



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

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Cabralea canjerana*
(Vell.) Martius NO ESPÍRITO SANTO**

Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis

Alegre, ES
Fevereiro de 2015

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

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Cabralea canjerana*
(Vell.) Martius NO ESPÍRITO SANTO**

Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como partes das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de mestre em Genética e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda

**Alegre, ES
Fevereiro de 2015**

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

A848d Assis, Arícia Leone Evangelista Monteiro de, 1988-
Diversidade e estrutura genética em populações naturais de *Cabralea canjerana* (Vell.) Martius no Espírito Santo / Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis. – 2015.
76 f. : il.

Orientador: Fábio Demolinari de Miranda.

Coorientadores: Tatiana Tavares Carrijo.

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

1. Floresta Atlântica. 2. Paisagens fragmentadas. 3. Conservação genética. 4. Marcadores moleculares. I. Miranda, Fábio Demolinari. II. Carrijo, Tatiana Tavares. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDU: 575:631.52

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM
POPULAÇÕES NATURAIS DE *Cabralea canjerana*
(Vell.) Martius NO ESPIRÍTO SANTO**

ARÍCIA LEONE EVANGELISTA MONTEIRO DE ASSIS

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo como partes das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para obtenção do título de mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovada:



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



Profª. Drª. Sustanis Horn Kuhn
Universidade Federal do Espírito Santo



Profª. Drª. Tatiana Tavares Carrijo
Universidade Federal do Espírito Santo
(Co-orientadora)



Prof. Dr. Fábio Demolinari de Miranda
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientador)

“A luz que me guia é mais forte que os
olhos que me cercam”

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas alegrias proporcionadas e por estar sempre presente, me auxiliando na superação dos momentos mais difíceis e por mais uma dádiva alcançada em minha vida;

À minha família, meu pai Nelson Monteiro de Assis, minha mãe Rosemara Leone Evangelista e minha irmã Marina Leone E.M. de Assis, que sempre me apoiou e acreditou no meu potencial, sem eles eu não chegaria tão longe;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo, por ter concedido a oportunidade de cursar o mestrado e desenvolver este trabalho;

A Reserva Natural Vale e a todos os seus gestores e funcionários que propiciaram o desenvolvimento do projeto e, além disso, toda a atenção e auxílio sempre que possível. Agradecer também a bolsa concedida no início do desenvolvimento do projeto;

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) e à administração do Parque Nacional do Caparaó por disponibilizarem a autorização desta pesquisa nos domínios do parque.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para este estudo por meio do Projeto Universal CNPq nº 475471/2011-3, intitulado Diversidade Biológica e Funcional da Floresta Ombrófila Densa do Parque Nacional do Caparaó, Espírito Santo;

Ao professor Fábio Demolinari de Miranda pelos ensinamentos, preciosas orientações, oportunidade, confiança, paciência e efetiva participação no decorrer do curso;

A minha Co-orientadora, Tatiana Tavares Carrijo pelas valiosas contribuições, preciosas orientações e ensinamentos e a seu esposo Mario L. Garbim por todas as contribuições na conclusão desse trabalho;

A todos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular que me ajudaram no desenvolvimento do meu projeto. Em especial a professora Tais Cristina Bastos Soares que me concedeu o espaço para o desenvolvimento do estudo.

A professora Sustanis Horn Kunz por toda atenção e pelas contribuições no trabalho;

Aos amigos em especial Clemilton Alves e Anderson Barros pela amizade confiança e pelos momentos de alegria, parceria e boa convivência no decorrer dessa jornada;

Aos amigos do curso de mestrado que dividiram comigo todas as alegrias e tristezas no decorrer do curso;

Aos colegas a efetiva participação no desenvolvimento desse projeto;

À secretaria do programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento na pessoa da Sabrina Furtado, pela sua dedicação;

Finalmente, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Descrição, ocorrência e potencialidades da <i>Cabralea canjerana</i>	13
2.2. Importância do estudo de morfologia foliar em espécies arbóreas	16
2.3. Fragmentação Florestal e perda da variabilidade genética.....	17
2.4. Análise da diversidade e estrutura genética com base no uso de marcadores moleculares ISSR	20
2.5 Marcação de Matrizes	25
2.6 A matriz florestal no contexto da restauração de áreas degradadas	28
3. OBJETIVO GERAL:.....	31
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1 Área de estudo.....	32
5.2 Análise dos dados Morfológicos.....	34
5.3 Extração do DNA	35
5.4 Amplificações ISSR.....	37
5.5 Análise dos dados moleculares.....	39
6. RESULTADOS	41
6.1 Análises Morfológicas	41
6.2 Análises Moleculares	46
6.3 Diversidade Intrapopulacional.....	48
6.4 Diversidade Interpopulacional.....	52
6.4.1 Entre 3 populações	52
7. DISCUSSÃO.....	54

8. CONCLUSÕES.....	58
9. REFERÊNCIAS.....	59

RESUMO

Como consequência do processo de fragmentação da Floresta Atlântica e do corte seletivo a variabilidade genética das espécies arbóreas tem se tornado cada vez mais comprometida. Dentre estas espécies arbóreas, a *Cabralea canjerana* encontra-se ameaçada pela redução da variabilidade genética de suas populações naturais. Desta forma, torna-se necessário a existência de programas mais efetivos para a conservação dessa espécie. Diante disso, este estudo objetivou caracterizar a diversidade e estrutura genética de populações de *C. canjerana* em remanescentes florestais de duas regiões no estado do Espírito Santo por meio de marcadores moleculares *Inter Single Sequence Repeats* (ISSR) e paralelamente realizou-se análise da morfologia foliar, com intuito de obter as variáveis mais representativas para os indivíduos coletados. Na análise morfológica, após a retirada dos *outliers*, em relação ao eixo 1 (59%) na ordenação as características de peso da massa seca do pecíolo (PMSP), comprimento do pecíolo (CP) e peso da massa seca do folíolo (PMSF) foram as variáveis mais representativas para os indivíduos da Reserva Natural Vale. Para os indivíduos do Caparaó as variáveis foram peso da massa seca da raque (PMSR) e área foliar (AF). Esses fatores podem ser explicados pelas interações genótipo ambientes. Na análise molecular foram utilizados 10 *primers* em 46 indivíduos de 3 populações distintas, obtendo-se 73 fragmentos polimórficos que serviram de bases para as análises de diversidade intrapopulacional e interpopulacional. Os resultados indicam altos níveis de diversidade genética de acordo com os valores do Índice de Shannon, os quais foram: Reserva Natural Vale - 0,31, Vale do Calçado - 0,44 e Vale do Santa Marta - 0,42. Na análise do índice global o valor foi de 0,475. A AMOVA mostrou que a maior parte da diversidade ocorre dentro das populações (73%). Na comparação das três populações, avaliadas por uma abordagem bayesiana, o número correto de grupos genéticos baseando na taxa de mudança no $\ln(k)$, estatística ΔK , indicou uma convergência para três grupos ($K=3$). O fluxo gênico foi de 0,676, considerado um valor baixo, fato que sustenta a formação dos três grupos bayesianos e estruturação das populações.

Palavras-chave: *Floresta Atlântica, fragmentação, conservação genética, marcadores moleculares.*

ABSTRACT

As a result of the fragmentation of the Atlantic Forest and the selective cutting process the genetic variability of tree species has become increasingly compromised. Among these tree species, the *Cabralea canjerana* species threatened by reduced genetic variability of their natural populations. It is necessary to the existence of more effective programs for the conservation of this species. Thus, this study aimed to characterize the genetic diversity and structure of species populations in forest remnants in two protected areas in the state of the Holy Spirit through molecular markers of type Inter Single Sequence Repeats (ISSR) and was held parallel analysis of leaf morphology, aiming to obtain the most representative variables for individuals collected in two different vegetation type. In the morphological analysis, after the removal of outliers in respect to the axis 1 (59%) in order to weight characteristics of the dry mass of the petiole (PMSF), petiole length (SL) and the weight of the dry mass of leaves (PMSF) were the most representative variables for individuals Reserve already worth for individuals Caparaó variables were weight of the dry mass of the rachis (PMSR) and leaf area (LA). These factors can be explained by genotype interactions environments. In the molecular analysis used primers 10 in 46 individuals of three different populations, yielding 73 polymorphic fragments that served as the basis for the analyzes and inter-intra-population diversity. The results indicate high levels of genetic diversity in accordance with the values of the Shannon Index, which were: Vale Reservation, 0.31, Footwear Valley, 0.44 and 0.42 Valley of Santa Marta. In the overall index analysis the value was 0.475. The AMOVA most diversity occurs within populations (73%). The correct number of groups, based on the rate of change in Ln (k), statistical ΔK , indicating a convergence to three Bayesian groups ($K = 3$). In comparing the populations of the three populations, gene flow was 0.676, considered a low value fact that supports the formation of the three Bayesian groups and structure of the population.

Keywords: Atlantic forest, fragmentation, genetic conservation, molecular markers.

1. INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica de acordo com Myers *et al.* (2000) é um dos biomas mais diversos e ameaçados do mundo, contemplando quatro principais formações fitogeográficas - Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Decidual e Floresta Estacional Semidecidual - e ecossistemas associados, além de apresentar elevadas taxas de endemismo, o que a leva ao status de *hotspot* de diversidade. Entretanto, é o bioma brasileiro mais severamente afetado pela fragmentação do ambiente natural, restando atualmente apenas uma pequena parte de sua área original. A devastação é um reflexo direto da exploração desordenada de seus recursos naturais, principalmente madeireiros, e da sua ocupação (BARBOSA, 2006).

De acordo com Giordane (2012), embora a Floresta Atlântica apresente historicamente evidências de fragmentação natural, a ação antrópica mostrou-se determinante para o atual estado de devastação deste bioma, como sinalizado por Rodrigues & Gandolfi (2007), ao afirmarem que essa fragmentação é devido aos sucessivos ciclos de uso do solo e também à pressão pelo crescimento populacional. Devido a séculos de perturbação, este bioma foi reduzido a 300 mil quilômetros quadrados de área florestal altamente fragmentada (MMA, 2009), resultando em porcentagens entre 11 e 16% de mata remanescente no país, incluindo fragmentos menores que 100 hectares (RIBEIRO *et al.*, 2009), com baixa resiliência e cuja restauração ecológica poderia levar anos (LIEBSCH *et al.*, 2008).

Neste cenário de fragmentação, no estado do Espírito Santo destacam-se áreas protegidas como a Reserva Natural Vale (RNV) e o Parque Nacional do Caparaó (PARNACAPA). A RNV constitui a segunda maior reserva de Mata de Tabuleiros do estado (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE 2005), abrangendo os municípios de Linhares e Jaguaré, região norte do estado. O Parque Nacional do Caparaó, uma Unidade de Conservação (UC) que se encontra situada na região sudoeste do Espírito Santo, fazendo divisa com o estado de Minas Gerais. Segundo o sistema de classificação empregado pelo IBGE (1988) a região do Parque é composta dos seguintes tipos de vegetação: floresta perenifolia higrófila costeira, floresta subcaducifolia tropical, vegetação litorânea e campos de altitude.

A Reserva (RNV) está inserida em uma das áreas de extrema importância biológica para a conservação da biodiversidade da Floresta Atlântica, assim como o Parque Nacional do Caparaó que foi intitulado pelo Ministério do Meio Ambiente (2002) como área de extrema importância para

conservação da biodiversidade. Apesar da devastação acentuada, a Floresta Atlântica abriga uma parcela significativa de diversidade biológica do Brasil, com altíssimos níveis de endemismo e com uma riqueza pontual tão significativa que um dos maiores recordes mundiais de diversidade botânica para plantas lenhosas foram registrados nesse bioma (MARTINI *et al.*, 2007; MITTERMEIER *et al.*, 2004).

Dentre as espécies arbóreas que ocorrem na Floresta Atlântica e nas duas áreas protegidas anteriormente citadas destaca-se a *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart., conhecida popularmente como “Canjerana”, pertencente à família Meliaceae. Sua madeira é considerada uma das mais valiosas dentre as espécies lenhosas brasileiras, devido à sua ótima qualidade e resistência ao ataque de organismos xilófagos (BACKES & IRGANG, 2002). Por apresentar características de importância econômica, as populações naturais desta espécie sofrem com o extrativismo inadequado por corte exacerbado para uso madeireiro. Este fato somado a intensa degradação de seu ambiente natural, pode levar a redução da variabilidade genética de suas populações naturais (KAGEYAMA & GANDARA, 1998).

Considerando o panorama descrito, a obtenção de informações que revelem os níveis de diversidade genética, bem como os processos que a mantém, tornam-se necessários quando se deseja praticar medidas conservacionistas (MELO, 2012). Conhecer e entender como a diversidade genética está estruturada no espaço geográfico contribui para o entendimento sobre a história evolutiva e a dinâmica populacional das espécies (CABALLERO *et al.*, 2010).

Neste sentido, a utilização de marcadores moleculares de DNA em estudos com espécies vegetais de ocorrência em áreas florestais é tida como referência, gerando conhecimento acerca da magnitude da diversidade genética existente em algumas destas populações e auxiliando aos conservacionistas, principalmente nas estimativas de parâmetros demográficos de populações ameaçadas (COLLEVATTI *et al.*, 2001).

Para este fim, os marcadores moleculares do tipo *ISSR* (Inter-Simple Sequence Repeat), se destacam como marcadores universais. Permitem a obtenção de estimativas das diferenças genéticas (polimorfismos) existentes entre indivíduos de uma mesma população, entre as populações e até mesmo entre espécies. Como são marcadores dominantes, fornecem uma abordagem flexível para estudar a variação de DNA e as informações geradas facilitam a compreensão dos padrões de distribuição da diversidade (NYMBOM, 2004).

Juntamente com a ferramenta molecular, outra forma de se analisar a diversidade e fornecer dados para sua conservação e programas de melhoramento de espécies arbóreas é a análise por

meio de caracteres morfológicos. As variações observáveis no fenótipo em espécies vegetais podem ser decorrentes tanto das propriedades genéticas da população, quanto da influência do ambiente na expressão de seus genótipos, o efeito fenotípico provocado pela interação entre o ambiente e o genótipo é dito plasticidade (BRADSHAW, 1965). Considerando a definição de plasticidade, a folha é o órgão da planta que por apresentar variações estruturais têm sido utilizados como indicador ambiental (DICKISON,2000). O conhecimento a respeito dessas características morfológicas está ganhando impulso nas áreas de agronomia e silvicultura, conservação, arqueobotânica e na interface entre evolução e ecologia nas comunidades e ecossistemas (HARGUINDEGURY, 2013).

Ainda no contexto de devastação da Floresta Atlântica, conhecer a diversidade morfológica e genética são de suma importância para questões conservacionistas das espécies arbóreas *in situ*. Por esse motivo, a conservação do pouco que sobrou e a restauração paralelamente daquilo que inadequadamente foi desflorestado, ou por uma questão legal ou pelas características do ambiente, se fazem necessárias e urgentes (KAGEYAMA & GANDARA, 1998).

Neste sentido, o presente trabalho objetivou, pela utilização de dados obtidos a partir da análise de marcadores moleculares, revelar o padrão de fluxo gênico e a magnitude da diversidade genética existente dentro e entre populações de *C. canjerana* spp. *canjerana* amostradas em três locais de coleta em áreas de Floresta Atlântica no Espírito Santo. Objetiva-se também, avaliar a diversidade morfológica foliar dos indivíduos com a intenção de saber quais os componentes principais que promovem a diferenciação dos mesmos nas duas distintas fitofisionomias. Assim, espera-se fornecer dados populacionais de uma espécie modelo de Floresta Atlântica e de importância econômica, para que ações eficientes de manejo, coleta e conservação possam ser elaboradas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Descrição, ocorrência e potencialidades da *Cabralea canjerana*

A espécie *Cabralea canjerana* (Vell.) Martius possui porte arbóreo ou arbustivo, de ocorrência Neotropical. De acordo com Barreiro & Souza (1986) no Brasil ocorrem em três subespécies: *Cabralea canjerana* ssp. *canjerana*, que apresenta porte arbóreo (até 40 m de altura) e ocorre em matas de galeria e florestas do norte ao sul do Brasil; *Cabralea canjerana* ssp. *selloi* (C.D.C.) Barr., com porte arbustivo (de 3 a 6m de altura), estando restritas às regiões continentais de solos pobres em climas quentes e secos e *Cabralea canjerana* ssp. *polytricha* (Adr. Juss.) Penn., que apresenta também porte arbustivo (de 3 a 6m de altura) e parece estar restrita às áreas de cerrado e campos dos estados de Minas Gerais e Goiás.



Figura 1. Mapa com registro de ocorrência das três subespécies de *Cabralea canjerana* na América Latina. Fonte: Barreiros & Souza, (1986); Pennington *et al.*, (1981) *apud* Melo, (2012).

Dependendo do local de ocorrência, *C. canjerana* é chamada de diversos nomes vulgares, tais como: canjerana, canjarana, caiarana, canjarana do litoral, canjerana de prego, cedro-canjerana, pau-de-santo. De acordo com Schussler (2006) o nome da espécie foi dado em homenagem a Pedro Álvares Cabral e significou aos colonizadores portugueses, já no século XVI, uma espécie de grande valor econômico, sendo reconhecida como madeira de lei. Sua madeira é considerada uma das mais valiosas dentre as espécies lenhosas brasileiras, devido à sua ótima qualidade e resistência ao ataque de organismos xilófagos (BACKES & IRGANG, 2002).

A canjerana é uma árvore que pode chegar aos 30 metros de altura, com 70 a 120 cm de diâmetro à altura do peito. As folhas são compostas paripenadas, com aproximadamente 50 cm de diâmetro, com uns 15-20 folíolos alternos; apresentam a face superior brilhante (Fig. 2 C), e glabra e a face inferior opaca com tufo de pelos nas axilas e nas nervuras secundárias (LORENZI, 1992). Apresentam inflorescências de tamanhos variados e flores com pedicelos curto-bracteados, corolas e tubos estaminais brancas e amarelos, respectivamente. As flores podem ser bissexuais ou unissexuais. Carmo (2005) esclarece que o sistema sexual da *C. canjerana* spp. *canjerana* é dioico. O fruto é globóide, levemente carnosos de cor vermelha (Fig. 2 A e B). As sementes, normalmente duas por lóculo, são envoltas por um arilo, carnosos e riquíssimo em lipídios (70,8%) (PIZO & OLIVEIRA, 2001).



Figura 2. Frutos de *Cabralea canjerana* ssp. *Canjerana* (A e B); Características da folha (C). Fotos: Arícia Leone E. M. de Assis.

A floração acontece no período de setembro a novembro, com pico no mês de outubro e o processo de frutificação dura aproximadamente um ano e ao final da tarde acontece a antese com a abertura das anteras depois da abertura das flores (FUZETO *et al.*, 2001) De acordo com Carmo (2005) a polinização acontece principalmente por mariposas da ordem Lepidóptera de diversas famílias, já a dispersão é realizada principalmente por aves (da espécie *Phyrrura frontalis*), morcegos, pequenos mamíferos e formigas. E a remoção do arilo, por formigas, no habitat natural aumenta significativamente a velocidade e o sucesso da germinação (PIZO & OLIVEIRA, 1998; CARMO, 2005).

