



Bernardo Dunley

Swartzia glazioviana (Taub.) Glaz.



Instituto de Pesquisas Jardim Botânico Rio de Janeiro
Escola Nacional de Botânica Tropical
Programa de Pós-graduação Stricto Senso

Dissertação de Mestrado

**Desenvolvimento de marcadores de DNA microssatélites e
caracterização da diversidade, estrutura genética e fluxo
gênico em populações de *Swartzia glazioviana* (Taub.)
Glaz., uma espécie ameaçada de extinção**

Janaína Spoladore

Rio de Janeiro
2014



Instituto de Pesquisas Jardim Botânico Rio de Janeiro
Escola Nacional de Botânica Tropical
Programa de Pós-graduação Stricto Senso

Desenvolvimento de marcadores de DNA microssatélites e caracterização da diversidade, estrutura genética e fluxo gênico em populações de *Swartzia glazioviana* (Taub.) Glaz. (Leguminosae), uma espécie ameaçada de extinção

Janaína Spoladore

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, Escola Nacional de Botânica Tropical, do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientador: Dr. Vidal de Freitas Mansano

Coorientador: Dr. Alexandre Magno Sebbenn

**Rio de Janeiro
2014**

Desenvolvimento de marcadores de DNA microssatélites e caracterização da diversidade, estrutura genética e fluxo gênico em populações de *Swartzia glazioviana* (Taub.) Glaz. (Leguminosae), uma espécie ameaçada de extinção

Janaína Spoladore

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro - JBRJ, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre.

Aprovado por:

Prof. Dr. Vidal de Freitas Mansano _____

Profa. Dra. Fernanda Amato Gaiotto _____

Prof. Dr. Haroldo Cavalcante Lima _____

em __/__/____

Rio de Janeiro
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Spoladore, Janaina.

S762d

Desenvolvimento de marcadores de DNA microssatélites e caracterização da diversidade, estrutura genética e fluxo gênico em populações de *Swartzia glazioviana* (Taub.) Glaz. (Leguminosae), uma espécie ameaçada de extinção / Janaina Spoladore. – Rio de Janeiro, 2014.

xiv,83f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro / Escola Nacional de Botânica Tropical, 2014.

Orientador: Vidal de Freitas Mansano.

Coorientador: Alexandre Magno Sebbenn.

Bibliografia.

1. Genética de populações. 2. Marcadores Microssatélites. 3. Conservação. 4. Leguminosae. 5. *Swartzia glazioviana*. Título. II. Escola Nacional de Botânica Tropical.

CDD 576.5

“... As pessoas precisam somente de oportunidade. Tendo oportunidade, todo mundo pode ser igual. (...) As pessoas só precisam de uma chance.”

Luiz Inácio Lula da Silva

Àqueles a quem tanto amo:
Otavio, Rubia, Simone, Bruna, Ed (amor),
Mel e Malu,
e à *Swartzia glazioviana*, objeto deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço enormemente a todas as pessoas que me ajudaram na realização deste estudo, todas, sem exceção, foram imprescindíveis e especiais.

Agradeço ao Dr. Vidal de Freitas Mansano por aceitar me orientar e permitir minha entrada no programa de Pós-graduação do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, pela possibilidade de trabalhar com genética de populações, pelo projeto incrível com *Swartzia glazioviana*, por me permitir aprender, pelo tempo disponibilizado e pelas maravilhosas viagens à Região dos Lagos;

Agradeço ao Dr. Alexandre Magno Sebbenn pelo entusiasmo, pelas maravilhosas aulas de genética de populações e pelas análises feitas;

Agradeço à Dra. Maristerra Rodrigues Lemes por tudo que me ensinou, cada passo no laboratório até a escrita da dissertação com profissionalismo, dedicação e amor pela genética;

Agradeço mais uma vez ao Dr. Alexandre Magno Sebbenn, à Dra. Maristerra Rodrigues Lemes e ao Dr. Rogério Gribel pelo apoio financeiro através de projetos respectivos financiados pelo CNPq e FAPERJ (E26/111.351/2010 e E-26/110.447/2012);;

Ao Jardim Botânico e ao programa de Pós-graduação do Jardim Botânico e Escola Nacional de Botânica Tropical agradeço pelo apoio estrutural e financeiro durante estes dois anos e meio de Mestrado nas figuras de Ana Marmelo e Hevelise, que me auxiliou muito neste período;

Ao CNPq pela bolsa de estudo, sem a qual a realização do mestrado seria inimaginável;

Àqueles que apontaram caminhos: Dr. Leandro de Freitas, Dr. Antonio Carlos da Silva Andrade, Dra. Jakeline Prates, Dra. Ananda Virginia de Aguiar;

À minha família, Otavio e Rubia, pai e mãe maravilhosos e generosos, sempre presentes e incentivadores;

Às irmãs Simone e Bruna, melhores amigas e conselheiras; à Simone, que me apoiou de todas as formas possíveis no decorrer do mestrado;

Ao amor e melhor amigo Ed Canedo: sem você a Biologia não teria entrado na minha vida de forma tão contundente;

À minha tia Carmen Rincavesky sempre nos acompanhando com palavras de tranquilidade e apoio;

Ao meu cunhado Inti Briones, pelos ensinamentos;

Aos meus amigos: Marcelo, Marcus Felipe, Patricia, Francismeire, Thalita, Hanna, Nyna, Felipe, Rafael, Ricardo Bahia, Ricardo Manoel, Alexandre Christo (*in memoriam*) pelas conversas especiais e apoio fundamentais;

Ao amigos queridíssimos:

Vivian, Cássio, Elisabeth e Marcus Oliveira pelas tardes maravilhosas no JB, especialmente divertidas e terapêuticas;

Tarlile, pelas idas a campo em busca da espécie, pelos mapas confeccionados, pela companhia sempre adorável;

Elton John de Lírio, por me ensinar tanto, me ajudar tanto, eu compartilho a feitura desta dissertação;

Luan Dias de Freitas por me ensinar tudo no dia-a-dia do laboratório de Biologia Molecular, pela convivência maravilhosa e por me ajudar em um dos momentos mais difíceis;

e Valderes Sarnaglia Bento Junior pelas animadas conversas e pelo carinho;

Aos meus colegas de mestrado: Juliana, Polyanna, Herison com quem tanto aprendi;

Aos queridíssimos meninos do Laboratório de Biologia Molecular do JB: Maurício, Evandson, Allan, cuja companhia encheu meus dias de alegria e aprendizado;

À Dra. Luciana, Daniele, Camila, Paulo Rogério pelo auxílio no Laboratório de Genética;

