

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Título do Projeto: Diversidade genética e estrutura Genética de populações de plantas arbóreas da Mata Atlântica usando marcadores AFLP e Microssatélites.

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
Depto de Biologia Geral/CCB
Universidade Estadual de
Londrina

Maio de 2011

Resumo

A preservação da diversidade genética tanto dentro como entre populações naturais é o principal objetivo da biologia de conservação sendo, a diversidade genética dentro de populações usada como um indicador do risco de extinção de uma determinada espécie. A quantidade de diferenciação genética entre populações pode também fornecer dados para o planejamento de ações que visem o incremento da variabilidade genética, pela reintrodução de plantas e/ou manutenção de coleções ex-situ ou coleções de sementes. Essas ações possibilitam o estabelecimento de populações que contenham todo o potencial genético da espécie, tendo em vista não apenas sua preservação como também sua utilização em programas de recuperação. Todavia, poucos estudos até o momento foram realizados com este objetivo. Sendo assim, para a execução de programas de recuperação de áreas sob impacto antrópico na região sul e sudeste do Brasil é importante o conhecimento de quanto a devastação afetou a variabilidade genética das espécies. Com esse objetivo, as técnicas microsatélites e AFLP serão aplicadas as espécies *Actinostemon concolor* (Euphorbiaceae), *Aegiphila sellowiana* (Lamiaceae), *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae), *Balfourodendron riedelianum* (Rutaceae), *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae), *Chrysophyllum gonocarpum* (Sapotaceae), *Inga marginata* (Leguminosae), *Luehea divaricata* (Malvaceae), *Parapiptadenia rigida* (Leguminosae), *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) e *Sorocea bonplandii* (Moraceae). Estas espécies foram escolhida para este estudo por serem comuns nas florestas semidecíduas da região sul e sudeste do país. De posse dos resultados, será possível a confecção de um diagnóstico do impacto da ação antrópica e das mudanças climáticas sobre a variabilidade genética das populações destas espécies.

Palavras Chave: AFLP, Microsatélites, Diversidade Genética, Espécies arbóreas, Genética de populações.

1 Caracterização do Problema

A recuperação e conservação dos recursos naturais têm sido uma das necessidades mais urgentes na atualidade em todos os ecossistemas brasileiros, onde inúmeras espécies arbóreas nativas têm sido exploradas indiscriminadamente, levando muitas delas ao risco de extinção.

O Bioma Mata Atlântica

A Mata Atlântica é a formação florestal mais antiga do Brasil, sua formação se deu há cerca de 70 milhões de anos (Leitão-Filho, 1982). Esta formação florestal se localiza sobre um embasamento cristalino pré-cambriano plenamente estabelecido no início do Terciário (Joly et al., 1991). No passado, a Mata atlântica, estendia-se entre os Estados do Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul, a qual se interiorizava a cerca de 100 km da costa no norte e alargava-se a mais de 500 km no sul (Magnanini, 1965). Na região do Rio Doce, ultrapassava a Serra do Mar, encontrando seu limite na borda da Serra do Espinhaço, e nos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina estendia-se por toda a sua extensão até o Rio Paraná (Campos, 1926). No total, essa floresta cobria mais de um milhão de quilômetros quadrados, compreendendo cerca de 12% do território brasileiro (Câmara, 1996).

Devastada desde o início da colonização, restam atualmente cerca de 7% da cobertura original da Mata Atlântica (SOS Mata Atlântica; Instituto de Nacional de Pesquisas Espaciais, 2002a). Aproximadamente 36% dos remanescentes da Mata Atlântica encontram-se sob áreas protegidas. Entretanto, estas não garantem a real conservação deste bioma, que sofrem o efeito da pressão antrópica em seus limites, como resultado de desmatamentos, uso do solo para agricultura, extrativismo seletivo, caça e introdução de animais domésticos (Mittermeier et al., 1999). A destruição da Mata Atlântica teve início com a extração do Pau-brasil no período colonial e foi intensificada ao longo do tempo, com o desenvolvimento das atividades econômicas do Brasil (Mantovani; Silva, 1999). Os ciclos econômicos foram extremamente prejudiciais em termos ecológicos e florestais e estiveram escudados no extrativismo predatório da cobertura florestal sem a preocupação de sua reconstituição ou da simples reposição para as futuras gerações (Siqueira, 1982). Após séculos de intervenções humanas, a Mata Atlântica está completamente fragmentada, com os maiores remanescentes concentrados nas regiões sudeste e sul do País (Isa et al. 2001). De acordo, com dados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) e a Fundação SOS Mata Atlântica para o período 2008-2009, a região Sul, mais especificamente, o estado do Paraná possuía 98% de seu território (ou 19.667.485 hectares) no Bioma Mata Atlântica, e atualmente, restam apenas 10,52% (2.068.985 hectares).