C. canjerana ssp. canjerana é uma espécie adaptada a locais de abundância de água, embora possa ser encontrada em diversas condições físicas de solo, necessita de muita luz para seu desenvolvimento e ocorre mais frequentemente em terrenos planos e em chapadas, onde o escoamento da água se processa de forma mais lenta (SCHUSSLER, 2006). É uma espécie secundária tardia de acordo com Carvalho (1994). Em estudos com a plasticidade foram encontrados valores elevados de plasticidade fenotípica para diversos caracteres avaliados em *C. canjerana ssp. polytricha* (FUZETO & LOMÔNACO, 2000) e *C. canjerana ssp. canjerana* (SCHUSSLER, 2006).

A importância econômica da cajerana se dá devido às ótimas características comerciais de sua madeira, moderadamente pesada (0,65-0,75 g cm³) e caracteriza-se pela resistência a umidade e aos agentes degradantes (LORENZI, 1998) é utilizada para diversos fins, como construções civis, dormentes, marcenaria, tábuas, moirões e carpintaria. Além da madeira, a canjerana também possui propriedades oleoquímicas com efeitos medicinais, dentre eles a utilização em pesquisas contra o câncer e a AIDS (SOARES *et al.*, 2004). Carneiro (2009) relata que os caules dessa espécie são utilizados no tratamento a distúrbios causados na pele e no tecido subcutâneo pelas populações tradicionais.

Além disso, a espécie é de grande importância na composição de reflorestamento heterogêneo ou recuperação de áreas de preservação permanente (LORENZI, 1998). Em consequência da intensa degradação de seu ambiente natural e dado o corte exacerbado para uso madeireiro, a espécie encontra-se ameaçada, restando hoje apenas uma pequena fração de suas populações naturais (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO, 1996). A agressividade pronunciada da canjerana sobre capoeiras e matas secundárias no sul do Brasil, foi relatada por Reitz *et al.* (1988) demonstrando um grande potencial de regeneração e de dinamismo nas associações secundárias, fato muito importante na silvicultura com espécies nativas.

2.2. Importância do estudo de morfologia foliar em espécies arbóreas

Entre as espécies nativas arbóreas consideradas promissoras e potenciais para o reflorestamento de várias regiões brasileiras, de acordo com CARVALHO (1994) encontram-se a canjerana (*Cabralea canjerana* subsp. *canjerana* - Meliaceae). Como no caso da *Cabralea canjerana*, as espécies madeireiras promissoras apresentam as seguintes características: a) valor econômico comprovado, com produção de madeira valiosa; b) desempenho silvicultural aceitável e c) aptidão para programas de regeneração induzida (CARVALHO, 1996).

Rêgo (2001), afirma que informações sobre o comportamento silvicultural de espécies nativas promissoras e potenciais são insuficientes e a literatura pertinente apresenta informações parciais sobre elas, restritas à descrição da espécie, sua importância, área de ocorrência natural, fenologia, características da semente, tentativas de produção de mudas e alguns dados sobre os plantios florestais. Torna-se, portanto, necessário o desenvolvimento de estudos sobre as espécies nativas com potencialidades para programas de reflorestamento, com finalidade econômica ou conservacionista (SCALON & ALVARENGA, 1993). Nesse sentido, estudos sobre a diversidade molecular e morfológica corroboram para obtenção de maiores informações sobre as espécies.

Como já mencionado, a silvicultura de espécies nativas carece de informações básicas, as quais são de fundamental importância para a compreensão do comportamento das plantas, em relação às diversas variações ambientais. O conhecimento da aptidão natural de cada espécie é fator fundamental para o desenvolvimento de uma silvicultura mais adequada e que leve em consideração a biologia de cada espécie. Nesta dinâmica, os fatores abióticos servem como importantes filtros ambientais, pois a estrutura das plantas é comumente afetada pelos diversos fatores ambientais e as variações resultantes desta interação são expressas na sua morfologia e anatomia (BOEGER *et al.*, 2008). Tais variações levam as espécies a expressar uma variedade de formas que caracterizam a plasticidade morfológica (KOZLOWSKI & PALLARDY, 1997).

Estão associadas à plasticidade morfológica, principalmente, mudanças anatômicas e fisiológicas na folha (KLICH, 2000), uma vez que esse órgão é o mais suscetível às alterações ambientais (DICKISON, 2000). Dickison (2000) afirma que as plantas respondem à disponibilidade de luz e água, concentração de nutrientes no solo, tipo de relevo, altitude, clima, entre outros e a influência destes fatores ambientais contribui para a grande diversidade vegetal e, conseqüentemente, para a distribuição das espécies nos diferentes biomas.

Sob influência de diferentes fatores ambientais, muitas espécies de plantas desenvolvem diversas estratégias, representadas por características morfológicas, anatômicas e fisiológicas, para se manterem e se propagarem nos mais variados ambientes (SULTAN, 2003). Neste contexto, as alterações foliares têm sido estudadas como indicadoras ambientais (MARQUES *et al.*, 1999). Ravem (2007) afirma que em muitas espécies, folhas que crescem sob altas intensidades luminosas (folhas de sol) geralmente são menores e mais espessas do que as folhas que se desenvolvem em ambientes de menor intensidade luminosa (folhas de sombra). Neste caso, a habilidade que as plantas possuem em alterar caracteres fenotípicos em resposta ao ambiente pode contribuir para a sua estabilidade funcional, em especial, quando a plasticidade fenotípica age sobre caracteres ligados à sobrevivência, tornando-se uma ferramenta muito importante para sua adaptação (REIS, 2003).

Devido a isso, para a compreensão da plasticidade de adaptação de determinada espécie submetida às condições ambientais diferentes, o estudo da morfologia foliar torna-se importante, visto que, são características diretamente ligadas ao crescimento da planta e a sua sobrevivência em ambientes distintos (LIMA JR. *et al.*, 2006). A plasticidade fenotípica pode ser considerada um mecanismo gerador de variabilidade fenotípica e, uma vez que a seleção natural age sobre fenótipos, cria oportunidades para que mudanças genéticas ocorram. Partindo desse pressuposto, espécies com grande potencial para plasticidade em caracteres ligados à sobrevivência apresentam vantagens adaptativas em ambientes instáveis, heterogêneos ou de transição, visto que as mudanças produzidas podem facilitar a exploração de novos nichos.

2.3. Fragmentação Florestal e perda da variabilidade genética

O processo global de fragmentação de habitat é, possivelmente, a mais profunda alteração causada pelo homem ao meio ambiente. A Floresta Atlântica é bioma brasileiro mais severamente afetado, esse fato é um reflexo direto da exploração desordenada de seus recursos naturais, principalmente madeireiros e da sua ocupação (BARBOSA, 2006).

A fragmentação ambiental segundo Korman (2003) é definida, do ponto de vista da conservação biológica, como sendo a separação ou desligamento não natural de áreas amplas, com diferentes tamanhos, forma, grau de isolamento, tipos de vizinhança e histórico de perturbações, comprometendo a conservação da biodiversidade. Viana (1995) define fragmento florestal como qualquer área de vegetação natural contínua, interrompida por barreiras antrópicas (estradas, culturas agrícolas, etc.) ou naturais (lagos, formações rochosas, etc.) capazes de diminuir significativamente o fluxo de animais, pólen e/ou sementes.

Estas quebras na continuidade da distribuição da vegetação original além de reduzir o habitat disponível para animais silvestres e plantas, propicia a formação de bordas na paisagem que anteriormente era contínua. Esse processo pode levar a redução no tamanho efetivo (N_e) de populações naturais, a perda de habitat e as alterações nas interações ecológicas e nos processos reprodutivos de várias espécies, resultando, posteriormente, em modificações nos padrões de diversidade e na dinâmica das comunidades (SILVA *et al.*, 2007). Para Young *et al.* (1996) no caso das plantas os efeitos da fragmentação se tornam mais agravados devido às características de hábito sésil. Além disso, as plantas possuem grande diversidade de sistemas reprodutivos, com possibilidade de fluxo gênico através da dispersão de pólen e semente, ambos suscetíveis aos efeitos da fragmentação. O mesmo ocorre com os agentes de polinização, que também podem ser afetados pela fragmentação (YOUNG *et al.*, 2001).

A redução do tamanho populacional intensifica a endogamia e os efeitos da deriva genética, levando a perda da variação genética pela perda da heterozigosidade e de alelos de baixa frequência (WHITE *et al.*, 1999). Conte (2004) complementa a ideia ao descrever que estes processos de alteração ambiental causam erosão da variabilidade genética e intensifica a divergência interpopulacional devido ao aumento da deriva, das taxas de endogamia e da redução do fluxo gênico.

Como já mencionado o processo de fragmentação exerce influência direta na composição genética de uma população visto que uma população submetida a estas condições sofre ação de uma série de fatores genéticos e estocásticos (CABALLERO *et al.*, 2010). A diminuição do número de indivíduos de uma população, como consequência do processo de fragmentação, faz com que a população remanescente tenha um tamanho menor que o mínimo adequado (N_e mínimo) para que a mesma possa ter sua normal continuidade e evolução. Em curto prazo, nessa população pequena pode ocorrer deriva genética, o que significa ter as frequências de seus genes afastadas daquelas da população original, inclusive podendo ocorrer a perda alelos. Em longo prazo, ainda pode ocorrer um aumento da endogamia, decorrente da maior probabilidade de autofecundação e acasalamento entre indivíduos aparentados (KAGEYAMA & GANDARA, 1998). Segundo White *et al.* (1999), este fato pode ser interpretado como a limitação do potencial evolutivo de uma população e/ou espécie, reduzindo a viabilidade da espécie a se adaptar às mudanças ambientais.

Atuando na via contrária à diferenciação genética entre populações fragmentadas, o fluxo gênico contrapõe os efeitos de deriva genética (SLAKTIN, 1987). Pode ser definido como o mecanismo resultante do movimento de genes entre 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 (SLATKIN, 1985; 1987). Em outras palavras, a variação genética existente entre as espécies resulta de um balanço entre forças evolutivas que tendem a produzir diferenciação local – como a deriva genética e a seleção natural – e a força que tende a produzir uma homogeneização genética entre as populações – o fluxo gênico (SLAKTIN, 1987).

Desta forma, por estarem relacionados aos *status* de preservação e à capacidade adaptativa local, a caracterização da variabilidade genética populacional é considerada relevante para estudos de preservação e manejo de populações naturais (RIBEIRO & RODRIGUES, 2006). Sob este aspecto informações acerca de alguns parâmetros genéticos assumem importância para caracterizar fragmentos florestais remanescentes com o objetivo de determinar áreas prioritárias para a aplicação da conservação *in situ*. Esta, por sua vez, se destaca por ser considerada a forma mais efetiva de conservação de recursos genéticos, por preservar não só a espécie alvo, mas toda a funcionalidade dos biomas, permitindo a ocorrência dos processos ecológicos e evolutivos (KAGEYAMA & GANDARA, 1998). Collevatti *et al.* (2001), afirmam que são muitos os métodos utilizados para avaliar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente, julga-se fundamental a junção de conceitos da ecologia de populações, da genética de populações, e definir parâmetros adequados de forma a orientar as ações a serem efetuadas para a conservação. Com isso, os marcadores moleculares têm demonstrado ser uma ferramenta muito útil, pois é possível observar polimorfismo diretamente na sequência gênica de organismos, abrindo perspectivas para pesquisa em conservação e em estudos populacionais de espécies arbóreas (FREITAS *et al.*, 2005).

Com a necessidade premente da conservação, manejo e recuperação dos fragmentos remanescentes da Floresta Atlântica é imprescindível que conceitos teóricos básicos sejam invocados para a construção de tecnologias adequadas para essas ações. Estes autores complementam que estudos genético-ecológicos em espécies representativas, tanto em florestas não perturbadas como em matas secundárias, vêm mostrando o efeito das ações antrópicas em suas populações e auxiliando na definição dos parâmetros genéticos mais adequados para orientar e monitorar as ações nesse bioma (KAGEYAMA & GANDARA, 1998).

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

A base da conservação de espécies é a manutenção da variabilidade genética em populações e para isso sua descrição e distribuição da variabilidade são fundamentais para o estabelecimento de medidas visando à conservação verdadeiramente eficiente (MOURA, 2005). O estudo da diversidade genética em populações, por exemplo, auxilia na descrição dos níveis de variabilidade genética mantida dentro das populações e como esta se encontra dividida entre e dentro das mesmas (HAMRICK, 1983).

Melo (2012) afirma que a escolha de populações naturais para um programa de manejo e conservação tem como primeiro, e mais importante passo, a caracterização dessas populações, sendo assim, os critérios genéticos baseados na utilização de marcadores moleculares estão entre os principais métodos de caracterização. Ainda segundo o autor, dentre os parâmetros genéticos populacionais mais importantes, que fornecem as informações mais preciosas para os projetos de conservação de espécies ameaçadas estão: o fluxo gênico, as medidas de diversidade genética e o grau de estruturação genética espacial das populações.

A caracterização da variabilidade pode ser feita, segundo Cavallari-Neto (2004), a partir de medidas de diversidade genética intrapopulacional e interpopulacional, que poderão ser estimadas a partir de dados de marcadores moleculares. O desenvolvimento dos marcadores de DNA abriu a possibilidade de amplos estudos em recursos genéticos vegetais e nesta área da biologia molecular, os rápidos avanços têm fornecido uma série de novos métodos que geram informações valiosas para programas de conservação genética e melhoramento florestal (ESTOPA *et al.*, 2006).

No contexto da utilização dos marcadores, em 1994 Zietkiewicz *et al.* desenvolveram um tipo de marcador dominante baseado em SSR, as chamadas *Inter Simple Sequence Repeats* (Inter sequencias simples repetidas) ou simplesmente ISSR, que foi bastante popularizado com os trabalhos de Wolfe *et al.* (1998). Este marcador contorna a problemática da informação prévia das sequencias que flanqueiam o microssatélite e em comparações com outros tipos de marcadores sua análise é tecnicamente simples. Semelhantes aos *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPDs), também marcadores dominantes, o ISSR proporciona alta reprodutibilidade dos resultados e gera abundante polimorfismo, além de serem marcadores rápidos e fáceis de trabalhar (LIU & WENDEL 2001). As sequências- alvo dos *primers* ISSRs são abundantes ao longo do genoma de eucariontes, sendo considerado um marcador semi-arbitrário, amplificado por reações de polimerase em cadeia (PCR) em presença de oligonucleotídeos complementares para o microssatélite designado, podendo ser

ancorado no final 3' ou 5' com 1 a 4 bases de purina ou pirimidina (FANG & ROOSE, 1997; ESSELMAN *et al.*, 1999).

Na técnica molecular utilizando o marcador do tipo ISSR, um único *primer* é usado na amplificação do DNA, gerando múltiplos fragmentos de comprimentos variados e para separação e visualização dos produtos da amplificação, a partir da técnica de ISSR, pode ser empregada tanto a eletroforese em gel de agarose e detecção com brometo de etídeo ou eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata ou brometo de etídeo (NAGAOKA & OGIHARA, 1997; JOSHI *et al.*, 2000). Atualmente, com vistas ao manejo e a conservação genética de espécies, os estudos utilizando as mais diversas classes de marcadores são realidade na grande maioria dos laboratórios de genética e biologia molecular do mundo todo (BRANDÃO *et al.*, 2011; DOMINGUES *et al.*, 2011; MELO, 2012; SOUTO *et al.*, 2012).

A análise dos dados genéticos, oriundos das informações geradas por marcadores, deve ser baseada em alguma teoria ou modelo (WEIR, 1996). O modelo clássico de uma população infinita, de cruzamento aleatório, na ausência de mutação, migração e seleção – Teorema de Hardy-Weinberg – permite que sejam feitas inferências estatísticas. E de acordo com Falconer e Mackay (1996), quando ocorrem desvios das proporções esperadas pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) significa que alguma das pressuposições do modelo foi violada e, então, são propostos modelos alternativos para a verificação das possíveis causas do desvio. As principais alterações nas frequências alélicas nas populações naturais podem estar relacionadas a processos sistemáticos como mutação, fluxo gênico (migração) e seleção natural ou processo dispersivo, como a deriva genética (FALCONER & MACKAY, 1996).

Hamrick (1989) relata que, em geral, a seleção e a deriva genética aumentam a diferenciação entre as populações, onde, espécies que apresentam intenso movimento de pólen e sementes têm menor diferenciação do que espécies com fluxo gênico restrito. De acordo com Zanettini & Cavalli (2003), espécies com grandes populações, que apresentam sistema misto de reprodução e mecanismos eficientes de dispersão de pólen e sementes apresentam, de maneira geral, alta variação genética dentro das populações e baixa entre estas. Por outro lado, espécies com pequenas populações, de autofecundação e/ou propagação vegetativa, com limitada dispersão de pólen e sementes tendem a apresentar uma baixa variabilidade dentro de suas populações e alta entre estas. Portanto, para se compreender a estrutura genética nas populações naturais de plantas é fundamental também o estudo das variáveis ecológicas que influem nessa estruturação.

A estrutura genética de uma população é definida como sendo a forma pela qual a variabilidade genética é distribuída entre e dentro dos níveis hierárquicos de subdivisão de uma

espécie (BROWN, 1978). Como os indivíduos de uma espécie raramente se distribuem de maneira homogênea no espaço, eles quase sempre formam agregados, bandos, colônias ou qualquer outro tipo de associação, sendo assim, a estrutura genética de populações refere-se à heterogeneidade na distribuição dos genótipos e do grau de endogamia dentro de populações e entre estas (ROBINSON, 1998).

Existem diferentes métodos estatísticos para caracterizar a estrutura genética populacional dos quais citam-se: as estatísticas F (WRIGHT, 1951); a diversidade genética de Nei (1973) e as análises de variância das frequências alélicas (COCKERHAM, 1969; WEIR, 1996).

Wright (1951), originalmente desenvolveu a estatística – F, como coeficientes de endogamia, definida como uma correlação entre gametas que se unem ao acaso e com herança mendeliana simples. Entretanto, isso foi muito antes do advento da isozimas e outros marcadores moleculares. Como a maioria dos geneticistas de seu tempo, ele se concentrou em morfologia, no entanto, quando isozimas foram introduzidas como um marcador conveniente para avaliar a diversidade genética de uma população, o F_{ST} de Wright foi adaptado para uso com *loci* multialélico. Isto levou ao desenvolvimento de vários quadros estatísticos para estimar F_{ST} de pequenas amostras de um número limitado de populações (WEIR & COCKERHAM 1984; NEI, 1987).

Wright (1951) considera o coeficiente F como uma medida do grau de desvio do EHW nas populações. Como nas populações naturais podem ocorrer vários níveis de estruturação, o autor, diante da necessidade de mensurar todos os desvios possíveis, propôs um sistema aplicável a uma população com um nível hierárquico de subdivisão. Considerando a população como um todo (T), suas subpopulações (S) e seus indivíduos (I), foram definidos os seguintes parâmetros: F_{IT} como a correlação entre os gametas que se unem para formar os indivíduos em relação à população, F_{ST} como a correlação entre gametas tomados ao acaso nas subpopulações e mede o nível de diferenciação genética entre subpopulações (CROW & KIMURA, 1970; WRIGHT, 1965) e F_{IS} como a correlação entre gametas que se unem para produzir indivíduos com relação à subpopulação. Wright (1951, 1965) estabeleceu a relação $(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$.

O valor de F_{ST} varia de zero a um. $F_{ST} = 1$ indica subpopulações completamente homocigotas com a fixação de alelos distintos entre elas. $F_{ST} = 0$ indica subpopulações com frequências alélicas idênticas, ou seja, não existe diferença genética entre as subpopulações. Wright (1978) sugeriu as seguintes orientações qualitativas para a interpretação de F_{ST} :

- 0 – 0,05 → pequena diferenciação genética;
- 0,05 – 0,15 → diferenciação genética moderada;
- 0,15 – 0,25 → grande diferenciação genética;
- Maior que 0.25 → diferenciação genética muito grande.