Ao Paulo e Jorge por cultivarem com tanto carinho “as minhas *Swartzias glaziovianas*”, acompanhando diariamente até o “surgimento” espetacular das primeiras folhinhas e além;

À Paula e Marina pela disponibilidade e agradável companhia no Laboratório de Sementes;

Aos professores das disciplinas que fiz no mestrado, principalmente à Profa. Dra. Alda Heizer pelos conhecimentos passados. Aos pesquisadores do JB, Dr. Ronaldo Marquete e Dra. Claudine Mynssen por tornarem o JB um ambiente acolhedor;

Ao Dr. Vitor Hugo, Doutoranda Fernanda, pela ajuda com as primeiras análises dos microssatélites;

Ao Maurício Vassali pela ajuda com algumas análises e ao Ricardo Bahia pela ajuda com o Abstract;

Aos meus cuidadores, mental e fisicamente: Nestor e Francisco, me mudando radicalmente

e aos trabalhadores do Jardim Botânico, presentes todos os dias;

A todos agradeço infinitamente, estarei sempre disponível,

Muito obrigada!!!!!!!!!!

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	iv
AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMO	15
ABSTRACT	16
I. INTRODUÇÃO	17
<i>I.1. Leguminosae e Swartzia glazioviana (Taub.) Glaz.</i>	17
<i>I.2. Mata Atlântica – Um bioma ameaçado</i>	19
<i>I.3. Genética de populações e conservação de plantas</i>	21
<i>I.4. Marcadores Moleculares</i>	23
II. OBJETIVO GERAL	26
<i>II.1. Objetivos específicos</i>	26
III. MATERIAL E MÉTODOS	27
<i>III.1. Coleta do material e amostragem populacional</i>	27
<i>III.2. Extração e quantificação do DNA</i>	28
<i>III.3. Desenvolvimento dos marcadores de DNA microssatélites</i>	29
<i>III.3.1. Construção da Biblioteca Genômica</i>	29
<i>III.3.2. Seleção e sequenciamento dos clones positivos</i>	31
<i>III.3.3. Desenho e síntese dos iniciadores (primers)</i>	31
<i>III.3.4. Caracterização dos locos microssatélites</i>	32
<i>III.3.5. Estimativa de parâmetros genéticos para a caracterização dos locos microssatélites</i>	33
<i>III.4. Transferibilidade dos marcadores para outras espécies de Swartzia</i>	37
<i>III.5. Caracterização da diversidade, estrutura genética, sistema de cruzamento e fluxo gênico em populações de S. glazioviana</i>	38
<i>III.5.1. Diversidade genética nas populações de S. glazioviana</i>	38
<i>III.5.2. Estrutura genética das populações</i>	38
<i>III.5.3. Análise da estrutura genética espacial intrapopulacional</i>	38
<i>III.5.4. Análise do tamanho efetivo populacional</i>	39

III.5.5. <i>Análise do sistema de cruzamento</i>	40
III.5.6. <i>Análise do fluxo, distancia e padrão de dispersão de pólen</i>	41
IV. RESULTADOS	43
IV.1. <i>Extração do DNA e quantificação do DNA</i>	43
IV.2. <i>Construção da Biblioteca Genômica e desenho dos iniciadores (primers)</i>	43
IV.3. <i>Screening de primers</i>	44
IV.4. <i>Caracterização dos locos microssatélites</i>	47
IV.5. <i>Transferibilidade dos locos de S. glazioviana para outras espécies do gênero</i>	55
IV.6. <i>Caracterização da diversidade, estrutura genética, sistema de cruzamento e fluxo gênico em populações de S. glazioviana</i>	56
IV.6.1. <i>Diversidade genética</i>	56
IV.6.2. <i>Estrutura genética das populações de S. glazioviana</i>	58
IV.6.3. <i>Estrutura genética espacial intrapopulacional</i>	58
IV.6.4. <i>Tamanho efetivo populacional</i>	60
IV.6.5. <i>Sistema de cruzamento</i>	61
IV.6.6. <i>Fluxo e dispersão de pólen</i>	62
V. DISCUSSÃO	63
V.1. <i>Desenvolvimento de marcadores de DNA microssatélites para S. glazioviana</i>	63
V.2. <i>Caracterização da diversidade, estrutura genética, sistema de cruzamento e fluxo gênico em três populações de S. glazioviana</i>	66
VI. CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS	83
ANEXO I – <i>Dados de coleta dos indivíduos adultos de S. glazioviana coletados</i>	84
ANEXO II – <i>Protocolo para extração de DNA de tecidos foliares de S. glazioviana, de acordo com Doyle & Doyle (1987), modificado por Ferreira & Grattapaglia (1998)</i>	87
ANEXO III – <i>Protocolo de germinação de sementes em Swartzia glazioviana</i>	90
ANEXO IV - <i>Resumo publicado nos Anais do II Simbioma (Simpósio sobre Biodiversidade da Mata Atlântica)</i>	91
ANEXO VI – <i>Resumo publicado no 65º Congresso Nacional de Botânica</i>	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização geográfica das populações amostradas de <i>S. glazioviana</i>	28
Tabela 2. Características de 20 marcadores microssatélites isolados para <i>S. glazioviana</i> . A identificação do loco SSR, a sequência de cada par de <i>primer forward</i> e <i>reverse</i> , a unidade de repetição do loco microssatélite, as temperaturas de anelamento (Ta) testadas por loco e o tamanho do fragmento em pares de bases (pb).	45
Tabela 3. Caracterização de 10 locos microssatélites desenvolvidos para <i>S. glazioviana</i> . N: amostragem; A: número de alelos por loco; H _O : heterozigosidade observada; H _E : heterozigosidade esperada; Q: probabilidade de exclusão de paternidade; QC: probabilidade de exclusão de paternidade combinada; I: probabilidade de identidade genética; IC: probabilidade de identidade genética combinada e F: índice de fixação. Teste de significância baseado em 1.000 permutações (ns: não significativo; *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,0001).	48
Tabela 4. Diversidade genética e índice de fixação (F) com base na análise de 10 locos SSR para três populações de <i>S. glazioviana</i> . H _O : Heterozigosidade observada e H _E : heterozigosidade esperada. Teste de significância baseado em 1.000 permutações (n.s.: não significante; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).	52
Tabela 5. Teste de herança Mendeliana 1:1 para 10 locos microssatélites em uma progênie de <i>Swartzia glazioviana</i>	53
Tabela 6. Teste G de máxima verossimilhança para a hipótese de segregação independente (1:1:1:1) entre pares de locos em uma progênie de <i>Swartzia glazioviana</i>	53
Tabela 7. Desequilíbrio genotípico entre pares de locos microssatélites em árvores adultas de três populações de <i>Swartzia glazioviana</i>	54
Tabela 8. Amplificação cruzada e análise de polimorfismos para 10 locos microssatélites desenvolvidos para <i>S. glazioviana</i> e testados em outras seis espécies de <i>Swartzia</i>	56
Tabela 9. Diversidade genética e índice de fixação (F) analisadas individualmente para cada uma das três populações de adultos e uma progênie amostrada de <i>Swartzia glazioviana</i> , com base na análise de dez locos microssatélites. N _t é número total de indivíduos adultos e progênies amostrados nas três populações; n e o tamanho amostral; n _{Privado} é o número de alelos privados; k é o número total de alelos; R é a riqueza alélica para 28 indivíduos genotipados nos dez locos; H _O é a heterozigosidade observada; H _E é a heterozigosidade esperada. P _{2° Parente} é a probabilidade de não excluir o segundo parente (quando um dos parentes é conhecido); P _{Parent-Pair} é a probabilidade de não excluir o par de parentes; Q _{Identity} é probabilidade de identidade.	57

