



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CAMPUS SÃO GABRIEL

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL EM *Luehea divaricata*
Mart. & Zucc. NA REGIÃO DA FRONTEIRA OESTE DO RIO GRANDE DO SUL,
BASEADA EM MARCADORES MICROSSATÉLITES**

JORDANA CAROLINE NAGEL
2013

JORDANA CAROLINE NAGEL

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL EM *Luehea divaricata*
Mart. & Zucc. NA REGIÃO DA FRONTEIRA OESTE DO RIO GRANDE DO SUL,
BASEADA EM MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, RS), *Campus* São Gabriel, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Valdir Marcos Stefenon.

**São Gabriel, RS, Brasil.
2013**

NAGEL, Jordana Caroline

Diversidade e Estrutura Genética Populacional em *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. na Região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, Baseada em Marcadores Microssatélites / Jordana Caroline Nagel. 2013.

59 f.: il.

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pampa, 2013.
Orientação: Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon.

1. Genética. 2. Genética de Populações. 3. Ecologia Molecular. I. Stefenon, Valdir Marcos. II. Título.

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL EM *Luehea divaricata*
Mart. & Zucc. NA REGIÃO DA FRONTEIRA OESTE DO RIO GRANDE DO SUL,
BASEADA EM MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Elaborada por

Jordana Caroline Nagel

Dissertação Defendida em 26/02/2013.
Banca examinadora:

Prof. Dr. Valdir Marcos Stefenon
Orientador – Universidade Federal do Pampa

Prof^ª. Dr^ª. Lia Rejane Silveira Reiniger
Membro Titular - Universidade Federal de Santa Maria

Prof^ª. Dr^ª. Adriana Pires Soares Bresolin
Membro Titular - Universidade Federal do Pampa

Prof. Dr. Guilherme Ribeiro
Membro Titular - Universidade Federal do Pampa

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo
Suplente - Universidade Federal do Pampa

Dedico esta dissertação ao meu anjo, meu amor,
minha vida, para minha linda filha Isabella.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado, dando-me toda a sabedoria e discernimento na trajetória de mais uma etapa cumprida.

A toda minha família que sempre me incentivou nos estudos e buscou sempre me ajudar nos momentos de dificuldade.

Principalmente aos meus pais, Beloni e Romeu, pelo apoio e a confiança que sempre depositaram em mim.

Ao meu marido, Maurício Madeira Tolfo, pela ajuda no trabalho, compreensão, carinho e paciência.

Ao maior presente que recebi durante o mestrado, a chegada da minha filha Isabella.

Agradeço à Universidade Federal do Pampa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas por oferecerem a estrutura e os recursos necessários para o desenvolvimento de meu mestrado.

Aos professores pelo ensinamento, dedicação e profissionalismo.

As minhas colegas de laboratório, Lilian, Fernanda, Prof. Marília, Carmine, pela ajuda, amizade, companheirismo e lealdade.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho, Dr^a. Denise Ester Ceconi e Dr. Igor Poletto, agradeço pela ajuda, carinho e apoio recebido durante esse período.

A CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa e ao CNPq pelo auxílio financeiro do projeto.

Ao professor Dr. Valdir Marcos Stefenon pela orientação, paciência, transmissão do conhecimento e experiência. Pois, sua colaboração e amizade fez com que esse trabalho tenha sido realizado com grande sucesso.

A todos MUITO OBRIGADA!

*“Semeia um pensamento e colherás um desejo;
semeia um desejo e colherás a ação; semeia a
ação e colherás um hábito; semeia o hábito e
colherás o caráter”.*

Tihamer Toth

RESUMO

Pertencente à família Malvaceae, o Açoita-cavalo (*Luehea divaricata*) é uma espécie florestal que ocorre naturalmente desde o Rio Grande do Sul até o sul da Bahia, sendo muito utilizada na confecção de móveis e, também, como fitoterápico. Por ser uma espécie pioneira de rápido crescimento, característica das florestas aluviais, apresenta, em condições de regeneração natural, uma grande quantidade de indivíduos, mostrando ser uma espécie recomendável para a regeneração natural de áreas degradadas. O Açoita-cavalo é uma das espécies nativas mais importantes do ponto de vista fitossociológico, ocorrendo em praticamente todas as bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul, na floresta ombrófila mista, na floresta estacional decidual, na floresta estacional semidecidual, na savana, na savana estépica e nas áreas de tensão ecológicas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade e estrutura genética de cinco populações naturais de *L. divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, no bioma Pampa. Amostras foliares foram coletadas de indivíduos adultos encontrados nas áreas (n=128). O DNA foi extraído com o kit Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek) e cinco *loci* microssatélites foram amplificados via PCR. Os alelos foram resolvidos em gel de poli(acrilamida) (a 10%) e os dados, analisados com auxílio do programa GenAlEx 6.4, FSTAT 2.9.3 e ARLEQUIN 3.1. Os resultados indicaram altos níveis de diversidade genética dentro das populações. A heterozigosidade esperada (H_e) e o índice de Shannon (I) foram de 0.627 e 1.223, respectivamente. A análise AMOVA mostrou que a maior parte da diversidade genética ocorre dentro das populações (76.12%). O índice de fixação nas populações estudadas demonstrou haver excesso de homocigotos em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os valores da distância genética de Nei indicaram alta divergência genética entre as populações, em função da baixa eficiência do fluxo gênico entre as populações. Os valores obtidos indicaram que o fluxo gênico está próximo do suficiente para prevenir a diferenciação populacional devido à deriva genética nas populações estudadas, e esse fluxo, deve ocorrer, principalmente, via pólen (por entomofilia), dado que a dispersão das sementes (por anemocoria) teoricamente alcançaria maiores distâncias. Essa baixa dispersão de sementes se deve, provavelmente, à fragmentação e consequente isolamento entre as populações estudadas. Estes resultados sugerem que a dispersão de propágulos reprodutivos em duas, das cinco populações, de certa forma é eficiente, pois apresentaram baixo grau de endogamia. Assim, programas de conservação dos recursos genéticos desta espécie tendem a ser efetivos se o fluxo de polinizadores for mantido, e, pela criação de corredores ecológicos para a conservação da conectividade entre os fragmentos. Além disso, os dados obtidos mostram que as populações estudadas devem ser priorizadas em programas de conservação genética da espécie, devido à alta diversidade genética observada, e, ao nível de fragmentação das áreas de remanescentes florestais na região do Pampa.

Palavras-chave: Açoita-cavalo, genética de populações, marcadores moleculares, bioma Pampa, ecologia molecular.

ABSTRACT

Belonging to the family Malvaceae, the Açoita-cavalo (*Luehea divaricata*) is a forest species that occurs naturally from the Rio Grande do Sul State to Bahia State, largely employed in the furniture manufacturing and as medicinal plant. It is a fast-growing pioneer species, characteristic of riparian forests, it presents in natural regeneration conditions, a large quantity of individuals, being indicated for the natural recovery of degraded areas. The açoita-cavalo is one of the most important native species for the phytosociology, occurring virtually in all hydrographical components of the Rio Grande do Sul, in the mixed ombrophylous forest, seasonal deciduous forest, seasonal semideciduous forest, savanna, stepic-savanna and in areas of ecological tension. This study aimed to characterize the genetic diversity and structure of five natural populations of *L. divaricata* in the region of “Fronteira Oeste” in the Rio Grande do Sul State, within the Pampa biome. Leaf samples were collected from adult individuals found in the areas (n=128). DNA was isolated using the Invisorb Plant Mini Kit (Invitex) and five microsatellite loci were amplified through PCR. The alleles were resolved in polyacrylamide gels (10%) and the data analyzed with the software GenAlEx 6.4, FSTAT 2.9.3 e ARLEQUIN 3.1. The results revealed high levels of genetic diversity within the populations. The expected heterozygosity (H_e) and the Shannon index (I) equaled 0.627 and 1.223, respectively. The AMOVA analysis revealed that the larger amount of the genetic diversity occurs within the populations (76.12%). The fixation index in the studied populations presented an excess of homozygotes in respect of the Hardy-Weinberg equilibrium. The values of the Nei's genetic distance point to high genetic divergence among the populations, consequence of the low efficiency of the gene flow among populations. The results indicate that gene flow is close enough to prevent population differentiation due to genetic drift in the populations studied, and this flow should occur mainly through pollen (by entomophily), since the seed dispersion (by anemochory), theoretically reaches longer distances. This low level of seed dispersion likely is due to the fragmentation and consequent isolation of the studied populations. These results suggest that the dispersal of reproductive propagules in two of the five populations in some ways is efficient because it presented low inbreeding. Thus, programs of genetic resources conservation of this species may be more efficient by maintaining the flow of pollinators, and the creation of ecological corridors for the conservation of connectivity between fragments. In addition, the obtained data reveals that the studied populations should be prioritized in programs of species genetic conservation, due to the relatively high level genetic diversity observed and the level of fragmentation of the areas of forest remnants in the Pampa region.

Key-words: Açoita-cavalo, population genetics, molecular markers, Pampa biome, molecular ecology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A. Folhas da espécie <i>Luehea divaricata</i> B. Copa da espécie <i>Luehea divaricata</i> C. Tronco da espécie <i>Luehea divaricata</i> . D. Flor da espécie <i>Luehea divaricata</i> . E. Fruto da espécie <i>Luehea divaricata</i> . F. Indivíduo adulto da espécie <i>Luehea divaricata</i>	20
Figura 2 – Mapa da distribuição natural de <i>Luehea divaricata</i> no Rio Grande do Sul.....	21
Figura 3 - Mapa do Rio Grande do Sul com as delimitações da região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul e do bioma Pampa.....	28
Figura 4 - Localização das cinco populações de <i>Luehea divaricata</i> amostradas na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	29
Figura 5 - Análise do gel pelo <i>software TotalLab TL120</i> ..	33
Figura 6 - Gel de poliacrilamida (a 10%) corado com nitrato de prata 2 gL^{-1} , em indivíduos de <i>Luehea divaricata</i> , com fragmentos de DNA amplificados com <i>primer</i> Ldiv31, em amostras da população do Rio Cacequi e população da BR 290.....	36
Figura 7 - Gel de poliacrilamida (a 10%) corado com nitrato de prata 2 gL^{-1} , em indivíduos de <i>Luehea divaricata</i> , com fragmentos de DNA amplificados com os <i>primers</i> Ldiv48A e Ldiv55, em amostras da população da BR 290 e população Camboazinho.....	36
Figura 8 - Frequência alélica para o <i>locus</i> Ldiv31 nas cinco populações de <i>Luehea</i> <i>divaricata</i> na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	40
Figura 9 - Frequência alélica para o <i>locus</i> Ldiv40 nas cinco populações de <i>Luehea</i> <i>divaricata</i> na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	40
Figura 10 - Frequência alélica para o <i>locus</i> Ldiv48A nas cinco populações de <i>Luehea</i> <i>divaricata</i> na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	40
Figura 11 - Frequência alélica para o <i>locus</i> Ldiv55 nas cinco populações de <i>Luehea</i> <i>divaricata</i> na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	41
Figura 12 - Frequência alélica para o <i>locus</i> Ldiv58 nas cinco populações de <i>Luehea</i> <i>divaricata</i> na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	41
Figura 13 - Análise de Componentes Principais (PCA) para cinco populações de <i>Luehea</i> <i>divaricata</i> na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	48

LISTA DE TABELAS

Quadro 1 - Períodos geológicos obtidos para as áreas de campo do sul do Brasil	18
Tabela 1 – Número de indivíduos e localização das cinco populações de <i>Luehea divaricata</i> da região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	29
Tabela 2 Identificação, sequência e temperatura de anelamento dos iniciadores utilizados nas análises de polimorfismo dentro e entre as populações de <i>Luehea divaricata</i> na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, tamanho e número de alelos revelados a partir do seu emprego.....	31
Tabela 3 - Número de alelos (N_a) por <i>locus</i> , e número efetivo de alelos (N_e) por <i>locus</i> para as cinco populações de <i>Luehea divaricata</i> na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	35
Tabela 4 - Índices de diversidade genética de cinco populações de <i>Luehea divaricata</i> na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	37
Tabela 5 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para <i>Luehea divaricata</i> , na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	42
Tabela 6 – Heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), estimativas de fluxo gênico (N_m) e estatísticas F para cada <i>locus</i> de todas as populações de <i>Luehea divaricata</i> na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	43
Tabela 7 - Valores de divergência genética (F_{st}), e estimativas de fluxo gênico (N_m) entre as cinco populações de <i>Luehea. divaricata</i> na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	45
Tabela 8 - Estimativas de distância genética de Nei (1978) entre as cinco populações de <i>Luehea divaricata</i> na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.....	47

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 A história dos Campos Sulinos	17
2.2 <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. (Malvaceae)	19
2.3 Diversidade e estrutura genética	22
2.4 Fragmentação de florestas e seus efeitos na estrutura e diversidade genética de populações naturais de espécies arbóreas	24
2.5 Marcadores moleculares	25
2.6 Marcadores microssatélites (SSR)	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Descrição da área de estudo e dos povoamentos amostrais	28
3.2 Análise de marcadores microssatélites	30
3.2.1 Extração das amostras de DNA e sequências de iniciadores utilizados.....	30
3.2.2 Reações de PCR e coloração do gel de poliacrilamida	31
3.2.3 Análise das bandas	32
3.2.4 Análises estatísticas	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Diversidade genética	35
4.2 Estrutura genética	42
4.3 Distância genética	47
5 CONCLUSÕES	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

Conforme a população mundial aumenta, as fronteiras agrícolas e urbanas se expandem, ocupando o habitat natural de inúmeras espécies de plantas e animais (STUSHNOFF e SEUFFERHELD, 1995). Estes acontecimentos vêm causando enormes perdas na diversidade genética de espécies de plantas nativas o que têm conduzido, muitas vezes, à sua completa extinção. Outro fator que beneficia o desequilíbrio na manutenção da variabilidade genética é o emprego maciço, na agricultura, de cultivares geneticamente melhoradas, devido ao seu potencial nutricional ou a alta produtividade (VILLALOBOS et al., 1991).

O Brasil é considerado o detentor da maior diversidade genética vegetal do planeta, contando com mais de 55 mil espécies catalogadas, distribuídas irregularmente em seus seis biomas de um total estimado entre 350 mil a 550 mil espécies de plantas (DIAS, 1996). O ritmo atual de extinção de plantas já se encontra em um nível 50 a 100 vezes maior que as médias observadas no século XIX (TILMAN et al., 1997).

O bioma Pampa, em particular, em sua porção brasileira, cobre mais da metade do Rio Grande do Sul, possuindo cerca de três mil espécies de plantas. Dentre estas, 450 espécies de gramíneas, mais de 150 de leguminosas, 70 tipos de cactos e 515 espécies de plantas arbóreas, conforme levantamentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) a pedido do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2007).

Dentre os biomas brasileiros, o Pampa tem recebido pouca, ou nenhuma, atenção, comparado com os demais, como a Amazônia ou a Mata Atlântica, e, até o momento, essa condição de ameaça não tem sido suficientemente reconhecida. As consequências da degradação do bioma Pampa foram estimadas em: fragmentação da paisagem, perda da biodiversidade, invasão biológica, erosão do solo, poluição da água, degradação da terra e uso abusivo de produtos químicos (BILENCA e MIÑARRO, 2004).