Extremamente rica em biodiversidade, a Mata Atlântica, abriga um grande número de organismos vegetais e animais em sua faixa de extensão. Destacando-se, entre os ecossistemas brasileiros, por ter os maiores índices de diversidade já encontrados em florestas tropicais e por apresentar um alto nível de endemismo (Giulietti & Forero, 1990; McNeely *et al.* 1990). A Fundação SOS Mata Atlântica (1992) aponta elevadas taxas de endemismo para a flora, sendo cerca de 50% das dez mil espécies de plantas endêmicas. Entre as famílias arbóreas mais expressivas destacam-se Annonaceae, Arecaceae,

Bignoniaceae, Chrysobalanaceae, Fabaceae, Melastomataceae, Meliaceae, Mimosaceae, Moraceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Sapindaceae e Sapotaceae (Mantovani et al., 1990). A grande riqueza de epífitas também constitui um dos aspectos fisionômicos mais característicos dessa formação (Por, 1992).

A Mata Atlântica apresenta grandes variações ao longo de toda a sua extensão, entretanto, observa-se uma certa homogeneidade em suas características devido a semelhanças nas condições climáticas e geológicas, sendo as transições entre diferentes formações vegetais condicionadas mais pela altitude do que pela latitude (Brown, 1992). A distribuição de espécies arbóreas de Mata Atlântica está diretamente correlacionada com características climáticas, especialmente a temperatura e a precipitação (Salis et al 1995; Torres et al 1997; Scudeller, 2002). Sendo assim, as mudanças climáticas são responsáveis não só pelo limite de biomas, mas também pela distribuição de espécies nos mesmos. Um exemplo são as flutuações climáticas do Quaternário que levaram a retração e expansão dos principais biomas brasileiros. Nos períodos mais frios e secos, que tiveram seu último pico a 18.000 anos atrás, a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica ficaram restritas às áreas hoje conhecidas como refúgios (Brown Jr e Ab'Saber, 1979), enquanto que os Cerrados e a Caatinga se expandiram cobrindo boa parte do território nacional. Portanto, a realização de estudos genéticos das espécies vegetais que compõem o Bioma Mata Atlântica, é indispensável para o conhecimento da biologia das mesmas, resultando em informações que poderão subsidiar estratégias de conservação, bem como predizer a influência das condições climáticas sobre a população de espécies arbóreas.

Diversidade Genética de espécies arbóreas

A preservação da diversidade genética, tanto dentro, como entre populações naturais de uma determinada espécie é o principal objetivo da biologia da conservação (Hamrick et al., 1991). Isto significa que, para que os recursos genéticos sejam conservados é importante que se entenda como a variância é distribuída e quais as características do ambiente ou da espécie que influenciam esta distribuição. Tais informações podem ser empregadas para o estabelecimento de populações representativas dos recursos genéticos de uma dada espécie, visando sua utilização em programas de conservação. Assim, se o tamanho de uma população é substancialmente reduzido, pode-se ter como consequências genéticas, fenômenos tais como depressão por endocruzamento e/ou diminuição da variabilidade, o que por sua vez afetará o valor adaptativo geral da população (Saccheri, 1998). Em decorrência destes acontecimentos, o tamanho efetivo da população irá declinar, levando assim a população à extinção. Portanto, informações sobre a diversidade e/ou estrutura genética são extremamente importantes antes que decisões sobre manejo sejam adotadas. A quantidade de diferenciação genética entre populações pode também fornecer dados para o planejamento de ações tais como reforço da variabilidade das populações atuais, reintrodução ou manutenção de coleções ex-situ ou coleções de sementes. Devido a razões práticas e financeiras nem todas as populações em perigo de extinção podem ser conservadas, portanto, prioridades devem ser estabelecidas (Gaudeul et al., 2000), tendo como base a conservação de populações que apresentem níveis genéticos mais diversos e/ou diferenciados. Entretanto, se o reforço de uma população atual é considerado, os novos indivíduos a serem introduzidos na população devem ser escolhidos de modo a serem

ecologicamente e geneticamente semelhantes às populações, no sentido de evitar eventual depressão por fertilização cruzada, devido à destruição de complexos gênicos coadaptados.

Dentre as espécies do Bioma Mata Atlântica, *Actinostemon concolor* (Euphorbiaceae), *Aegiphila sellowiana* (Lamiaceae), *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae), *Balfourodendron riedelianum* (Rutaceae), *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae), *Chrysophyllum gonocarpum* (Sapotaceae), *Inga marginata* (Leguminosae), *Luehea divaricata* (Malvaceae), *Parapiptadenia rigida* (Leguminosae), *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) e *Sorocea bonplandii* (Moraceae) são importantes para a recolonização de áreas florestais degradadas. Por apresentarem ampla distribuição no Bioma Mata Atlântica, estas espécies foram escolhidas para este estudo. A espécie arbórea *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg., conhecida comumente como peroba ou peroba-rosa, é amplamente distribuída no Brasil abrangendo os estados da Bahia, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Rondônia e Paraná, presentes principalmente em florestas estacionais semidecíduais. A peroba é uma árvore com aproximadamente de 20 a 30m, tronco de 60 a 90cm de diâmetro e folhas glabras. Ocorre em solos profundos e férteis, situados nos espigões e nas encostas. Floresce durante os meses de outubro a novembro, sendo a maturação dos frutos nos meses de agosto a setembro. Produz grande quantidade de sementes apenas em intervalos de 2 a 4 anos. As sementes são aladas, o que facilita a dispersão anemocórica, não possui dormência e perdem a viabilidade em seis meses quando armazenadas em laboratório, sendo que a disseminação de pólen entre as flores se dá provavelmente por mariposas e/ou pequenos insetos (Morellato, 1991). A espécie é longeva, podendo ultrapassar 1.200 anos de idade (Carvalho, 1994), levando mais de 50 anos para atingir seu estágio reprodutivo. Sua taxa de crescimento é de 10 a 15 anos para aumentar seu diâmetro na altura do peito em 5cm (Torezan et al., 2005). *Aspidosperma polyneuron* apresenta importância econômica pela sua madeira pesada e compacta utilizada na construção civil (Lorenzi, 2002).