Tabela 10. Divergência genética ($G_{ST(Hedrick)}$) padronizada de Hedrick (2005) entre pares de populações de adultos e uma progênie de <i>Swartzia glazioviana</i>	58
Tabela 11. Estimativa de parâmetros da estrutura genética espacial para adultos de três populações de <i>Swartzia glazioviana</i>	60
Tabela 12. Número censo, coancestria de grupo, tamanho efetivo da população e relação entre o tamanho efetivo e o número censo na população Encosta Rua Vitória de <i>S. glazioviana</i>	60
Tabela 13. Sistema de cruzamento em uma progênie oriunda da população Encosta Rua Vitória de <i>Swartzia glazioviana</i> (95% IC é o intervalo de confiança a 95% calculado por 1.000 reamostragens <i>bootstraps</i>).	61
Tabela 14. Análise de dispersão de sementes e pólen em uma população de <i>S. glazioviana</i> , na região dos Lagos, RJ.	62
(ANEXO I) Tabela 15. Coordenadas geográficas, circunferência à altura do peito (CAP), diâmetro à altura do peito (DAP) e altura de todos os indivíduos de <i>S. glazioviana</i> coletados para as três populações amostradas (Trilha do Forno, Praia das Conchas e Encosta Rua Vitória).	84

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Locais de coleta das populações de *Swartzia glazioviana* na Região dos Lagos, RJ. ... 27
- Figura 2.** Quantificação do DNA genômico total extraído de folhas de indivíduos de três populações de *S. glazioviana*, em gel de agarose 1%, corado com GelRed. Nos três primeiros poços observa-se DNA do fago λ nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/ μ l, respectivamente. Os dez poços seguintes referem-se a amostras de DNA extraído de 10 indivíduos das três populações de *S. glazioviana* 43
- Figura 3.** Produtos resultantes da amplificação de 13 locos microssatélites (*Sgl01*, *Sgl05*, *Sgl06*, *Sgl11* e *Sgl12*, *Sgl13*, *Sgl14*, *Sgl15*, *Sgl16*, *Sgl17*, *Sgl18*, *Sgl19* e *Sgl20*) de *S. glazioviana*, em gel de agarose 2%. A primeira coluna mostra DNA *Ladder 1Kb* para inferência dos tamanhos dos produtos amplificados. As demais colunas em cada gel referem-se aos produtos amplificados para quatro diferentes indivíduos de *S. glazioviana*. 46
- Figura 4.** Eletroferogramas resultantes da genotipagem de dois indivíduos de *S. glazioviana* para quatro locos de DNA microssatélites em sequenciador 3500 XL (Life Technologies Inc). A) *Sgl01* (6-FAM); B) *Sgl05* (NED); C) *Sgl17* (6-FAM) e D) *Sgl20* (VIC). 49
- Figura 5.** Frequências dos alelos observados para dez locos microssatélites desenvolvidos para *S. glazioviana*. 51
- Figura 6.** Estrutura genética espacial intrapopulacional em três populações de *Swartzia glazioviana*. A linha contínua refere-se à estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se à estimativa do intervalo de confiança do erro à 95% de probabilidade da hipótese de ausência de estrutura genética espacial ($H_0: \theta_{xy} = 0$). a) Pop 1 = Trilha do Forno, b) Pop 2=Praia das Conchas e c) Pop 3 = Encosta Rua Vitória. 59

RESUMO

Swartzia glazioviana (Leguminosae) é uma espécie arbustiva-arbórea endêmica à região dos Lagos, no Rio de Janeiro, a qual ocorre exclusivamente em florestas de encosta da restinga. A espécie encontra-se ameaçada de extinção pelo endemismo e contínua modificação do habitat em função da extensiva ocupação humana. Neste estudo foi desenvolvida uma bateria de marcadores microssatélites para *S. glazioviana* buscando disponibilizar ferramentas informativas para aplicação em estudos genéticos visando a conservação da espécie. Para tal utilizou-se a técnica de enriquecimento de biblioteca genômica. Foram obtidos 96 clones dos quais 38 sequências (40%) apresentaram microssatélites e vinte pares de *primers* foram desenhados. 10 locos foram caracterizados quanto aos parâmetros de diversidade genética e poder discriminatório. A diversidade genética observada para o conjunto dos locos foi alta (média de alelos = 12,3). As heterozigosidades médias observada (H_O) e esperada (H_E) foram 0,672 e 0,825, respectivamente. O índice de fixação (F) foi significativamente maior que zero em duas populações sugerindo a ocorrência de endogamia. A probabilidade de identidade genética combinada foi de $2,245 \times 10^{-14}$ e a de exclusão de paternidade combinada foi de 0,999995, indicando o alto poder discriminatório dos locos. A transferibilidade dos marcadores desenvolvidos para *S. glazioviana* mostrou 76% de sucesso em testes realizados para seis espécies congêneres. Análises genéticas populacionais de três populações de *S. glazioviana* mostram alta diversidade e diferenciação genética entre elas, além de estruturação genética intrapopulacional. A análise sobre o sistema reprodutivo indicou uma alta taxa de cruzamento ($t_m=0,892$). Também foi detectada a ocorrência de fluxo gênico entre as populações. O estudo mostrou que os dez microssatélites desenvolvidos para *S. glazioviana* são ferramentas úteis para estudos sobre a genética de populações e podem contribuir para a conservação efetiva das populações desta espécie ameaçada.

Palavras-chave: Genética de populações, marcadores SSR, conservação, Leguminosae.