O Mapeamento da Vegetação Nativa do Bioma Pampa (MMA, 2007), verificou que existem 105 áreas importantes para conservação dos Pampas. O estudo observou 23,03% de remanescentes de campos, 5,38% de florestas e 12,91% de áreas de transição, em total de 73.649.746 Km² – o equivalente a 41,32% do seu território. Quase metade do bioma, hoje, foi

modificado, tornando-se áreas rurais antrópicas, como plantações e construções, menos de 1% é ocupado por cidades (MMA, 2007).

A expansão da agricultura é outra preocupação para este ecossistema, uma vez que os cultivos anuais aumentaram em torno de 5 milhões de hectares de 1985 para 1995/1996. A soja, em particular, disseminou em 250 mil hectares (em áreas primárias de campo nativo) somente em 2002. Em 2005, a indústria de celulose anunciou investimentos, esperando alcançar 1 milhão de hectares de *Eucaliptus* spp e *Acacia* spp nos anos subsequentes. Um censo aponta que os campos sulinos estão decrescendo em taxas de 3,6; 7,7 e 11,9%, respectivamente, na Argentina, Uruguai e Brasil (BILENCA e MIÑARRO, 2004).

Dados recentes do desmatamento do bioma Pampa, divulgados pelo Ministério do Meio Ambiente, em 2010, mostraram que, entre 2002 e 2008, 2.183 Km² de cobertura nativa foram derrubados. Entre 2008 e 2009, o bioma perdeu 331 Km² de área com a supressão de vegetação nativa, equivalente a um percentual de 0,18% do total original ocupado. Contudo, se comparado ao período de 2002 a 2008, com um percentual de 1,2%, houve um grande decréscimo (IBAMA, 2012). A progressiva introdução e expansão das monoculturas e das pastagens com espécies exóticas têm levado a uma rápida degradação e descaracterização das paisagens naturais do Pampa. Estimativas de perda de habitat dão conta de que, em 2002, restavam 41,32%, em 2008, apenas 36,03% da vegetação nativa do bioma Pampa (MMA, 2010).

O manejo de espécies nativas ainda apresenta muitas oportunidades de pesquisa e de novas buscas por informações. A preocupação com as espécies nativas é de grande relevância, considerando que ocorreu no sul do Brasil, uma significativa redução dessa cobertura florestal original e, paralelamente, uma degradação das formações florestais remanescentes, o que acaba comprometendo a biodiversidade do bioma (ROESCH et al., 2009).

Essa perda na biodiversidade do bioma ocasiona, segundo Young e Brown (1999), a perda de diversidade genética dentro de espécies, que pode estar relacionada a um efeito “gargalo”, que, quando muito severo, pode levar as populações de remanescentes florestais de tamanho efetivo pequeno à ação da deriva genética (processo estocástico, que atua sobre as populações, modificando as frequências alélicas e a predominância de certas características na população), caso essas populações permaneçam isoladas por certo número de gerações. Esse isolamento também pode levar as populações a um aumento significativo da endogamia (STEFENON e COSTA, 2012).

Assim como outras espécies nativas florestais brasileiras, *Luehea divaricata* tiveram suas populações naturais assoladas pela ação antrópica e, apesar de não estar na “Lista Oficial

das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção” do Ministério do Meio Ambiente, a conservação genética desta espécie é de grande importância, garantindo, assim, a preservação de seus genes, que serão a base para o melhoramento genético (RUAS et al, 2009). A escassez de estudos genéticos envolvendo espécies vegetais do bioma Pampa, especialmente arbóreas, leva à necessidade da elaboração de um quadro de informações com o maior número de espécies possível, e que possa orientar a seleção de espécies e populações a serem utilizadas em projetos de reflorestamento de áreas degradadas.

Além disso, esta espécie pode estar ameaçada localmente devido à redução do tamanho efetivo populacional, a retirada descontrolada da espécie para a confecção de móveis, e ao isolamento das populações em função da ação antrópica. A extinção de uma espécie ou a perda de indivíduos dentro de uma população com alelos únicos significa um prejuízo para sempre de combinações gênicas únicas e insubstituíveis, o que justifica a conservação genética (KAGEYAMA et al, 1998).

Para tal, é indispensável não só o conhecimento da diversidade de espécies, mas, também, conhecer a variabilidade genética dentro e entre populações presentes no bioma Pampa. Entretanto, poucas pesquisas foram realizadas sobre a diversidade genética em regiões neotropicais, sendo este o maior desafio colocado aos pesquisadores que visam à conservação de recursos genéticos. Até o momento, a estrutura genética de espécies arbóreas dos neotrópicos é praticamente desconhecida (CHASE et. al., 1995).

Devido à intensa degradação do bioma Pampa, provocada, principalmente, pelo estabelecimento de campos de cultivo e agropecuária que se estendem por grandes áreas, onde antigamente, florestas prevaleciam, faz-se necessário a elaboração e execução de projetos de recuperação e manejo dos fragmentos florestais que ainda persistem. Pois, o processo de degradação contribui para o declínio da riqueza e o crescente risco de extinção de espécies vegetais (HARRIS, 1980).

Tal perda de espécies não se dá facilmente por um efeito de redução do número de indivíduos, mas também pela perda das condições do habitat onde elas se encontram. Sendo que, algumas espécies não persistem em fragmentos devido às alterações das condições microclimáticas em relação à floresta contínua, resultantes do efeito de borda (LOVEJOY, 1983).

Além de estudos a respeito da ecologia, biologia das espécies, características ambientais de cada área, esses projetos só poderão ser adequados e eficientes se embasados em informações científicas obtidas a partir de estudos das características genéticas. Uma vez que estes estudos propiciam informações sobre padrões das populações, como o fluxo gênico,

a distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações, as taxas de cruzamento, etc.

A conservação genética de espécies arbóreas nativas é um dos tópicos mais relevantes da atualidade, uma vez que as elevadas taxas de destruição das comunidades naturais e massiva extinção de espécies arbóreas são iminentes. E, também, contribuindo para a sua não extinção, pois é uma espécie que tem uma ampla distribuição no Rio Grande do Sul, pioneira, de rápido crescimento, e por este motivo, pode ser usada em programas de recuperação de áreas degradadas do Estado.

Este trabalho propõe-se a efetuar caracterização da diversidade e estrutura genética da espécie arbórea *Luehea divaricata*, utilizando-se marcadores microssatélites no estudo de cinco sistemas populacionais da espécie na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul. E objetiva gerar informações úteis na determinação de áreas prioritárias para a conservação dos recursos genéticos florestais da região.

1.1 Objetivos

Geral:

- Gerar informações relacionadas à genética populacional da espécie arbórea *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, que possibilitem o desenvolvimento de estratégias e iniciativas de conservação, recuperação e manejo sustentável da região.

Específicos:

- Caracterizar a diversidade e estrutura genética de *Luehea divaricata* no bioma Pampa, baseado em marcadores microssatélites.

- Avaliar o fluxo gênico entre as populações de *Luehea divaricata*, na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

- Avaliar a importância das populações estudadas para a conservação dos recursos genéticos da espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A história dos Campos Sulinos

A vegetação do Rio Grande do Sul apresenta-se como um mosaico resultante das diferenças de relevo, geologia, solo e hidrografia. Esta vegetação, composta basicamente de campos e florestas, encontra-se em constante competição no espaço regional e é condicionada sob forte influência ambiental, principalmente as condições climáticas, que sofreram transformações ao longo do tempo (BAUERMANN et al., 2007).

Rambo (1956; 1961) e Klein (1975) sugeriram por evidências fitogeográficas que os campos foram as primeiras plantas herbáceas a se estabelecerem na região sul do Brasil e, que a presença atual de ampla diversidade de táxons florestais seria decorrente de um segundo período, em que houve alterações no clima para condições mais úmidas.

Outros trabalhos foram realizados na região dos campos da Campanha, perto da cidade de São Francisco de Assis, oeste do Rio Grande do Sul (BEHLING et al. 2005). A região esteve naturalmente coberta por campos durante todo o período Glacial e Holoceno, sob condições frias e relativamente secas e condições quentes e secas, respectivamente.

Uma mudança no clima para condições mais úmidas foi sugerida ter ocorrido a partir da expansão inicial das matas de galeria, após 5170 anos AP (Antes do Presente - O “presente” é, na verdade, o ano de 1950, que é a referência usada nas datações por radiocarbono). O auge da expansão dessas matas, após 1550 anos AP, reflete o período mais úmido registrado, mas a região conservou-se predominantemente campestre. Nesse mesmo trabalho, de Behling et al. (2005), foi apresentada uma síntese dos resultados obtidos para as áreas de campo do sul do Brasil com os períodos geológicos, os quais podem ser visualizados no Quadro 1.

Quadro 1- Períodos geológicos obtidos para as áreas de campo do sul do Brasil.

Época Geológica		Vegetação	Clima
Último Máximo Glacial	~ 18 ka* AP*	Predomínio de campo	Marcadamente seco e 5-7°C abaixo da temperatura atual
Pleistoceno Tardio	14-10 ka AP	Predomínio de campo	Permanece muito seco e frio
Holoceno Inferior	10-7,5 ka AP	Predomínio de campo	Clima seco e frio com períodos secos de ~3 meses ao ano
Holoceno Médio	7,5-4 ka AP	Campo continua sendo a vegetação predominante	Prevalecem as condições climáticas do Holoceno Inferior
Holoceno Superior	4 ka AP-presente	A partir de 3 ka AP: Início da expansão da Floresta com Araucária de refúgios florestais ao longo de rios sobre o campo em áreas mais elevadas Somente após 1 a 1,5 ka AP: Início da franca expansão da Floresta com Araucária substituindo o campo também em áreas mais elevadas	Aumento na quantidade e frequência das precipitações Condições climáticas atuais úmidas, sem ou com um curto período seco

*ka – mil anos. *AP – antes do presente.

Fonte: Behling et al, 2005.

A presença humana no Pampa, provavelmente, teve início no Pleistoceno, a cerca de 13 mil AP (BELLANCA e SUERTEGARAY, 2003). No período compreendido entre cerca de 18 mil e 12 mil anos AP imperava um clima mais seco e frio, e nível do mar abaixo do encontrado atualmente (CARVALHO, 2003).

O bioma Pampa sofreu vários ciclos de transformações ambientais ao longo do tempo, segundo Cruz et al. (2012), sendo o primeiro ciclo constituído pela chegada dos seres humanos por volta de 13 mil anos AP. Esses autores sustentaram a hipótese de que a chegada de seres humanos induziu, nesta época, à extinção da megafauna e à manutenção das paisagens abertas, no entanto com um novo padrão de vegetação, equilíbrio e perturbações, em uma escala temporal de milhares de anos. O segundo ciclo, caracterizado pela chegada dos europeus, em um cenário dominado por campos altos de hemicriptófitas adaptadas ao fogo, iniciou um novo período de modificações com a introdução de bovinos. Missões Jesuíticas

foram fundadas a partir de 1605, estancieiros Lagunenses chegaram a partir de 1719 (ASSUNÇÃO, 2007).

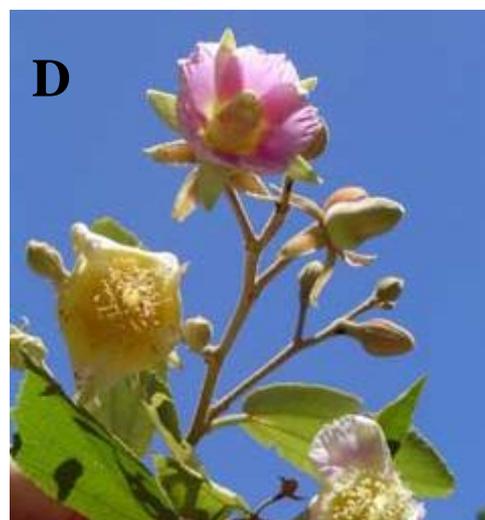
Deste modo, cerca de 7 mil anos após a extinção da megafauna, os novos colonizadores trouxeram novos grandes herbívoros para o bioma Pampa, principalmente bovinos e equinos, em uma escala temporal que decorreu centenas de anos. O terceiro ciclo envolveu um processo de perda e fragmentação dos campos naturais do bioma Pampa e sua substituição por uma matriz de agroecossistemas, em uma escala temporal de dezenas de anos. O quarto ciclo seria constituído por uma mudança climática induzida pelo ser humano, ou seja, uma “savanização” do clima e o aparecimento dos campos como são hoje conhecidos, o que levou uma escala temporal de dezenas de anos.

2.2 *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. (Malvaceae)

Pertencente à família Malvaceae (APG III, 2009) e conhecida popularmente como Açoita-cavalo, Caiboti, Açoita-cavalo miúdo, Ibatingui, Pau-de-canga (LORENZI, 2002), *Luehea divaricata* é uma espécie florestal com diversas finalidades, como, por exemplo, o uso para estrutura de móveis ou confecção de móveis vergados, fato este que contribuiu bastante para a redução de suas populações naturais.

A espécie pode atingir 15-30 m de altura e 50-100 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), suas folhas são simples, alternas, dísticas, com estípulas, irregularmente serradas, com três nervuras típicas, quase glabras na face superior e densamente pubescentes e de cor esbranquiçada na face inferior, com 4,5 e 15 cm de comprimento. A ramificação é irregular e a copa é larga. Apresenta tronco tortuoso, nodoso, com reentrâncias, sendo a base alargada com sapopemas (LORENZI, 2002; CARVALHO, 1994). As flores hermafroditas são róseas dispostas em inflorescências terminais e axilares, em cimeiras dicotômicas, em torno de 2,5 cm de comprimento e os frutos são cápsulas cônicas, secas, oblongas, pentaloculares, de coloração castanha com densa pilosidade, deiscentes, medindo de 2 a 3 cm de comprimento. O florescimento ocorre de dezembro a julho e a maturação dos frutos, durante os meses de maio a agosto. Cada fruto possui de 5 a 15 sementes (RICHTER e DALLWITZ, 2012) (Figura 2). Espécie hermafrodita, polinizada por insetos, principalmente abelhas e esporadicamente beija-flores, alógama, e dispersão anemocórica de suas sementes (CARVALHO, 2008).

FIGURA 1 – **A.** Folhas da espécie *Luehea divaricata* **B.** Copa da espécie *Luehea divaricata* **C.** Tronco da espécie *Luehea divaricata*. **D.** Flor da espécie *Luehea divaricata*. **E.** Fruto da espécie *Luehea divaricata*. **F.** Indivíduo adulto da espécie *Luehea divaricata*.



Fonte: **A., B., C., E., F.** - Jordana Caroline Nagel. Universidade Federal do Pampa (2013). **D.** Herbário Florestal de Santa Maria.

A madeira é moderadamente pesada, apresentando peso específico básico de 0,6-0,7 g cm³, anéis de crescimento bem distintos, cerne de coloração marrom e avermelhado (RICHTER e DALLWITZ, 2012), resistente e extremamente flexível, sendo muito empregada para estruturas de móveis, confecção de móveis vergados (curvados), peças torneadas, entre outros (LORENZI, 2002). A madeira de Açóita-cavalo serve para produzir celulose e papel, enquanto a casca fornece fibras, resina, mucilagens e tanino (BACKES e IRGANG, 2002).