De acordo com Kirst (1999), marcadores dominantes, tais como os ISSR, baseiam-se em mutações ou rearranjos nos sítios de anelamentos dos “*primers*” caracterizam-se pela ausência ou presença de produtos amplificados, sendo, portanto, um marcador com padrão de segregação dominante, com o qual não é possível a distinção entre homozigotos e heterozigotos. Diante disso, Lynch e Milligan (1994) afirmam que essa dominância limita as inferências estatísticas feitas, especialmente em organismos diploides, e pode fornecer algum viés na estimativa de alguns parâmetros genéticos quando comparados com marcadores codominantes. A natureza dominante e binária dos marcadores tem limitado a análise da estrutura e diversidade em populações naturais, principalmente com relação às estimativas da diversidade genética, frequências genotípicas, verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg e taxas de endogamia (MOURA, 2005).

No intuito de contornar esta deficiência, modelos estatísticos foram desenvolvidos. Em 1992, Excoffier *et al.* introduziram a estatística ϕ “fi”, proporcionando uma nova alternativa para a análise dos dados obtidos por esses marcadores. Foi desenvolvida por esses autores, uma análise de variância que incorpora as informações sobre a divergência de DNA provenientes de dados de haplótipos, derivada de uma matriz de distâncias quadradas em todos os pares de haplótipos e é denominada análise de variância molecular (AMOVA).

A AMOVA estima os componentes de variância análogos às estatísticas F, denominada estatística ϕ , refletindo a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. A significância dos componentes de variância e das estatísticas ϕ é testada por meio de permutações. A base dessa análise de variância molecular é que ela trata as distâncias genéticas como desvios da média de um grupo e usa os quadrados dos desvios como variâncias, permitindo a partição da variação genética entre e dentro das populações analisadas. Esta metodologia acomoda diferentes tipos de matrizes de entrada, fornecida por diversos tipos de marcadores moleculares, e diferentes tipos de pressuposições evolutivas sem modificar a estrutura básica da análise. De acordo com Excoffier *et al.*, (1992), a AMOVA é facilmente aplicável em diferentes situações e constitui uma estrutura coerente e flexível para a análise de dados moleculares.

Outra estatística para a análise de diversidade e o índice de Shannon, inicialmente utilizado em estudos ecológicos para indicar a diversidade de espécies por área, foi introduzido em 1972 por Lewontin nos estudos de genética de populações. A utilização desse índice como medida de diversidade populacional é bastante interessante, especialmente quando se trabalha com dados de marcadores dominantes, pois seu uso possibilita contornar o problema da não detecção dos genótipos heterozigotos, já que o índice de Shannon não se baseia na heterozigosidade da população e, sim, na frequência fenotípica da banda na população (MOURA, 2003). O conhecimento desses parâmetros é fundamental para um direcionamento adequado de programas de melhoramento, manejo e conservação genética, tornando-os realmente efetivos.

Corroborando com outras estatísticas utilizadas em estudos genéticos de problemas complexos (como genética de populações, testes de paternidade, genética forense), a abordagem Bayesiana destaca-se com enorme potencial de aplicação. A análise de agrupamento é realizada e fundamenta-se no princípio proposto por Rannala e Mountain (1997). Este princípio considera situações em que a partir de dados genéticos de uma amostra de indivíduos e assumindo que estes são originados de populações desconhecidas, os algoritmos Bayesianos devem agrupar os indivíduos geneticamente similares e identificar grupos formados.

De acordo com o contexto supracitado, Avise (2010), define genética da conservação como estudos genéticos com a finalidade de compreensão de processos populacionais e evolutivos, relevantes para a conservação de espécies ameaçadas por meio de parâmetros genéticos. Desta forma conclui-se que a área da genética da conservação está totalmente relacionada, nos dias atuais, com a ecologia molecular.

2.5 Marcação de Matrizes

Com a redução das áreas florestais, a recuperação de biomas degradados vem se tornando uma atividade crescente (RODRIGUES *et al.*, 2009), uma vez que o processo de desmatamento, com conseqüente fragmentação florestal, tem levado à extinção de muitas espécies vegetais e animais (BARBOSA, 2000; VIEIRA; GANDOLFI, 2006). Intervenções nessas áreas degradadas, através de técnicas de manejo, tais como, a introdução de sementes pode acelerar o processo de regeneração, permitir o processo de sucessão e evitar a perda de biodiversidade (VIEIRA; GANDOLFI, 2006).

De acordo com Nogueira (2007), com o objetivo de coleta de sementes para fins de melhoramento genético, devem-se selecionar as melhores árvores, denominadas árvores matrizes, as quais comparadas com as outras da mesma espécie, apresentam características superiores. Essas matrizes devem apresentar fuste reto, de maior diâmetro e de maior volume, boa condição fitossanitária, vigor e produção de sementes. E ainda segundo o autor, para o caso das coletas de sementes para fins de revegetação ambiental, devem-se considerar apenas as condições fitossanitárias da matriz, não se importando com fuste, forma de copa e outros aspectos produtivos.

Para restauração de habitats preferencialmente, busca-se a coleta em populações naturais não perturbadas, no entanto, caso não seja possível, a coleta é realizada em populações pequenas ou fragmentadas e conforme árvores isoladas (plantadas dentro de quintais, praças ou em pastagens) devem ser evitadas (LLERAS, 1988).

De acordo com Ricklefs (1996), fragmentos pequenos, com menos de 10 hectares, são os que apresentam maior risco de extinção de espécies, sendo este mecanismo denominado de extinção estocástica de pequenas populações. Entretanto, são justamente estes pequenos fragmentos os últimos depositários da biodiversidade nativa de boa parte de nossas florestas (VIANA & TABANEZ, 1996). Diante disso Weir (1990) afirma que por motivos genéticos é essencial colher sementes de várias árvores da mesma espécie nesses fragmentos com a finalidade de representar a diversidade genética.

Segundo Cunningham (1975), para que haja uma utilização adequada de sementes em programas de restauração florestal, é importante definir zonas de coleta e uso de sementes (ZCU), que são subdivisões regionais estabelecidas para identificar origens de sementes e controlar o movimento de sementes para o plantio. A definição dos limites das ZCU deve ser realizada a partir de dados experimentais que identifiquem a variação genética, ou pela análise de fatores ambientais que provavelmente exercem maior influência sobre as forças seletivas criadoras dessa variação.

Corroborando com esse fato, Freitas e Berel (2003) afirmam que grupos de indivíduos da mesma espécie estabelecidos em diferentes regiões com características ambientais próprias tendem a diferenciar-se geneticamente em forma de populações e isso ocorre como consequência da limitação de fluxo gênico além das diferentes pressões de seleção sofridas por cada população. Consequentemente, a variabilidade genética de uma espécie encontra-se distribuída entre e dentro de populações e devido a esse fato constatou-se que essa variação está associada com sua distribuição geográfica (BIERNASKI *et al.*, 2012). Com isso, a avaliação da estrutura entre populações com auxílio de testes genéticos pode ser utilizada como parâmetro para definição das referidas zonas de coleta (BOWER & AITKEN, 2008).

O campo da restauração ecológica está crescendo e o fornecimento de sementes próprias é uma questão importante e a obtenção de informações sobre a estrutura genética da população de uma espécie pode fornecer dados valiosos para ajudar na coleta de sementes e na definição de zonas (SINCLAIR & HOBBS, 2009). A escolha de fonte adequada de sementes para reflorestar determinada região é importante por várias razões, tais como: limitar danos causados por desastres climáticos ou pragas; produção rápida de produtos; e manutenção do “pool” gênico local (PIÑA-RODRIGUES *et al.*, 2007). Ainda segundo os autores, as mudas e sementes disponíveis no mercado carecem de informações sobre a procedência e o número de matrizes que deram origem, com isso, a obtenção de sementes e mudas de espécies nativas de boa qualidade depende de tecnologias apropriadas que garantam não só sua qualidade física e fisiológica, como também sua qualidade genética. Para tanto, o uso de marcadores moleculares como uma ferramenta torna-se útil para se adquirir conhecimentos adicionais sobre a estrutura e a organização do genoma das plantas (MENDONÇA, 2011).

Ferreira e Grattapaglia (1998), afirmam que a expressão da variabilidade genética ocorre de forma diferenciada nas diversas etapas de crescimento de uma espécie e a identificação em nível de fenótipo tem sido uma tarefa difícil devido à influência ambiental. No entanto, com o advento dos marcadores moleculares a análise do DNA passou a ser a principal ferramenta para se detectar a variabilidade genética e possuem a vantagem de não serem afetados pelo ambiente e pelo estado fisiológico. Como os marcadores genéticos são neutros as interpretações dos padrões de estrutura genética restringem - se a fatores amostrais (PIÑA- RODRIGUES *et al.*, 2007).

Corroborando com a ideia de manutenção da variabilidade genética, Cancela (2007) afirma que as sementes carregam em seus genes o potencial de crescimento dos indivíduos aos quais darão origem, daí a importância de um programa bem conduzido de seleção de matrizes que não apenas atendam às tendências de mercado, mas também possuam características genéticas favoráveis

passíveis de serem transmitidas à descendência. Atualmente o número de árvores matrizes, descrito na literatura, para a coleta de sementes é variável. Oliveira *et al.*, (1989) sugeriram que o lote fosse formado com cinco indivíduos ou mais. Mori (2003) e Davide & Silva (2008) recomendam o número de 15 matrizes, enquanto Sebbenn (2006) sugere maior número de árvores (30 a 45).

Em todos os casos, o princípio desejável é o de visar sementes contendo alta diversidade genética, principalmente se o objetivo da colheita for a produção de mudas para áreas degradadas em recuperação, enriquecimento de fragmentos, implantação de corredores ecológicos ou até mesmo arborização urbana (PIÑA- RODRIGUES *et al.*, 2007). Piña-Rodrigues (2000) recomenda que a estratégia de seleção de matrizes para esses fins deve ser adequada à situação a que as árvores se encontram. Desta forma, sugere-se:

- ✓ Árvores agregadas: de cada família (mesmo grupo), selecionar de 3 a 5 matrizes, com distância mínima entre famílias de 100 m.
- ✓ Árvores dispersas (distribuição rarefeita): árvores matrizes devem estar distantes entre si, no mínimo 100 m.
- ✓ Árvores em praças públicas: marcar tantas árvores quanto necessárias para compor um lote de sementes.
- ✓ Árvores isoladas: marcar uma matriz a cada 100 a 200 m de distância entre árvores.

Existem outros fatores que também devem ser levados em consideração, como o conhecimento do tipo de reprodução da espécie-alvo da colheita, pois espécies alógamas e autógamas apresentam estruturas de populações diferentes (HAMRICK, 1983; TONETTO *et al.*, 2013). Espécies alogâmicas mostram altos níveis de diversidade dentro das populações e relativamente pouca variação entre populações em contrapartida, as espécies endogâmicas mostram menores níveis de diversidade dentro das populações e maior entre populações, contendo maior quantidade de homozigotos nos locos (KANOWSKI & BOSHIER, 1997), conseqüentemente os níveis de diversidade observados serão diferentes a nível molecular. Outro fator é o tamanho efetivo de população, definido como o tamanho genético de uma população reprodutiva, na qual deve-se estar atento a selecionar populações que detenham um número mínimo de indivíduos que estejam efetivamente se cruzando e que sustentem esta variabilidade genética.

Desta forma, a caracterização tanto do ambiente quanto da estrutura de populações de plantas é importante para fornecer informações sobre os fatores que influenciam os processos populacionais e as respostas de uma população às perturbações em determinado local (MIRANDA-MELO *et al.*, 2007). Nesse contexto, a caracterização tanto morfológica quanto molecular das populações

fornece dados para a realização de ações que visem à escolha de matrizes adequadas para coleta de sementes e assim sendo, fornecendo subsídios necessários ao desenvolvimento de planos de recuperação de áreas degradadas, restauração ambiental e de manejo e conservação de espécies.

Portanto, estudos que forneçam informações sobre populações naturais de *C. Canjerana* são importantes para fins conservacionistas e manejo sustentável. Os parâmetros inferidos através das análises genéticas e morfológicas são importantes ferramentas na determinação de estratégias adequadas à conservação da espécie.

2.6 A matriz florestal no contexto da restauração de áreas degradadas

Por contínua pressão antrópica, a conservação e recuperação da Floresta Atlântica é um desafio que vem aumentando a preocupação social com o destino das florestas remanescentes e suas espécies. Esse fato faz com que os projetos de restauração de áreas degradadas baseiem-se no desencadeamento ou na aceleração do processo de sucessão ecológica, que é o processo através do qual uma comunidade evolui no tempo, tendendo a se tornar progressivamente mais complexa, diversificada e estável. De acordo com Engel e Parrotta (2003), o termo restauração era utilizado no seu sentido restrito, significando o retorno ao estado original do ecossistema com suas características, com destaque para as características estruturais das espécies finais da sucessão.

Entretanto, com a mudança recente do referencial teórico da ecologia de restauração (ZEDLER & CALLAWAY, 1999; SUDING *et al.*, 2004; YONG *et al.*, 2005), perdeu-se o sentido da reprodução de uma única comunidade clímax nos modelos de restauração, visto que segundo Zedler & Callaway (1999), aceita-se que as mudanças sucessionais da vegetação possam ocorrer seguindo múltiplas trajetórias, não existindo uma convergência nas mudanças do sistema para chegar a um “único ponto clímax ideal”.

O conceito de restauração mais difundido atualmente, de acordo com Society for Ecological Restoration International (SERI), descreve o processo como “a ciência, prática e arte de assistir e manejar a recuperação da integridade ecológica dos ecossistemas, incluindo um nível mínimo de biodiversidade e de variabilidade na estrutura e funcionamento dos processos ecológicos, considerando-se seus valores ecológicos, econômicos e sociais”. Portanto, a restauração dos processos ecológicos em ecossistemas florestais é a construção de uma floresta funcional e, logo, sustentável e perpetuada no tempo, e não apenas a restauração de uma fisionomia florestal. Assim, busca-se garantir que a área não retornará à condição de degradada se devidamente protegida e/ou manejada. Visto que, várias paisagens tropicais têm ultrapassado o limite de percolação, e que a

restauração ecológica não só minimiza os efeitos da degradação ambiental, mas também colabora para a conservação de biodiversidade, é urgente ampliar projetos de restauração em fragmentos florestais tropicais (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Por meio da mudança recente do referencial teórico da ecologia de restauração, incorporou-se uma profunda reformulação da metodologia, que parou de se preocupar com a reprodução de uma única comunidade madura. A partir desse momento outras possibilidades foram incorporadas nas ações de restauração, principalmente aquelas relacionadas com a resiliência ecológica dessas áreas, tais como a possibilidade da chegada de propágulos da vizinhança, a presença de regenerantes naturais e o resgate da diversidade regional, com o intuito de garantir a sustentabilidade da comunidade restaurada (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Dependendo do grau de degradação do ambiente, técnicas simples podem ser implementadas para sua recuperação, dispensando tratamentos mais dispendiosos. Em muitas circunstâncias a dinâmica natural do ecossistema é plenamente satisfatória para a recuperação. A regeneração natural da vegetação é, sem dúvida alguma, o procedimento mais barato para recuperar áreas degradadas. Portanto, antes de iniciar qualquer processo de recuperação de áreas, é necessário avaliar as causas da degradação e o grau de comprometimento do meio ambiente natural (SEITZ, 1994).

Neste contexto de regeneração natural, Cubiña e Aide (2001) relatam a forte relação entre matriz florestal próxima do ambiente degradado. Reis *et al.* (2003) afirma que regeneração de um ambiente degradado depende principalmente da chegada de propágulos a este local e o conjunto de sementes dispersadas por diversos meios é conhecido como chuva de sementes, a qual, conforme Bechara (2003), também tem a função de colonizar áreas em processo de sucessão primária ou secundária. A chuva de sementes é responsável pela formação do banco de sementes (REIS *et al.*, 2003), o qual desempenha importante papel na recolonização vegetacional das áreas degradadas (SCHMITZ, 1992). Corroborando com essas informações, Hool (1999), diz que a baixa taxa de aporte de sementes é o principal fator limitante na restauração de áreas degradadas.

Ainda segundo Cubiña e Aide (2001), quanto maior a distância de áreas, menor a intensidade de propágulos, principalmente devido a grande maioria das espécies florestais apresentarem dispersão zoocórica. Reforçando a ideia, Metzger (2001), afirmou que o ponto central da análise em ecologia de paisagens é o reconhecimento da existência de uma dependência espacial entre as unidades de paisagem e o funcionamento de uma unidade depende das interações que ela mantém com suas vizinhas (por exemplo, diferentes tipos de habitats).

Conforme Hanski e Gilpin (1997), a configuração espacial, expressada em particular pelo tamanho das manchas da paisagem e pelo grau de isolamento ou conectividade entre manchas, é um fator chave na determinação de uma série de processos ecológicos, como os riscos de extinção e as possibilidades de migração ou (re)colonização. Uma mancha é definida como uma forma da superfície delimitada não linearmente e que sua aparência é distinta em relação ao seu entorno (exemplo: fragmentos florestais) (LANG, 2009).

De acordo com Rodrigues e Gandolfi (2004), para que haja um desenvolvimento no processo de sucessão, é necessário que exista uma área aberta onde espécies vegetais possam se estabelecer e sobreviver; que novas espécies possam chegar ao longo do tempo, ou que sementes pré-existentes no solo germinem introduzindo novas espécies nessa área; e também que as espécies que vão ocupando a área tenham comportamentos ecológicos distintos, promovendo uma gradual substituição de espécies na área, aspecto que caracteriza a sucessão.

Partindo do pressuposto de uma área aberta, nas Florestas Tropicais essas áreas são comumente encontradas como reflexo do abandono das técnicas agropecuárias, acompanhado por um vasto conjunto de modificações ao nível do uso do solo e, conseqüentemente, alterações na paisagem. Embora esses terrenos possam ser usados por muitos anos, alguns são eventualmente abandonadas por causa de redução da produtividade, mudanças econômicas ou sociopolíticas (THOMLINSON *et al.*, 1996).

Com objetivo de conhecer a sustentabilidade dos biomas, Aide *et al.* (2000) procuraram responder as seguintes perguntas: Uma vez abandonada, qual o destino dessas pastagens? Será que florestas secundárias conseguem recuperar essa área a um estado semelhante às florestas originais, ou será que essas áreas se desenvolvem em habitats distintos? Como resposta descobriram que o abandono de terras utilizadas anteriormente no sistema pecuário, na Costa Rica, eram o suficiente para a formação de florestas secundárias com características muito semelhantes às que nunca haviam sofrido qualquer tipo de ação antrópica.