Balfourodendron riedelianum (Engl.) Engl. é uma planta semidecídua, heliófila e pioneira, comum em clareiras da mata primária, matas secundárias e capoeirões, em toda a região da floresta semidecídua da bacia do Rio Paraná e Alto Uruguai. Apresenta regeneração natural graças a grande produção de sementes, facilmente disseminadas pelo vento. Floresce a partir do final de setembro, prolongando até novembro. A maturação do fruto ocorre durante os meses de agosto-setembro. Distribui-se desde Minas Gerais e Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul. A madeira é indicada para o fabrico de móveis de luxo, portas, ripas, rodapés, tábuas e tacos para assoalhos. A árvore pode ser empregada na arborização de parques e jardins (Lorenzi, 2002).

Aegiphila sellowiana é uma planta decídua, heliófila, pioneira, característica das formações secundárias das florestas pluviais e semidecíduas, ocorrendo nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Paraná. Esta espécie apresenta de 4-7m de altura, com tronco de 20-30 cm de diâmetro, sendo sua madeira utilizada para obras internas e construção de caixotes. Outra espécie a ser estudada é a *Luehea divaricata*, a qual é uma espécie decídua, heliófila, seletiva, higrófila, e de ocorrência freqüente nas florestas aluviais ou mata ciliares. É uma planta pioneira de rápido crescimento, que não pode faltar nos reflorestamentos mistos de áreas degradadas de preservação permanente. Sua madeira é empregada na confecção de móveis, construção civil, molduras, rodapés e guarnições. Sua *Luehea divaricata* ocorre desde o sul da Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais,

Goiás e Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul. *Parapiptadenia rigida* apresenta altura de 20-30 metros, com tronco de 60-110 cm de diâmetro. A planta é decídua, heliófita, pioneira, característica e exclusiva da mata latifoliada das bacias do Paraná, Uruguai e afluentes. É mais frequente nas matas abertas e menos densas e, principalmente nas associações secundárias mais evoluídas. Anualmente produz grande quantidade de sementes. A madeira é ótima para construção civil e naval, postes dormentes, confecção de peças de resistência. Ocorre nos Estados de Minas Gerais, Mato grosso do Sul, São Paulo até Rio Grande do Sul porém, muito mais frequente nos três estados do sul do Brasil, na mata latifoliada semidecídua da bacia do rio Paraná (Lorenzi, 2002). *Schinus terebinthifolius* é uma árvore com 5-10 metros de altura com troncos de 30-60cm de diâmetro. A planta é perenifolia, heliófita e pioneira, comum em beira de rios, córregos, em várzeas húmidas e também em terrenos secos e pobres. É disseminada por pássaros sendo sua dispersão ampla, ocorrendo desde a restinga até as florestas pluviais e semidecídua de altitude. Ocorre desde o estado de Pernambuco até Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (Lorenzi, 2002). *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae) é uma espécie arbórea que ocorre nas porções húmidas das florestas semidecíduas. Esta espécie tem uma distribuição ampla em fragmentos de florestas em vários biomas no Brasil. Encontra-se espalhada a partir do estado do Espírito Santo indo até os estados da região sul do Brasil e também no Uruguai, Argentina e Paraguai. Esta espécie cresce de 8 a 25 metros de altura com diâmetro de 30 a 60 cm. As flores muito pequenas são hermafroditas e polinizadas por abelhas, particularmente pela espécie *Tetragonisca angustula*. Florescimento ocorre de setembro até novembro e os frutos amadurecem entre novembro a fevereiro (Lorenzi, 2002). *Campomanesia xanthocarpa* é encontrada nos fragmentos semidecíduais que ocorrem nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, na floresta latifoliada semidecídua da bacia do rio Paraná. *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl. (Sapotaceae) é uma espécie que cresce até 20 metros sendo comumente usada para paisagismo urbano e construção de casas. Esta espécie produz uma grande quantidade de frutos os quais são muito apreciados por pássaros, razão pela qual não pode faltar na composição de florestas heterogêneas durante a restauração de áreas degradadas. Esta espécie ocorre desde o Rio de Janeiro e Minas Gerais até o Rio grande do Sul, na floresta latifoliada da bacia do Paraná (Lorenzi, 2002). *Actinostemon concolor* (Spreng.) Müll.Arg. (Euphorbiaceae) conhecida popularmente como laranjeira do mato e pau-rainha. Esta espécie é considerada uma arvoreta de folhas simples, alternas, lisas e brilhantes, apresentando glândulas no limbo foliar, próximas a base, ocorrendo facilmente em sub-bosque (Lorenzi, 2002). *Sorocea bonplandii* (Baill.) W.C.Burger, Lanj. & de Boer (Moraceae) também considerada uma arvoreta (6 a 12 m) lactescente, perenifolia, característica do subbosque florestal e de grande interesse farmacológico, apresentando valor medicinal similar ao da espinheira-santa (Klein, 1972; Vilegas et al., 1998; Gonzalez et al., 2001; Keller, 2001; Ruschel et al., 2006a). A espécie apresenta vasta distribuição ocorrendo desde o Sul ao Nordeste brasileiro. No domínio da Floresta Estacional Decidual, a espécie corresponde a aproximadamente 10% do total das plantas lenhosas (DAP $\geq$ 5cm) e exibe dispersão espacial agrupada, formando tipicamente banco de plântulas (Ruschel et al., 2006b). *Inga marginata* Kunth (Leguminosae) é uma árvore de 3-12 metros de altura, ramos cilíndricos a levemente angulosos, glabros ou glabrescentes quando jovens, tornando-se glabros quando maduros, densa ou esparsamente lenticelados, lenticelas pouco proeminentes,