Outra utilidade relevante da espécie é o uso das folhas como fitoterápico, no combate à disenteria, leucorréia, reumatismo, blenorragia e tumores; a infusão das flores, contra bronquite; e a raiz, depurativa (TANAKA et al., 2005). É uma planta pioneira de rápido crescimento, decídua, heliófita, característica das florestas aluviais (LORENZI, 2002). Em condições de regeneração natural, observa-se uma grande quantidade de indivíduos, mostrando que é uma espécie recomendável para a regeneração natural de áreas degradadas, além da possibilidade de plantios consorciados com outras espécies em áreas degradadas (ANTON et al., 2005).

Estudos realizados por Reitz et al. (1988) identificaram a presença de *Luehea divaricata* em várias partes do Rio Grande do Sul, cuja localização pode ser visualizada na Figura 2.

FIGURA 2 – Mapa da distribuição natural de *Luehea divaricata* no Rio Grande do Sul.



Fonte: Reitz et al., 1988.

Ratificando essa observação, conforme dados do Inventário Florestal Contínuo do Rio Grande do Sul (SEMA/UFSM, 2002), *Luehea divaricata* é uma das espécies nativas mais importantes do ponto de vista fitossociológico. Ocorre na floresta ombrófila mista, na floresta estacional decidual, na floresta estacional semidecidual, na savana, na savana estépica e nas áreas de tensão ecológicas, em praticamente todas as bacias hidrográficas do Rio Grande do Sul.

Luehea divaricata teve uma presença marcante ao longo da história e do desenvolvimento da indústria madeireira no sul do Brasil. Contudo, sua abusiva exploração levou a uma enorme redução dos exemplares desta espécie, sendo que, atualmente, é raro encontrar espécimes com boas características fenotípicas, adequadas ao uso comercial (RUAS, 2009).

2.3 Diversidade e estrutura genética

A base para a evolução das espécies concentra-se na variação genética presente em cada população de uma determinada espécie (FOSTER e RAHS, 1985). A proteção da diversidade genética dentro das espécies em geral é uma prioridade inerente a projetos de conservação (BARRET e KOHN, 1991), cuja finalidade, em longo prazo, é manter a variabilidade e a diversidade das espécies, sendo que, as características genéticas podem influenciar processos fisiológicos e demográficos das populações.

A variabilidade genética pode ocorrer em níveis diferentes: 1) de espécies dentro de ecossistemas; 2) de populações dentro de espécies; e 3) de indivíduos dentro de populações de espécies. Sendo a caracterização destes níveis condição básica para a idealização de estratégias de conservação genética (KAGEYAMA, 1987). Basicamente, existem duas estratégias de conservação denominadas *in situ* e *ex situ*, as quais não são excludentes, devendo ser consideradas como complementares (KAGEYAMA, et al., 2001).

Na conservação *in situ* as espécies são deixadas em seus habitats naturais e tem como objetivo conservar o máximo possível do número de alelos e/ou a diversidade de genótipos para que a evolução ocorra de forma contínua. Isso é importante na geração de novos genes e genótipos, particularmente, em resposta às mudanças ambientais e para conferir resistência a novos tipos de patógenos desenvolvidos, bem como, para que a seleção ocorra de maneira contínua, incluindo também a coevolução entre as plantas, os animais e os microrganismos. O benefício dessa prática está na conservação da biodiversidade, num ecossistema inteiro, do que apenas por amostras de germoplasmas de uma espécie. Sua desvantagem está no fato de o

germoplasma não poder ser utilizado eficientemente, por não se encontrar disponível para que seja explorado rapidamente (HAYAWARD e HAMILTON, 1997).

A conservação *ex situ* refere-se à manutenção de genes ou complexos de genes em condições artificiais, fora do seu habitat natural. Este tipo de conservação pode ser feito por meio de coleções permanentes de pólen, sementes, culturas de tecidos, ou coleções de plantas mantidas em campo, entre outros (PAIVA e VALOIS, 2001). O objetivo da conservação *ex situ* é manter amostras representativas das populações, ou seja, com muitos alelos e combinações gênicas suficientes para que, depois de caracterizadas, avaliadas e multiplicadas, possam ser utilizadas no melhoramento genético (LLEIRAS, 1992).

A manutenção de populações *ex situ* tem-se revelado uma importante forma de intervenção na conservação da diversidade biológica, dado o crescente número de espécies ameaçadas de extinção. Os programas têm contribuído para a manutenção da variabilidade genética das populações, garantindo assim, a permanência de espécies, que de outra forma, estariam indisponíveis para gerações futuras. As populações, também, podem servir como estoque de indivíduos para possíveis reintroduções, ou aumento do tamanho de populações selvagens (YOUNG e BOYLE, 2000).

Um dos interesses da conservação *in situ* é manter a diversidade genética dentro de populações em florestas naturais ou semi-naturais, possuindo a grande vantagem de permitir processos genéticos, tal como, o fluxo gênico dentro das espécies de interesse (YOUNG e BOYLE, 2000).

O conhecimento da estrutura genética de populações é entendido como a etapa fundamental para a realização de programas conservacionistas. Os dados gerados por pesquisas em genética de populações podem ser utilizados para definir unidades de conservação e manejo de recursos genéticos, indicando áreas e populações de maior ou menor importância, para a preservação de táxons em questão, e, permitindo, o desenvolvimento de estratégias efetivas de conservação (CAVALLARI, 2004).

A estrutura genética de uma espécie pode ser definida como a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações, como resultado da combinação entre mutação, migração, seleção e deriva genética. Além disso, muitas espécies arbóreas possuem mecanismos efetivos para a dispersão de alelos, tanto via pólen, como de sementes, sendo capazes de manter altos níveis de variabilidade genética dentro de suas populações (HAMRICK et al., 1979; HAMRICK, 1983; LOVELESS e HAMRICK, 1987). O fluxo gênico entre as populações tem o efeito de homogeneizar a composição genética, de modo que

se ele for o único fator operante, todas as populações irão convergir para uma mesma frequência alélica (FUTUYMA, 1992).

Hamrick (1983), estudando várias populações naturais de espécies arbóreas tropicais, verificou que a variabilidade genética entre e dentro de populações pode ser afetada diretamente pelo sistema reprodutivo, síndrome de dispersão de pólen e mecanismo de dispersão de sementes, além do tamanho efetivo de cada população. Estes fatores estão relacionados também com a distribuição geográfica da espécie e com o tipo de comunidade ou ambiente em que ocorrem naturalmente.

2.4 Fragmentação de florestas e seus efeitos na estrutura e diversidade genética de populações naturais de espécies arbóreas

A constante fragmentação e ocupação de áreas naturais para a expansão urbana, industrial, e agropecuária resultam em preocupações com o uso dos recursos naturais (BARBOSA e MANTOVANI, 2000). Uma das decorrências da fragmentação de habitats são a redução e a subdivisão de populações, o que pode ocasionar alterações em processos genéticos e ecológicos. Neste sentido, são observadas mudanças na riqueza e composição de espécies (MURCIA, 1995), no comportamento de polinizadores e dispersores, no sistema reprodutivo e fluxo gênico de espécies vegetais (GONÇALVES, 2006).

Nos fragmentos florestais pequenos, ocorre uma transição abrupta entre os habitats, dentro do fragmento, e nas regiões adjacentes, promovendo intensas alterações bióticas e abióticas nestes locais (MURCIA, 1995). A fragmentação de áreas contínuas pode levar as populações remanescentes a graves consequências, como, por exemplo, mudanças na estrutura genética (HAMRICK et al., 1992; LOVELESS et al., 1984; NASON et al. 1997), uma vez que a maioria das espécies arbóreas tropicais ocorre em baixa densidade e é dependente de animais para realizar a polinização, além de apresentar altas taxas de fecundação cruzada (BAWA, 1974; HAMRICK et al., 1990).

Algumas espécies são extintas dentro dos fragmentos devido a eventos genéticos ou demográficos (SHAFFER, 1981), perda de variabilidade genética (LANDE, 1988) e declínio das taxas de reprodução devido à perda de polinizadores (AIZEN e FEINSINGER, 1994). Segundo Young e Boyle (2000), os efeitos genéticos mais aparentes da fragmentação florestal envolvem perda de diversidade genética, aumento de cruzamentos endogâmicos e aumento da estrutura interpopulacional.

Portanto, a capacidade de uma espécie em responder a novas pressões ambientais é limitada dentro de sua diversidade intraespecífica, a diminuição desta variabilidade pode levar, em casos mais severos, a extinção desta população. Pesquisas relacionadas à estrutura genética de formações florestais com o enfoque de fragmentação de habitats ainda são escassas (ALDRICH et al., 1998). No entanto, a compreensão da estrutura e diversidade genética das espécies existentes nos fragmentos florestais é fundamental para a escolha correta das estratégias de manejo e conservação a serem implantadas nestas e em outras áreas (KAGEYAMA, 1987).

2.5 Marcadores moleculares

A revolução causada pelo uso dos marcadores moleculares teve início em 1959 por Market e Moller, com a descoberta e a utilização de marcadores isoenzimáticos, ampliando o número de marcadores genéticos e permitindo a aplicação desta técnica a praticamente todas as espécies de plantas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

O desenvolvimento tecnológico na área de marcadores moleculares é extremamente rápido. A tecnologia do DNA recombinante e a crescente amplificação de segmentos de DNA via reação de polimerase em cadeia - PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), abriram o caminho para uma transformação no paradigma genético, fazendo a transição da “genética Mendeliana” para a “genética genômica” (BECKMANN e SOLLER, 1988).

O desenvolvimento dos marcadores moleculares tem como base o polimorfismo localizado em proteínas ou DNA e têm sido vastamente utilizados para acessar a variabilidade genética que pode ocorrer em populações humanas, de animais e de plantas. O uso de marcadores moleculares permite acessar a variabilidade genética, não mais ao nível fenotípico, mas diretamente nas modificações dos padrões isoenzimáticos e de regiões aleatórias ou não do DNA (WILLIAMS et al., 1990).

O polimorfismo genético identificado por marcadores moleculares pode ser usado para construção de mapas genéticos, assim como para revisar a posição sistemática de vários grupos de plantas e animais e para realizar estudos comparativos, fazendo deduções sobre a origem e evolução de populações, espécies, gêneros e famílias como um todo (WILLIAMS et al., 1990).

Além disso, esses marcadores têm demonstrado grande poder de detecção da variabilidade genética encontrada em populações de plantas e animais e são de grande

utilidade em programas de conservação de recursos genéticos e recuperação de áreas degradadas (RAJORA e MOSSELER, 2001).

Para se adotar estratégias efetivas de manejo e conservação genética é necessário conhecer a estrutura e diversidade genética das populações, que envolve o conhecimento dos níveis de variabilidade genética e como esta se distribui entre e dentro das populações. Sendo, a principal contribuição dos marcadores moleculares, a detecção dos níveis de diversidade genética das populações de interesse, gerando informações essenciais para programas de conservação (KAGEYAMA 1987; DIAS et al., 1991)

2.6 Marcadores microssatélites (SSR)

Distintos experimentos no início dos anos 1980 confirmaram que os genomas eucariotos são intensamente povoados por diferentes categorias de sequências repetidas, umas mais complexas e outras mais simples. Sequências poli “TG” e poli “CA” foram descritas em conexão com expressão de genes por Hamada et al. (1984) e foram denominadas sequências simples repetidas SSR (do inglês *Simple Sequence Repeats*). Logo após, essas sequências foram designadas também como “microssatélites” (LITT e LUTY, 1989; WEBER e MAY, 1989).

Os SSRs consistem de pequenas sequências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem. Weber e May (1989), Tautz (1989) e Litt e Luty (1989), simultaneamente, sugeriram a utilização destas regiões polimórficas amplificadas via PCR como marcadores moleculares.

Microssatélites são observados em diversos organismos eucariotos. Em plantas, uma busca em bancos de dados de sequência de DNA publicadas revelou que os sítios de microssatélites são amplamente distribuídos, com uma frequência de um sítio a cada 50 mil pares de bases (FERREIRA e GRATTAPLAGLIA, 1998).

As bases genéticas desses marcadores são organizadas por regiões contendo sequências simples repetidas que são amplificadas individualmente através de PCR utilizando-se um par de iniciadores específicos complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. Segmentos amplificados a partir destes sítios quase que constantemente apresentam um polimorfismo extensivo resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos. Deste modo, cada microssatélite independentemente do elemento repetido (CA, TG, ATG, etc.) constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de

vasto teor informativo. Portanto, cada segmento amplificado via PCR de tamanho diferente, representa um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA e GRATTAPLAGLIA, 1998).

A visualização de sequências de microssatélites via PCR é realizada através de eletroforese em gel de agarose de alta resolução, ou em gel de poliacrilamida, sendo que a visualização das bandas no gel pode ser feita por coloração com brometo de etídeo, nitrato de prata, através de autoradiografia ao se utilizar iniciadores marcados com radioisótopos na reação de PCR, ou por meio da análise em sequenciadores automáticos de DNA, utilizando-se iniciadores com marcação fluorescente.

Tendo em vista a expressão codominante e o multialelismo, os marcadores SSR são os que possuem o maior conteúdo de informação sobre polimorfismo, na terminologia de marcadores moleculares. Devido a isso, toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação, e mapeamento genético (JONES et al., 1997).

Assim, a escolha da população para mapeamento não mais precisa ser feita com base na maximização da distância genética, e sim, visando à população mais informativa do ponto de vista das características biológicas, ou econômicas de interesse. Os SSR são muito mais frequentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto (LIU et al, 2001).

Estas e outras características fazem com que marcadores SSR sejam ideais para mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A maior limitação da tecnologia microssatélites é a grande quantidade de trabalho necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores e a adequação dos protocolos de amplificação de cada *locus* desenvolvido, sendo, muitas vezes, necessária a determinação de um protocolo específico de PCR para cada *locus* a ser utilizado (JONES et.al, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da área de estudo e dos povoadamentos amostrais

Este estudo foi realizado em populações amostrais de *Luehea divaricata* localizadas na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul (Figura 3). Todas as áreas amostradas fazem parte do bioma Pampa, o qual ocupa uma área de 177.767 km² (MMA, 2012). O bioma agrega grande parte do território do Rio Grande do Sul (62,2% do total), parte da Argentina e todo o território do Uruguai (BOLDRINI et al., 2010).