3. OBJETIVO GERAL:

Levando em consideração que qualquer estratégia de proteção *in situ* de uma espécie deve estar embasada no conhecimento e manutenção da diversidade genética de suas populações naturais, o presente estudo tem como objetivos gerais estudar a diversidade e estrutura genética e verificar se existe variação morfológica foliar em populações naturais de *C. canjerana* presentes em remanescentes de Mata Atlântica do Espírito Santo.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificação e demarcação (utilizando Sistema de Posicionamento Global - GPS) indivíduos adultos e regenerantes de *C. canjerana* presentes em remanescentes de Mata Atlântica no estado do Espírito Santo;
- Estimar e comparar a magnitude e a distribuição da variabilidade genética entre os indivíduos de *C. canjerana* demarcados utilizando marcadores moleculares (*Inter Simple Sequence Repeats* - ISSR);
- Determinar a distribuição espacial dos genótipos entre indivíduos adultos demarcados, o que permitirá avaliar seu potencial para serem utilizados como matrizes para coleta de sementes e produção de mudas com maior variabilidade genética;
- Analisar as diferenças morfológicas foliares de indivíduos coletados em diferentes fitofisionomias do Espírito Santo;
- Obter informações que contribuam de maneira efetiva para a conservação *in situ* e *ex situ* de *C. canjerana* presentes em alguns remanescentes de Floresta Atlântica no Estado do Espírito Santo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Área de estudo

Foram selecionadas 3 áreas de estudo para amostragem das populações de *C. canjerana* no estado do Espírito Santo, sendo duas no Parque Nacional do Caparaó e uma na Reserva Natural Vale (Tabela 1).

Tabela 1. Coordenadas geográficas e características dos fragmentos onde os dados de *Cabralea canjerana* foram coletados.

Locais de Coleta	Latitude S	Longitude W	Altitude (m)	Número de Indivíduos
Vale do Calçado	20°27'57.65"	41°44'32.50"	1197	16
Santa Marta	20°29'23.81"	41°45'00.13"	1303	16
Reserva Vale	19°09'49.71"	39°59'54.45"	43	14

A Reserva Natural Vale (RNV) abrange os municípios de Linhares e Jaguaré (19° 06'-19° 18' S e 39° 45'-40° 19' W), norte do Espírito Santo. A Reserva está inserida em uma das áreas de extrema importância biológica para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica, o Corredor Central da Mata Atlântica (Ministério do Meio Ambiente 2000). Com aproximadamente 21.787 ha de extensão, a RNV representa parcela significativa da área de Mata Atlântica Primária remanescente do Espírito Santo e constitui a segunda maior reserva de Mata dos Tabuleiros do estado (Fundação SOS Mata Atlântica & INPE 2005). Nessa região foram demarcados 14 indivíduos e numerados de 1 a 14. Coletou-se com um a ajuda de um auxiliar de campo o maior número de indivíduos possíveis. Alguns indivíduos nessa região já estavam em processo de senescência ou com sua fitossanidade comprometida e devido a isso, não foram demarcados. Para as folhas das árvores mais altas as quais não havia a possibilidade de coletar com podão foi necessário à ajuda de um auxiliar de campo com um equipamento de escalada para a obtenção dos ramos (Figura 3A).

O outro ponto de coleta foi o Parque Nacional do Caparaó (PARNACAPA). Esta Unidade de Conservação federal possui área de 32.000 ha, localiza-se na divisa dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Situado entre as coordenadas 20°19'-20°37'S e 41°43'-41°53'W apresenta em sua

maior extensão altitudes em torno de 2.000 metros, sendo o Pico da Bandeira conhecido nacionalmente pelos seus 2890 metros. O Parque está situado na província biogeográfica da Floresta Pluvial do Brasil e pertence ao Domínio Atlântico, ou Mata Atlântica. Nele encontram-se as formações vegetais de Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual, Matas Ciliares e Campos de Altitude.

Nos limites internos do Parque foram amostrados 32 indivíduos para as análises moleculares, distribuídos em duas áreas divididas por uma cadeia montanhosa. As distribuições dos pontos de coleta estão representadas na figura 3B. As áreas foram denominadas Vale do Santa Marta, onde os indivíduos foram numerados de 15 a 30, e Vale do Calçado onde a numeração vai do 31 ao 46. Segundo informações obtidas com moradores da região e com analistas ambientais do PARNACAPA, as regiões do Vale do Calçado e Vale do Santa Marta estão em processo de regeneração natural há aproximadamente 30 anos. Anterior a este período as áreas pertenciam a particulares e eram utilizadas para o plantio de café e pastoreio extensivo de gado.

Ao total, considerando a Reserva Natural Vale e o Parque Nacional do Caparaó, foram coletadas amostras foliares de 46 indivíduos de *C. canjerana* para análises moleculares. Para as análises morfologia coletou-se 28 indivíduos, sendo 14 indivíduos do Parque Nacional do Caparaó e 14 da Reserva Natural Vale. O número de árvores amostradas para a análise morfológica foi menor devido ao fato de que na região do PARNACAPA, por ser um ambiente em regeneração, os indivíduos em sua grande maioria eram regenerantes e apresentavam poucas folhas o que comprometeria o seu desenvolvimento caso as folhas fossem retiradas. A maioria dos indivíduos localizam-se no sub bosque.

Os indivíduos demarcados no PARNACAPA em sua grande maioria estavam localizados próximos a trilha, já os da Reserva Natural Vale novamente foi necessário a ajuda de um auxiliar de campo com conhecimento prévio e, além disso, realizou-se uma consulta ao banco de dados da Reserva com o intuito de conhecer as principais regiões de ocorrência da espécie anteriormente relatadas. Em ambos os locais de coleta a metodologia empregada para o reconhecimento das árvores foi a denominada “busca exaustiva”, na qual consiste basicamente em observar o dossel e reconhecer a espécie, isso é feito em todo o percurso.

As folhas foram retiradas e armazenadas em uma sacola, devidamente identificadas, juntamente com um papel umedecido com o intuito de evitar a perda de água e conseqüentemente a degradação durante o percurso até ao laboratório para posteriores análises.



Figura 3. Coleta de *C. canjerana* na Reserva Natural Vale (A). Distribuição dos pontos de coleta de indivíduos de *C. canjerana* (B).

5.2 Análise dos dados Morfológicos

Foram retirados 10 ramos de cada árvore e de cada ramo retirou-se 5 folhas para as análises morfológicas. As medidas de comprimento de pecíolo (CP) e raque foliar (CRF) foram obtidas por meio de uma régua de 60 centímetros. Por apresentarem folhas compostas inicialmente as folhas eram separadas da raque e acondicionadas em geladeira e posteriormente foram analisadas no Medidor da Área Foliar, de bancada, mod^o "LI-3100C". Após a etapas de medição de área, pecíolo e raque todas as partes foram colocadas em estufa a 40°C para secagem. Após a etapa de secagem utilizou-se uma balança de precisão, Modelo BL320 da marca Marte, para pesar os componentes, peso massa seca folíolo (PMSF) peso massa seca raque foliar (PMSRF) e peso massa seca pecíolo (PMSP).

Foi gerada uma matriz contendo seis variáveis, CP, CRF, AR, PMSF, PMSRF, PMSP. Foram analisados 28 indivíduos, sendo 14 indivíduos do Caparaó (Sul do estado do Espírito Santo) numerados de 1 a 14 e os outros 14 do da reserva Natural Vale (Norte do estado) numerados de 15 a 28. Acredita-se que devido às diferenças fitofisionômicas espera-se encontrar agrupamentos de indivíduos da mesma região. Portanto, uma das hipóteses testada foi a de que indivíduos do Caparaó deveriam ficar agrupados entre eles, assim como, os da Reserva Natural Vale. Com os dados de cada variável analisada em cada indivíduo (variáveis e objetos) foi confeccionada uma matriz de entrada

para o programa R (com cabeçalho e identificação dos indivíduos) e uma para o Multiv (apenas com os valores das variáveis).

Em geral não é possível ou não é conveniente acessar a totalidade de um dado universo amostral ou população, devido a esse fato, a amostragem é necessária. Sendo assim, tomam-se informações sobre uma parte deste, uma amostra, para inferir atributos sobre o todo. Para as análises estatísticas dos dados sempre será necessário avaliar se o tamanho da amostra é suficiente para uma precisão requerida. A análise de suficiência amostral, através do programa Multiv, por reamostragem *bootstrap* foi realizada. Observou-se por meio das frequências que o numero de amostras era suficiente para as análises estatísticas.

Para a transformação e padronização dos dados, visto que nem todas as variáveis encontravam-se na mesma unidade de medida, utilizou-se a transformação escalar do tipo *log*. A Distância Euclidiana (medida de semelhança) foi utilizada para as análises de agrupamentos e de ordenação, uma matriz padronizada foi utilizada para o calculo. A distância euclidiana é uma distância métrica, sendo uma medida de dissimilaridade e esta foi calculada através do programa R e do programa Multiv. Para a análise de agrupamento neste estudo, foi realizada a análise de agrupamento do tipo, ligação média (UPGMA) e os grupos formados foram representados por um dendograma.

Através da utilização do Multiv realizou-se o teste de nitidez de grupos. Por meio de uma matriz de dados somente com os valores das variáveis. O teste de nitidez informou quais os grupos formados no método de agrupamento (UPGMA) eram significativos e assim, contribuiu para a definição de um nível de partição adequado no dendograma. Por ultimo realizou-se a ordenação onde, os objetos são organizados em gradientes definidos pela combinação de variáveis. Neste estudo foi utilizado o método de ordenação não restrita (*unconstrained*) Análise de componentes principais (PCA).

5.3 Extração do DNA

As amostras foram coletadas e levadas ao laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências Agrarias da Universidade Federal do Espírito Santo para a extração de DNA no menor intervalo de tempo possível. Durante este trabalho foi verificado que quanto maior o tempo entre as coletas e a extração do DNA maior a produção de compostos fenólicos, fato que comprometia as genotipagens posteriores. O DNA foi obtido a partir do método proposto pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) de extração de DNA genômico total para plantas que apresentam alta

concentração de polissacarídeos, adequação Doyle & Doyle (1990). Cerca de 0,250g de tecido fresco foi triturado com N₂ líquido em um cadinho com ajuda de um pistilo e incubado a 65°C por meia hora em microtubos de 2mL com 700µL de tampão de extração (2% CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA pH8; 100mM Tris-HCl pH 8,0; 1% PVP; 0,2% β-mercaptoetanol).

Diferentemente do protocolo tradicional de Doyle e Doyle (1990), após a retirada do banho-maria adicionou-se novamente 650 µL Clorofórmio-Álcool Isoamílico (24:1) e homogeneizou. Em seguida, centrifugou-se a 12000 rpm (centrifuga do modelo: Pico 21 da Thermo Scientific, raio de 7,5 cm) por 10 minutos. Transferiu-se a fase aquosa, adicionou-se 200 µL de tampão de extração juntamente com 650 µL Clorofórmio-Álcool Isoamílico (CIA), homogeneizou novamente e logo em seguida centrifugou-se a 12000 rpm por 10 minutos. Após esse passo transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo e novamente se adicionou 650 µL CIA e centrifugou novamente a 12000 rpm por 10 minutos.

Ao final dessa etapa, para precipitar o DNA adicionou-se 1 volume de isopropanol gelado e 230 µL de acetato de amônio (solução não presente no outro protocolo). Centrifugou-se a 12000 rpm por 10 minutos. O precipitado gerado foi lavado 3 vezes com 250 µL de etanol 70%. Ao final esperou-se secar e o DNA foi ressuspendido em 40 µL de TE + 40 µg/mL de RNase, colocado em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, as concentrações e a integridade das amostras de DNA obtidas foram observadas pelo aparelho Nanodrop (Thermo Scientific 2000C). As alíquotas de DNA total foram armazenadas em freezer -20°C para manipulação cotidiana e o restante do material, estocado em freezer (-30°C).

5.4 Amplificações ISSR

Foram inicialmente testados um total de 43 iniciadores ISSR (Tabela 2) para a seleção dos *primers* mais polimórficos. Para esta etapa foram utilizadas amostras de DNA de cinco indivíduos.

Tabela 2- *Primers* ISSR da University of British Columbia testados em amostras de *Cabralea canjerana* e suas respectivas sequências.

Primers	Sequências(5'-3')
UBC 802	ATA TAT ATA TAT ATA TG
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC 813	CTC TCT CTC TCT CTC TT
UBC 814	CTC TCT CTC TCT CTC TA
UBC 815	CTC TCT CTC TCT CTC TG
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG
UBC 822	TCT CTC TCT CTC TCT CA
UBC 824	TCT CTC TCT CTC TCT CG
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC 827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
UBC 829	TGT GTG TGT GTG TGT GC
Primers	Sequências(5'-3')

UBC 833	ATA TAT ATA TAT ATA TYG
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC 836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT
UBC 842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG
UBC 849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA TCC A
UBC 852	TCT CTC TCT CTC TCT CRA
UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
UBC 861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
UBC 862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC 865	CCG CCG CCG CCG CCG CCG
UBC 866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
UBC 867	GGC GGC GGC GGC GGC GGC
UBC 868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA
UBC 870	TGC TGC TGC TGC TGC TGC
UBC 874	CCC TCC CTC CCT CCC T
UBC 876	GAT AGA TAG ACA GAC A
UBC 877	TGC ATG CAT GCA TGC A
UBC 878	GGA TGG ATG GAT GGA T
UBC 880	GGA GAG GAG AGG AGA
UBC 884	HBH AGA GAG AGA GAG AG
UBC 886	VDV CTC TCT CTC TCT CT
UBC 887	DVD TCT CTC TCT CTC TC

Amostras do DNA genômico foram amplificadas através das reações de polimerase em cadeia (PCR) para um volume final de 20 μ L contendo: tampão 1X (16mM $(\text{NH}_4)_2$, 67mM Tris HCl(pH 8.8), 0,1% Tween 20, 2,5mM MgCl_2), 2,5 mM de MgCl_2 , 1 mM de dNTPs, 0,4 μ M de *primer*, 1 unidade de Taq DNA polimerase e cerca de 20 ng de DNA genômico. A amplificação foi feita em termociclador Applied Biosystems por meio do programa que inclui etapas de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 s para a desnaturação; 52°C por 45 s para o anelamento; 72°C por 90 s para a extensão) e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5% com tampão TBE 1X (Tris – 0,89 M, Ácido bórico – 0,89 M e EDTA – 0,02 M), correndo em voltagem de 110 V por aproximadamente 5 h. Os géis foram corados em solução 30 μ L/L de brometo de etídio, fotodocumentados e o tamanho dos fragmentos foi estimado utilizando Ladder de 50 pb e 100 bp.

5.5 Análise dos dados moleculares

A interpretação dos padrões de bandas exibidas levou em consideração o princípio de que as bandas geradas por um mesmo *primer* e que ocuparem a mesma posição relativa indicam a amplificação do mesmo fragmento de DNA, ou seja, pertencem ao mesmo loco gênico, enquanto bandas ocupando posições relativas diferentes são de locos distintos. Dessa forma, foi feita uma matriz de dados envolvendo os 46 indivíduos amostrados, atribuindo-se valor igual a 1 se a banda homóloga estiver presente e 0 caso contrário.

Para a análises intrapopulacional o calculo de distância entre os genótipos foi efetuado com base na complementaridade do coeficiente de Jaccard. Os valores encontrados, para Jaccard, se enquadram na escala de 0 a 1, assim, quanto mais próximo de 1 maior será a similaridade. Considerando também o método de agrupamento, aplicou-se o algoritmo de médias ponderadas *Unweighted Pair-Group Method Average* (UPGMA), a partir dos coeficientes de Jaccard. Estes foram transformados em distância Euclidiana quadrada, que é a determinação da distância entre dois pontos, indicando que quanto maior este valor, maior será a dissimilaridade. O resultado gerado deste processamento é representado na forma de dendrograma, caracterizando de maneira clara as distâncias. Sua forma lembra 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 (SNEATH & SOKAL, 1973). A análise foi

realizada por meio o programa GENES (CRUZ, 2013). Seus resultados fornecem a ideia do quanto certos indivíduos de cada local são semelhantes ou divergentes molecularmente.

Para a análise interpopulacional calculou-se a AMOVA por meio do programa Arlequin versão 3.11 (LAURENT EXCOFFIER, 1998). Um programa de genética de populações capaz de analisar grandes quantidades de amostras de dados moleculares, o qual mediu o grau de diferenciação genética baseada na σ^2 de frequências de haplótipos.

Para a análise de fluxo gênico entre as populações realizou-se o calculo manual da seguinte formula $Nm = 1/4[(1/Fst) - 1]$, fundamentado na teoria do isolamento pela distância de Wright, Nm “histórico” também denominado Nm “aparente”. Para inferir o número de grupos genéticos nas populações amostradas foi conduzida análise Bayesiana e para avaliar a estrutura populacional procedemos a simulações de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC), utilizando os genótipos multilocus dos indivíduos amostrados para detecção de grupos genéticos prováveis (K) e assumindo o modelo de populações mistas. Nesta abordagem foi possível acessar as probabilidades posteriores de populações estruturadas e probabilidade de cada indivíduo pertencer à população amostrada ou apresentar origem externa (HOLSINGER *et al.*, 2002, HOLSINGER & WALLACE 2004, LARSON *et al.*, 2004). O número de populações estabelecidas (K) foi de K = 1 a K = 6 com 20 execuções independentes para cada valor de K. Cada corrida teve 200.000 iterações de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC), com 50.000 iterações descartadas (*burn-in*) e todos os dados obtidos por meio do programa Structure 2.3.4.

6. RESULTADOS

6.1 Análises Morfológicas

O agrupamento de todos os indivíduos (Fig. 4) revelou que os indivíduos 3 e 16 formam grupos distintos em relação aos outros indivíduos de *C. canjerana*. Corroborando com esse fato, na ordenação (Fig.5) observa-se que o indivíduo 3 apresenta valores altos para a variável comprimento do pecíolo (CP) e o indivíduo 16 peso da massa seca da raque (PMSR). Esses indivíduos com valores discrepantes (*outliers*) foram retirados das análises, visto que estavam influenciando na obtenção das principais variáveis determinantes na diferenciação dos grupos.

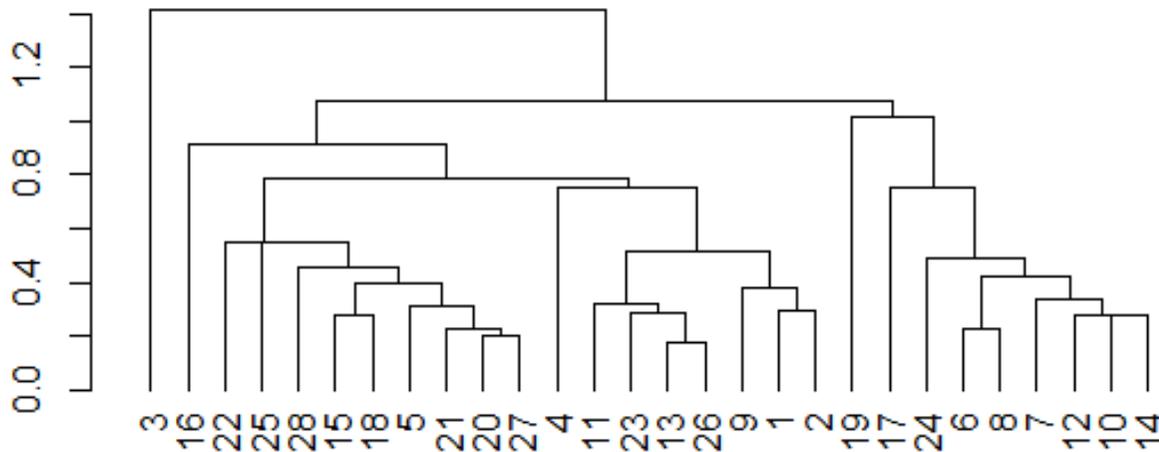


Figura 4- Agrupamento pelo UPGMA de todos os indivíduos de *C. canjerana*. Números de 1 a 14 representam indivíduos da Reserva Natural Vale e números de 15 a 28 indivíduos do Caparaó.