esbranquiçadas, às vezes verrucosas; estípulas pubescentes a glabras, lanceoladas ou oblongas, 6-15 x 1,2-2,5 mm, estriadas longitudinalmente, caducas. Folhas pecioladas, ápices acuminados ou acuminado-apiculados; superfície glabra; nectários foliares sésseis, cilíndricos. Inflorescências espiciformes cilíndricas, sem adensamento, 1-4 por axila; pedúnculos pubescentes a glabros. Flores sésseis ou curto-pediceladas. Frutos sésseis, coriáceos, glabros, verde-amarelados quando maduros; sementes verdes, quase circulares, sarcotesta adocicada, comestível (Lorenzi, 2002).

Duas técnicas serão utilizadas para determinar a variabilidade genética destas espécies: AFLP e microssatélites. A técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), primeiramente descrita por Vos et al. (1995), explora a simplicidade e geração de grande número de marcadores que abrangem todo o genoma sem qualquer sequenciamento prévio do mesmo. Deste modo a técnica de AFLP permite com relativa facilidade o desenvolvimento de marcadores, os quais são importantes na conservação e manejo de espécies em perigo de extinção. Uma das principais vantagens desta técnica é que a sua repetibilidade é relativamente elevada. Porém, os marcadores gerados por AFLP são dominantes e não é possível uma distinção entre homozigotos e heterozigotos (Gaudeul et al., 2000). O sistema de marcador polimórfico mais informativo são os microssatélites. A variação no comprimento de regiões repetidas entre indivíduos é revelada pela amplificação do DNA genômico com dois primers que as flanqueiam, e deste modo definem o loco microssatélite. Microssatélites são marcadores codominantes, portanto mais informativos que os marcadores AFLP, já que permitem a determinação de genótipos heterozigotos. Porém, sua obtenção requer sequenciamento das extremidades das regiões do genoma com repetições e o delineamento dos primers, tornando esta técnica laboriosa e cara.

2. Objetivos e Justificativas

Objetivos

1 – Estudos de variabilidade genética e estrutura de populações

a) Aplicar técnicas de AFLP e Microssatélites em diferentes populações de *A. concolor*, *A. polyneuron*, *A. sellowiana*, *B. riedelianum*, *I. marginata*, *L. divaricata*, *S. terebinthifolius*, *C. xanthocarpa*, *C. gonocarpum* e *P. rigida* e *S. bonplandii*, para identificar o nível de variabilidade genética entre e dentro de populações em toda a área de distribuição das espécies;

b) Verificar a variabilidade genética entre plantas jovens e planta adultas de *A. concolor*, *C. gonocarpum*, *I. marginata* e *S. bonplandii*, com objetivo de averiguar se a variabilidade genética não foi diminuída de uma geração para outra por ação antrópica nas reservas: 1. Parque Estadual Mata dos Godoy (Londrina) e Parque Estadual Mata São Francisco (Cornélio Procopio);

c) verificar se o tamanho efetivo das diferentes populações de *A. polyneuron*, *A. sellowiana*, *L. divaricata*, *S. terebinthifolius*, *C. xanthocarpa*, *C. gonocarpum* e *P. rigida* *A. concolor*, *S. bonplandii*, *I. marginata* foi reduzido devido ao processo de colonização antrópica das diferentes áreas de distribuição natural destas espécies;

d) Verificar se o fluxo gênico ocorre entre as diferentes populações das espécies citadas, e caso este fluxo seja verificado, determinar se o mesmo é uni- ou bidirecional;

e) Verificar se desequilíbrio de ligação ocorre dentro de cada população e se o nível de desequilíbrio de ligação em toda a espécie na área em estudo indica ocorrência de efeito de gargalo de garrafa e alta taxa de extinção-substituição durante a história recente da espécie;

f) Verificar se ocorre alguma correlação entre as distâncias genéticas e geográficas como também entre o tamanho das populações e o seu nível de heterozigosidade.