ABSTRACT

Swartzia glazioviana (Leguminosae) is an endemic woody species from “Região dos Lagos”, Rio de Janeiro state, Brazil. Its populations are restricted to slopes of “restinga” vegetation. This species is threatened with extinction due its endemism and continuous habitat modification by extensive human occupation. In this study, a battery of microsatellite (SSR) DNA markers for *S. glazioviana* were developed in order to provide informative tools for genetic studies aiming species conservation. It was used the technique of genomic library enrichment. Recombinant DNA of 96 clones was sequenced and 38 sequences (40%) from them showed microsatellites. Twenty pairs of primers were designed but ten were polymorphic in capillary electrophoresis. The loci were characterized concerning their genetic diversity and their discriminatory power. The genetic diversity observed was high average of allele/loci = 12.3. The average observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities were 0.672 and 0.825, respectively. The fixation index (F) was significantly higher than zero for the two populations, suggesting inbreeding. The combined probability of identity was 2.24×10^{-14} and the combined paternity exclusion was 0.999995, indicating a high discriminatory power of the developed loci. The transferability of SSR markers showed 76% of positive results for tests employed in six congeneric species. Genetic analyses of three populations of *S. glazioviana* showed high diversity and genetic differentiation among them, in addition to intrapopulation genetic structuring. Analysis about mating system showed a high outcrossing rate ($t_m = 0,892$). We also detected occurrence of gene flow among populations. Our study demonstrates that the ten developed microsatellites for *S. glazioviana* are useful tools for studies on population genetics and may contribute to effective conservation of this threatened species.

Key words: Populations genetics, SSR markers, conservation, Leguminosae.

I. INTRODUÇÃO

I.1 Leguminosae e Swartzia glazioviana (Taub.) Glaz.

Leguminosae é a terceira maior família de angiospermas, apresentando cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies (Lewis *et al.* 2005). A família é considerada monofilética e é tradicionalmente dividida em três subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae, sendo a primeira parafilética e as duas últimas monofiléticas (Lewis *et al.* 2005). A subfamília Papilionoideae é caracterizada por apresentar flores geralmente com cinco pétalas modificadas, sendo a pétala adaxial denominada de vexilo ou estandarte, a mais externa no botão floral e geralmente maior que as demais, as duas pétalas laterais denominadas de asas ou alas e duas pétalas abaxiais, denominadas de quilha ou carena, que podem ser fundidas e encobrir o androceu e o gineceu (Barroso *et al.* 1984). Dentre as Papilionoideae, há um grupo denominado clado "*swartzioid*" (Torke & Mansano 2009), no qual o gênero *Swartzia* Schreb. está incluído. Este gênero é caracterizado por ter exsudato nos caules e ramos, folhas estipeladas e imparipinadas. As flores não apresentam a estrutura típica de uma flor papilionácea pois apresentam cálice inteiro no botão floral ou são apétalas ou monopétalas, com estames numerosos e livres e tipicamente de dois tamanhos com anteras dorsifixas, grãos de pólen apresentando membrana do colpus com grânulos espessos (Torke & Mansano 2009; Paulino *et al.* 2013). As sementes de *Swartzia* são geralmente ariladas e não apresentam as estruturas típicas daquelas encontradas nos demais membros da subfamília Papilionoideae. Dentre as características atípicas figuram-se: testa dura e espessa com células em forma de ampulheta, uma faixa de traqueídeos abaixo da inserção do hilo e um embrião curvo (Kirkbride & Wiersema 1999). As espécies de *Swartzia* abrangem de arbustos ramificados a árvores do dossel e diferem umas das outras pela combinação de caracteres que são contínuos quando examinados por todo o gênero, tais como forma de crescimento, características da casca e madeira, tipo e densidade do indumento, e tamanho, forma, número e cor das partes reprodutivas e vegetativas. Os caracteres descontínuos tais como tricomas multicelulares, apetalia, estames isomórficos e brácteas estipuladas parecem ter múltiplas origens em *Swartzia* (Torke & Mansano 2009).

As espécies pertencentes ao gênero *Swartzia* foram pouco estudadas em relação à biologia floral, aspectos ecológicos e genéticos e pesquisas farmacológicas. (Paulino *et al.* 2013). No entanto há indicação de potencial para ornamentação, plantio em áreas degradadas, utilização da madeira e para fabricação de produtos farmacológicos e fitoquímicos pela presença de determinados constituintes químicos (Marqui *et al.* 2008; Cardoso *et al.* 2012).

Uma proposta de classificação infragenérica foi realizada para *Swartzia* por Torke & Mansano (2009), na qual as espécies foram agrupadas em 15 seções. Dentre estas seções figura a seção *Acutifoliae*, que se distribui predominantemente da região litorânea do Paraná até Pernambuco, com uma distribuição mais a oeste principalmente nos estados de Minas Gerais, Goiás e Tocantins, tendo ainda poucas espécies na porção sul da bacia amazônica. Tal grupo é monofilético apresentando um suporte de 100% de probabilidade posterior segundo as análises Bayesianas (Torke & Mansano 2009). A seção caracteriza-se por apresentar folhas imparipinadas, inflorescência ramiflora, pedicelo bracteolado, pétala branca, estames dimórficos com 2 a 24 estames grandes, gineceu unipistilado, pubescente a glabro com estilete lateral. Os frutos apresentam de 1 a 15 sementes beges com arilo amarelo, alaranjado ou ausente (Torke & Mansano 2009).

Swartzia glazioviana (Taubert) Glaziou é uma das 20 espécies da seção *Acutifoliae*, tendo como habitat a restinga e a encosta de morros litorâneos (Araujo 2009). Trata-se de uma espécie arbustiva-arbórea, cujas folhas possuem estípulas persistentes, flores com cálice lanoso internamente e gineceu glabro, os frutos são do tipo legume nucóide, as sementes são dorsiventralmente achatadas, esverdeadas e sem arilo (Mansano & Lima 2007). A espécie é considerada ameaçada de extinção (MMA 2008) por ser endêmica da Região dos Lagos do Estado do Rio de Janeiro. A região é litorânea, sendo intensamente ocupada e portanto, modificada pela ação humana. Estudos relativos à ecologia, biologia floral e genética de populações da planta são inexistentes, impossibilitando ações que viabilizem a conservação efetiva de populações desta espécie.