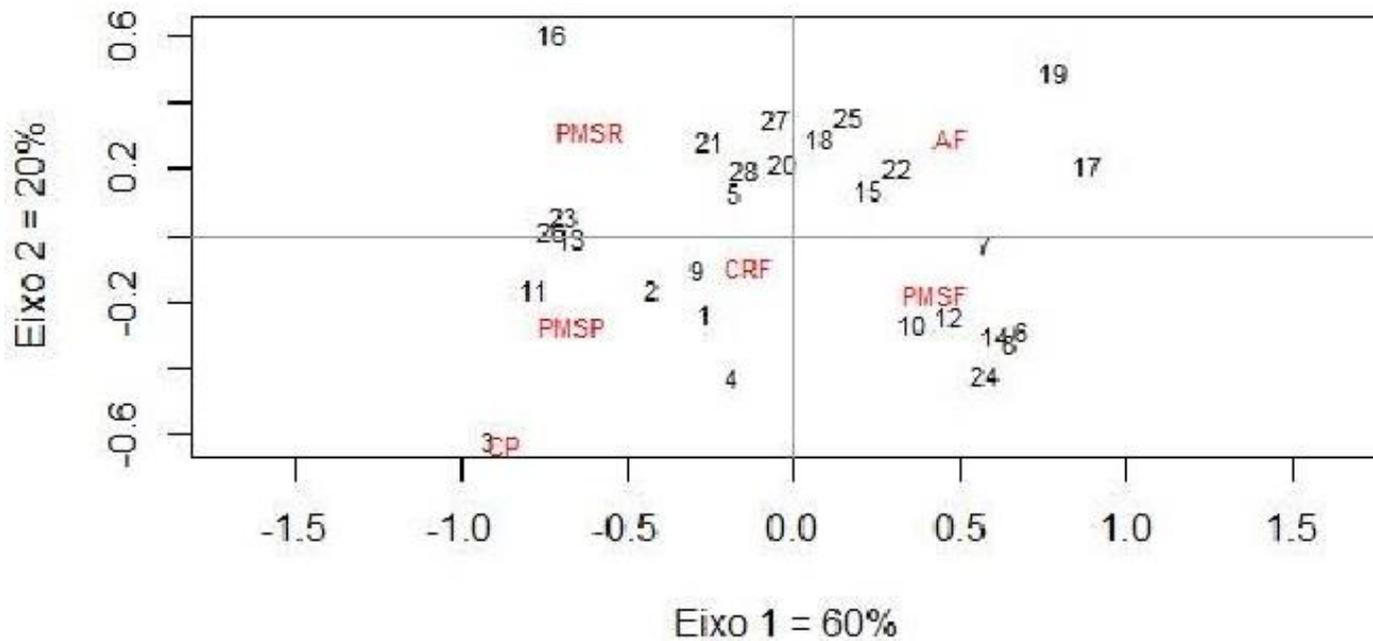


Figura 5- Ordenação de todos os indivíduos de *C. canjerana*.

Com a retirada dos indivíduos 3 e 16, quatro grupos significativos foram formados pelo agrupamento UPGMA (Fig. 6), obtidos por meio do teste de nitidez. Na ordenação (Fig. 7) nota-se que o eixo mais significativo foi o 1, com o valor percentual de 63%, acima do eixo, as variáveis peso da massa seca do pecíolo (PMSF), comprimento do pecíolo (CP) e peso massa seca folíolo (PMSF) são características morfológicas que explicam o agrupamento dos indivíduos da Reserva Natural Vale. As variáveis peso da massa seca da raque (PMSR) e área foliar (AF) explicam o agrupamento dos indivíduos do Caparaó. No entanto, novamente nota-se que existem indivíduos com características contrastantes aos indivíduos de suas respectivas regiões, como no caso do 23 e 26 que apesar de possuírem peso de massa (PMSR) alto, característica dos indivíduos do Caparaó, compartilham também alto o valor das variáveis peso da massa do pecíolo (PMSF) e comprimento do pecíolo (CP), características representativas dos indivíduos da Reserva Natural Vale. O indivíduo 24 também é considerado um *outlier* visto que possui valores altos para a variável peso da massa seca do folíolo (PMSF).

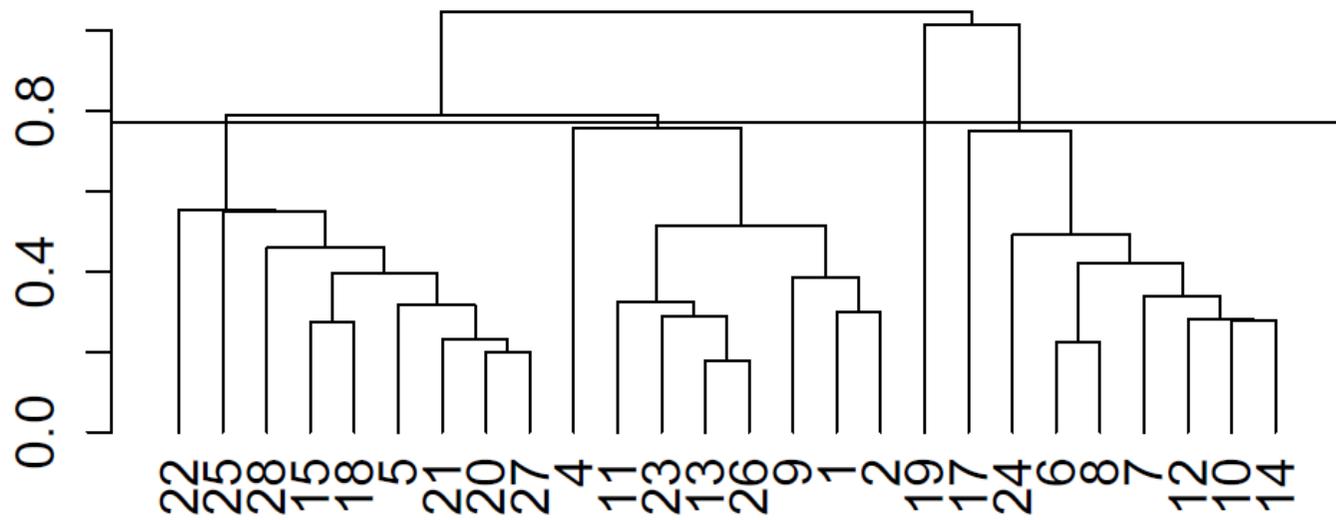


Figura 6- Agrupamento pelo UPGMA de *C. canjerana* retirando os indivíduos 3 e 16 (*outliers*).

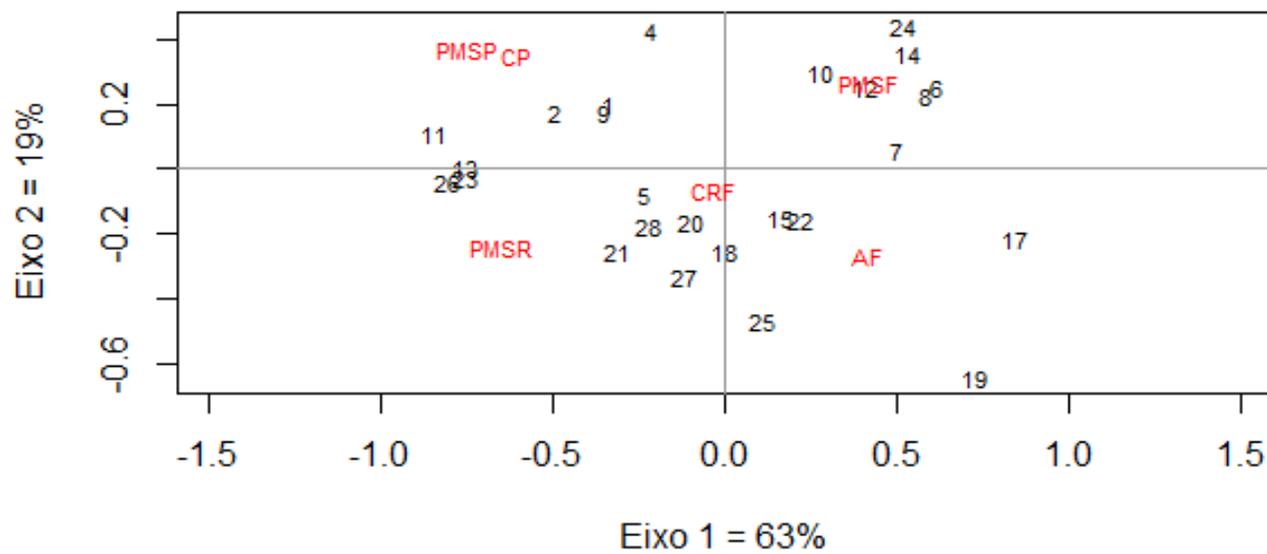


Figura 7- Ordenação de todos os indivíduos de *C. canjerana*, retirando os indivíduos 3 e 16.

Visando melhorar a resolução das análises para a visualização das variáveis morfológicas que explicam a formação dos grupos na análise de agrupamentos, retiraram-se todos os *outliers* 3, 16, 23, 24 e 26. Novamente realizou-se o agrupamento e houve a formação de 5 grupos nítidos (Fig. 8). É possível observar que os grupos são formados principalmente pelos indivíduos da mesma fitofisionomia como no caso do grupo contendo os indivíduos 6, 8, 7, 12, 10, 14 e do grupo formado pelos indivíduos: 4, 11, 13, 9, 1, 2. O maior grupo formado possui um representante da Reserva Natural Vale, indivíduo 5, contudo o restante são todos indivíduos do Caparaó (22, 25, 28, 15, 18, 21, 20, 27).

Na análise da ordenação (Fig. 9) após a retirada dos *outliers*, o eixo 1 (59%) revela a as variáveis de maior influencia na formação dos grupos com os indivíduos das duas regiões de coleta. Acima do eixo encontram-se todos os indivíduos da Reserva Natural Vale (1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 14), explicados pelas variáveis peso da massa seca do pecíolo (PMSP), comprimento do pecíolo (CP) e peso da massa seca do folíolo (PMSF). Abaixo do eixo 1 encontram-se todos os indivíduos da região do Caparaó (15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 27 e 28), explicados pelas variáveis, peso da massa seca da raque (PMSR) e área foliar (AF).

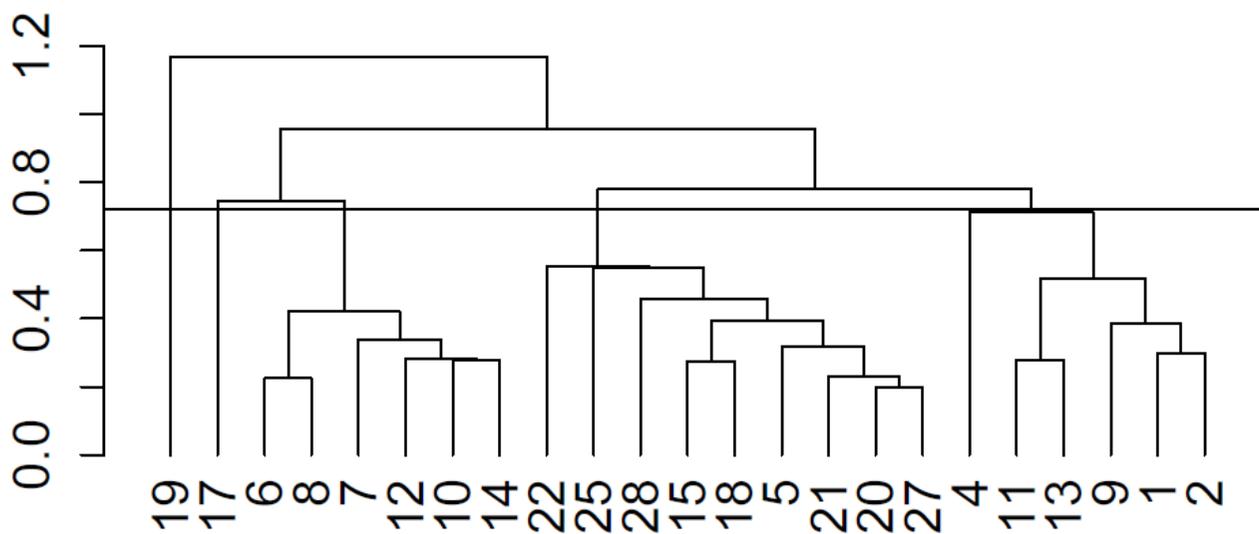


Figura 8- Agrupamento pelo UPGMA de retirando os indivíduos 3, 16, 23, 24 e 26 (*outliers*) de *C. canjerana*.

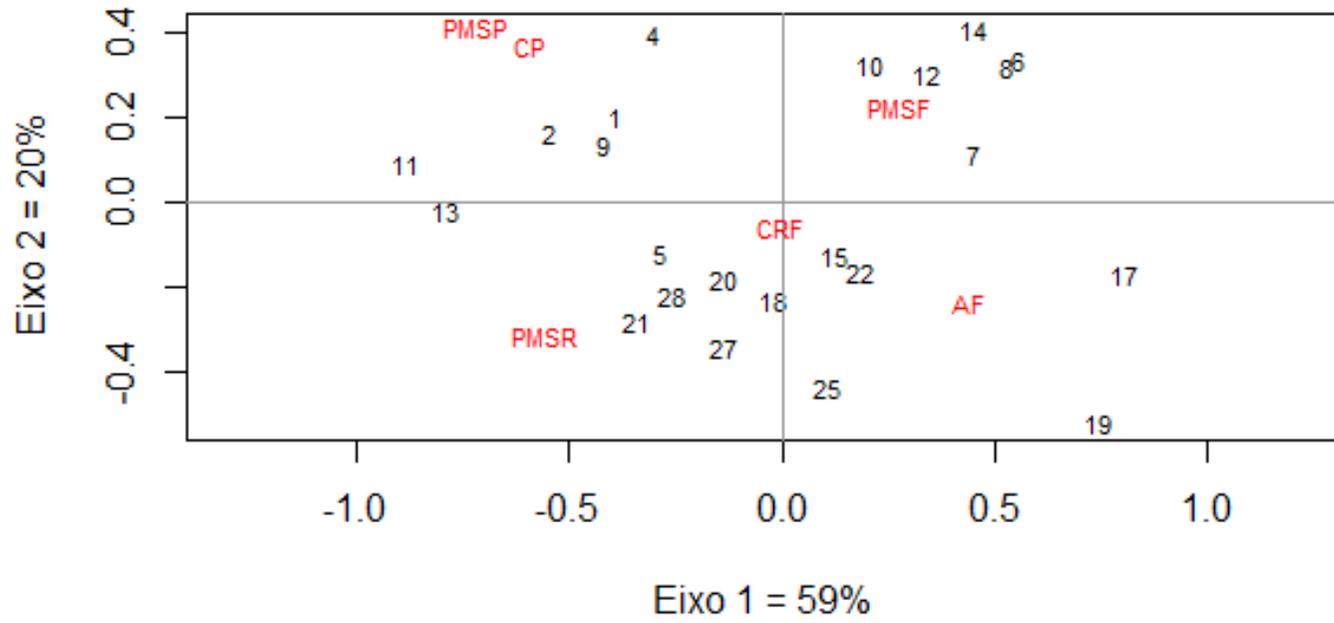


Figura 9- Ordenação de todos os indivíduos de *C. canjerana*, retirando os indivíduos 3, 16, 23, 24 e 26 (*outliers*).

6.2 Análises Moleculares

Entre os 43 *primers* ISSR testados (Tabela 2), foram selecionados por meio de observação em gel de agarose (Figura 10), os 10 mais polimórficos, os quais possibilitaram a obtenção de 84 fragmentos amplificados (Tabela 3). O número de fragmentos por iniciador variou entre 5 a 12 e em média, foram obtidas 6,2 bandas. Dos 84 fragmentos, 62 foram polimórficos, o que resulta em um percentual de 73% de polimorfismo.

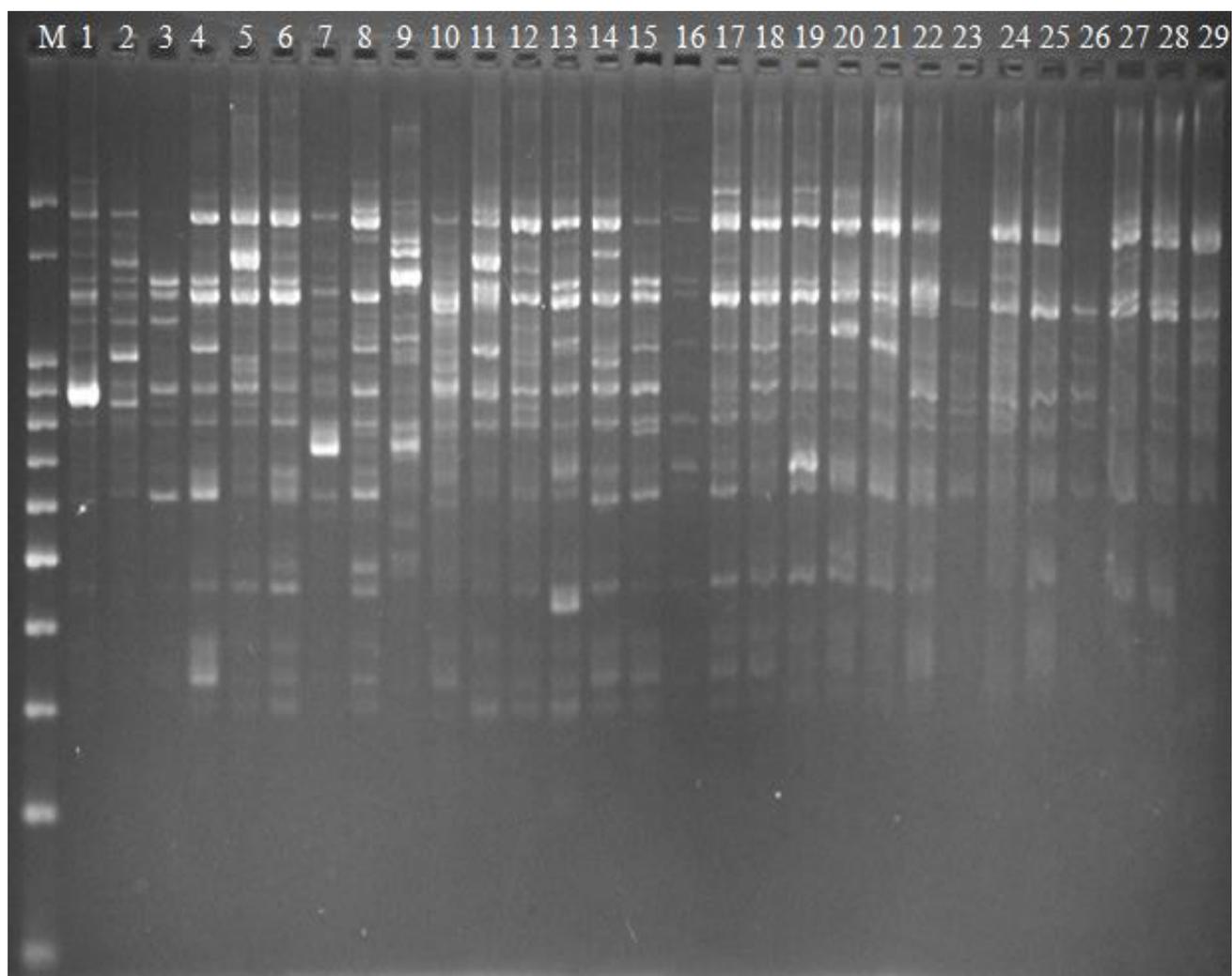


Figura 10. Fotografia do gel de agarose mostrando o perfil dos fragmentos produzidos pelo *primer* UBC811 em indivíduos (1 a 29) de *C. canjerana*. Ladder 100 pb. M- Marcado.