Justificativa: Aspectos mais relevantes a serem considerados sobre a realização deste projeto

A - Aspectos Econômicos: As espécies a serem estudadas, foram por longo tempo, exploradas economicamente pelo homem e várias das populações remanescentes não mais suportam a atividade extrativista. Entretanto, a preservação de tais populações é economicamente importante para manutenção da qualidade do solo, desejável para a agricultura, e para a manutenção da qualidade da água quando as mesmas fazem parte de matas ripárias, o que aumenta os estoques pesqueiros e diminui os custos de captação, tratamento e distribuição da água para a comunidade humana.

B - Aspectos Ambientais: A introdução de indivíduos ao acaso, sem que se conheça a origem genética, em uma dada comunidade vegetal, pode fazer com que complexos gênicos importantes para as condições adaptativas das populações sejam destruídos. Portanto, é extremamente importante antes de iniciar a recuperação de uma comunidade vegetal que se conheça a variabilidade genética da mesma. Outro fator importante é de conhecer quais fragmentos ou população de uma determinada espécie vegetal não tem ainda a sua variabilidade comprometida pela ação do ser humano de modo que estas populações possam servir como doadoras de mudas para a recomposição de fragmentos degradados.

C - Aspectos Científicos: Poucos estudos envolvendo técnicas moleculares foram realizados até o momento em espécies arbóreas da Mata Atlântica. As informações serão importantes para a elaboração de estratégias voltadas para manutenção, recuperação e uso sustentável das populações de plantas. Este projeto resultará em vários artigos científicos que serão publicados nos periódicos *Genetica*, *Biologia Plantarum*, *Conservation Genetics*, *Conservation Genetics Resources*, *Genetics and Molecular Biology* e *Molecular Ecology Resources*. Ainda, devem resultar deste trabalho, teses de doutorado, e dissertações de Mestrado e várias apresentações, com participação de vários alunos de iniciação científica, em encontros científicos regionais, nacionais e internacionais.

3. Metodologia e Estratégia de Ação: Aplicações de técnicas de PCR

3.1 Coleta de plantas para análise das populações por AFLP e microssatélites nas áreas de distribuição das mesmas. As árvores adultas serão identificadas, amostradas e mapeadas. Para coleta do material vegetal será estabelecido uma distância mínima 20m de uma árvore da outra. Para assegurar a amostragem de adultos será estabelecido um DAP mínimo para coleta para cada espécie de acordo com a idade reprodutiva observada em campo. Para estudar a distância de dispersão de sementes e pólen e estrutura genética espacial da regeneração serão coletados juvenis e sementes de 30 matrizes, ou seja árvores

com frutos, para obtenção de famílias de polinização aberta. A coleta de juvenis será amostrada em parcelas circulares com um raio de 30m em torno da matriz.

3.2 Extração de DNA: DNA será extraído segundo o protocolo CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987) com a substituição do CTAB por MATAB. Cada reação de AFLP terá cerca de 500ng de DNA e cada reação de microssatélite conterá cerca de 10ng de DNA na reação.

3.2 .1 Metodologia de AFLP

A - Restrição e Ligação: Cada amostra de DNA será submetida a restrição com as enzimas *EcoRI/MseI* e os fragmentos serão ligados a adaptadores específicos, conforme descrito por Vos et al. (1995).

B - Amplificação pré-seletiva: A reação pré-seletiva utilizando a reação de restrição-ligação diluída será efetuada de acordo com Vos et al. (1995).

C - Amplificação seletiva: a reação será realizada com as combinações de primers seletivos *EcoRI/MseI* que fornecerem um maior polimorfismo. O produto da amplificação será separado por eletroforese a 220V por aproximadamente duas horas.

D - Análise estatística de dados de AFLP – Devem ser analisados em torno de 300 marcadores para cada espécie em estudo. Os géis serão analisados usando o Sistema de Análise Genética CEQ™ 8000 (solicitado), o qual permite estudos detalhados de estruturas genômicas. Pelo fato de não existir nenhuma informação sobre o nível de heterozigosidade para as espécies sob estudo, duas alternativas serão consideradas para a análise dos dados: 1. Assumindo que todas as populações em estudo estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($F_{IS}=0$) e que a frequência da ausência de uma banda específica é q^2 , onde q é a frequência do alelo nulo; 2. Análise dos dados de presença/ausência, de modo que as frequências das bandas são iguais as frequências alélicas e assumindo autofecundação por várias gerações ($F_{IS}=1$) (Gautier et al. 2000). A estatística F será computada sob a hipótese de cruzamentos ao acaso ($F_{IS}=0$) pela aplicação do software “Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA; Miller,1997)”, o qual fornece um valor de F_{ST} sem “viés” (Weir e Cockerham, 1984) com um intervalo de confiança de 95%, obtido com um bootstrap de 1000 replicações para cada loci. Dados sobre presença/ausência ($F_{IS}=1$) serão usados para calcular F_{ST} com o programa POPGENE 1.31 (Yeh et al. 1999). Para verificar a correlação entre distâncias genéticas (F_{ST}) e distâncias geográficas (em km) entre populações, o teste de Mantel será aplicado (Mantel, 1967), com o uso do programa TFGPA. Distância e identidade genética entre populações serão estimadas de acordo com Nei (1978). Estes parâmetros e a porcentagem de loci polimorficos serão calculados com o software 1.31 POPGENE (Yeh et al.,1997). A matriz de distância para cada espécie será calculada com o software NTSY-pc, versão 2.1 (Rohlf, 2000). Dendograma será construído com o emprego do método UPGMA. O método bootstrap será aplicado para avaliar o grau de confiança do dendograma, usando o software BOOD, versão 3.0 (Coelho, 2001). A análise de variância molecular (AMOVA) será calculada com o objetivo de estimar a variação dentro e entre populações, utilizando somente os loci polimorficos de AFLP. A AMOVA, o índice de