Os municípios de Arraial do Cabo, Armação de Búzios, Cabo Frio, Iguaba, Saquarema e São Pedro da Aldeia integram a Região dos Lagos, conhecida como de ocorrência preferencial da espécie e que tem como limites a leste e sul o Oceano Atlântico, a oeste a Serra do Mato Grosso e a norte os limites superiores da Lagoa de Araruama e os cursos inferiores dos rios Una e São João (Ribeiro & Lima 2009). Na

região a altitude varia do nível do mar até aproximadamente 500 metros (Ribeiro & Lima 2009). A localidade tem clima tropical seco (Fonseca-Kruel & Peixoto 2004) e tendência ao xerofitismo e à salinização (Ibraimo *et al.* 2004). O clima Bsh, de acordo com Köppen, característico da região, é árido quente com temperaturas que variam entre 23 e 25°C até 40°C no verão com umidade relativa do ar de 83% e precipitação anual de 823 mm com ventos constantes (Fonseca-Kruel *et al.* 2009; Ribeiro & Lima 2009). A salinidade do solo é elevada (35%) devido à baixa quantidade de água doce, baixa pluviosidade e à intensa evaporação (Ibraimo *et al.* 2004). Geotectonicamente a região é o prolongamento da linha de afundamento tectônico que formou tanto a Baía da Ilha Grande quanto a da Guanabara, além de um ressalto abrupto das escarpas da Serra do Mar (Ibraimo *et al.* 2004). As fisiografias predominantes são as planícies arenosas costeiras, os depósitos alúvios-colúvios, as lagunas, os morros baixos das penínsulas e as encostas (Ribeiro & Lima 2009). A associação de processos de erosão e intrusivos, tectônicos e deposicionais originaram a diversidade litológica e de formas de relevo local. Isto, combinado à diferenciação espacial nas condições de umedecimento e a alternância de condições climáticas, resultou na diversificação dos solos e das fisionomias da vegetação, evidenciada pela mistura de espécies típicas de restingas com espécies comuns às florestas ombrófila e estacional (Bohrer *et al.* 2009).

1.2. Mata Atlântica – Um bioma ameaçado

A Mata Atlântica, segunda maior floresta neotropical, estendia-se por volta de 1840 desde o Cabo de São Roque (RN), a 5 graus de latitude sul, até a altura do Rio Taquari (RS), a 30 graus de latitude sul (Adams 2000). Desde então a intensificação da ocupação e das atividades antrópicas na Mata Atlântica reduziram a cobertura vegetal a menos de 12% de sua extensão original (Ribeiro *et al.* 2009). Este bioma, portanto, apresenta-se como um dos mais afetados pela ação antrópica devido ao crescimento e desenvolvimento de centros urbanos, resultando no bioma com maior número de espécies ameaçadas de extinção (>50%), 276 das 472 espécies da lista oficial da flora brasileira (MMA 2008).

A destruição de habitats, de acordo com atuais estudos ecológicos de espécies e populações, de fato é a principal causa da extinção de espécies contemporâneas (Futuyma 2009), sendo a região neotropical a de maior risco ambiental por ser a mais

afetada pela ação do homem (Oliveira 2001). Possivelmente como sugere Adams (2000) sob este aspecto, a Mata Atlântica é um sistema ideal para analisar os efeitos do desmatamento e da fragmentação na eliminação de populações inteiras, na inevitável erosão da diversidade genética e na possível extinção de espécies.

Localizado no sudeste brasileiro, o estado do Rio de Janeiro está integralmente inserido no bioma Mata Atlântica e na atualidade apresenta sua cobertura florestal original reduzida a cerca de 17% (INEA 2012). O bioma Mata Atlântica com estruturas e composições florísticas diferenciadas pode ser visto como um mosaico de ecossistemas: floresta ombrófila densa, floresta estacional decidual e semidecidual, floresta ombrófila mista, encrave de Araucária, formações florísticas associadas (manguezal, vegetação de restinga e ilhas litorâneas), encrave de Cerrado, campo e campo de altitude, mata de topo de morro e de encosta do Nordeste (brejos e chás) e formações vegetacionais nativas da Ilha de Fernando de Noronha (IBAMA 2012).

A Região dos Lagos no estado do Rio de Janeiro e sua vegetação abarcam considerável diversidade e grau de endemismo, a composição florística desta área é um reflexo da especificidade climática e da heterogeneidade física e possivelmente da história paleoevolutiva da localidade (Bohrer *et al.* 2009), que é formada tanto por cordões de areia, paralelos à linha da praia, intercalados por depressões e cobertos por vegetação de restinga, como por dunas, salinas e encostas (Dantas *et al.* 2000; Pereira 2003).

A flora desta região abriga 1.200 espécies de vegetais superiores inseridas em 120 famílias botânicas, destacando-se entre elas as famílias: Leguminosae, Bromeliaceae, Myrtaceae, Rubiaceae e Orchidaceae (GERJ 2008) e as espécies arbóreas *Abarema cochliacarpus*, *Bauhinia pentandra*, *Chamaecrista ensiformis*, *Exostyles venusta*, *Grazilodendron rio-docensis*, *Hymenaea courbaril*, *Pterogyne nitens* e *Senegalia bahiensis*, sendo endêmicas *Swartzia galzioviana* e *Machaerium obovatum* (Ribeiro & Lima 2009). Frutos da flora local como pitanga (*Eugenia uniflora*) e caju (*Anacardium occidentale*) estão disponíveis e são geralmente utilizados por comunidades da região (Fonseca-Kruel *et al.* 2009).

O processo de degradação histórica deste ecossistema pode ser compreendido pela forma enfática com que as atividades humanas têm reduzido a cobertura vegetal desde o período colonial. Inicialmente houve busca por pau-brasil e posteriormente culturas agrícolas foram estabelecidas. Nos anos 1960, com o crescimento das cidades a ocupação humana em princípio tomou as principais vias de acesso e as regiões

planas, mas logo em seguida enveredou para os morros e costões interferindo no interior da mata de península e das áreas costeiras (Dantas *et al.* 2009). Neste início do século XXI, o intenso turismo de veraneio nas cidades de Cabo Frio, Araruama, Arraial do Cabo e Búzios, continua a modificar este ecossistema através do uso da areia local na construção civil, da ocupação de salinas para empreendimentos imobiliários, da exploração da vegetação e da contaminação de lagunas e lençol freático (Dantas *et al.* 2000).

1.3. Genética de populações e conservação de plantas

A estrutura e o funcionamento dos ecossistemas estão sendo modificados constantemente e enfaticamente através da ação humana (Aguilar *et al.* 2008). Embora extinção e especiação sejam processos naturais evolutivos, no último século como consequência das atividades e da ocupação humana do território, o número de extinções têm superado ao de especiações, pondo em risco a biodiversidade do planeta (Frankham *et al.* 2008). Observa-se, por exemplo, que do total de plantas conhecidas 49% estão ameaçadas de extinção, sendo 53% musgos, 23% gimnospermas e 80% angiospermas, sendo 26% monocotiledôneas e 54% eudicotiledôneas (IUCN 2014; Frankham *et al.* 2008).