Tabela 3- Total de bandas (incluindo todas as populações) amplificadas (NTB) por *primer* ISSR, porcentagem de bandas polimórficas (PBP) e peso molecular máximo e mínimo dos fragmentos obtidos, estabelecido com base em marcador de 50pb e de 100pb.

Primer	NTB*	PBP	PM (máx-min.)
UBC808	5(2)	60%	270 - 600
UBC810	8(2)	75%	150-730
UBC811**	12(1)	91,66%	450 – 1000
UBC812	9(2)	77,77%	220 – 720
UBC818	5(2)	60%	500 – 700
UBC827	6(2)	66,66%	550 – 700
UBC834	12(3)	75%	200 – 750
UBC836**	11(2)	81,81%	300 – 1200
UBC886	9(2)	77,77%	220 – 600
UBC891	7(4)	42,85%	450 – 850

*Valores entre parênteses refere-se às bandas monomórficas.

***primers* que utilizaram marcador de 100pb.

6.3 Diversidade Intrapopulacional

Na população do Vale do Calçado, os valores de dissimilaridade genética entre os indivíduos amostrados, comparados dois a dois, variou de 0,166 a 0,562 e apresentou média de 0,318. A representação gráfica dos agrupamentos obtida pelo método UPGMA revelou oito grupos estabelecidos (Fig. 11). O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi de aproximadamente 0,71. O valor do índice de diversidade de Shannon foi de 0,44.

Os indivíduos do Vale do Santa Marta apresentaram coeficiente de dissimilaridade entre 0,133 e 0,642, com média de 0,356. No dendrograma foram observados 10 grupos (Fig. 12) e um valor de CC de aproximadamente 0,79. Obteve também um valor de 0,42 para o índice de Shannon.

Em Reserva Natural Vale, os valores do coeficiente de dissimilaridade variaram de 0,290 a 0,764, média de 0,502. O dendrograma agrupou os indivíduos em 7 grupos (Fig.13), e a consistência do agrupamento gerado pela correlação cofenética, foi a maior das três populações, se aproximando de 0,89. Para o índice de Shannon o valor foi de 0,31.

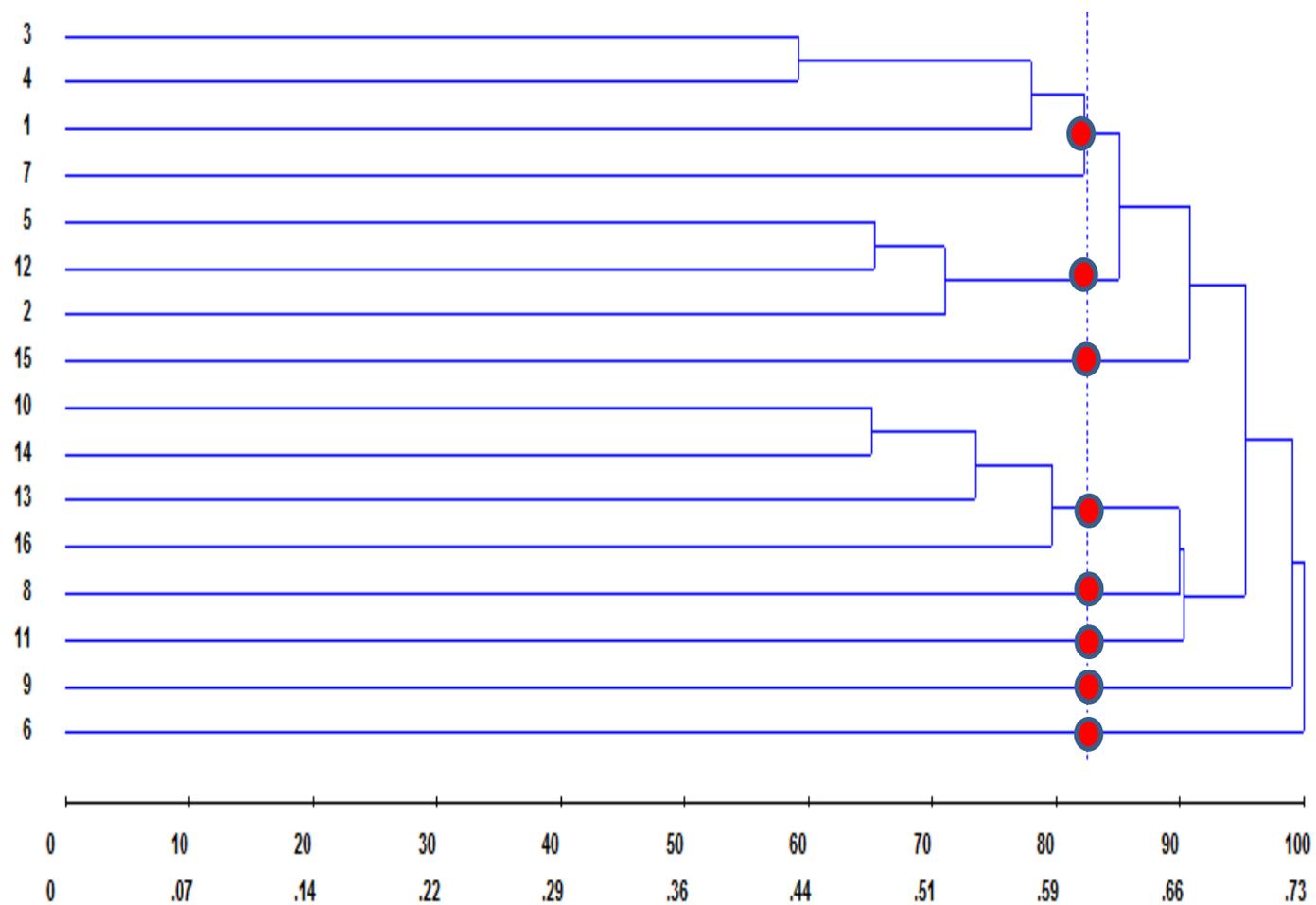


Figura 11- Dendrograma obtido pelo método UPGMA no programa GENES, formando 8 grupos na população do Vale do Calçado. Ponte de Corte (PC): 82,91%.

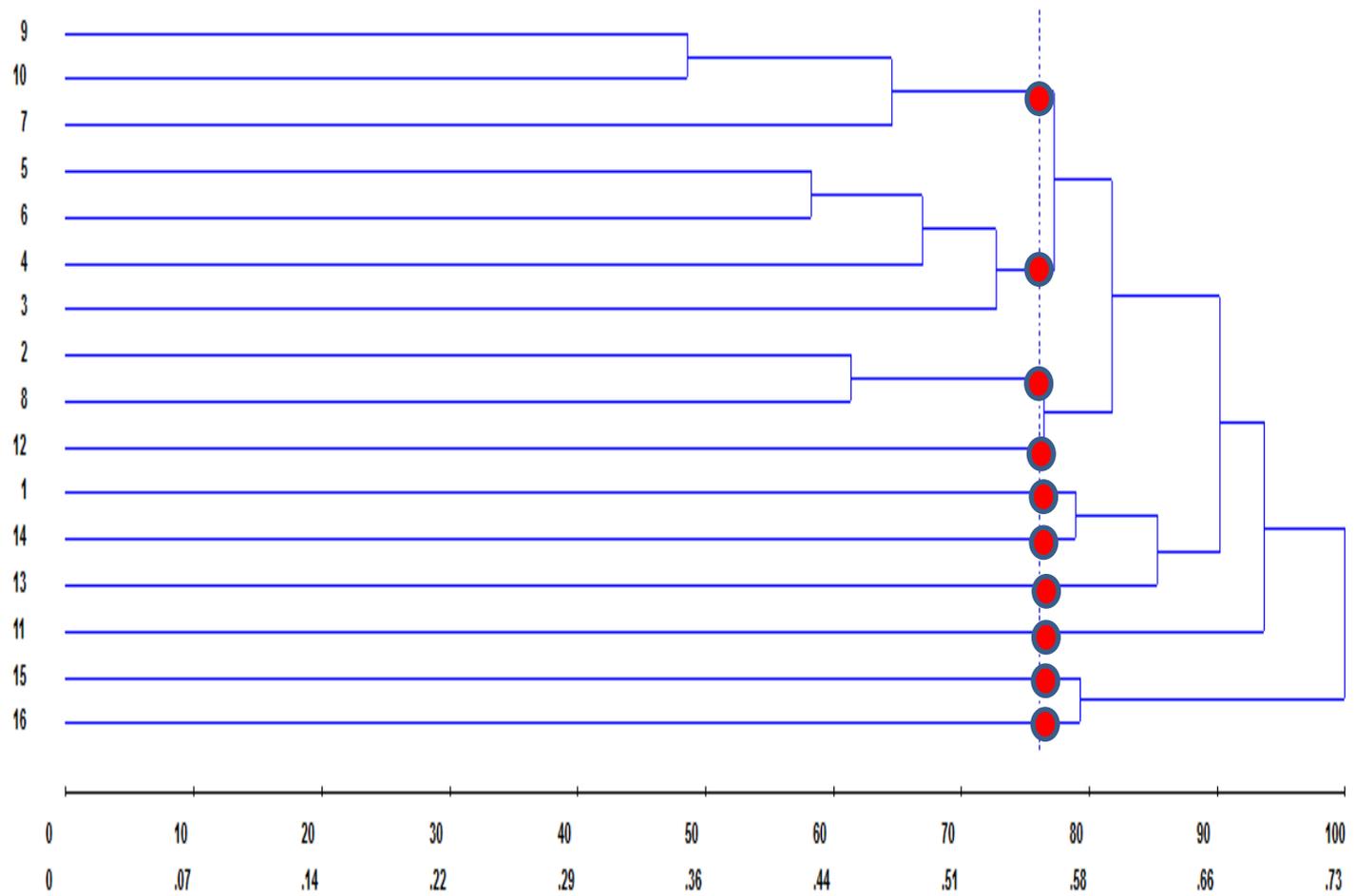


Figura 12- Dendrograma obtido pelo método UPGMA no programa GENES, formando 10 grupos na população do Vale do Santa Marta. Ponte de Corte (PC): 76,94%.

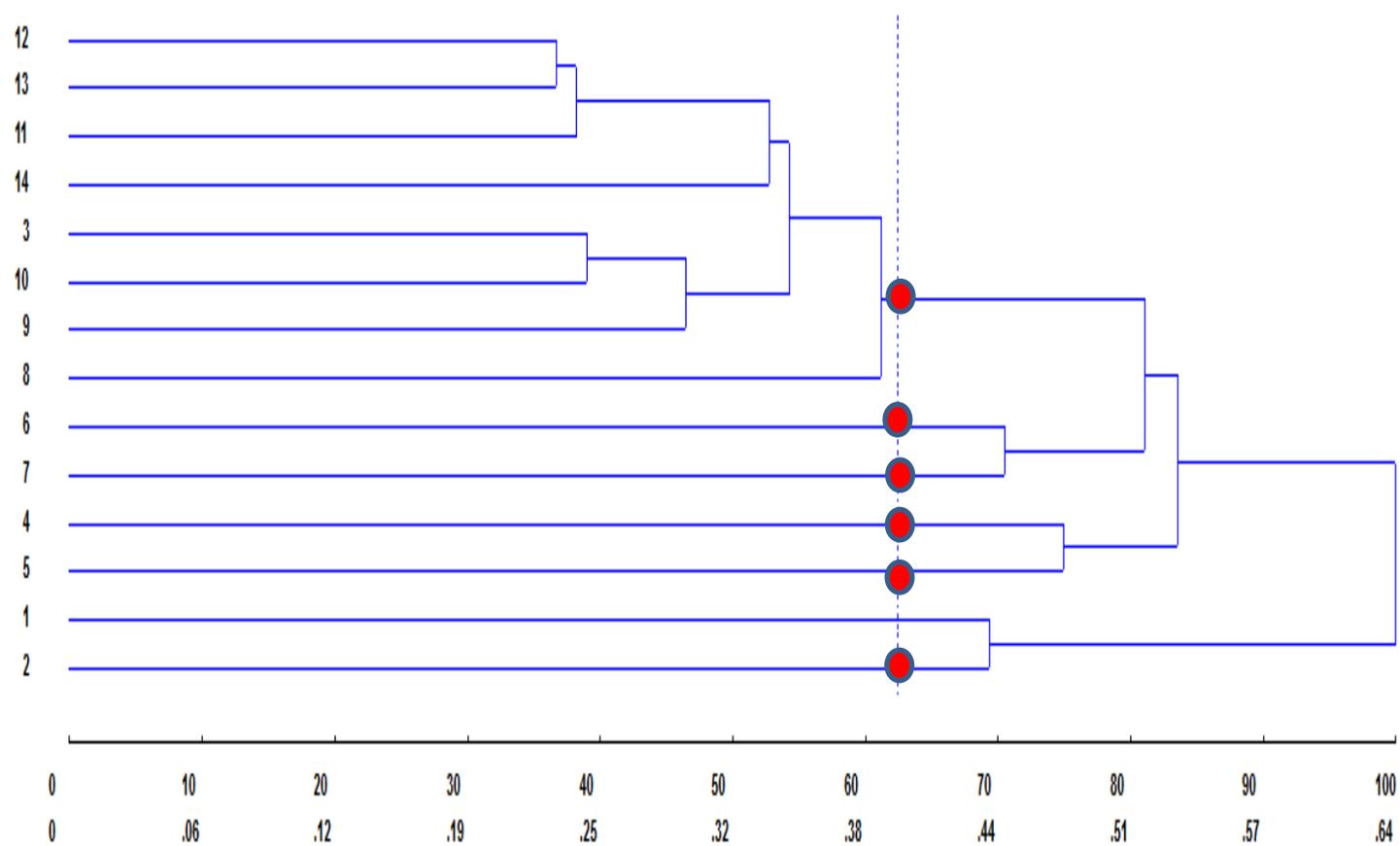


Figura 13- Dendrograma obtido pelo método UPGMA no programa GENES formando 7 grupos na população da Reserva Natural Vale. Ponte de Corte (PC): 63,4%.

6.4 Diversidade Interpopulacional

6.4.1 Entre 3 populações

O valor do Índice de Shannon Global foi de 0,475. Por meio da AMOVA, foi realizada a partição da variação genética em três níveis: dentro de populações (73,03%), entre populações dentro grupos (11,50%) e entre populações (15,47%), tal partição mostrou maior variação genética dentro da população, com 73,03% da variação total, e os 26,97% da variação genética restante foram observados entre as três populações. O valor de diferenciação genética das populações Φ_{ST} foi 0,269. A média do fluxo gênico entre as três populações foi de 0,676.

A partição da variação genética das populações foi verificada por agrupamento dos indivíduos em grupos bayesianos. As marcações genéticas encontradas definiram o número correto de grupos, baseando na taxa de mudança no $\ln(k)$, estatística ΔK , indicando uma convergência para três grupos bayesianos ($K=3$) (Fig.14). Houve formação de um grupo específico para cada localidade (Fig.15) com características genéticas bem diferenciadas para ambos.

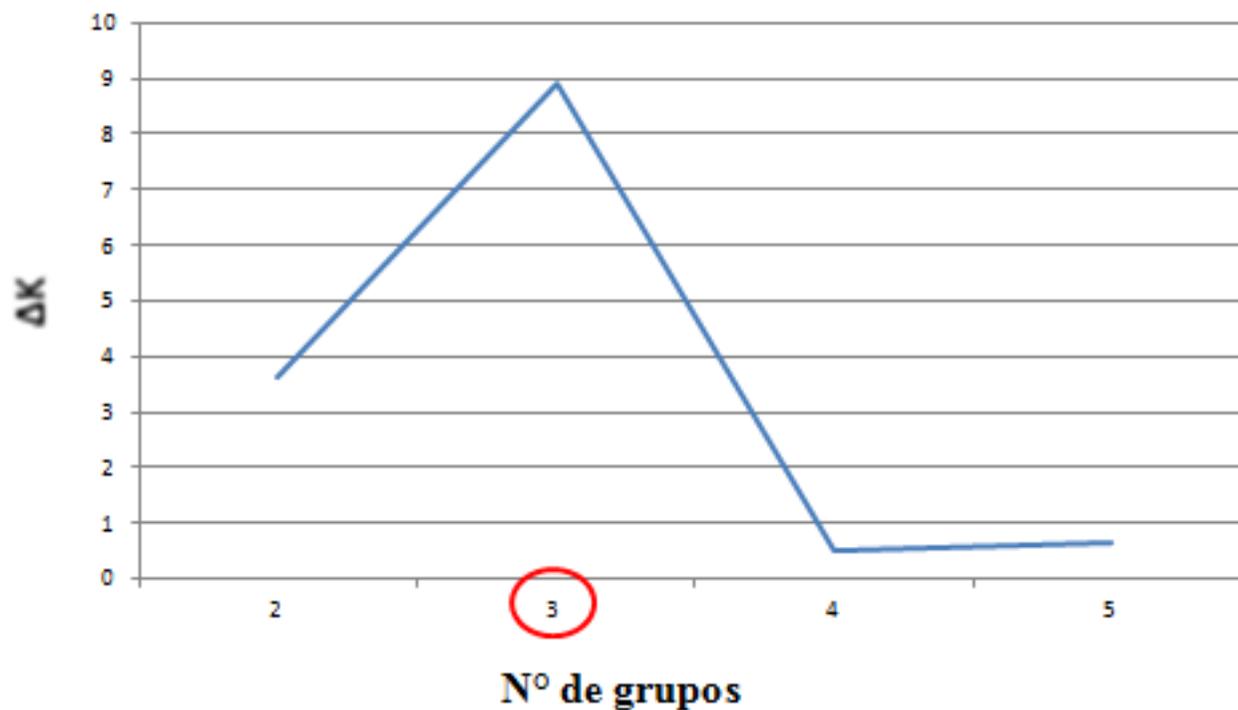


Figura 14– Melhor K (3), calculado manualmente, seguindo o critério proposto por Evano *et al.* (2005) para definição do número correto de grupos, baseado na taxa de mudança no $\ln(k)$.

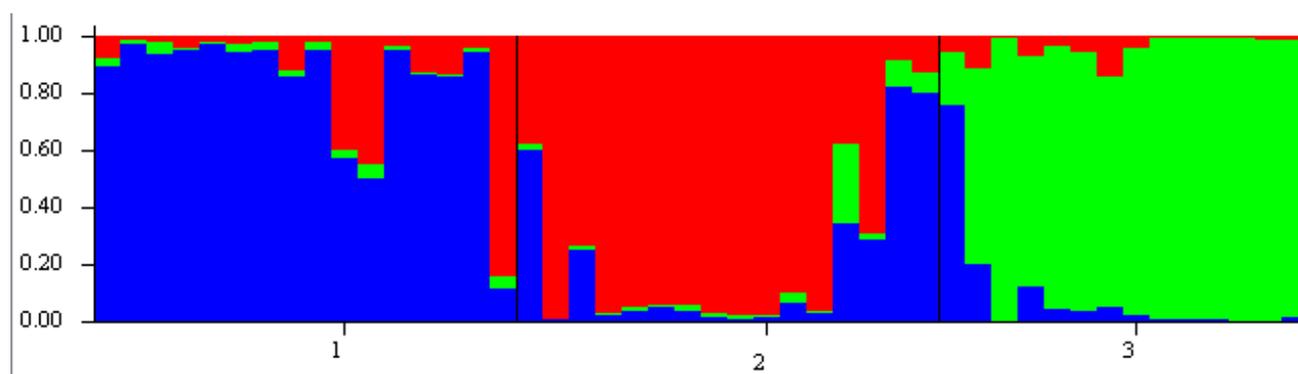


Figura 15- Inferência bayesiana de populações de *C. canjerana* usando o programa STRUCTURE quando $K = 3$.