fixação de Fixação F_{ST} e o desequilíbrio de ligação serão calculados com o software Arlequin (Schneider et al. 2000).

3.2.2 Construção de bibliotecas enriquecidas em microssatélites

A - Para construção dos bancos enriquecidos em microssatélites o DNA genômico de cada espécie em estudo será digerido pela enzima de restrição *RsaI*, os fragmentos resultantes serão ligados a dois adaptadores específicos e amplificados via PCR. O produto da amplificação será purificado usando o kit “Quiaquick PCR purification kit”. A seleção de fragmentos contendo microssatélites será feita pelo uso de esferas magnetizadas cobertas com streptavidina e de oligo de microssatélites biotinolado Biotina-III (CT)₈ e Biotina III (GT)₈. Os fragmentos selecionados serão amplificados e clonados em vetor pGEN-T EASY. A seguir o DNA plasmidial das colônias recombinantes (contendo o inserto) será isolado para posterior sequenciamento, no Sistema de Análise Genética CEQ™ 8000. Fragmentos que contenham sequências de DNA com regiões de microssatélites de di- tri- ou tetranucleotídeos repetidos mais de cinco vezes serão escolhidos para confecção de primers de microssatélites. Sequências que flaqueiam as regiões de microssatélites serão escolhidas por meio de software específico para confecção dos primers a serem usados nas reações de PCR.

B - Análise Estatística dos dados obtidos com primers de microssatélites

Os locos serão testados para desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação com o software GENEPOP versão 3.4 (Raymond and Rousset, 1995). O número de alelos, heterozigosidade observada (H_0) e diversidade gênica de Nei (H_E) serão calculados pelo software Microsatellite Analyser (Dieringer e Schlötterer, 2002). A deficiência de heterozigotos para cada loco e população será testada com o software GENEPOP versão 3.4 (Raymond; Rousset, 1995). A distância genética de Nei (1978) será calculada pelo software POPGENE (Yeh et al. 1999). O coeficiente de endocruzamento F_{IS} e riqueza alélica (A_R , correlacionada com tamanho de população) para cada localidade será calculada pelo programa FSTAT versão 2.9.3 (Goudet, 2001). Para comparar os valores de F_{IS} , H_0 e A_R entre as localidades o programa FSTAT será usado com permutação de 5000 vezes. Variação genética dentro e entre populações será analisada pela análise de variância molecular (AMOVA) com o uso do software Arlequin 2.0 (Schneider et al. 2000). Estimativas de F_{ST} , com intervalo de confiança de 95%, entre as diferentes populações serão calculadas pelo software Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), com um bootstrap de 1000 replicações por locos. Para testar a correlação entre distâncias genéticas (F_{ST}) e distâncias geográficas (em km) entre as populações o teste de Mantel será aplicado com o uso do software TFPGA (5000 permutações). Para verificar se as populações estão realmente estruturadas em populações distintas ou se todos os indivíduos fazem parte de uma única metapopulação será utilizado o software Structure (Pritchard et al. 2000). A taxa de migração entre os pares de subpopulações será determinada com o uso do software BAYESASS (Wilson e Rannala 2003). Redução recente no tamanho da população (em 2-4 gerações) será investigada com o emprego do software BOTTLENECK (Cornuet e Luikart 1996, Piry et al. 1999). Efeito de gargalo recente nas populações são detectados pelo excesso relativo de heterozigosidade em relação ao valor de equilíbrio da heterozigosidade em uma população estável (Piry et al. 1999) pois, populações que experimentaram

recentemente o efeito de gargalo de garrafa apresentam uma perda no número de alelos mais rápido do que a população com equilíbrio da heterozigosidade (Maruyama e Fuerst 1985).

