	S 20° 48' 16.4" / W 041° 21' 53.5"	196
57	26	46,4	Fruto dispersado	Terço Médio	Borda da floresta	S 20° 48' 16.5" / W 041° 21' 53.5"	196
58	27	49,3	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 45' 41.8" / W 041° 32' 12.2"	106
59	26	22,5	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 45' 18.5" / W 041° 21' 54.5"	110
60	24	19	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 18.6" / W 041° 21' 54.2"	131
61	18	19	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 16.2" / W 041° 21' 55.7"	154
62	19	19,5	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 16.1" / W 041° 21' 55.7"	158
63	23	65,3	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 15.6" / W 041° 21' 56.1"	167
64	24	43,5	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 15.3" / W 041° 21' 56.4"	171
65	20	28	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 15.0" / W 041° 21' 56.7"	175
66	36	54,5	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 14.7" / W 041° 21' 57.2"	180
67	22	19	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 14.4" / W 041° 21' 57.3"	184
68	24	19	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 14.4" / W 041° 21' 57.8"	189
69	22	38,5	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 14.9" / W 041° 21' 58.0"	191
70	20	19	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 14.7" / W 041° 21' 58.8"	194
71	36	55	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 14.8" / W 041° 21' 58.9"	196
72	18	19	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 14.8" / W 041° 21' 59.3"	196
73	22	32	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 14.7" / W 041° 21' 59.6"	197
74	22	35	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 14.6" / W 041° 22' 00.1"	199
75	24	46	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 14.7" / W 041° 22' 00.9"	197
76	16	27	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 14.8" / W 041° 22' 00.8"	196
77	16	19	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 14.3" / W 041° 22' 01.1"	197
78	19	25	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 09.4" / W 041° 21' 59.9"	177
79	18	28,5	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 10.7" / W 041° 21' 55.8"	169

(Continuação)

80	22	32,5	Fruto dispersado	Terço Superior	Borda da floresta	S 20° 48' 11.3" / W 041° 21' 53.6"	169
82	17	27	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 04.8" / W 041° 31' 57.3"	238
83	18	27,1	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 01.8" / W 041° 32' 58.4"	243
84	17	19	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 02.1" / W 041° 32' 59.5"	245
85	18	16	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 01.1" / W 041° 33' 00.4"	343
86	9	9	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 01.6" / W 041° 33' 01.0"	355
87	14	16	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 01.4" / W 041° 33' 03.9"	349
87	17	27	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 01.6" / W 041° 33' 04.1"	357
89	17	21,2	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 01.0" / W 041° 33' 05.8"	361
90	19	21,8	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 01.0" / W 041° 33' 08.1"	386
91	12	11,9	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 01.2" / W 041° 33' 10.7"	403
92	12	12,6	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 02.4" / W 041° 33' 12.1"	413
93	16	12	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 01.3" / W 041° 32' 54.1"	301
94	25	16	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 01.2" / W 041° 33' 11.9"	393
95	26	18	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 01.1" / W 041° 33' 11.4"	393
96	32	27	Fruto dispersado	Terço Médio	Clareira	S 20° 46' 00.6" / W 041° 33' 03.3"	341
97	22	34	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 21' 46.7" / W 041° 28' 16.3"	144
98	17	37	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 52.4" / W 041° 27' 56.5"	142
99	24	32	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 52.5" / W 041° 27' 56.4"	146
100	12	27	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 52.7" / W 041° 27' 53.3"	157
101	25	12,5	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 52.0" / W 041° 27' 56.5"	170
102	17	16	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 51.9" / W 041° 27' 56.5"	173
103	18	27	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 52.0" / W 041° 27' 57.3"	178
104	12	21,2	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 51.9" / W 041° 27' 57.4"	185
105	32	21,8	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 50.4" / W 041° 27' 58.1"	185
106	18	13	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 51.2" / W 041° 27' 57.8"	187
107	18	12,6	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 51.4" / W 041° 27' 57.7"	188
108	22	10	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 38.6" / W 041° 30' 34.8"	194
109	17	12	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 51.2" / W 041° 27' 58.0"	193

(Conclusão)

110	23	16	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 48.3" / W 041° 27' 58.0"	207
111	28	18	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 51.1'' / W 041° 27' 57.9''	193
112	19	27	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 49.2'' / W 041° 27' 57.7''	209
113	17	34,5	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 49.5" / W 041° 27' 57.9"	211
114	17	33	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 50.4" / W 041° 28' 00.7"	205
115	26	27,6	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 50.5" / W 041° 28' 00.7"	201
116	27	32	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 50.4" / W 041° 27' 59.9"	202
117	26	26,4	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 50.8" / W 041° 27' 59.9"	200
118	32	38	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 50.8" / W 041° 27' 59.9"	194
119	28	19,7	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 50.9" / W 041° 28' 01.6"	180
120	26	28	Fruto dispersado	Terço Médio	Interior da Floresta	S 20° 45' 51.6" / W 041° 28' 00.5"	219

ANEXO

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