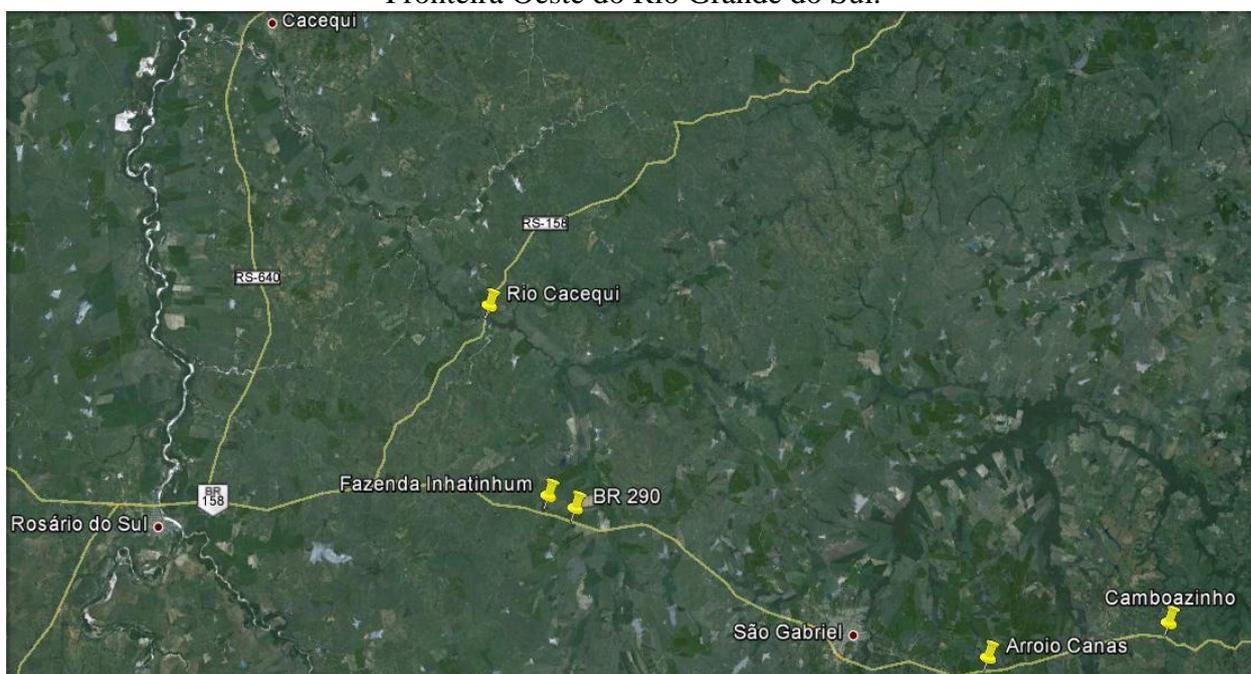
FIGURA 3 - Mapa do Rio Grande do Sul com as delimitações da região da Fronteira Oeste e do bioma Pampa.



Fonte: IBGE – MMA.

Foram coletadas amostras de 128 indivíduos adultos de *Luehea divaricata* em cinco populações amostrais localizadas na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul (Figura 4), durante os meses de agosto, setembro e outubro de 2011. Para tal amostragem foram percorridos os povoamentos de modo a coletar material (folhas) de indivíduos adultos por todo o povoamento. O número de indivíduos amostrados em cada população e respectivas coordenadas geográficas estão listados na Tabela 1.

FIGURA 4 – Localização das cinco populações de *Luehea divaricata* amostradas na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.



Fonte: Google Earth.

TABELA 1 – Número de indivíduos e localização das cinco populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

População	Número de indivíduos	Latitude	Longitude
Camboazinho	18	54°03'08.9"	30°20'24.8"
Arroio Canas	31	54°12'35.9"	30°22'00.2"
Fazenda Inhatinhum	21	54°34'44.0"	30°14'48.8"
Rio Cacequi	27	54°19'10.1"	30°20'23.4"
BR 290	31	54°33'35.7"	30°15'23.4"
Total	128		

As denominações das populações amostrais, apresentadas na Tabela 1, fazem referência ao local de coleta. A população Camboazinho foi coletada junto ao Rio Camboazinho, ou seja, na mata ciliar deste, aonde se iniciaram as coletas, próximo a BR 290,

e, a partir desta, no sentido rio abaixo, percorrendo-se, aproximadamente 3 km, foram encontrados 18 indivíduos, já que o último trecho percorrido para coleta não apresentou exemplares de *Luehea divaricata*.

A população Arroio Canas, também foi de mata ciliar, amostrada a partir da BR 290 no sentido arroio acima, tendo sido encontrados, no trecho percorrido, 31 exemplares.

Na população amostral da Fazenda Inhatinhum foi coletada o total de 21 exemplares, na unidade produtiva de mesmo nome, em um remanescente florestal bem conservado, haja vista o grande número de espécies nativas observadas e as condições de regeneração natural propiciadas, uma vez que se encontra cercado, impedindo o acesso do gado.

A população Rio Cacequi, amostrada na mata ciliar deste recurso hídrico, fica junto à BR 158, sendo que a coleta de material ocorreu a partir da BR no sentido rio acima, percorrendo-se uma distância aproximada de 2 km para obter os 27 indivíduos amostrados. Nesta população, apesar de a área ser de preservação permanente, passam trilhos da viação férrea, que por ocasião de sua construção, destruíram parte da mata ciliar, devido aos cortes e aterros realizados para a passagem dos trilhos. Atualmente, exceto à beira dos trilhos, a mata nativa encontra-se bem conservada.

A população amostral denominada BR 290, foi coletada em um povoamento quase que homogêneo de *Luehea divaricata* junto à rodovia de mesmo nome. Os 31 indivíduos coletados encontram-se em um trecho de menos de 0,5 km de extensão às margens da BR 290.

3.2 Análise de marcadores microssatélites

3.2.1 Extração das amostras de DNA e sequências de iniciadores utilizados

Folhas de cada indivíduo foram coletadas e armazenadas em sílica gel até a extração de DNA. Dentro de tubos tipo eppendorf (QIAGEN), de 2 mL, foram colocados 60 mg de material foliar de cada indivíduo, e duas *beads* de tungstênio de 5 mm (QIAGEN) entre o material foliar. Após, esses tubos foram imersos em nitrogênio líquido por 5 minutos. Posteriormente, os tubos foram colocados no equipamento TissueLyser II® (QIAGEN) para que as amostras foliares fossem maceradas, durante 2 minutos a 3000 RPM. Deste material macerado foi extraído o DNA utilizando-se o kit Invisorb® Spin Plant Mini Kit (Invitex, Berlin, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante. O DNA foi diluído em uma concentração de 10 µl de DNA extraído, para 90 µl de água Milli-Q autoclavada. Não foram realizadas quantificações das soluções de DNA obtidas.

O polimorfismo de cinco *locus* microsatélites (Tabela 2), caracterizados por Ruas et al. (2009), foram avaliados dentro e entre as populações amostradas de *Luehea divaricata*.

TABELA 2 - Identificação, sequência e temperatura de anelamento dos iniciadores utilizados nas análises de polimorfismo dentro e entre as populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, tamanho e número de alelos revelados a partir do seu emprego.

Loco	Sequência do primer 5' - 3'	Temperatura de Anelamento	Tamanho dos Alelos	K*
Ldiv48A	F: GCCCTTCAGAATGCAAACCTC R: AAAATTAAACACAGGCCACCA	59,6	205-230	4
Ldiv55	F: TTCCTCGCGGATAAATTGAC R: CGCGGACACAACCTCATATCTT	60,0	240-260	5
Ldiv31	F: ACCTCACATGGATGCCAGTA R: GAGGTTTCACACGTGGCTTT	59,6	230-255	8
Ldiv40	F: GCTTCTTGCCAAAATGGTC R: ATGTTTAATGCCGCGTTTTTC	59,9	250-260	2
Ldiv58	F: GACGCATGATGGAAGGAAAT R: TGATGGTCTGAGCAGTCAGG	60,0	150-175	4

*K = número de alelos.

Fonte: Ruas et al., 2009.

3.2.2 Reações de PCR e coloração do gel de poliacrilamida

Cada reação de amplificação foi realizada em um volume total de 25 µl de solução contendo 2 µl de DNA já diluído, em uma concentração de 10 µl de DNA extraído para 90 µl de água Milli-Q autoclavada, tampão de enzima livre de magnésio 1X, 2,5 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de dNTPs, 10 pMol de iniciadores reverso e direto, e 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). Os ciclos para a PCR apresentaram as seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguida por 16 ciclos a 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos com decréscimo de 1°C por ciclo de anelamento até 50°C, e 72°C por 30 segundos, seguidos por 20 ciclos adicionais de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 7 minutos a 72°C (RUAS et al., 2009).

Para a condução da eletroforese vertical em gel de poliacrilamida foram preparadas placas de 40 cm, sendo que em uma das placas foi usado a solução *bind mix* (995 µl de etanol absoluto + 5 µl de Ácido Acético + 6 µl de *Bind*), para a fixação do gel na placa, e a outra com solução *repel*, para repelir o gel na outra placa. Para a corrida de eletroforese foi utilizado TBE 1X na cuba. Para a placa de 40 cm, foi preparado um total de 80 ml de gel de poliacrilamida a 10%, empregando-se: 47,68 mL de água destilada, 20 mL de acrilamida,

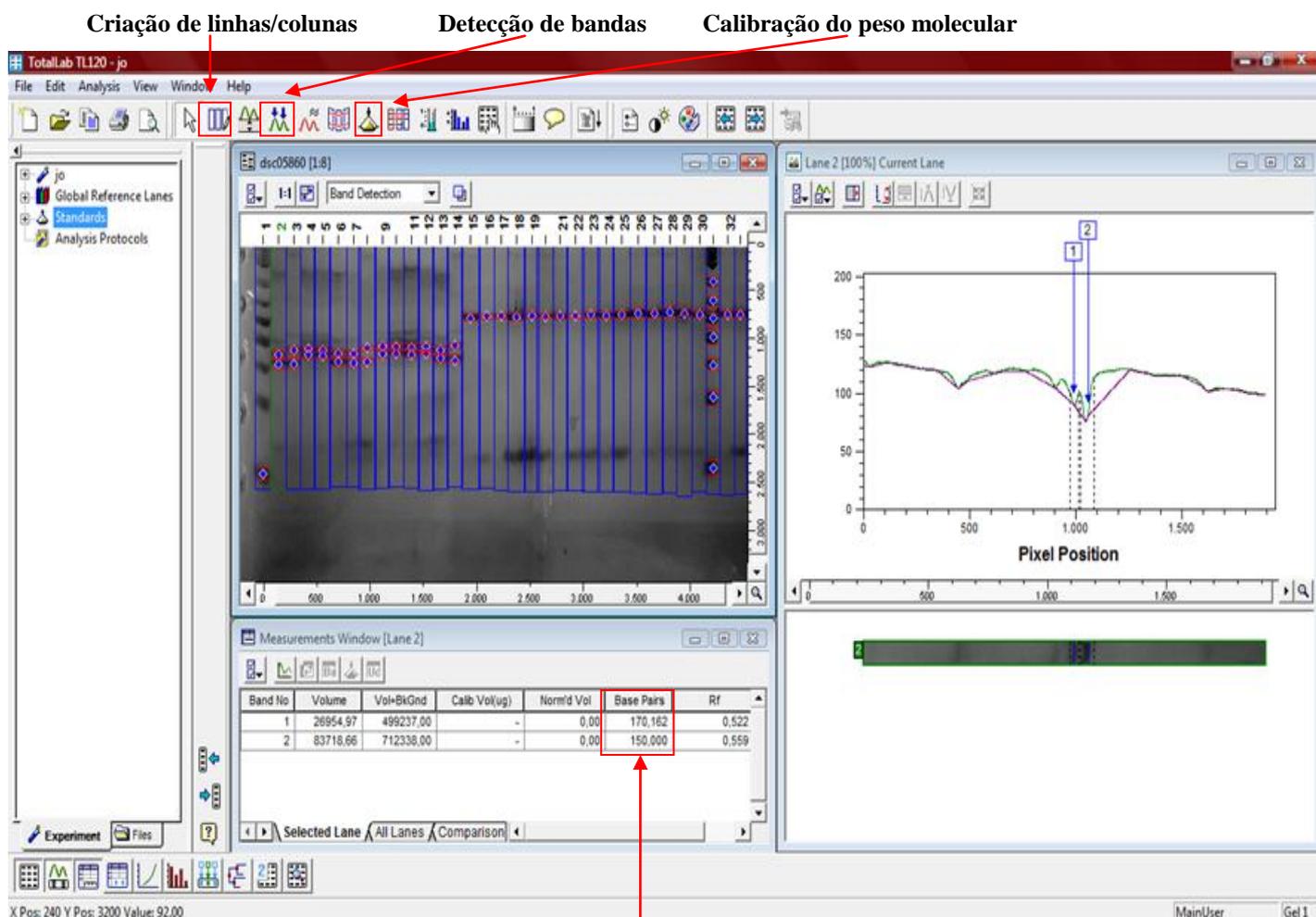
12,32 mL de TBE 10X, 550 µl de APS (Persulfato de amônio – em que foi diluído 1g para 10 mL em água destilada), e 55 µl de TEMED (Tetrametiletilenodiamina), deixando-se polimerizar por 1 hora.

Após a separação dos alelos via eletroforese, as placas foram coradas com nitrato de prata para a visualização dos alelos de cada amostra, efetuando-se os seguintes procedimentos: a placa que continha o gel aderido foi mergulhada em uma solução de fixação, contendo etanol absoluto em uma diluição com concentração 10% e ácido acético com concentração de 1% para um litro de água destilada (em temperatura ambiente), com agitação durante 10 minutos. Após, a placa foi retirada dessa solução e colocada em uma solução de impregnação com nitrato de prata, de 2 gL⁻¹ (temperatura ambiente), sendo o recipiente coberto com um pano preto e agitado por 20 minutos. Em seguida, a placa foi colocada em uma solução de revelação que continha 30 g de hidróxido de sódio (NaOH), 997,62 mL de água destilada e 2,5 mL de formaldeído a 37% (temperatura ambiente), efetuando-se agitação em torno de 15 minutos até a revelação das bandas no gel.

3.2.3 Análise das bandas

O software *TotalLab TL120* (versão 2009, Sweden) foi usado para análise das bandas no gel de poliacrilamida. Primeiramente, fez-se a seleção manual das linhas/colunas, definindo-se o local de cada poço em que foi pipetado a amostra, após fez-se a detecção das bandas manualmente e, em seguida, a calibração do marcador de peso molecular 50 pb. Posteriormente, os valores dos pares de bases foram fornecidos, por coluna, sendo que, a partir de então, o programa calcula uma série de algoritmos para se verificar os picos de cada banda/coluna no gel, assim como os limites das bandas, sendo que esses limites podem ser ajustados manualmente, também. Ao lado da imagem do gel, o programa fornece um gráfico com a posição da intensidade (em pixels) da banda. Em seguida, foi selecionada cada coluna, sendo que o programa disponibiliza uma tabela informando os valores dos pares de bases abaixo da imagem (Figura 5).

FIGURA 5 – Análise do gel pelo *software TotalLab TL120*.



Fonte: Jordana Caroline Nagel. Universidade Federal do Pampa (2013).

O programa *TotalLab TL120 1D gel analysis* detectou as bandas, suas intensidades (em pixel), assim como o peso molecular das bandas que foram detectadas nas análises. O que, possibilitou uma igualdade nas análises de todos os géis, quanto à interpretação dos resultados obtidos após as corridas eletroforéticas.