A capacidade das espécies de sobreviver às mudanças ambientais, adaptando-se, mesmo em casos de isolamento reprodutivo extremo, está diretamente ligada à diversidade genética, ou seja, à variação de alelos e suas frequências inerentes às populações e seus indivíduos (Mayr 2009). A diversidade genética é gerada através dos processos de mutação e recombinação, enquanto, a seleção natural, o fluxo gênico, a deriva genética, os gargalos e o efeito do fundador (Mayr 2009; Futuyma 2009) alteram as frequências ou podem mesmo levar à perda de alelos nas populações.

As espécies arbóreas, em especial, são bastante suscetíveis aos impactos ambientais, devido ao seu lento crescimento. O desmatamento, a sobre-exploração, as atividades agrícolas têm impactado a variedade de espécies arbóreas com perda de habitat, redução de populações e consequente estrangulamento de remanescentes florestais em matrizes antrópicas (Aguilar *et al.* 2006, 2008).

O resultado imediato da diminuição das populações florestais parece ser a redução da diversidade genética, o aumento da divergência entre populações e do

cruzamento entre indivíduos aparentados com a alteração do fluxo gênico (Kageyama *et al.* 1998). Populações assim atingidas tornam-se suscetíveis aos efeitos estocásticos demográficos e ambientais que interagem com a estocasticidade genética (Kageyama *et al.* 1998; Frankham *et al.* 2008). Nas plantas, aspectos específicos como o ciclo de vida, a presença de reprodução vegetativa, os níveis de poliploidia, o sistema de cruzamento, a polinização, a dispersão de sementes e a distribuição das populações influenciam a maior ou menor suscetibilidade das espécies à perda de habitat (Aguilar *et al.* 2008).

Os efeitos a curto e médio prazos ocorrem durante o processo de supressão da vegetação levando à diminuição do tamanho efetivo das populações (efeito gargalo), ou após uma ou duas gerações em função de alterações nas frequências alélicas nas populações (deriva genética). Os efeitos em longo prazo que ocorrem após várias gerações são mais difíceis de serem detectados em espécies longevas com amostras de indivíduos adultos remanescentes da pré-perda de habitat. Uma alteração fundamental nas populações e que se inicia imediatamente após o processo de perda de habitat, é o aumento na taxa de acasalamento entre parentes e na endogamia com a consequente redução no tamanho efetivo populacional, devido ao aumento da frequência de alelos idênticos por descendência. Os efeitos em curto prazo podem ser detectados em amostras de juvenis e sementes de polinização aberta, imediatamente após a perda de habitat (Kremer *et al.* 2008; Aguilar *et al.* 2008).

Efeitos decorrentes da perda e fragmentação de habitats foram detectados em alguns estudos sobre a diversidade genética de populações de plantas (Jum & Penuelas 2006; Bittencourt & Sebbenn 2007; Collevati *et al.* 2010; Gaino *et al.* 2010; Sebbenn *et al.* 2010).

Conhecimentos ecológicos somados a estudos genéticos populacionais, por intermédio do uso de marcadores moleculares, os quais possibilitam estimar os níveis de variabilidade genética (frequência de alelos, de heterozigotos), de diferenciação genética entre populações, sistema de cruzamento e fluxo gênico, podem fornecer subsídios importantes para o conhecimento sobre a adaptação dos organismos, bem como para elaborar diretrizes que visem à conservação das espécies apontadas como em perigo. Neste sentido, vários estudos, ecológicos e genéticos, com espécies neotropicais têm sido desenvolvidos nas últimas décadas (ver *Myroxylon peruiferum* – Sebbenn *et al.* 1998; *Trema micranta*, *Cecropia pachystachya*, *Cedrela fissilis*, *Cariniana legalis*, *Maytenus aquifolia* e *Esenbeckia leiocarpa* – Kageyama *et al.*

2003; *Swietenia macrophylla* – Lemes *et al.* 2003, 2007; *Caryocar brasiliense* – Collevatti *et al.* 2003; *Ceiba aesculifolia* – Herrerías-Diego *et al.* 2005; *Theobroma grandiflorum* – Alves *et al.* 2007; *Araucaria angustifolia* – Bittencourt & Sebbenn 2007; 2008; *Hymenaea courbaril* - Biscaia *et al.* 2008; *Solanum* spp. – Moura *et al.* 2009; *Gomortega keule* – Lander *et al.* 2010; *Tabebuia roseo-alba* – Feres *et al.* 2012, dentre outros), no entanto, a enorme diversidade de espécies de árvores do Neotrópico ainda carece de informações, o que põe em foco estas pesquisas e sua importância para a conservação da flora nesta região.

1.4. Marcadores moleculares

A conservação das espécies ameaçadas depende diretamente do conhecimento obtido através da análise da diversidade genética. O estudo da diversidade através do uso de marcadores moleculares remonta à história das questões relacionadas à diversidade de organismos e domesticação das espécies (Darwin 1859-1872; Mayr 2009). Objeto de estudo dos naturalistas do século XIX, foi somente com a união dos estudos de Mendel e Darwin, no início do século XX, através da teoria neodarwinista que se lançou luz sobre a evolução dos organismos e a sua variação inerente (Futuyma 2002; Futuyma 2009; Mayr 2009). No processo de entendimento e de possibilidade de análise da variação genética, diferentes classes de marcadores foram desenvolvidas para acessar estas informações (Ferreira & Grattapaglia 1998).

Marcadores moleculares são tanto o produto da expressão de um gene quanto determinados fragmentos de DNA. Mendel baseou seus experimentos na análise de diferentes fenótipos, posteriormente descobriu-se a base genética dos estudos mendelianos e os chamados marcadores morfológicos ou fenotípicos puderam ser empregados no melhoramento de plantas (Mondini *et al.* 2009; Futuyma 2009). No entanto, o uso restrito desses marcadores a algumas plantas e a dificuldade de se encontrar marcadores ligados à características econômicas, impulsionou o desenvolvimento dos marcadores bioquímicos, as isoenzimas, que foram muito utilizadas nos últimos 60-70 anos em estudos de diferenciação e análise de estrutura de populações (Kumar *et al.* 2009). A grande contribuição dessa classe de marcadores para a biologia evolutiva foi a constatação de que a maioria das mutações que ocorrem são neutras (Schlötterer 2004). Posteriormente, o advento das enzimas de restrição por Arber na década de 60 permitiu desenvolver o marcador de DNA, RFLP

(Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) e nos anos 80 a técnica da PCR, que requer uma quantidade mínima de DNA, possibilitou desenvolver os demais marcadores de DNA (polimorfismo de sequência DNA e de variações de repetições de DNA), mais informativos: RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente), AFLP (Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados), VNTR (Número variável de repetições em tandem), microssatélites ou SSR (Sequências Simples Repetidas), ISSR, SNP (Polimorfismo de nucleotídeo único), Sequenciamento de DNA entre outros e na atualidade o uso combinado de alguns marcadores em estudos populacionais e taxonômicos (Ellegren 2004; Schlötterer 2004; Sharma *et al.* 2008). As diferenças entre esses marcadores dizem respeito, sobretudo, a custos, possibilidade de reprodutibilidade, nível de polimorfismo detectado e abundância no genoma (Ferreira & Grattapaglia 1998).