7. DISCUSSÃO

De acordo Silveira (2009), o estudo da morfo-anatomia foliar é uma ferramenta para estudos de fitocomunidades, sendo interpretada como indicador das condições ambientais, pois as folhas que se desenvolvem em uma mesma comunidade sofrem juntamente pressões seletivas do ambiente. Nesse caso as variáveis comprimento do pecíolo (CP), peso de massa seca dos folíolos (PMSF) e peso de massa seca do pecíolo (PMSR) caracterizam os indivíduos da Reserva Natural Vale, enquanto as variáveis peso de massa seca da raque (PMSR) e área foliar (AF) caracterizam os indivíduos do Caparaó.

As variáveis AF e PMSR, foram representativas para os indivíduos do Caparaó e podem ser explicadas devido ao fato da maioria dos indivíduos serem regenerantes e encontrarem-se em crescimento, conseqüentemente abaixo do dossel da floresta. A AF é uma característica muito utilizada na avaliação de tolerância ao sombreamento. Em geral, o incremento da AF com o sombreamento é uma das maneiras da planta aumentar a superfície fotossintética, assegurando um aproveitamento mais eficiente nas baixas intensidades luminosas e, conseqüentemente, compensar as baixas taxas de fotossíntese por unidade de AF, característica típica das folhas de sombra (BOARDMAN, 1977; JONES & McLEOD, 1990).

Outro autor que corrobora com esse fato é Boeger *et al.*, (2006) quando afirma que em termos anatômicos, as folhas do sub-bosque de florestas ombrófilas tendem a apresentar folhas com poucos estratos celulares fotossintéticos, o que se expressa em folhas finas e com grandes superfícies laminares. Conseqüentemente para suportar uma área foliar maior é necessária uma raque maior e com isso torna-se diretamente proporcional o tamanho da raque ao da área foliar, com isso também o peso da massa seca da raque se torna maior.

Além do estudo das principais variáveis representativas para cada região o estudo da morfologia foliar possibilita o detalhamento da variabilidade e juntamente com dados de outros caracteres pode servir de base para programas de melhoramento. Diante da potencialidade de *C. canjerana* em programas de reflorestamento a caracterização de suas folhas torna-se importante na escolha de potenciais matrizes para coleta de sementes. Informações sobre a planta nunca são suficientes para a sua escolha, quanto mais se conhece sobre a planta melhores os resultados obtidos em programas de reflorestamento. Corroborando com a importância da análise de dados morfológicos, Oliveira *et al.*, (2012), realizaram a avaliação da diversidade e a caracterização de folhas dos acessos pertencentes ao banco de germoplasma de umbuzeiro da Embrapa Semiárido e comprovaram que as análises possibilitam aproveitar a variabilidade na definição de descritores

morfológicos em estudos posteriores associados ao pré-melhoramento, finalizando com a seleção de variedades e as possibilidades de uso comercial.

Em estudo realizado por Fuzeto e Lomônaco (2000), com o intuito de analisar o potencial plástico de *Cabralea canjerana* subsp. *polytricha* (Adr. Juss.) Penn. (Meliaceae) e seu papel na formação de ecótipos em áreas de cerrado e vereda em Uberlândia, MG, os autores comprovaram que existe grande variabilidade genética para caracteres importantes na determinação do valor adaptativo da subespécie e os genótipos respondem fenotipicamente à heterogeneidade ambiental, provocada pelo gradiente cerrado/vereda.

No entanto, se as divergências fenotípicas geradas dentro de uma população forem mantidas por seleção disruptiva, haverá favorecimento para o surgimento de subespécies, raças ou ecótipos. Segundo Sultan (1987), ecótipo pode ser definido pelos padrões de respostas morfológicas e fenológicas que contrastam entre ambientes distintos. Uma vez formados, os ecótipos podem evoluir, aumentando suas divergências, num processo que culminaria com o evento da especiação (MACKENZIE & GULDEMOND, 1994).

Paralelamente ao estudo da variabilidade morfológica realizou-se o estudo da diversidade e estrutura genética das populações de *C. canjerana* por meio de marcadores moleculares dominantes. Os *primers* utilizados geraram um total de 84 locos/fragmentos amplificados, sendo 64 polimórficos (73%). O polimorfismo é de suma importância para a manutenção da variabilidade das espécies e conseqüentemente propiciar sua sobrevivência diante das adversidades ambientais. No estudo realizado por Brandão (2011), no qual foi analisado a diversidade genética de *Myrcia splendens*, também por meio de marcadores ISSR, foram obtidos 70 locos com a utilização de 10 *primers*, com percentual de locos polimórficos de 73%. No estudo realizado por Jena *et al.* (2015), para a análise de diversidade genética de *Merope angulata*, sete *primers* UBC foram pré selecionados gerando uma média de 6,2 bandas polimórficas por *primer*. De acordo com Junior (2010), a variação expressiva nos percentuais de polimorfismo obtidos com marcadores ISSR em diferentes estudos encontrados na literatura pode ser atribuída às características ecológicas de cada espécie, amostragem dos indivíduos e populações que variam a cada trabalho. De acordo com Ge e Sun (2001) em comparação com marcadores codominantes, em geral, locos de marcadores dominantes revelam maiores níveis de diversidade genética.

Na análise de agrupamento UPGMA para os indivíduos da localidade Vale do Calçado houve a formação de 8 grupos distintos no ponto de corte de 82,91% (Fig. 11). Na localidade Vale do Santa Marta houve a formação de 10 grupos com ponto de corte de 76,94% (Fig. 12) e na Reserva Natural Vale formou-se 7 grupos com ponto de corte foi de 63,4 % (Fig. 13).

Partindo do pressuposto de que a variabilidade genética é de suma importância para a manutenção das espécies a formação de vários grupos de acordo com a dissimilaridade genética mostra que esses grupos de indivíduos são divergentes, como no caso do Vale Santa Marta em que dos 14 indivíduos analisados molecularmente, formou-se 10 grupos distintos demonstrando a grande variabilidade dos indivíduos.

Ainda sobre a diversidade intrapopulacional, os resultados aqui obtidos quando comparados com trabalhos da mesma natureza encontrados na literatura, constataram valores elevados do Índice de Shannon para as três populações estudadas sendo para o Vale do Santa Marta de 0,42, Vale do Calçado 0,44 e Reserva Natural Vale 0,31. No estudo realizado por Brandão (2011) na análise de diversidade genética entre corredores e fragmentos não houve diferença significativa na diversidade de *M. splendens* entre as localidades, para corredores o valor Índice de Shannon variou 0,44 a 0,53 e para fragmentos a variação foi de 0,49 a 0,56. Diferentemente do estudo realizado por Ferreira (2011) na análise da diversidade genética de *Annona crassiflora*, com implicações para a conservação, utilizando marcadores ISSR os valores obtidos foram baixos quanto a diversidade genética (0,19 e 0,24) fato que pode ser considerado devido a esses locais ainda sofrerem com o extrativismo.

Torna se relevante ressaltar que nas populações do Vale do Santa Marta e no Vale do Calçado a maioria das arvores amostradas são jovens regenerantes e apesar da perda parcial da vegetação devido a antropização recente, a representatividade da diversidade foi mantida pelo banco de sementes presente no solo e pela introdução de propágulos da matriz florestal no entorno responsáveis pela regeneração natural do ambiente. No entanto, o abandono das áreas não deve ser tornado como uma premissa para a reestruturação da vegetação é necessário um estudo detalhado do grau de fragmentação para posteriormente tomar as decisões corretas para a restauração (Aide *et al.*, 2000).

Avaliando sob a ótica da marcação de matrizes para a coleta de sementes, a existência de variabilidade genética significativa é de fundamental importância para garantir do vigor e resistência das progênes a serem obtidas. Neste contexto, as áreas analisadas no presente estudo revelaram potencial para este fim, pois, conservam uma satisfatória diversidade genética intrapopulacional, fundamentada pelos valores do Índice de Shannon e pela formação de vários grupos pelo método UPGMA.

Além disso, diversos autores ressaltam a importância da coleta de sementes em matrizes florestais distintas e que apresentem características edafoclimáticas semelhantes à área a ser restaurada (KAGEYAMA, 2003; ROGALSKI, 2003; LIMA & RODRIGUES, 2009). Corroborando com essa informação, McKay *et. al.* (2005) afirmaram que a estrutura genética das espécies pode afetar os

esforços da restauração em duas principais formas: genótipos não locais podem reduzir o sucesso de projetos de restauração, se eles são mal adaptados e / ou negativamente afetar, por meio de fluxo gênico, as populações nativas adjacentes.

Por meio da análise de diversidade interpopulacional o valor de ϕ_{ST} foi 0,269 indicativo que a diferenciação genética das três populações é muito grande (HARTL & CLARK, 2010) sugerindo que as populações estudadas podem estar se diferenciando por um processo estocástico como a deriva.

Na análise de variância molecular (AMOVA) para as populações de *C. canjerana* aqui avaliadas, mostrou-se que a maior diversidade genética encontra-se dentro das populações (73,03%). Outro fator que corrobora na análise da estruturação dessas populações foi a estatística ΔK , indicando uma convergência para três grupos bayesianos ($K=3$). O grau de diferenciação entre as três populações, que pode fornecer uma estimativa do fluxo gênico aparente. De uma forma geral, as espécies arbóreas apresentam sistema misto de reprodução, bem como uma eficiência na dispersão de sementes e de pólen, o que favorece a ocorrência de fluxo gênico, aumentando assim a variação genética encontrada dentro das populações. De acordo com Mori (2003), espécies com agentes polinizadores que atingem grandes distâncias (como vento, aves ou morcegos) e, ou, dispersores que distribuam as sementes por grandes extensões (como vento ou animais de grande porte) possuem maior variabilidade genética dentro de populações, conseqüentemente o fluxo gênico. No caso da *Cabralea canjerana* a polinização acontece principalmente por mariposas da ordem Lepidóptera de diversas famílias já a dispersão é realizada principalmente por aves (da espécie *Phyrrura frontalis*), morcegos, pequenos mamíferos.

É neste sentido que Ghanzoul (2005) relatou que a fragmentação dos ecossistemas pode afetar o comportamento dos animais dispersores de polens e sementes, interferindo diretamente na estrutura genética das populações. Neste estudo o valor de fluxo alélico observado para o conjunto das populações foi de 0,676. Este dado é claramente influenciado pela fragmentação existente e pela distancia em que se encontram estes fragmentos, o que limita os agentes de dispersão de sementes e polens. Este valor pode não estar sendo suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética nessas populações. Em princípio, seria necessário um fluxo alélico superior a quatro migrantes por geração, para que os efeitos da deriva genética sejam contrapostos com conseqüente redução da divergência genética entre as populações (WRIGHT, 1951; SLATKIN, 1987). Wang (2004), afirma que de 1 a 10 migrantes por geração entre fragmentos pode evitar os efeitos dos acasalamentos de indivíduos aparentados. Ferreira (2011) também encontrou valores baixos para o fluxo alélico para populações de Araticum de 2,03, neste estudo o autor conclui que este valor pode não estar sendo suficiente para homogeneizar a diversidade genética entre as populações.

8. CONCLUSÕES

Para o estudo aqui apresentado as variáveis comprimento do pecíolo (CP), peso da massa seca dos folíolos (PMSF) e peso da massa seca do pecíolo (PMSP) caracterizam os indivíduos da Reserva Natural Vale, enquanto as variáveis peso da massa seca da raque (PMSR) e área foliar (AF) caracterizam os indivíduos do Caparaó;

As áreas analisadas revelaram potencial para marcação de matrizes com finalidade de coleta de sementes, pois, conservam uma satisfatória diversidade genética intrapopulacional;

Por meio da análise da estatística ΔK para a estruturação dessas populações notou-se uma convergência para três grupos bayesianos ($K=3$). Para a análise de diversidade interpopulacional o valor de Φ_{ST} foi 0,269 fato que indicam que a diferenciação genética das três populações é muito grande. O fluxo gênico entre as populações foi de 0,676 fato que comprova que as populações estão estruturadas devido ao baixo fluxo gênico entre os fragmentos .

9. REFERÊNCIAS

- AIDE, T. M. Clues for tropical forest restoration. **Restoration Ecology**, v. 8, n. 4, p. 327, 2000.
- AIDE, T.M.; ZIMMERMAN, J. K.; PASCARELLA, J. B.; RIVERA, L. & MARCANOVEJA, H. Forest regeneration in a chronosequence of tropical abandoned pastures: implications on restoration ecology. **Restoration Ecology** v. 8, p. 328-338, 2000.
- AVISE, J. C. Perspective: conservation genetics enters the genomics era. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 11, p.665-669, 2010.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: Guia de identificação e interesse ecológico**. Santa Cruz do Sul, RS -Brasil, Instituto Souza Cruz, p. 200–201, 2002.
- BARBOSA, K. C.; PIZO, M. A. Seed Rain and Seed Limitation in a Planted Gallery Forest in Brazil. **Restoration Ecology**, v.14. n.4, p.504-515, 2006.
- BARBOSA, L. M. **Manual para recuperação de áreas degradadas do Estado de São Paulo: Matas Ciliares do Interior Paulista**. São Paulo: Instituto de Botânica,p.129., 2006.
- BARREIROS, H. D. S.; SOUZA, D. S. E. Notas Geográficas e Taxonômicas sobre *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. no Brasil (Meliaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 46, p.17-26, 1986.
- BIERNASKI, F. A.; HIGA, A. R.; SILVA, L. D. Variabilidade genética para caracteres juvenis de progênies de *Cedrela fissilis* Vell.: subsídio para definição de zonas de coleta e uso de sementes. **Rev. Árvore**. Viçosa Jan./Feb v.36 n.1, 2012.
- BOARDMAN, N. K. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. **Annual Review Plant Physiology**, v.28, p.355-77, 1977.
- BOEGER, M. R. T.; GLUZEZAK, R. M.; PIL, M. W.; GOLDENBERG, R.; MEDRI, M. Variabilidade morfológica foliar de *Miconia sellowiana*(DC.) Naudin (Melastomataceae) em diferentes fitofisionomias no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31 p.443-452, 2008.
- BOWER, Q. D.; AITKEN, S. N. Ecological genetics and seed transfer guidelines for *Pinus albicaulis* (Pinaceae). **American Journal of Botany**, v.95, n.1, p.66-76, 2008.
- BRADSHAW, A. D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. In Advances in genetics (E.M. Casparly & J.M. Thoday, eds.). **Academic Press**, New York. p.115-155, 1965.
- BROWN, A. H. D. Isozymes, plant populations genetics structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 52, n. 4, p. 145- 157, 1978.
- 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.
- CANCELA, K. C. **Influência da matriz (aps) ou clone (pcs) e do tamanho da semente de *Pinus taeda* I. Nas propriedades tecnológicas das sementes, performance da muda em viveiro e altura em campo após 9 meses**. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

- CARMO, R. M. **Biologia reprodutiva de *Cabralea canjerana* ssp. *canjerana* e a influência do tamanho do fragmento florestal no sucesso reprodutivo e diversidade genética.** 2005. 108 f. Tese (Doutorado em Ecologia)– Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- CARNEIRO, M. R. B. **A flora medicinal do Centro Oeste do Brasil: Um estudo de caso com abordagem etnobotânica em campo limpo de Goiás.** 243f. Dissertação (Mestrado em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente). UniEvangélica. Anápolis, 2009.
- CARVALHO, J.M.F.C. **Aplicación de las técnicas de cultivo in vitro en la multiplicación y mejora del algodón.** . 174f. Tese doutorado. E.T.S.I.U.P.M., 1996.
- CARVALHO, P. E. R. **“Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira”** / Paulo Ernani Ramalho Carvalho; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Centro Nacional de Pesquisa de Florestas – Colombo: EMBRAPA – CNPF; Brasília: EMBRAPA – SPI,p.640, 1994.
- CAVALLARI-NETO, M. M. **Estrutura genética em populações de *Enchilium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação.** 92f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2004.
- COCKERHAM, C. C. Variance of Gene Frequencies. **Evolution**, Washington, v. 23, n. 1, p. 72-84, Mar. 1969.
- COLLEVATTI, R.G., GRATTAPAGLIA, D. & HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology** v.10, p.349-356, 2001.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. **Heredity**, v.86, n.1, p.60-67, 2001.
- 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.
- CROW, J. F.; KIMURA, M. A. **An introduction to population genetics theory.** 591 p.1970.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes - Diversidade Genética.** Editora UFV, Viçosa, 278p, 2008.
- CUBIÑA, A.; AIDE, T. M. The effect of distance from forest edge on seed rain and soil bank in a tropical pasture. **Biotropica**. v.33 p. 260-267, 2001.
- CUNNINGHAM, R. A. Provisional tree and shrub seed zones for the Great Plains. **Great Plains Agricultural Council Publication**, v.71, p.1-15, 1975.
- DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. Sementes florestais. In: Davide AC, Silva EAA. **Produção de Sementes e Mudanças de Espécies Florestais.** Lavras: Universidade Federal de Lavras; p. 11-82, 2008.
- DICKISON, W. C. Integrative plant anatomy. **Harcourt Academic Press**, San Diego, 2000.
- DOLPH, G.E. & DILCHER, D.L. Variation in leaf size with respect to climate in Costa Rica. **Biotropica**. v.12 p.91-99, 1980.

DOMINGUES, R.; MACHADO, M.A.; FORZZA R.C. ; MELO T.D.; WOHLRES-VIANA S.; VICCINI, L.F.. Genetic variability of an endangered Bromeliaceae species (*Pitcairnia albiflos*) from the Brazilian Atlantic rainforest. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 2482-2491, 2011.

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

ENGEL, V. L.; PARROTTA, J. A. Definindo A Restauração Ecológica: Tendências E Perspectivas Mundiais. In: Kageyama, P.Y.; Oliveira, R.E.; Moraes, L.F.D. Et Al. (Coord.). **Restauração Ecológica De Ecossistemas Naturais**. Botucatu: Fepaf, p. 1-26, 2003.

ESSELMAN, E. J.; JIANQIANG, L.; CRAWFORD, D. J.; WINDUSS, J. L.; WOLFE, A. D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* SSP. *Inspersata (Poaceae)*: comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, Edinburgh, v. 8, p. 443-451, 1999.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M. de; MOURA, M. C. de; BOTREL, M. C. G.; MENDONÇA, E. G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropapus* (DC.) MacLeish) **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.70, p. 97-106, 2006.

EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Incorporating genotypes of relatives into a test of linkage disequilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* p.171-180, 1998.

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

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. **Introdução à genética quantitativa**. Londres: Longman, p.464,1996.

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, n. 3, p. 408-417, 1997.

FAO. Guidelines for pest risk analysis. Secretariat of the International Plant Protection Convention of the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. ISPM Publ. n° 2, FAO, Rome. 1996.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 220 p., 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.

FRANKEL, O. H.; SOULÉ, M. E. Conservation and Evolution. **Cambridge University Press**. Cambridge, 327 p., 1981.

FREITAS, L. B.; BEREL, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande Sul, 2003.