3.2.4 Análises estatísticas

As análises dos dados moleculares foram realizadas através do programa GenAlEx 6.4 (PEAKALL e SMOUSE, 2006). A distância entre pares de populações foi medida pela distância genética de Nei (1978). A partir dos resultados da distância genética de Nei (1978), fez-se a análise de coordenadas principais (PCA), mostrando as distâncias entre as

populações. Foram determinadas também as estimativas de F_{st} e fluxo gênico (N_m) para todas as populações de *Luehea divaricata* (PEAKALL e SMOUSE, 2006) estudadas.

Foram estimados, no programa FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 2001), para cada *locus*, a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) (Nei, 1987), o índice de fixação ou coeficiente de endogamia intrapopulacional (F_{is}), o índice de fixação ou coeficiente de endogamia para o conjunto das populações (F_{it}), o índice de fixação ou divergência genética entre as populações (F_{st}), o coeficiente de diferenciação populacional (G_{st}), e a riqueza alélica (R_s) (WEIR e COCKERHAM, 1984).

A matriz de distâncias foi submetida a uma análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992), sendo que este procedimento permitiu fazer uma estimativa dos componentes de variância determinado as diferenças existentes entre as cinco populações, entre as regiões e entre indivíduos dentro das regiões. Esta análise foi realizada por meio do programa ARLEQUIN 3.1 (EXCOFFIER et al., 2005), sendo que, a acurácia da análise foi testada através de 10000 permutações.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diversidade genética

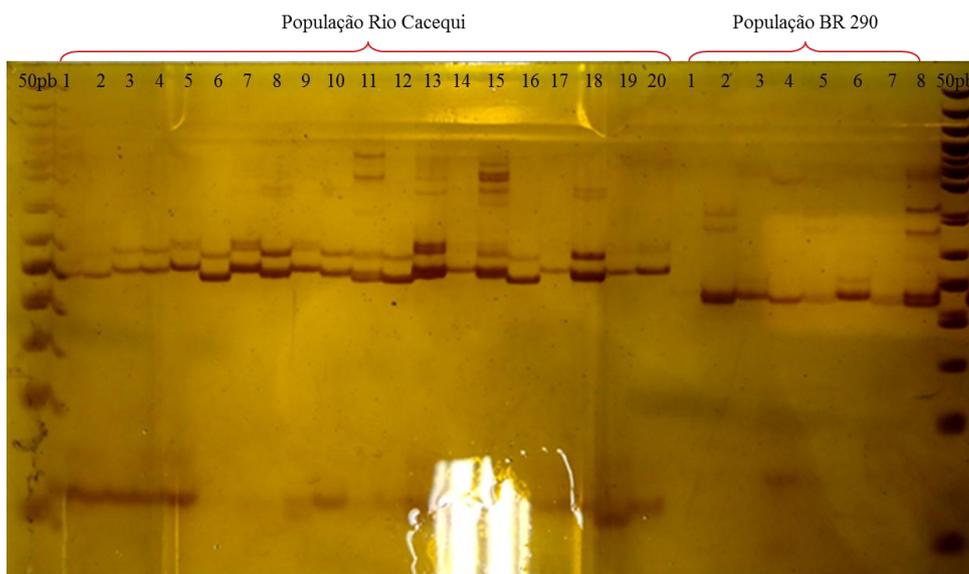
O número de alelos por *locus* variou de 2 a 11, e o número efetivo de alelos por *locus* variou de 1,15 a 7,81 para as cinco populações estudadas (Camboazinho, Arroio Canas, Fazenda Inhatinhum, Rio Cacequi e BR 290) (Tabela 3).

TABELA 3 – Número de alelos (N_a) por *locus*, e número efetivo de alelos (N_e) por *locus* para as cinco populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

Populações	<i>Locus</i>	N_a	N_e
Camboazinho	Ldiv31	3,000	2,119
	Ldiv40	3,000	2,571
	Ldiv48A	5,000	3,393
	Ldiv55	6,000	4,281
	Ldiv58	5,000	3,640
Arroio Canas	Ldiv31	6,000	3,721
	Ldiv40	3,000	2,633
	Ldiv48A	6,000	4,390
	Ldiv55	11,000	7,813
	Ldiv58	9,000	4,891
Fazenda Inhatinhum	Ldiv31	6,000	4,563
	Ldiv40	2,000	1,800
	Ldiv48A	6,000	2,464
	Ldiv55	2,000	1,633
	Ldiv58	8,000	4,873
Rio Cacequi	Ldiv31	5,000	2,899
	Ldiv40	2,000	1,159
	Ldiv48A	2,000	1,929
	Ldiv55	4,000	2,477
	Ldiv58	6,000	3,523
BR 290	Ldiv31	6,000	4,247
	Ldiv40	3,000	2,209
	Ldiv48A	4,000	1,839
	Ldiv55	2,000	1,661
	Ldiv58	7,000	5,085

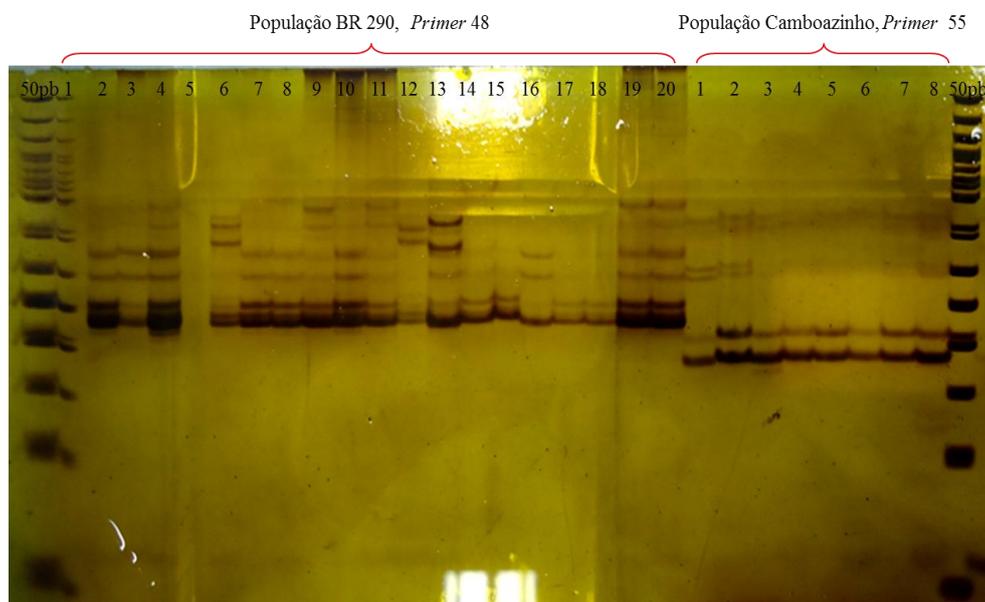
As figuras 6 e 7 ilustram géis de poliacrilamida a 10%, corados com nitrato de prata 2 gL^{-1} , e marcador molecular de 50 pb, que mostraram o padrão de alelos encontrados para as populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

FIGURA 6 – Gel de poliacrilamida (a 10%) corado com nitrato de prata 2 gL^{-1} , em indivíduos de *Luehea divaricata*, com fragmentos de DNA amplificados com o *primer* Ldiv31, em amostras da população Rio Cacequi e população BR 290.



Fonte: Jordana Caroline Nagel. Universidade Federal do Pampa (2013).

FIGURA 7 – Gel de poliacrilamida (a 10%) corado com nitrato de prata 2 gL^{-1} , em indivíduos de *Luehea divaricata*, com fragmentos de DNA amplificados com os *primers* Ldiv48A e Ldiv55, em amostras da população BR 290 e população Camboazinho.



Fonte: Jordana Caroline Nagel. Universidade Federal do Pampa (2013).

O número de amostras (N), o número de alelos (N_a), o número efetivo de alelos (N_e), a riqueza alélica (R_s), o índice de Shannon (I), a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), e o índice de fixação (F) para cada população podem ser observados na Tabela 4.

TABELA 4 – Índices de diversidade genética de cinco populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

População	N	N_a	N_e	R_s	I	H_o	H_e	F
Camboazinho	17,00	4,40	3,20	4,316	1,238	0,515	0,667	0,213
Arroio Canas	30,20	7,00	4,69	5,813	1,629	0,572	0,758	0,282
Fazenda Inhatinhum	19,60	4,80	3,07	4,809	1,167	0,423	0,600	0,295
Rio Cacequi	24,80	3,80	2,40	3,591	0,948	0,540	0,517	0,086
BR 290	28,60	4,40	3,01	4,138	1,135	0,547	0,594	0,054
Total	24,04	4,88	3,27	4,553	1,223	0,519	0,627	0,186

Inicialmente serão discutidos os resultados observados para o total das cinco populações amostrais e, posteriormente, aqueles relacionados às cinco populações estudadas. Sendo que, os resultados observados para a espécie *Luehea divaricata* permitiram inferir que a fragmentação de habitat não reduziu a riqueza alélica dessa espécie. A riqueza alélica é mais sensível à redução no tamanho populacional do que a heterozigosidade, devido à eliminação preferencial de alelos raros que contribuem pouco para esta estimativa (NEI et al., 1975; COURNUET e LUIKART, 1996). Depois de uma redução no tamanho populacional, a diversidade gênica pode levar muitas gerações para chegar a um equilíbrio. A riqueza alélica, nesse sentido, pode refletir com maior precisão os atuais níveis de diversidade genética dos remanescentes florestais (VARVIO et al., 1986; COURNUET e LUIKART, 1996).

A heterozigosidade observada foi de 0,519, enquanto a esperada foi de 0,627, o que é considerado um alto índice de diversidade genética para espécies arbóreas (BERG e HAMRICK, 1997). Observa-se com isso, que a heterozigosidade observada foi menor do que a esperada, sugerindo que há menos heterozigotos nas populações do que o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), demonstrando que há uma fixação de indivíduos homozigotos nas populações.

No estudo com *Caesalpinia echinata*, Giudice Neto et al. (2005) encontraram valores de heterozigosidade de 0,248, valor inferior ao observado no presente trabalho. Lacerda et. al (2001) observaram valores de H_e variando de 0,301 a 0,367 para *Plathymenia reticulata*, Torezan et al. (2005) obtiveram $H_e = 0,410$ para indivíduos adultos de *Aspidosperma polyneuron*, números inferiores que os encontrados no presente trabalho. Tais comparações constituem forte evidência de que a espécie *Luehea divaricata*, nas cinco populações estudadas na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, apresenta níveis altos de

variabilidade genética intrapopulacional. Os altos índices de diversidade genética podem ser resultados de suas características ecológicas, uma vez que a espécie é hermafrodita, e polinizada, principalmente, por abelhas, além disso, tem dispersão anemocórica de suas sementes (CARVALHO, 2008).

As populações estudadas apresentaram maior quantidade de homozigotos em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), o que pode ser depreendido pelo valor estimado médio do índice de fixação $F = 0,186$.

Outra maneira para a mensuração da diversidade genética molecular é o uso do Índice de Diversidade de Shannon (SHANNON, 1948), que pode ser empregado tanto para comparar a diversidade entre espécies como entre populações da mesma espécie (CAVALLARI, 2004). O valor médio para o Índice de Diversidade de Shannon-Wiener foi de 1,223 (Tabela 4), não ocorrendo uma grande variação entre os valores, mostrando que as populações possuem uma diversidade genética alta. Melo Júnior (2010), com a espécie *Cavanillesia arborea*, da mesma família de *Luehea divaricata* obteve $H_e = 0,43$ e $I = 0,61$, os quais foram interpretados como altos índices de diversidade genética.

Os índices de diversidade genética observados ($H_e = 0,627$ e $I = 1,223$) demonstram haver elevados níveis de diversidade genética dentro das populações estudadas de *Luehea divaricata*. Observando-se as estimativas de H_e é possível perceber que os níveis de diversidade genética são similares em todas as populações. A existência de alta diversidade genética dentro das populações naturais de *Luehea divaricata* também pode ser confirmada quando se compararam os valores do índice de Shannon, com aqueles observados para outras espécies arbóreas, como aqueles registrados por Melo Júnior (2010) que estudou uma espécie da mesma família de *Luehea divaricata* (Malvaceae), e nos estudos de Brandão (2008) e Fernandes (2008).

O elevado grau de endogamia em três das populações (Camboazinho, Arroio Canas e Fazenda Inhatinhum) de *Luehea divaricata* estudadas pode estar correlacionado ao sistema de reprodução da espécie, por ser uma espécie hermafrodita, e também pelo tipo de polinização, entomofílica. Em espécies alógamas, é esperado, em geral, alta diversidade dentro de populações e baixa divergência entre populações, o contrário do esperado para espécies autógamias (LOVELESS e HAMRICK, 1984; HAMRICK e GODT, 1996).

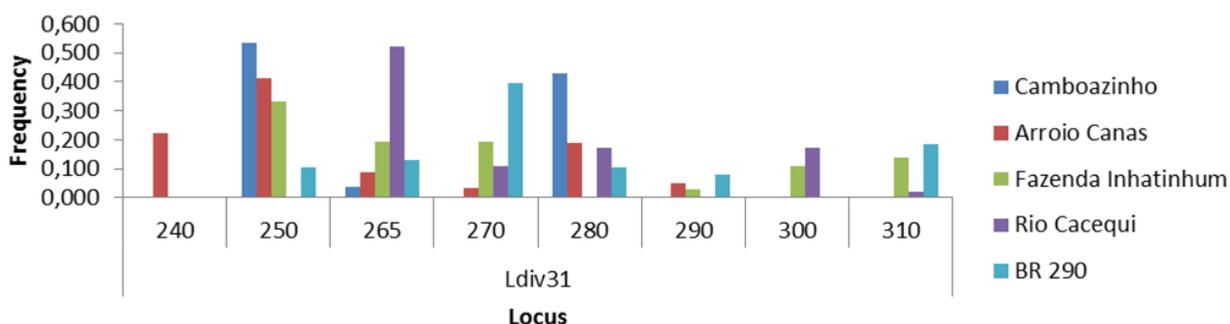
O número de alelos (N_a) observados para a população Camboazinho foi de 4,4, para a população Arroio Canas foi de 7 alelos, para a população Fazenda Inhatinhum foi de 4,8 alelos, para a população Rio Cacequi foi de 3,8 alelos e para a população BR 290 foi de 4,4 alelos (Tabela 4).

Contudo, os alelos 150 e 152 foram encontrados, apenas, na população Arroio Canas, assim como, os alelos 140 e 145 foram encontrados, exclusivamente, na população Fazenda Inhatinhum. O alelo 215 foi visualizado, apenas, na população BR 290, assim como, o alelo 190 foi encontrado, somente, na população Arroio Canas. O alelo 245 foi encontrado, apenas, na população Fazenda Inhatinhum. O alelo 220 foi visualizado, somente, na população Camboazinho, como o alelo 205, unicamente, na população Arroio Canas. O alelo 195 ocorreu, exclusivamente, nas populações Camboazinho e Arroio Canas.

O alelo 270, não ocorreu na população Camboazinho, assim como, os alelos 170, 210 e 280, não ocorreram na população Fazenda Inhatinhum. Os alelos 155, 240 e 260, não ocorreram na população Rio Cacequi. O alelo 180, não ocorreu nas populações Camboazinho e Rio Cacequi, assim como, o alelo 185, não ocorreu nas populações Camboazinho e BR 290. O alelo 257, não ocorreu nas populações Fazenda Inhatinhum e Rio Cacequi. Os alelos 235, 300 e 310, não ocorreram na população Camboazinho e Arroio Canas, porém, o alelo 230 ocorre, unicamente, nessas duas populações. O alelo 290, não ocorreu na população Camboazinho e população Rio Cacequi.