A aplicação desses marcadores tem sido vasta, culminando no início dos anos 2000 na maior aplicabilidade dos marcadores de DNA microssatélites (Schlötterer 2004) devido principalmente ao alto grau de polimorfismo encontrado (Powell *et al.* 1996; Oliveira *et al.* 2006).

Considerado um marcador altamente informativo para análises de genética de populações, os marcadores de DNA microssatélites são sequências simples de um a seis nucleotídeos dispostos sequencialmente (Litt & Luty 1989; Selkoe & Toonen 2006). Estas repetições são classificadas em três categorias, sendo elas: perfeitas, imperfeitas ou compostas (Weber 1990), as quais correspondem a um único tipo de repetição, uma só repetição com sequências intervenientes e repetições diferentes, respectivamente. São fragmentos no DNA que apresentam alta taxa de mutação (10^{-6} a 10^{-2} por geração – Schlötterer 2000), cuja origem provável são “escorregões” (*slippage*) da polimerase durante o processo de replicação ou mesmo recombinação desigual ou incorreto alinhamento das fitas de DNA (Salles *et al.* 2003; Schlötterer 2004). Porém o mecanismo de mutação proposto, *DNA (replication) slippage*, parece predominar para a variabilidade dos microssatélites. Neste mecanismo, que ocorre durante a replicação, as fitas de DNA se dissociam e voltam a se associar erroneamente alterando o número de sequências repetidas (Schlötterer 2000). Os microssatélites são encontrados tanto em regiões não codificantes como codificantes (mais raro) (Salles *et al.* 2003). Para efeito analítico são considerados seletivamente neutros, com nulo ou mínimo efeito epistático e pleiotrópico (Ferreira & Grattapaglia

1998). São marcadores codominantes, sendo possível detectar tanto os homozigotos como os heterozigotos.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o desenvolvimento dos marcadores microssatélites (ver Zane *et al.* 2002), uma delas é o enriquecimento de bibliotecas genômicas que consiste no uso de sondas marcadas (repetições de DNA) para a seleção dos fragmentos de interesse (Salles *et al.* 2003; Souza *et al.* 2012). Esta técnica parece ser preferível pela facilidade e rapidez da sua aplicação uma vez que requer limitados equipamentos de laboratório (Zane *et al.* 2002).

É possível, apesar de serem marcadores espécie-específicos, fazer a transferibilidade destes marcadores entre espécies e mesmo entre gêneros devido à conservação da região adjacente aos microssatélites (Salles *et al.* 2003; Selkoe & Toonen 2006; Barbará *et al.* 2007) ampliando a abrangência de espécies para o uso de marcadores desenvolvidos.

Marcadores de DNA microssatélites, portanto, disponibilizam o acesso informativo à diversidade genética entre e dentro de populações reprodutivas, ao sistema de cruzamento, fluxo gênico e estrutura genética das populações (Ashley 2010), informações estas de grande relevância, principalmente quando se considera espécies ameaçadas, as quais demandam ações cientificamente embasadas para a conservação de suas populações.

II. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi desenvolver e caracterizar marcadores de DNA microssatélites de *Swartzia glazioviana* (Leguminosae) para estudos da diversidade, estrutura genética, sistema de cruzamento e o fluxo gênico de populações desta espécie endêmica e ameaçada de extinção, visando assim, contribuir para sua conservação.

II.1. Objetivos específicos

- Desenvolver e caracterizar marcadores microssatélites do genoma nuclear de *S. glazioviana*;
- Investigar a transferibilidade dos marcadores de DNA microssatélites desenvolvidos, para outras espécies de *Swartzia* (*S. apetala*, *S. flaemengii*, *S. langsdorffii*, *S. macrostachya*, *S. myrtifolia* var. *elegans* e *S. simplex* var. *continentalis*), a fim de disponibilizar marcadores informativos para a realização de futuros estudos genéticos com estas espécies;
- Quantificar a diversidade genética em populações de *S. glazioviana*
- Determinar os padrões de distribuição da variabilidade genética em três populações de *S. glazioviana*, estimando o nível de diferenciação entre elas;
- Determinar a estrutura genética espacial nas populações amostradas;
- Determinar o sistema de cruzamento e estimar o alcance do fluxo gênico contemporâneo via pólen em populações de *S. glazioviana*, por meio de análise de progênies,
- Gerar informações genéticas consistentes que contribuam para a conservação efetiva de populações de *S. glazioviana*.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Coleta de material e amostragem populacional

Para o desenvolvimento dos marcadores de DNA microssatélites foi extraído o DNA genômico total de folhas coletadas de um único indivíduo de *S. glazioviana* proveniente do município de Arraial do Cabo (RJ). Após a coleta, as folhas foram acondicionadas em frascos contendo sílica gel e mantidas em freezer -20°C até a extração do DNA.

As coletas para as análises genéticas das populações de *S. glazioviana* foram realizadas em três localidades situadas nos municípios de Arraial do Cabo e Cabo Frio, no estado do Rio de Janeiro (Figura 1), entre julho de 2012 e maio de 2013. No total foram amostradas três populações. A escolha das populações foi feita com base na consulta de espécimes de *S. glazioviana* depositados no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB) e no Herbário do Museu Nacional (UFRJ – R), bem como por meio de expedições realizadas à Região dos Lagos, RJ, área conhecida como de ocorrência da espécie. Duas das localidades integram o Parque Estadual da Costa do Sol sob a jurisdição do Instituto Estadual do Ambiente (INEA).