FREITAS, M. L.; AUKAR, A. P. A.; SEBBENN, A. M.; MORAES, M. L. T.; LEMOS, E. G. M. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. por marcadores AFLP. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.68, p. 21-28, 2005.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA & INPE. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica** / Período 2000-2005. Resultados Quantitativos – Estado do Espírito Santo. Relatório Final, Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São Paulo, 2005.

FUZETO, A. P.; BARBOSA, A. A. A.; LOMÔNACO, C. *Cabralea canjerana* subsp. *polytricha* (Adri. Juss.) Penn. (*Meliaceae*), uma espécie dióica. **Acta botânica brasileira**, Feira de Santana, v, 15, n.2, p.167-175, 2001.

FUZETO, A. P.; LOMONACO, C. Potencial plástico de *Cabralea canjerana* subsp. *polytricha* (Adr. Juss.) Penn. (*Meliaceae*) e seu papel na formação de ecótipos em áreas de cerrado e vereda, Uberlândia, MG. **Rev. bras. Bot.**, São Paulo , v. 23, n. 2, June 2000 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042000000200007&lng=en&nrm=iso>. Access on 16 Feb. 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042000000200007>.

FUZETO, A. P.; LOMÔNACO, C. Potencial plástico de *Cabralea canjerana* subsp. *polytricha* (Adr. Juss.) Penn. (*Meliaceae*) e seu papel na formação de ecótipos em áreas de cerrado e vereda, Uberlândia, MG. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.23, n.2, p. 169-176, 2000.

GIORDANE, A. C. **AVALIAÇÃO GENÉTICO-POPULACIONAL DE DUAS ESPÉCIES PIONEIRAS EM ÁREAS DE RESTAURAÇÃO ECOLÓGICA NA FLORESTA ATLÂNTICA**. 2012. 41f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente). Universidade Federal do Paraná, 2012.

HAMRICK, J. L. Isozymes and analysis of genetic struture in plant populations. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P., (Ed.) **Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations**. New York: Chapman and Hall. p. 87-105, 1989.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant population. In: SCHONE-WALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. H.; MACBYDE B.; THOMAS N. L. **Genetics and Conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, p. 335-348, 1983.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural forest population. In: SCHONEWALD-COX, C.M. et alii. **Genetic and conservation**. New York, The Benjamin / Cumnings, p.335-48, 1983.

HANSKI, I.A.; GILPIN, M.E. Metapopulation biology: ecology, genetics, and evolution. London: **Academic Press**, 1997.

HARGUINDEGUY, I. **Respostas fisiológicas à hipoxia e a manganês em clones de eucalipto com tolerância diferencial à seca de ponteiros do Vale do Rio Doce**. 2013. 30f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas). Universidade Federal de Viçosa, 2013.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4ª ed. Editora Artmed: Porto Alegre, 2010.

HOLL, K. D. Factors limiting rain forest regeneration in abandoned pasture: seed rain, seed germination, microclimate, and soil. **Biotropica**. v.31 p.229-242, 1999.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Sistema fitogeográfico Inventário das formações florestais e campestres Técnicas e manejo de coleções botânicas Procedimentos para mapeamentos. 2. ed. Rio de Janeiro, 2012.

JENA, S. N.; VERMA, S.; NAIR, K. N.; SRIVASTAVA, A. K.; MISRA, S.; RANA, T. S. Genetic diversity and population structure of the mangrove lime (*Merope angulata*) in India revealed by AFLP and ISSR markers. **Aquatic Botany**, v. 120, p. 260–267, 2015.

JONES, R.H.; MCLEOD, K.W. Responses to a range of light environments in Chinese Tallotree and Carolina Ash seedlings. **Forest Science**, v.36, p.851-62, 1990.

JOSH, S. P.; GUPTA, V. S.; AGGARWAL, R. K.; RANJEKAR, P. K.; BRAR, D.S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.100, p. 1311-1320, 2000.

JÚNIOR, A. F. M. **Diversidade, estrutura genética e fenologia de populações naturais de *Cavanillesia arbórea* K. Schum no norte do estado de Minas Gerais**. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2010.

KACEYAMA, P.; GANDARA, F.B. **Revegetação de áreas ciliares**. In: RODRIGUES, R.R., coord. Ecologia de matas ciliares. Piracicaba: ESALQ/USP, 1998.

KAGEYAMA, P. Y. Reflexos e potenciais da resolução SMA 21, de 21/11/2001, na conservação da biodiversidade específica e genética. **Anais do seminário temático sobre recuperação de áreas degradadas**. Instituto de Botânica, São Paulo, p. 07-12, 2003.

KANOWSKI, P. J.; BOSHIER, D.H. Conserving the genetic resources of trees in situ . In Plant Conservation: the in situ Approach . N. Maxted et al. (eds). **Chapman and Hall**, p. 207 – 219, 1997.

KIRST, M. **Desenvolvimento de sistemas de genotipagem multi-locos semi-automatizados, baseados em marcadores microssatélites e sua aplicação em espécies do gênero *Eucalyptus***. Viçosa, 1999. 103p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.

KORMAN, V. **Proposta de integração das glebas do Parque Estadual de Vassununga (Santa Rita do Passa Quatro, SP)**. 2003. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. Physiology of wood plants. 2nd. ed. San Diego: **Academic Press**, 1997.

LANG, S. **Análise da paisagem com SIG**. I ed. São Paulo: Oficina de textos. 405p., 2009.

LEWONTIN, R. C. The apportionment of human diversity. **Evolutionary Biology**, New York, v. 6, p. 381-398, 1972.

LIEBSCH, D.; MARQUES, M.C.M.; GOLDENBERG, R. How long does the Atlantic Rain Forest take to recover after a disturbance?. Changes in species composition and ecological features during secondary succession. **Biological conservation**, v.141, p. 1717-1725, 2008.

LIMA JÚNIOR, E. C.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; VIEIRA, C. V.; BARBOSA, J. P. R. A. D. Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore** 30: 33-41, 2006.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 1420-1425, Nov, 2001.

LLERAS, E. Coleta de recursos genéticos vegetais. In: ENCONTRO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS, 1988, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/EMBRAPA-CENARGEN, p. 23- 42, 1988.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**.. Nova Odessa, Plantarum. v.1, 1992.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum. v.1; .352p, 1998.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 91-99, 1994.

MACKENZIE, A.; GULDEMOND, J.A. **Sympatric speciation in aphids**. II. Host race formation in the face of gene flow. In Individuals, populations and patterns in Ecology (S.R. Leather, A.D. Wait, N.I. Mills & K.F.A. Walters, eds.). Intercept Ltda, Andover, p.379-196, 1994.

MARQUES, A.R., GARCIA, Q.S.; FERNANDES, G.W. Effects of sun and shade on leaf structure and sclerophylly of *Sebastiania myrtilloides* (Euphorbiaceae) from Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil. **Boletim Botânico** 18:21-27, 1999.

MARTINI, A.M.Z, FIASCHI, P., AMORIM, A.M. & PAIXAO, J.L. A Hot-point within hotspot: a high diversity site in Brazil Atlantic Forests. **Biodiversity and Conservation**, v.16, p.3111-3128, 2007.

McKAY, J. K.; CHRISTIAN, C. E.; HARRISON, S.; RICE, K. J. "How local is local"? A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. **Restoration Ecology**, v.13, n.3, p.432-440, 2005.

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.

MENDONÇA, P. C. **Caracterização da diversidade genética de *Stryphnodendron adstringens* (mart.) Coville por marcador molecular AFLP e transferência de microssatélites**. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011.

METZGER, J.P. O que é ecologia de paisagens?. **Biota Neotropica** <http://www.biotaneotropica.org.br>. 2001.

Ministério do Meio Ambiente – MMA. **Campos Sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade**. 403p. Brasília, 2009.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentada e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira** . MMA, Brasília. 2002.

MIRANDA-MELO, A. A.; MARTINS, F. R., SANTOS, F. A. M. dos. Estrutura populacional de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. e de *Roupala montana* Aubl. em fragmentos de cerrado no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 3, p. 501-507, 2007.

MITTERMEIER, R.A., GIL, P.R., HOFFMANN, M., PILGRIM, J., BROOKS, J., MIITERMEIER, C.G., LAMOURUX, J.; FONSECA, G.A.B. (eds.). **Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions**. Washington, DC: Cemex, 390p., 2004.

MMA (Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal). **Avaliação e ações prioritárias para conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos**. Brasília-DF: Conservation Internacional do Brasil, Fundação SOS Mata Atlântica e Fundação Biodiversitas, 2000.

MORI, E. S. **Genética de Populações Arbóreas**: orientações básicas para seleção e marcação de matrizes. IF Série Registros. São Paulo: Instituto Florestal; n. 25, p. 35-44, 2003.

MOURA, E. F. **Divergência genética entre acessos de jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*)**. 75 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2003.

MOURA, M. C. O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish por isoenzimas e RAPD**. 2005. 165p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2005.

MYERS, N., R.A. MITTERMEIER, C.G. MITTERMEIER, G.A.B. FONSECA & J. KENT. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403: 853-845, 2000.

NAGAOKA, T.; OGIHARA, Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.94, p. 597-602, 1997.

NAVES, V. L. **Crescimento, distribuição de matéria seca, concentração de clorofilas e comportamento estomático de mudas de três espécies florestais submetidas a diferentes níveis de radiação fotossinteticamente ativa**. Lavras, 1993.76p. Dissertação Mestrado - Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1993.

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

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 512 p., 1987.

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

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 1143-1155, May, 2004.

OLIVEIRA, E. C.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M. FIGLIOLIA, M. B. Propostas para a Padronização de Metodologias em Análise de Sementes Florestais. **Revista brasileira de sementes**; v.11p. 01-42, 1989.

OLIVEIRA, V. R.; MARTINS, B. E. de S. SANTOS, C. A. F. NASCIMENTO, C. E. de S. DRUMOND, M. A. ARAUJO, F. P. de NASCIMENTO, T. DIAS, R. de C. S. Diversidade em acessos de umbuzeiro, com base na morfologia e nas correlações entre caracteres foliares - resultados preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., 2012, Belém, PA. Anais.Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012.

ONES, R. H.; MCLEOD, K. W. Responses to a range o light environments in Chinese Tallowtree and Carolina Ash seedlings. **Forest Science**, v.36, p.851-62, 1990.

PIÑA- RODRIGUES, F. C. M.; FREIRE, J. M.; LELES, P. S. S.; BREIER, T. B. Parâmetros técnicos para produção de sementes florestais. Rede Mata Atlântica de Sementes Florestais; 1. Ed. – **Seropédica**: EDUR, UFRRJ, 2007.

PIZO, M. A.; OLIVEIRA, P. S. Interaction between ants and seeds of a nonmyrmecochorous neotropical tree, *Cabralea canjerana* (Meliaceae), in the Atlantic forest of southeast Brazil. **American Journal of Botany**, St. Louis, v.85, n.5, p.669–674, 1998.

PIZO, M. A.; OLIVEIRA, P. S. Size and lipid content of nonmyrmecochorous diaspores: effects on the interaction with litter-foraging ants in the Atlantic rain forest of Brazil. **Plant Ecology**, Perth, v. 157, p. 37–52, 2001.

RANNALA, B.; MOUNTAIN, J. L. Detecting immigration by using multilocus genotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, La Jolla, v. 94, p. 9197–9201, 1997.

Raven, P. H.; Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. **Biologia Vegetal**. 7ª. ed. Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 830p., 2007.

RÊGO, G.M. **Ecofisiologia do Jequitibá-rosa e do Jacarandá-da-bahia: morfogênese, germinação e crescimento inicial**. Curitiba, UFPR, 90 p. Tese Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2001.

REIS, A.; BECHARA, F.C.; ESPÍNDOLA, M.B.; VIEIRA, N.K.; SOUZA, L.L. **Restauração de áreas degradadas: a nucleação como base para incrementar os processos sucessionais**. *Natureza e Conservação*. v.1, n.1, p.28-36, 2003.

REIS, N. S. **Variações fenotípicas em espécies lenhosas do Cerrado em três áreas no Triângulo Mineiro**. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais. UFU. Uberlândia-MG. 91p., 2003.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura e Abastecimento. 525p., 1988.

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

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do Cerrado. **Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2006.

RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. 360-361. 3ª Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1996.

ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (Ed.). **Eletoforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa, MG: UFV, p. 329-380, 1998.

RODRIGUES, R. R.; BRANCALION, P. H. S.; ISERNHAGEN, I. (Orgs.) **Pacto para a restauração ecológica da Mata Atlântica: referencial dos conceitos e ações de restauração florestal**. São Paulo: Instituto BioAtlântica, 2009.

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. 286p., 2007.

RODRIGUES, R.R.; GANDOLFI, S. Conceitos, tendências e ações para recuperação de florestas ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO-FILHO, H. de F. (eds.). **Matas ciliares: conservação e recuperação**. São Paulo: EDUSP, p. 235-247, 2004.

RODRIGUES, R.R.; GANDOLFI, S.; NAVE, A.G.; ATTANASIO, C.M. Atividades de adequação ambiental e restauração florestal do LERF/ESALQ/USP. **Pesq. Flor. bras.**, n.55, p. 7 – 21, 2007.

RODRIGUES, R.R., GANDOLFI, S. As teorias e os processos ecológicos envolvidos nas diversas etapas da restauração florestal (capítulo 5). In: BARBOSA, L.M., SANTOS JUNIOR (orgs). *A botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais*. São Paulo, Sociedade Botânica do Brasil. 680p., 2007.

ROGALSKI, J. M.; BERKENBROCK, I. S.; REIS, A. Sucessão e manutenção da Diversidade biológica e variabilidade genética: ferramentas básicas para a restauração ambiental. **Anais do Simpósio Nacional de Recuperação de Áreas Degradadas**. Foz do Iguaçu, no prelo. 2003.

SCALON, S. P. Q.; ALVARENGA, A.A. Efeito do sombreamento sobre a formação de mudas de Pau-pereira (*Platycyamus regnelli* Benth). **Revista Árvore**, v.17, n.3, p.265-270, 1993.

SCHIMTZ, M.C. Banco de sementes no solo em áreas do reservatório da UHE Paraibuna. In: Kageyama, P.Y. *Recomposição da vegetação com espécies arbóreas nativas em reservatórios de usinas hidroelétricas da CESP*. Série IPEF 25:7-8, 1992.

SCHUSSLER, G. **Dinâmica populacional e aspectos de regeneração natural de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (*Meliaceae*) em uma zona de contato entre as florestas ombrófilas montanas, RS**. 2006. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

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

SEITZ, R. A. A regeneração natural na recuperação de áreas degradadas. **II Simpósio Nacional de Áreas Degradadas**. Curitiba-PR, painel 2/103 a 110, 1994.

SILVA, W. G., METZGER, J. P.; SIMÕES, S.; SIMONETTI, C. Relief influence on the spatial distribution of the Atlantic Forest cover on the Ibiúna Plateau, SP. **Braz. J. Biol.**, 67(3): 403-411, 2007.

SILVEIRA, T. I. **Morfologia foliar de espécies arbóreas de um capão de floresta ombrófila mista, PR, BRASIL**. Dissertação (mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

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

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.

SNEATH, P. H. A; SOKAL, R. R. **Numeric taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W. H. Freeman, 573p., 1973.

SOARES, M. S.; SILVA, M. F.; FERNANDES, J. B.; VIERIA, P. C. Triterpeno e Limonóides isolados dos frutos de *Cabralea canjerana*. In: XXVI REUNIÃO ANUAL SOBRE EVOLUÇÃO,

- SISTEMÁTICA E ECOLOGIA MICROMOLECULARES, p.23. Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2004.
- SUDING, K.N.; GROSS, K.L. & HOUSEMAN, G.R. Alternative states and positive feedbacks in **Restoration Ecology**. *Trends in Ecology and Evolution* 19(1):46-53, 2004.
- Sultan, S. E. Evolutionary Implications of Phenotypic Plasticity in Plants. **Evol. Biol.** 21: 127 - 178. 1987.
- SULTAN, S.E. Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. **Evolution and Development** 5:25-33, 2003.
- THOMLINSON, J. R.; SERRANO, M. I.; LOPEZ, T. M.; AIDE, T. M.; ZIMMERMAN, J. K. Land-use dynamics in a post-agricultural Puerto Rican landscape (1936-1988). **Biotropica**. v. 28, p. 525-536, 1996.
- TONETTO, T. S.; PRADO, A. P.; ARAUJO, M. M.; SCCOTI, M. S. V.; FRANCO, E. T. H. Dinâmica Populacional e Produção de Sementes de *Eugenia involucrata* na Floresta Estacional Subtropical. **Floresta e Ambiente** jan./mar.; 20(1):62-69, 2013.
- VÄLI Ü, EINARSSON A, WAITS L, ELLEGREN H . To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? **Molecular Ecology** 17: 3808–3817, 2008.
- VAN ANDEL, J. & ARONSON, J. Restoration Ecology: the new frontier. Blackwell **Publishing Oxford**. 254p. 2005.
- VIANA, V. M.; TABANEZ, A. A. J. Biology and conservation of forest fragments in the Brazilian Atlantic Moist Forest. Pp. 151-167. In: J. Schelhas & R. Greenberg (Eds.). **Forest patches in tropical landscapes**. Island Press, Washington, 1996.
- VIANA, V.M. Conservação da biodiversidade de fragmentos de florestas tropicais em paisagens intensivamente cultivadas. In: **Abordagens interdisciplinares para a conservação da biodiversidade e dinâmica do uso da terra no novo mundo**. Belo Horizonte/Gainesville: Conservation International do Brasil/Universidade Federal de Minas Gerais/ University of Florida. p. 135-154. 1995.
- VIEIRA, F. de A. **Diversidade e estrutura genética de *Protium spruceanum* (Benth) Engler em remanescentes de corredores de vegetação na região do Alto Rio Grande- MG**. 2005. 100P. Dissertação(Mestrado Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2005.
- WEBB, L.J. A physiognomic classification of australian rain forests. **Journal of Ecology** v.47 p.551-570, 1959.
- WEIR, B. S. **Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 455 p., 1996.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analyses of population structure. **Evolution**, Washington, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.
- WEIR, B.S. Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. **Sunderland, Sinauer Associates**, Inc. Publishers. 377 p., 1990.
- WHITE, G. M.; BOSHIER, D. H.; POSELL, W.. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**, v.8, p. 1899-1909, 1999.

WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: SOLTIS, P. S.; doyle, j. j.(Ed). **Plant molecular systematics II**. Boston: Kluwer. p.43-86, 1998.

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

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F- statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, Washington, v. 19, n. 3, p. 395- 420, 1965.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, A The populationa genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution** 11:413-418, 1996.

YOUNG, B. E.; LIPS, K. R.; REASER, J. K.; IBANEZ, R.; SALAS, A. W.; CEDEÑO, R. COLOMA, L. A.; RON, S. MARCA, E. L.; MEYER, J. R.; MUÑOZ, A.; BOLAÑOS, F.; CHAVES, G.; ROMO, A. D. Population declines and priorities for Amphibian conservation in Latin America. **Conserv. Biol.**, v.15 p. 1213-1223, 2001.

YOUNG, T. P.; PETERSEN, D. A.; CLARY, J. J. The ecology of restoration: historical links, emerging issues and unexplored realms. **Ecology Letters**,v. 8 p. 662–673, 2005.

ZANETTINI, M. H. B.; CAVALLI, S. S. Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre, RS: Editora UFRGS, p. 177-187, 2003.

ZEDLER, J.B. & CALAWAY, J.C. Tracking wetland restoration: do mitigation sites follow desired trajectories? **Restoration Ecology** v.7 p. 69-73, 1999.

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