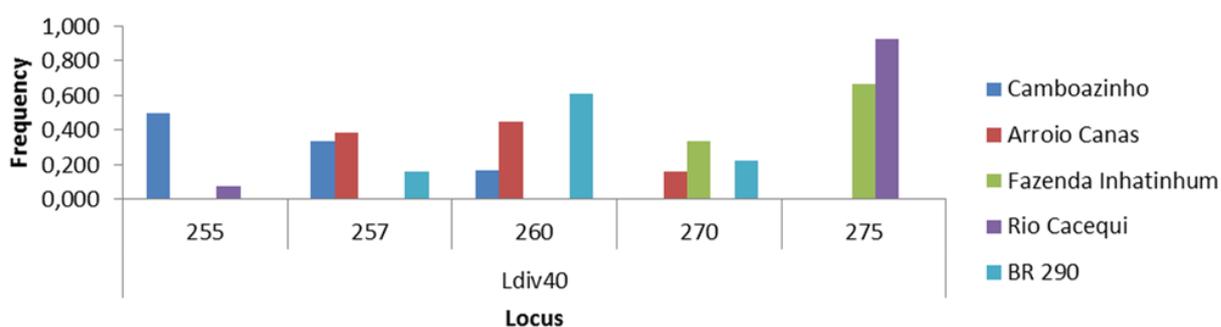
Foram estimadas as frequências alélicas para cada *locus* (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12), sendo que, para o *locus* Ldiv31, a maior frequência alélica foi observada para o alelo 250 na população Camboazinho, e a menor frequência alélica, para o alelo 290, na população do Rio Cacequi. Foram observadas, para o *locus* Ldiv40, maior frequência para o alelo 275 na população do Rio Cacequi, e menor frequência alélica, para o alelo 255 na mesma população. Para o *locus* Ldiv48A, a maior frequência alélica foi registrada para o alelo 235 na população da BR 290, e menor, para a mesma população para os alelos 240 e 255. Em relação ao *locus* Ldiv55, a maior frequência alélica foi obtida para o alelo 165 na população da Fazenda Inhatinhum, e a menor, para a população Arroio Canas, para os alelos 160 e 195. Para o *locus* Ldiv58, a maior frequência alélica foi verificada para o alelo 165, na população Camboazinho, e a menor, na população Arroio Canas, para os alelos 170, 210 e 215.

FIGURA 8 – Frequência alélica para o *locus* Ldiv31 nas cinco populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.



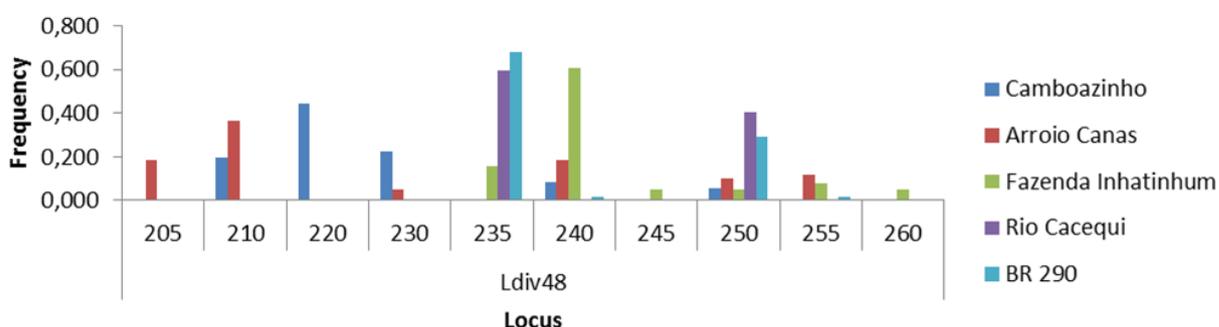
Fonte: Jordana Caroline Nagel. Universidade Federal do Pampa (2013).

FIGURA 9 – Frequência alélica para o *locus* Ldiv40 nas cinco populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.



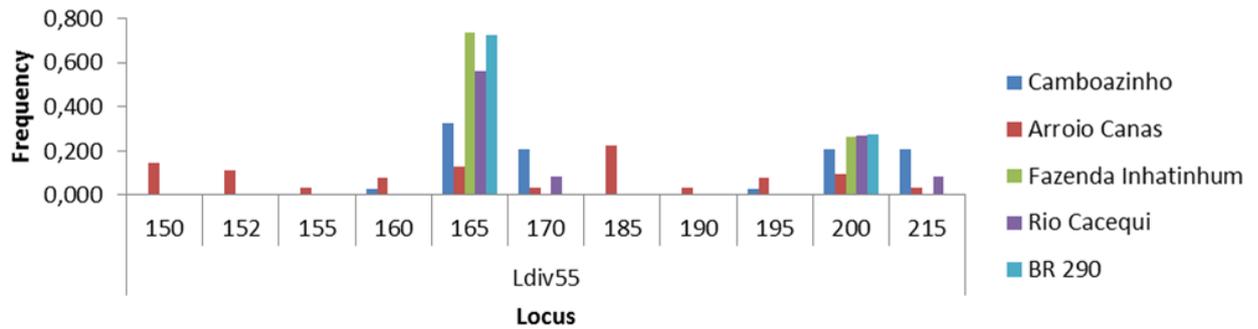
Fonte: Jordana Caroline Nagel. Universidade Federal do Pampa (2013).

FIGURA 10 – Frequência alélica para o *locus* Ldiv48A nas cinco populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.



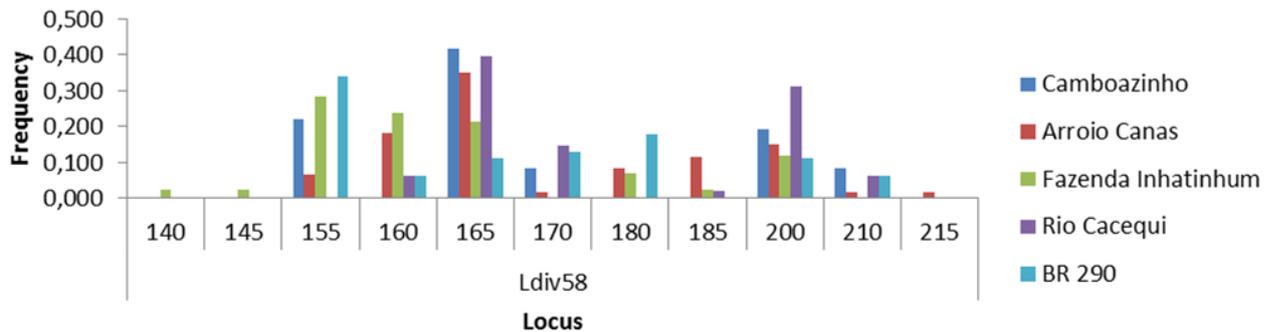
Fonte: Jordana Caroline Nagel. Universidade Federal do Pampa (2013).

FIGURA 11 – Frequência alélica para o *locus* Ldiv55 nas cinco populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.



Fonte: Jordana Caroline Nagel. Universidade Federal do Pampa (2013).

FIGURA 12 – Frequência alélica para o *locus* Ldiv58 nas cinco populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.



Fonte: Jordana Caroline Nagel. Universidade Federal do Pampa (2013).

Por meio da AMOVA, com base nos cinco *locus* polimórficos de SSR, constatou-se que 23,88% da variabilidade genética está distribuída entre as populações e 76,12% dentro das populações (Tabela 5). O valor médio de $F_{st} = 0,238$ (Tabela 5) obtido, também indicou que há elevada distinção entre as populações. Os resultados de alta diversidade dentro das populações estão de acordo com vários estudos efetuados em outras populações naturais de plantas (CAMACHO e LISTON, 2001; AULER et al., 2002; ZUCCHI, 2002; GUSSON, 2003; CONTE, 2004; CAVALLARI, 2004; MELO JUNIOR et al., 2004; SOUZA et al., 2004; XIAO et al., 2004).

TABELA 5 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) para *Luehea divaricata*, na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

Fonte de variação	d.f.	Soma dos quadrados	Varição (%)	F_{st}
Entre populações	4	80,858	23,88	0,238****
Dentro das populações	251	295,849	76,12	
Total	255	376,707	100	

**** $p < 0,001$.

Determinados autores, como Sebbenn e Etori (2001), mencionaram que a redução das populações naturais tem levado a um prejuízo de genes adaptados a ambientes específicos de ocorrência das espécies arbóreas, e que a diminuição contínua no tamanho das populações as submete a perdas de variabilidade genética por deriva genética. A deriva pode ocasionar a depressão por endogamia e, conseqüentemente, reduzir a capacidade adaptativa, fertilidade, vigor, porte e produtividade, entre outros aspectos (ALLARD, 1971).

4.2 Estrutura genética

O fluxo gênico médio estimado por *locus* estimado foi de 1,533 (Tabela 6). Este é um dos componentes fundamentais da estrutura de populações. Se há elevados níveis de fluxo gênico entre as populações, elas evoluem juntas, porém se os níveis estão baixos, cada população evolui quase independentemente das demais. Adicionalmente, o fluxo de genes é necessário para prevenir a evolução independente de populações de uma espécie, a qual vai estar sujeita a outras forças evolutivas presentes e de sua estrutura, ou seja, o modelo espacial que se enquadra para a espécie (SLATKIN, 1994).

Segundo Slatkin (1987), em genética de populações uma distinção significativa da população acontece quando o fluxo gênico (N_m) é menor que um migrante por geração dentro de uma população ou até quando o G_{st} , análogo ao F_{st} , é maior que 0,25. Hamrick e Loveless (1989) verificaram que o potencial para o movimento de genes e valores de fluxo gênico, calculados pela variação entre populações (G_{st}), foram altamente correlacionados.

Kageyama e Lepsch-Cunha (2001), mostraram que a diversidade genética entre populações (G_{st}) foi crescente no sentido dos agentes polinizadores, da seguinte forma: morcegos ($G_{st} = 0,021$), abelhas grandes ($G_{st} = 0,035$), abelhas médias ($G_{st} = 0,041$), abelhas pequenas ($G_{st} = 0,062$) e vento ($G_{st} = 0,065$). Hamrick e Loveless (1986) também detectaram diversidades genéticas crescentes entre populações de espécies arbóreas com dispersão de sementes na seguinte ordem: morcegos ($G_{st} = 0,028$), pássaros ($G_{st} = 0,040$) e autopropulsão

($G_{st} = 0,065$). Quanto maior o potencial de voo do polinizador ou do dispersor das sementes, menor seria a divergência genética (KAGEYAMA e LEPSCH-CUNHA, 2001).

A diferenciação genética entre as populações (G_{st}) foi de 0,197 (Tabela 6), sendo este valor considerado relativamente baixo, pois indica que a maior parte da variabilidade genética está dentro das populações, e, quando isso ocorre, geralmente existe baixo fluxo gênico entre as subpopulações, determinado pela polinização e dispersão de sementes. Melo Júnior et al. (2010), trabalhando com a espécie *Cavanillesia arborea* (Malvaceae), observou um valor de $G_{st} = 0,0874$, indicando que a maior parte da diversidade genética estaria ocorrendo dentro das populações. Steenbock (2003), estudando populações naturais de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), obteve um valor de $G_{st} = 0,032$, considerando haver uma alta variabilidade dentro das populações, e baixa entre as populações.

TABELA 6 – Heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), estimativas de fluxo gênico (N_m) e estatísticas F para cada *locus* de todas as populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

<i>Locus</i>	H_o	H_e	N_m	G_{st}	F_{st}	F_{it}	F_{is}
Ldiv31	0,659	0,712	1,344	0,136	0,157	0,253	0,114***
Ldiv40	0,000	0,485	0,392	0,378	0,438	1,000	1,000
Ldiv48A	0,511	0,616	0,668	0,262	0,310	0,388	0,113***
Ldiv55	0,740	0,615	1,712	0,150	0,191	0,016	-0,215
Ldiv58	0,719	0,772	3,550	0,061	0,080	0,131	0,056
Média	0,526	0,640	1,533	0,197	0,236	0,367	0,171

*** $P < 0,005$.

No trabalho de Ruas et al. (2009), que isolou e caracterizou 10 *loci* microssatélites para a espécie *Luehea divaricata*, e que, para essa caracterização, coletaram em torno de 42 indivíduos em três populações, com 21, 11 e 10 o número de indivíduos de cada uma, respectivamente, foram observados, para o *locus* Ldiv31, oito alelos, para o Ldiv40, dois alelos, Ldiv48A, quatro alelos, Ldiv55, cinco alelos e para o *locus* Ldiv58, quatro alelos. No presente estudo, foram obtidas médias do número de alelos por *locus* em cada uma das populações, sendo respectivamente para cada um desses *loci*, Ldiv31 - 5,2 alelos, Ldiv40 - 2,6 alelos, Ldiv48A - 4,6 alelos, Ldiv55 - 5 alelos e Ldiv58 - 7 alelos. Para os *loci* Ldiv40, Ldiv 48A e Ldiv58, o número de alelos é maior se comparado, já para o *locus* Ldiv31 o número de alelos é menor, e o *locus* Ldiv55 o número de alelos é igual, se compararmos esses resultados com os resultados do trabalho de Ruas et al. (2009). Contudo, os trabalhos foram realizados em regiões distintas, e o número de populações e o número amostral das populações também

diferem, revelando que, podemos encontrar valores de números de alelos por *locus* em quantidades diversas em cada população amostral.

Comparando-se os valores de $H_o = 0,740$ e $H_e = 0,615$ para o *locus* Ldiv55, com os valores do trabalho de Ruas et al. (2009), $H_o = 0,929$ e $H_e = 0,770$, o valor de heterozigosidade observado é maior do que o esperado, o mesmo encontrado em nosso trabalho, mostrando que há um número maior de heterozigotos nas populações do que o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para esse *locus*. No entanto, no estudo de Ruas et al. (2009), a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), para os *loci* Ldiv48A ($H_o = 0,952$ e $H_e = 0,664$), Ldiv55 ($H_o = 0,929$ e $H_e = 0,770$) e Ldiv58 ($H_o = 0,762$ e $H_e = 0,718$) foi observado um valor maior para a heterozigosidade observada se comparada a heterozigosidade esperada, já em nosso estudo, foi observado o oposto, constatando, que há maior número de homozigotos nas populações de *Luehea divaricata* para a região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

O valor de N_m determina se a deriva genética, por si só, pode causar variabilidade genética substancial entre locais. Se N_m for maior que 1,0, o fluxo gênico será alto o suficiente para prevenir uma diferenciação devido à deriva (MORAES e DERBYSHIRE, 2003). No presente, trabalho o fluxo gênico médio estimado entre as populações foi maior que 1,0, para todos os pares de populações (Tabela 6), o que, juntamente com a alta variabilidade genética dentro das populações, indica ter havido um reduzido impacto da fragmentação de habitats sobre a diversidade genética de *Luehea divaricata* nas cinco populações amostrais estudadas. Assim sendo, os valores obtidos indicaram que o fluxo gênico está próximo do suficiente para prevenir a diferenciação populacional devido à deriva genética nas populações estudadas.