4. Equipe

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas (Coordenador e responsável pelo projeto)

Profª. Dra. Claudete de Fátima Ruas (Colaboradora)

Prof. Dr. Edmilson Bianchini (Colaborador)

Prof. Dr. José Antônio Pimenta (Colaborador)

Dra. Ana Paula Silva Campos Gaino – (Colaboradora auxiliando na orientação de alunos de Iniciação científica e de Pós-graduação)

Dr. Eduardo Augusto Ruas bolsista de Pós-doutorado (Colaborador e responsável pela análise estatística dos dados)

- Doutorandos

Luana Alves Rodrigues

- Mestrandos

André Ricardo Oliveira Conson

Bruno Fernandes Costa

- Bolsistas de Iniciação Científica

Natalia Cristine Signore

Jessica Delfini

Thiago Vidoto

- Bolsista de Auxílio Técnico

Bruna Gonçalves Vieira

5. Cronograma de execução

Descrição das Atividades	2011		2012		2013	
	1º sem	2º sem	1º sem	2º sem	1º sem	2º sem
Caracterização das áreas de estudo	X	X				
Revisão bibliográfica	X	X	X			
Coleta de Plantas	X	X	X			
Extração de DNA	X	X	X			
Quantificação de DNA	X	X	X			
Desenvolvimento de bancos enriquecidos em microssatélites (SSRs)	X	X	X			
Análise de sequências e construção de primers específicos para SSR	X	X	X	X		
Reações de AFLP	X	X	X	X		
Reações de amplificação com primers de microssatélites	X	X	X	X		
Mapeamento e amostragem de plantas de <i>A. polyneuron</i> no Parque Estadual Mata dos Godoy.	X	X				
Análise de parentesco de plantas regenerantes	X	X	X	X	X	
Determinação da distância e padrões de dispersão de pólen e sementes de <i>A. polyneuron</i>	X	X	X	X	X	
Análise estatística dos dados		X	X	X	X	X
Disseminação: Apresentação em eventos científicos	X	X	X	X	X	X
Redação de artigo e envio para publicação	X	X	X	X	X	X

6. Bibliografia citada

BROWN JR, K.S. & AB' SABER, A. N. Ice-age forest refuges and evolution in the neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with modern biological endemism. **Paleoclimas** 5: 1-30, 1979.

BROWN, K. S.; BROWN, G. G. Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: WHITMORE, T. C.; SAYER, J. A. (Ed.). Tropical deforestation and species extinction. London: Chapman and Hall. cap. 6, p. 119-147, 1992.

CÂMARA, I. G. Plano de Ação para a Mata Atlântica: roteiro para a conservação de sua biodiversidade. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica e UNESCO, Programa MAB – O homem e a biosfera, (Série Políticas Públicas, Caderno 4) 22p., 1996.

CAMPOS, L. F. G. Mapa florestal do Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura,

Indústria e Comércio, 20p., 1926.

CARVALHO, P.E.R. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa-CNF/Colombo, Pr., 1994.

COELHO, A.S.G. **Software: BOOD Versão 2.0** Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap, Versão 3.0. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2001.

CORNUET J.M.; LUIKART G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics** 144: p. 2001-2014, 1996

DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite analyzer (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. **Molecular Ecology Notes** v. 3 p. 1767-169, 2002.

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

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. Dossiê Mata Atlântica. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, p. 23-27, 1992.

GAUDEUL, M.; TABERLET, P.; TILL-BOTTRAUD, I. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. **Molecular Ecology** v. 9: p. 1625-1637, 2000.

GIULIETTI, A. M. & FORERO, E. Diversidade taxonômica e padrões de distribuição das angiospermas brasileiras. *Acta Botanica Brasilica*, v. 4, p. 3-10, 1990.

GONZALEZ F.G., PORTELA T.Y., STIPP E.J., DI STASI L.C. 2001. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bonplandii* and *Zollernia ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77: 41-47.

GOUDET, J. **FSTAT , a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)**. Webside <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>, 2001.

HAMRICK, J. L.; GODT, M.J.W.; MURAWSKI, D.A.; LOVELESS, M.D. Correlations between Species Traits and Allozyme Diversity: Implication for Conservation Biology. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (Eds) **Genetics and Conservation of Rare Plants** . Oxford University Press, Oxford. p.75-86, 1991.

JOLY, C. A.; LEITÃO-FILHO, H. F.; SILVA, S. M. O patrimônio florístico. In: CÂMARA, I. G. (Org.). SOS Mata Atlântica. Rio de Janeiro: Index; Fundação SOS Mata Atlântica; Fundação Banco do Brasil, p. 94-125, 1991.