Ao se correlacionar os resultados da Tabela 7 com outros trabalhos, depreende-se que o número de migrantes foi relativamente baixo àqueles observados para *Caryocar brasiliense*, cujo valor foi de 4,00 (FERNANDES, 2008), e, também, em *Myrcia splendens*, com valor de 8,72 (BRANDÃO, 2008), que analisaram populações em ambientes fragmentados. Entretanto, o fluxo gênico verificado em *Chorisia speciosa* (0,370) (SOUZA et al., 2004) espécie da mesma família de *Luehea divaricata*, que também se utilizou de marcador codominante (aloenzimas), foi obtido um valor baixo, inferior a 1,00.

Os valores de divergência genética (F_{st}) entre as populações (Tabela 7) mostram uma diferenciação de moderada a alta, segundo classificação de Yeh (2000) que considera valores de 5 a 15% moderados, e aqueles iguais ou superiores a 15%, indicativos de alta divergência genética.

TABELA 7 - Valores de divergência genética (F_{st}), e estimativas de fluxo gênico (N_m) entre as cinco populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

		F_{st}	N_m
Camboazinho	Arroio Canas	0,072	3,214
Camboazinho	Fazenda Inhatinhum	0,149	1,426
Arroio Canas	Fazenda Inhatinhum	0,129	1,691
Camboazinho	Rio Cacequi	0,191	1,062
Arroio Canas	Rio Cacequi	0,185	1,100
Fazenda Inhatinhum	Rio Cacequi	0,111	2,000
Camboazinho	BR 290	0,150	1,420
Arroio Canas	BR 290	0,114	1,949
Fazenda Inhatinhum	BR 290	0,122	1,801
Rio Cacequi	BR 290	0,140	1,534

Foré *et al.* (1992) observaram a estrutura genética posteriormente à fragmentação em 15 populações de *Acer saccharum* (Aceraceae) e relacionaram o isolamento de fragmentos com os níveis de diversidade genética. Os autores observaram baixa divergência entre os fragmentos ($F_{st} = 0,03$) e que o fluxo gênico foi máximo após a fragmentação, nesta ocorrência, devido a maior incidência de vento e que a fragmentação não acarretou isolamento das populações. Por outro lado, Souza *et al.* (2004) encontraram alta divergência genética entre populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* (Malvaceae) sugerindo, que a fragmentação leva à deriva genética e ao aumento da divergência entre populações.

Por outro lado, Nei (1978) afirmou que, quando acontece redução no tamanho populacional, mesmo que o número de alelos seja diminuído, o grau de heterozigosidade e a diversidade genética podem continuar tão altos quanto na população original. Isto se deve, na maioria das ocorrências, ao fato de que os alelos perdidos por deriva são raros, os quais contribuem pouco para o nível de heterozigosidade.

A espécie *Luehea divaricata* tem como vetores de polinização principalmente as abelhas, destacando-se abelha-europeia ou abelha-africanizada, e, esporadicamente, beija-flores (CARVALHO, 2008). No presente estudo, dentro das populações, a estrutura genética observada sugere que a dispersão de pólen e sementes está ocorrendo de maneira homogênea.

A ocorrência do fluxo gênico, especialmente via pólen, ou o deslocamento dos genes via animais polinizadores, tem sido pouco discutido, considerando-se que a grande maioria

das espécies arbóreas tropicais é alógama e polinizada por animais (BAWA, 1974; BAWA et al., 1985). Tanto por medidas indiretas, como pelo estudo do desempenho dos diferentes grupos de vetores de pólen, alguns autores têm apontado distâncias geográficas consideráveis para o fluxo gênico (atingindo centenas de metros), demonstrando que muitos polinizadores são de voo longo (KAGEYAMA et al. 1998). Da mesma forma, poucos dados existem que quantifiquem a real importância da falta dos polinizadores em paisagens fragmentadas, em relação ao efeito da fragmentação na população de polinizadores (KAGEYAMA et al. 1998).

Aizen e Feinsinger (1994), trabalhando com duas espécies arbóreas do norte da Argentina, descobriram diferenças expressivas entre a floresta contínua e fragmentos pequenos, para a frequência de visitas de insetos polinizadores. Os autores verificaram, ainda, um acréscimo na frequência de visitas de *Apis mellifera* (exótica), da área de floresta contínua para os fragmentos, em duas espécies nativas da região, *Prosopis nigra* e *Cercidium australe*.

Assim, ao avaliar os valores de N_m , e compará-los aos observados para outras espécies em outros estudos é possível presumir que o fluxo gênico em *Luehea divaricata*, ocorre em função das características ecológicas da espécie, como a polinização (entomofilia), e, ainda, pela dispersão das sementes (anemocórica), tornando, de certa forma eficiente, o fluxo gênico e a migração desses alelos entre as populações.

Apesar do reduzido número de indivíduos encontrados nas populações e do elevado grau de endogamia dentro de três das populações estudadas (Camboazinho, Arroio Canas e Fazenda Inhatinhum), os valores moderados do índice de fixação observados (Tabelas 5, 6 e 7) de *Luehea divaricata* sugerem que a dispersão de propágulos reprodutivos é eficiente. Assim, programas de conservação dos recursos genéticos desta espécie tendem a ser efetivos se o fluxo de polinizadores for mantido. Inobstante, há de se considerar que a fragmentação florestal provoca uma diminuição no número de indivíduos de uma população, favorecendo perdas de variação genética.

Essas populações remanescentes passam a ter um tamanho menor que o mínimo adequado (N_e mínimo) para que a mesma possa ter uma normal continuidade e desenvolvimento. Nessas populações pequenas de *Luehea divaricata*, nesses fragmentos florestais, pode vir a ocorrer, em tempo indeterminado, deriva genética, o que acarretará em alterações das frequências de seus genes daquelas da população original, até mesmo chegando a perder alelos. A longo prazo, pode se agravar a presença da endogamia, decorrente da maior possibilidade de autofecundação e cruzamento entre indivíduos aparentados (STEFENON e COSTA, 2012).

4.3 Distância genética

As estimativas de distância genética de Nei (1978) entre as cinco populações estudadas de *Luehea divaricata*, estão apresentadas nas cinco populações está descrito na Tabela 8.

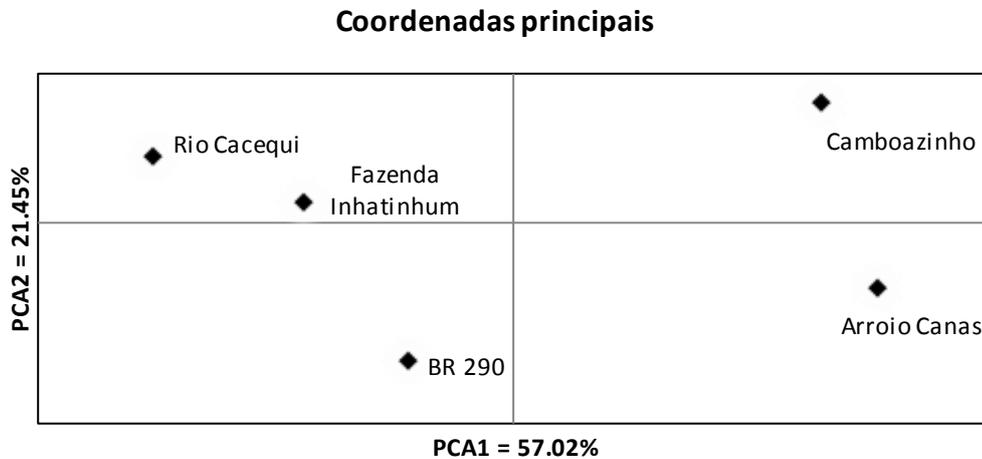
TABELA 8 - Estimativas de distância genética de Nei (1978) entre as cinco populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.

Populações	Camboazinho	Arroio Canas	Fazenda Inhatinhum	Rio Cacequi	BR 290
Camboazinho	-				
Arroio Canas	0,471	-			
Fazenda Inhatinhum	0,947	0,908	-		
Rio Cacequi	1,099	1,382	0,381	-	
BR 290	0,922	0,762	0,566	0,576	-

A distância genética média entre as cinco populações foi de 0,801. As populações que apresentaram menor distância entre si foram Rio Cacequi e Fazenda Inhatinhum (0,381), e as que apresentaram maior valor foram Rio Cacequi e Arroio Canas. A Análise de Componentes Principais (PCA) (Figura 13) também mostra que Rio Cacequi e Fazenda Inhatinhum possuem menor distância entre si. Provavelmente essa baixa diferenciação genética média pode ser atribuída ao fato de que essas populações faziam parte de uma única população contínua no passado. Assim, os possíveis efeitos de degradação e fragmentação só poderão ser constatados com estudos de progênes, e ou indivíduos regenerantes, pois os eventos de fragmentação mais intensos ocorridos no bioma Pampa, nos locais de ocorrência dessas populações, principalmente em decorrência de pecuária extensiva e sobre pastoreio, ocorreram em uma escala de dezenas de anos (CRUZ et al., 2012) e ainda não estão sendo observados em indivíduos adultos, muitos dos quais devem ser remanescentes desta formação contínua pré-fragmentação.

As outras três populações (Arroio Canas, Camboazinho e BR 290), encontram-se isoladas devido à fragmentação do habitat na região. Este isolamento pode impedir a troca de alelos entre as populações, o que causa a divergência genética e a formação de grupos distintos observados na Figura 13.

FIGURA 13 – Análise de Componentes Principais (PCA) para as cinco populações de *Luehea divaricata* na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul.



Fonte: Jordana Caroline Nagel. Universidade Federal do Pampa (2013).

De um modo geral, os valores da distância genética de Nei (1978) indicaram a existência de moderada a alta divergência genética entre as populações, em função da reduzida eficiência do fluxo gênico (N_m) entre elas (Tabela 7). O fluxo gênico deve ocorrer via pólen, apesar da dispersão dos frutos da espécie ocorrer por vento, que teoricamente alcançaria maiores distâncias. Devido ao isolamento geográfico, que impede a dispersão das sementes a longas distâncias, reforça-se a hipótese de fluxo gênico via pólen, pois as distâncias geográficas entre as populações podem ter gerado a divergência, uma vez que algumas populações apresentam distâncias consideráveis umas das outras, como é o caso da população Camboazinho, por exemplo, que se encontra, em média, a 62 km de distância da população Rio Cacequi.

Fatores biológicos, como a falta de polinizadores para a ocorrência do fluxo gênico entre as populações, e geográficos, pois ocorre o isolamento em distância dessas populações, podem, também, estar influenciando a dinâmica populacional da espécie.

5 CONCLUSÕES

A diversidade genética estimada para a espécie *Luehea divaricata* a partir das cinco populações estudadas, nos cinco *loci* microssatélites utilizados é alta.

A maior parte dessa diversidade genética (76,12%) encontra-se distribuída dentro dessas populações, enquanto a menor parte 23,88% está distribuída entre as populações.

A Análise de Componentes Principais (PCA) e as estimativas de distância genética de Nei (1978) comprovaram que as populações Rio Cacequi e Fazenda Inhatinhum são aquelas que possuem menor distância entre si, a qual provavelmente decorrente do fato de que essas populações faziam parte de uma única população contínua, no passado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A persistência de populações em paisagens fragmentadas é criticamente dependente da conservação da conectividade entre fragmentos, que, por sua vez, evita o isolamento das populações. Uma maior conectividade pode ser obtida pela criação de habitats mais parecidos com o ambiente original, no entorno dos fragmentos, pela criação de corredores ecológicos e pela redução da distância entre fragmentos. Essa conservação genética pode ser favorecida, também, se ocorrerem trocas de propágulos ou sementes entre os fragmentos de forma antrópica, além disso, acrescentando-se a esses fragmentos, espécies florestais nativas. Nesse sentido, até mesmo árvores isoladas poderiam colaborar para o fluxo de indivíduos e genes entre os fragmentos.

Um ponto importante, e que tem merecido da comunidade científica, pouca atenção dada sua dificuldade de abordagem, é o de estudos de reintrodução de espécies da fauna (aves, morcegos e insetos), que tenham função de dispersão de pólen ou sementes. Essas iniciativas poderiam ajudar a manter as frequências genotípicas dentro e entre os fragmentos florestais do bioma Pampa.

Por ser uma espécie nativa, pioneira e de rápido crescimento, e característica de florestas ripárias, a utilização de *Luehea divaricata* para a recuperação de áreas degradadas do bioma Pampa ou para recuperação de Áreas de Preservação Permanente, como as situadas ao longo de rios, seria uma boa maneira de manter as características fenotípicas atuais, antes que ocorra um maior processo de deriva genética nessas populações, tanto por isolamento reprodutivo, como por falta de polinizadores nesses fragmentos florestais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIZEN, M. A.; FEINSINGER, P. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a chaco dry forest, Argentina. **Ecology**. v. 75. p. 330-351. 1994.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blucher. p. 381. 1971.
- ANTON, C. S. et al. Universidade Federal de Lavras. UFLA. Lavras, 2005. Disponível em <<http://www.cemacufra.com.br/trabalhospdf/trabalhos%20voluntarios/protoc%2063.pdf>>. Acesso em: janeiro de 2013.
- AULER, N. M. F. et al. The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: genetic structure and diversity of natural populations by of means of non-adaptive variation in the state of Santa Catarina. **Genetic Molecular Biology**. v. 25. p. 329–338. 2002.
- ALDRICH, P. R. et al. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented population of the tropical tree *Symphonia globulifera*. **Molecular Ecology**. v. 7, p. 933-944. 1998.
- APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 161. p. 105-121. 2009.
- ASSUNÇÃO, F. O. **Historia del Gaucho. El Gaucho: Ser y Quehacer**. Buenos Aires: Ed. Claridad. 2 ed. 309 p. 2007.
- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores do Sul: Guia de Identificação e Interesse Ecológico**. 326p. 2002.
- BARBOSA, L. M.; MANTOVANI, W. Degradação ambiental: conceituação e bases para o repovoamento vegetal. In: Barbosa, l. m. (coord.) workshop sobre recuperação de áreas degradadas da serra do mar e formações florestais litorâneas, 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente. p. 34-40. 2000.
- BARETT, S. C. H.; KOHN, J. R. Genetics and evolutionary consequences of small population size in plants: Implications for conservation. In Falk, D.A., Holsinger, K.E. (Eds.), **Genetics and Conservation of Rare Plants**. Oxford University Press. New York, USA. p. 3–30. 1991.
- BAUERMANN, S. G.; MACEDO, R. B. Dinâmicas paleovegetacionais, paleoclimáticas e evidências antrópicas baseado em dados polínicos no Rio Grande do Sul. In: Workshop Quaternário do Rio Grande do Sul, **Resumos**, Canoas, ULBRA. p. 35-36. 2007.
- BAWA, K. S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution**. v. 28. p. 95-92. 1974.

BAWA, K. S.; PERRY, D. R.; BEACH, J. H. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany**. v. 72. p. 331-345. 1985.

BECKMANN, J. S.. SOLLER, M. Detection of linkage between marker loci affecting quantitative traits in crosses between segregating populations. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 76. p. 228-236. 1988.

BEHLING H. et al. Late Quaternary grassland (Campos), gallery forest, fire and climate dynamics, studied by pollen, charcoal and multivariate analysis of the São Francisco de Assis core in western Rio Grande do Sul (southern Brazil). **Review of Palaeobotany and Palynology**. v. 133. p. 235-248. 2005.

BELLANCA E.T.; SUERTEGARAY D. M. A. Sítios arqueológicos e areas no sudoeste do Rio Grande do Sul. **Mercator – Revista de Geografia da UFC**. v. 2. p. 99-114. 2003.

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

BILENCA, D.; MIÑARRO, F. **Identificación de áreas valiosas de pastizales en las pampas y campos de Argentina, Uruguay y Brasil**. Fundação Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires, 351p. 2004.

BOLDRINI, I. I. et al. **Bioma Pampa: diversidade florística e fisionômica**. Porto Alegre, editora Pallotti. 64p. 2010.

BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no Sul de Minas Gerais**. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2008.

CAMACHO, F.J.; LISTON, A. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). **American Journal of Botany**. v. 88. p. 1065-1070. 2001.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e usos da madeira**. Colombo, PR: EMBRAPA – CNPF. p. 640. 1994.

CARVALHO P. C. F. et al. Herbage allowance and species diversity in native pastures. In: **VII International Rangeland Congress** (Proceedings...). Document Transformation Technology Congress, Durban, South Africa. p. 858-859. 2003.

CARVALHO, P. E. R. Açoita-Cavalo (*Luehea divaricata*). **Circular técnica**, Colombo, PR. p. 2- 48. 2008.

CAVALLARI, M. M. **Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para a sua conservação**. 106f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2004.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites.** 122f. Tese (Doutorado ESALQ/USP). 2004.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**. v. 144. v. 4. p. 2001-2014. 1996.

CHASE, M. R.; BOSHIER, D. H.; BAWA, K. S. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1. Genetic variation in natural populations. **American Journal of Botany**. v. 82. p. 468-475. 1995.

CRUZ, R. C. et al. 2012. Disponível em: <<http://w3.ufsm.br/ppggeo/files/ebook02/Artigo%208.pdf>> Acesso em: janeiro de 2013.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Variação genética em espécies arbóreas e consequências para o melhoramento florestal. **Agrotópica**. Itabuna. v. 3. n. 3. p. 119-127. 1991.

DIAS, B. F. S. **A implementação da Convenção sobre Diversidade Biológica no Brasil: Desafios e Oportunidades.** Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello. p. 10. 1996.

EXCOFFIER L., SMOUSE P. E., QUATTRO J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**. v. 131, p. 479–491. 1992.

EXCOFFIER L., LAVAL G., SCHNEIDER S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**. v. 1. p. 47–50. 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Brasília: EMBRAPA/CENARGEM**, 3. ed. p. 220. 1998.

FERNANDES, R. C. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de pequi (Caryocar brasiliense Camb.) no Norte de Minas Gerais.** 73f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2008.

FORÉ, S. A. et al. Genetic structure after forest fragmentation: an landscape ecology perspective on *Acer saccharum*. **Canadian Journal of Botany**. Ottawa. v. 70. n. 8. p. 1659-1668. 1992.

FOSTER, B. R.; RAHS, E. Y. A study of canyon-dwelling mountain goats in relation to proposed hydroelectric development in Northwestern British Columbia, Canada. **Biological Conservation**. v. 33. p. 209-228. 1985.

FUTUYMA, D. J. Biologia reprodutiva. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto. 631p. 1992.

GIUDICE NETO, J.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em *Caesalpinia echinata* Lam. implantada em arboreto experimental. **Revista Brasileira de Botânica**. v.28. n.2. p. 409-418. 2005.

GONÇALVES, A. C. **Estrutura genética em populações naturais de *Dimorphandra mollis* Benth.** 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras. 2006.

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

GUSSON, E. **Uso e diversidade genética em populações naturais de biriba (*Eschweilera ovata* [Cambess.] Miers): subsídios ao manejo e conservação da espécie.** Piracicaba. 91f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. 2003.

HAMADA, H. M. et al. Enhanced gene expression. by the poly(dT-dG) and poly(dC-dA) sequence. **Molecular and Cellular Biology**, v. 4. p. 2622-2630. 1984.

HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B.; MITTON, J. B. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v. 10, p. 173-200. 1979.

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, L. (Ed.). **Genetics and Conservation. Menlo Park: Benjamin Cummings.** p. 335-348. 1983.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. In: **Frugivorous and Seed Dispersal.** Estrada, A. e Fleming, T.H. (eds), Junk Publishers, Berlin. 392 p. 1986.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. **In Plant population genetics, breeding and germplasm resources** (ed. A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler & B. S. Weir). Sunderland, MA: Sinauer. p. 43-63. 1989.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The genetic structure of tropical tree population: associations with reproductive biology. In: BOCK, J. e LINHART, Y. B. (Eds) **Evolutionary ecology of plants.** Boulder: Westview. p. 129-146. 1989.

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

HAMRICK, J. L. et al; GODT, M. J. W.; SHERMAN-BROYLES, S. L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests.** Amsterdam. v. 6. n. 1-4. p. 95-124. 1992.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Conservation genetics of endemic plant species. In **Conservation genetics: case histories from nature** (ed. J. C. Avise e J. L. Hamrick). New York: Chapman and Hall. p. 281-304. 1996.

HARRIS, A. R. Population studies of *Xiphinema pachtaicum* and *X. americanum* in a vineyard in north-eastern Victoria. **Victoria : Mildura Horticultural Research Station, Department of Agriculture.** 8p. 1980.

HAYAWARD, M. D.; HAMILTON, N. R. S. Genetic diversity – population structure and conservation. In: CALLOW, J. A.; FORD-LLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J. Biotechnology and plant genetic research conservation and use. **Biotechnology in Agriculture Series**. Cab internacional. v.19. p. 49-76. 1997.

IBAMA. 2012. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/publicadas/mma-divulga-dados-do-monitoramento-do-desmatamento-de-tres-biomas>> Acesso em: janeiro de 2013.

INVENTÁRIO FLORESTAL CONTINUO DO RIO GRANDE DO SUL. 2002. Disponível em: <<http://coralx.ufsm.br/ifcrs/frame.htm>> Acesso em: janeiro de 2013.

JONES, C. J. *et al.* Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. **Molecular Breeding**, Dordrecht. v. 3. p. 381-390. 1997.

KAGEYAMA, P. Y. Conservação *in situ* de recursos genéticos de plantas. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais – IPEF**. v. 35. p. 7-37. 1987.

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

KAGEYAMA, P. Y.; LEPSCH-CUNHA, N. M. Singularidade da biodiversidade nos trópicos. In: GARAY, I; DIAS, B. F. S. **Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais**. Petrópolis. Vozes. 2001.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; VENCOSKY, R. Conservação *in situ* de espécies arbóreas tropicais. In: NASS, L. L et al. **Recursos genéticos e melhoramento-plantas**. Rondonópolis: Fundação MT. p. 149-158. 2001.

KLEIN, R. M. Southern Brazilian phytogeography features and the probable influence of upper Quaternary climatic changes in the florist distribution. **Boletim Paranaense de Geociências**. v. 33. p. 67-88. 1975.

LACERDA, D. R. et al. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymentia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**. v. 10, n.5. p. 1143-1152. 2001.

LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. **Science**. v. 241. p. 1455-1461. 1988.

LLEIRAS, E. Conservação de recursos genéticos florestais. In: Congresso Nacional sobre Essências Nativas, 2, 1992, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente/Instituto Florestal. pt.4, p.1179-1184. 1992.

LITT, M. LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44. p. 397-401. 1989.

LIU, B.; WENDEL, J. F. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. **Molecular Ecology Notes**, Oxford. v. 1. n. 4. p. 205-208. 2001.

- LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 2 edição. Nova Odessa, SP: **Editora Plantarum**. v. 2. 368p. 2002.
- LOVEJOY, T. E. **Ecological dynamics of tropical forest fragments**. In: Sutton, S. L.; Whitmore, T. C., Chadwick, A. C. Tropical Rain Forest: Ecology and Management. Oxford: Blackwell Scientific Publication. p. 377-384. 1983.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v. 15. p. 65 -95. 1984.
- LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Distribucion de la variacion en especies de arboles tropicales. **Revista Biologia Tropicales**. San Jose. v. 35. n. 1. p. 165-75, 1987.
- MARKET, C. L., MOLLER, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. **Proceedings of Natural Academic Science**. v. 45. p. 753-763. 1959.
- MELO JUNIOR, A. F. et al. Estrutura genética de populações naturais de pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, Piracicaba. v. 66. p. 56-65. 2004.
- MELO JÚNIOR, A. F. **Diversidade, estrutura genética e fenologia de populações naturais de *Cavanillesia arborea* K. Schum no norte do Estado de Minas Gerais**. 100f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras. Lavras. 2010.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2007). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php>> Acesso em: maio de 2011.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2009). Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/campossulinos_parte1_14.pdf> Acesso em: janeiro de 2013.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2010). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/pampa>> Acesso em janeiro de 2013.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2012). Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/182/_arquivos/pampa2002_2009_182.pdf> Acesso em: janeiro de 2013.
- MORAES, P. L.; DERBYSHIRE, M. T. C. Diferenciação genética e diversidade em populações naturais de *Cryptocarya aschersoniana* Mez (Lauraceae). **Biota Neotropica**. v. 3. p. 85-94. 2003.
- MURCIA, C. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**. v. 10. p. 58-62. 1995.
- NASON, J. D.; HAMRICK, J. L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. **Journal of Heredity**. Oxford. v. 88. n. 4. p. 264-276. 1997.
- NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**. 29: 1-10. 1975.

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

NYBOM, H. et al. Microsatellite DNA marker inheritance indicates preferential pairing between highly homologous genomes in polyploid and hemisexual dog-roses *Rosa* L. Sect. *Caninae*. **Heredity**. v. 92. p. 139–150. 2004.

PAIVA, J. R. VALOIS A. C. C. Espécies selvagens e sua utilização no melhoramento. In: NASS, L. L. et al. **Recursos genéticos e melhoramento- plantas**. Rondonópolis: Fundação MT. p. 79-100. 2001.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetics software for teaching and research. **Molecular Ecology**. 6: Weir BS e Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**. v. 38.p.1358–1370. p. 288-295. 2006.

RAJORA, O. P.; MOSSELER, A. Challenges and opportunities for conservation of Forest genetic resources. **Euphytica**. v. 118. p. 197-212. 2001.

RAMBO, B. **A fisionomia do Rio Grande do Sul**. Selbach, Porto alegre. 456p. 1956.

RAMBO, B. Migration routes of the South Brazilian rain forest. **Pesquisas Série Botânica**.v. 5. p. 1-5. 1961.

REITZ, R.; KLEIN, R. N.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: SUDESUL, Governo do Rio grande do Sul. Herbário Barbosa Rodrigues. 525p. 1988.

RICHTER, H. G.; DALLWITZ, M. J. Disponível em: <[http://deltaintkey.com/wood/pt/www/tilludiv .htm](http://deltaintkey.com/wood/pt/www/tilludiv.htm)> Acesso em: abril de 2012.

RIO GRANDE DO SUL. Governo do Estado. Secretaria Estadual do Meio Ambiente. **Inventário florestal contínuo do Rio Grande do Sul**. Santa Maria: SEMA/UFSM. 706p. (Relatório). 2002.

ROESCH L. F. W. et al. The Brazilian Pampa: A Fragile Biome. **Diversity**. v. 1. p. 182-198. 2009.

RUAS E. A. et al. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) and intergeneric transferability. **Conservation Genetics Resources**. v. 1. p. 245-248. 2009.

SEBBENN, A. M.; ETTORI, L. C. Conservação genética *ex situ* de *Esenbeckia leiocarpa*, *Myracrodruon urundeuva* e *Peltophorum dubium* em teste de progênes misto. **Revista Instituto Florestal**, São Paulo. v. 13. n. 2. p. 201-211. 2001.

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

SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication. **Bell System Technical Journal**. v. 27. p. 379-623. 1948.

- SLATKIN, M. Gene flow and geographic structure of natural population. **Science**. v. 236. p. 787 – 792. 1987.
- SLATKIN, M. Na exact test for neutrality based on the ewens sampling distribution. **Genetical Research**. v. 64. n. 1. p. 71-74. 1994.
- SOUZA, L. M . F .I. de; KAGEYAMA, P. Y; SEBBENN, A. M. Estrutura genética em populações fragmentadas em *Chorisia speciosa* St. Hil (BOMBACACEAE). **Scientia Florestalis**, Piracicaba. v. 65. p. 70-79. 2004.
- STEENBOCK, W. **Fundamentos para o manejo de populações naturais de espinheira-santa , Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss. (Celastraceae)**. 145f. Dissertação (Mestrando em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina. 2003.
- STEFENON, V. M., COSTA, L. S. A simulation study on the behavior of allelic richness and inbreeding coefficient over generations in fragmented populations of tree species. **Annals of Forest Research**. v. 55. p. 3-10. 2012.
- STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus* species) genetic resource. In: BAJAJ, Y.P.S. eds. **Biotechnology in agriculture and forestry, cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag. v. 32. p. 87-101. 1995.
- TANAKA, J. C. A.. et al. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**. v. 28. n. 5. p. 834-837. 2005.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**. v. 17. p. 6463–6471. 1989.
- TILMAN, D.; KNOPS, J.; WENDIN, D. The influence of functional diversity and composition on ecosystem process. **Science**. v. 277. p. 1300-1302. 1997.
- TOREZAN, J. M. D. et al. Genetic variability of pré and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, n. 2, p. 171-180. 2005.
- VARVIO, S. L.; CHAKRABORTY, R.; NEI, M. Genetic variation in subdivided populations and conservation genetics. **Heredity**. v. 57. p. 189-198. 1986.
- VILLALOBOS, V. M.; FERREIRA, P.; MORA, A. **The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm**. Biotechnology Advances. v. 9. p. 197-215. 1991.
- WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms can be typed using polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44. p. 397-401. 1989.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution, Lancaster**. v. 38. n. 6. p. 1358-1370. 1984.

WILLIAMS, J. G. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18. p. 6531-6535. 1990.

XIAO, C. L. et al. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. **Phytopathology**, St. Paul. v. 94. p. 446-453. 2004.

YEH, F. Populations genetics. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T., ed. **Forest conservation genetics: principles and practice**. Melbourne: CSIRO Publishing. 352p. 2000.

YOUNG, A. G.; BROWN, A. H. D. Paternal bottlenecks in fragmented populations of the grassland daisy *Rutidosia leptorrhynchoides*. **Genetical Research**, v. 73. p. 111-117. 1999.

YOUNG, A.; BOYLE, T. Forest fragmentation In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. Forest conservation genetics: principles and practice. **Austrália**: CSIRO Publishing. Cap.10. p.123-132. 2000.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC. utilizando marcadores de RAPD e SSR**. Tese Doutorado - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba. p. 130. 2002.