- KELLER H.A. 2001. [Online]. Etnobotánica de los guaraníes que habitan la selva Misionera. Jornadas de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste, p.01-04. Homepage: <http://www.unne.edu.ar/cyt/2001/6-Biologicas/B-008.pdf>, Acessada em Janeiro 2003.
- KLEIN R.M. 1972. Árvores Nativas da Floresta Subtropical do Alto Uruguai: Sellowia. 24: 09-62.
- LEITÃO-FILHO, H. F. Aspectos taxonômicos das florestas do Estado de São Paulo. Silvicultura em São Paulo, São Paulo, v. 16A, n. 1, p. 197-206, 1982.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. Nova Odessa, São Paulo, 2002.
- MAGNANINI, A. A ação do homem na extinção das espécies selvagens. Vellozia, Rio de Janeiro, n. 1, p. 18-22, 1961.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research** 27: 209-220, 1967
- MANTOVANI, W.; RODRIGUES, R. R.; ROSSI, L.; ROMANIUC NETO, S.; CATHARINO, E. L. M.; CORDEIRO, I. A vegetação da Serra do Mar em Salesópolis, SP. In: SIMPÓSIO DE ECOSISTEMAS DA COSTA SUL E SUDESTE BRASILEIRA: ESTRUTURA, FUNÇÃO E MANEJO, 2., 1990, São Paulo. Anais... São Paulo: Academia de Ciências do Estado de São Paulo, v. 1, p. 348-384, 1990.
- MANTOVANI, W. & SILVA, S.M. Flora - Relatório técnico. In: Workshop Floresta Atlântica e Campos Sulinos. Disponível em: http://www.bdt.fat.org.br/workshop/mata.atlantica/BR/rp_flora, 1999. Acesso em: 25.10.2003.
- McNEELY, J. A.; MILLER, K. R.; REID, W. V.; MITTERMEIER, R. A. & WERNER, T. B. Conserving the World's Biological Diversity. IUCN, Gland, Switzerland; WRI, CI, WWF-US, and the World Bank, Washington, 1990.
- MARUYAMA, T.; FUERST, P.A. Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. **Genetics** 111: p. 675-689, 1985.
- MITTERMEIER, R. A.; MYERS, N.; MITTERMEIER, C. G. Hotspots: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. Cidade do México: CEMEX, 430p., 1999.
- MILLER, M.P. **Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), Version 1.3**: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population data. Computer software distributed by author, 1997.

MORELLATO, L.P.C. Fenologia de árvores, arbustos e lianas em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. Tese de doutorado, Universidade de Campinas, Campinas, 1991.

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

PIRY, S.; LUIKART, G.; COURNET, J.M. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity** 90: p. 502-503, 1999.

POR, F. D. Sooretama: The Atlantic Rain Forest of Brazil. Hague: SPB Academic Publishing, 130p., 1992.

PRITCHARD, J. K.; STEPHANS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** v.155: p.945-959, 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP, Version1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity** v.86: p.248-249, 1995.

RUSCHEL A.R., NODARI R.O., MOERSCHBACHER B.M. 2006b. Woody plant species richness in the Turvo State Park, a large remnant of Deciduous Atlantic Forest, Brazil. *Biodiversity and Conservation* . DOI 10.1007/s10531-006-9044-7.

RUSCHEL A.R., MOERSCHBACHER B.M., NODARI R.O. 2006a. Demography of *Sorocea bonplandii* in Subtropical Atlantic Forest fragments in the Southern Brazil. *Scientia Forestalis*. 70: 149-159

SACCHERI, I.; KUUSSAARI, M.; KANKARE, M. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. **Nature** v. 392: p.491-494, 1998.

SCHNEIDER, S.; RÖSSL, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin, Version 2000**: a software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SALIS, S.M.; SHEPHERD, G.J. & JOLY, C.A. Floristic comparison between mesophytic forests of the interior of the state of São Paulo, S.E. Brazil. **Vegetation** vol. 119:155-164, 1995.

SCUDELLER, V.V. 2002. **Análise fitogeográfica da Mata Atlântica - Brasil**. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Biologia Vegetal, IB, UNICAMP.

SIQUEIRA, J. D. P. Expressão econômica e social das essências nativas. *Silvicultura em São Paulo*, São Paulo, v. 16A, n. 3, p.1444-1464, 1982.

SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: período 1995-2000. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, p. 42-43, 2002a.

TORRES, R. B.; MARTINS, F. R. & KINOSHITA, L. S. 1997. Climate, soil and tree flora relationships in forests in the state of São Paulo, southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Botânica** 20 (1): 41-49, 1997.

TOREZAN, J.M.D.; SOUZA, R.F.; RUAS, P.M.; RUAS, C.F.; CAMARGO, E.H.; VANZELA, A.L.L. Genetic variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Mell. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology** v. 48: p. 171-180. 2005.

VILEGAS J.H.I., LANÇAS F.M., WAUTERS J.N., ANGENOT L. 1998. Characterization of adulterations of “espíneira-santa” (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*, Celastraceae) hydroalcoholic extracts with *Sorocea bonplandii* (Moraceae) by highperformance thin layer chromatography. *Phytochem Anal*, 9: 263-266.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** v. 23: p. 4407-4414, 1995.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. . Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution** v. 43: p.1358-1370, 1984.

WILSON G.A.; RANNALA B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. **Genetics** 163: p.1177-1191, 2003.

YEH, F.; YANG, R.C.; MAO, J.; YE, Z.; BOYLE, T.J.B. **The user-friendly shareware for Population Genetic Analysis**. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, 1999.

7. Orçamento para execução do projeto:

Este projeto consta com orçamento de R\$ 55.000,00 aprovados pelo CPPq (Proc. N° 478179/2006-5 e Fundação Araucária (Convênio 064/2007).

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
Coordenador do projeto
Depto de Biologia Geral
Universidade Estadual de Londrina