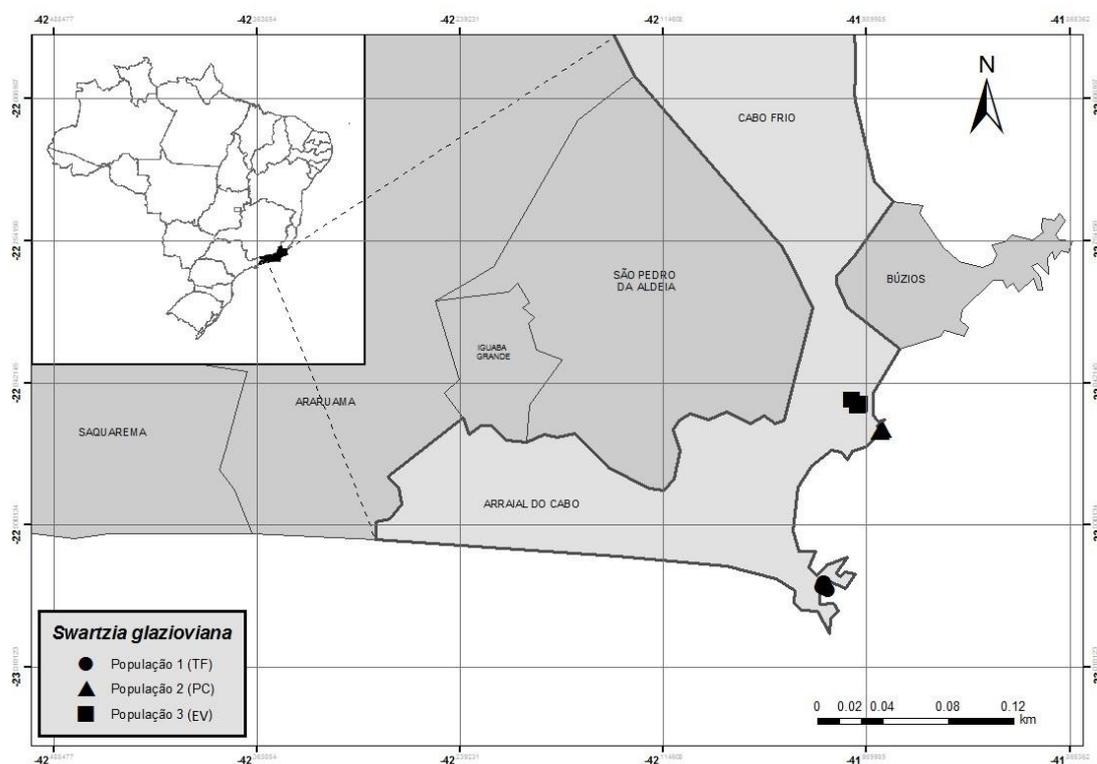


Figura 1. Locais de coleta das populações de *Swartzia glazioviana* na Região dos Lagos, RJ.

Nas populações amostradas, as folhas foram coletadas de indivíduos adultos (>120 cm de altura, ANEXO I) de *S. glazioviana*, os quais foram mapeados utilizando um GPS (GARMIN). Na tabela 1 são apresentadas a localização e as coordenadas geográficas das populações amostradas. Para os indivíduos coletados também foram feitas medidas da circunferência à altura do peito (CAP). As folhas coletadas foram secas em sílica gel em temperatura ambiente por aproximadamente sete dias e posteriormente o material foi armazenado em *freezer* a -20° C até a extração do DNA.

Tabela 1. Localização geográfica das populações amostradas de *S. glazioviana*.

População	Município	Localidade	Sigla	N	Coordenadas geográficas
1	Arraial do Cabo	Trilha do Forno	TF	50	S22°58'07,53"/ W42°01'00,60"
2	Cabo Frio	Praia das Conchas*	PC	40	S22°52'21,68"/W41°58'53,17"
3	Cabo Frio	Encosta RuaVitória*	EV	45	S22°51'20,68"/W41°59'38,44"

*Parque Estadual da Costa do Sol – INEA

Para a análise do sistema de cruzamento e fluxo gênico via pólen, foram coletados frutos em duas das populações amostradas (Praia das Conchas e Encosta Rua Vitória), visando à análise de progênies. As coletas dos frutos ocorreram entre março e maio de 2013. Os frutos coletados foram armazenados em sacos separados para cada indivíduo amostrado. Em sala de beneficiamento os frutos foram abertos e as sementes que apresentavam boas condições (sem a presença de fitopatógenos visíveis) foram desinfetadas com hipoclorito 2% por 1 minuto e em seguida lavadas consecutivamente três vezes com água destilada. Após este tratamento, as sementes foram colocadas para germinar em substrato contendo vermiculita em câmaras germinadoras a 25⁰C. Após a germinação, que variou de três semanas a dois meses, as sementes germinadas foram encaminhadas para casa de vegetação até o aparecimento da parte aérea. Posteriormente, as folhas das plântulas foram coletadas e acondicionadas em sacos tipo ziploc contendo sílica gel para posterior extração do DNA.

III.2. Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA genômico total foi feita a partir de folhas coletadas dos 196 indivíduos (adultos e progênies) de *S. glazioviana* amostrados nas três populações, seguindo o método CTAB 2% (Doyle & Doyle 1987) modificado por

Ferreira & Grattapaglia (1998) (Anexo II). O protocolo utilizado contém proteinase K, enzima que auxilia na degradação de proteínas, visando a obtenção de um DNA mais puro, uma vez que espécies da subfamília Faboideae são conhecidas por apresentarem altas concentrações de metabólitos secundários em seus tecidos foliares (APG II 2008)

A quantificação do DNA foi feita por método comparativo utilizando padrões de massa molecular conhecida (DNA fago Lambda) em gel de agarose 1% (tampão TBE 0,5X [Tris base; ácido bórico; 0,5 mM EDTA pH 8,0], corado com GelRed (Biotium). A eletroforese foi feita em minicuba horizontal (Helix) contendo TBE 0,5X, a 100V, por 20 min. Posteriormente os géis foram visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e as imagens foram fotodocumentadas.

III.3. Desenvolvimento dos marcadores de DNA microsatélites

III.3.1. Construção da Biblioteca Genômica

Para o desenvolvimento dos marcadores microsatélites do genoma nuclear de *S. glazioviana* utilizou-se a técnica de enriquecimento de biblioteca genômica, na qual foram utilizados dinucleotídeos.

A amostra de DNA (250 ng/μl - 5μg) extraída de um indivíduo de *S. glazioviana* foi utilizada no desenvolvimento dos marcadores com base no protocolo de Billotte *et al.* (1999) com modificações propostas por Souza *et al.* (2012). O DNA genômico total foi clivado utilizando a enzima *AfaI* (*Acidophilis facilis* – 10 u/μl) em reação de volume final de 100 μl contendo água, tampão da enzima, espermidina (40 mM - para auxiliar a digestão), enzima *AfaI* e DNA e posterior incubação em estufa a 37 °C por três horas. O resultado da digestão foi observado em gel de agarose 1%, contendo TAE 1X, corado com brometo de etídeo. Foram detectados fragmentos de 700 a 1200 pb com extremidades não coesivas, devido ao sítio de restrição da enzima (GT|AT) promover corte abrupto. Para que todos os fragmentos passassem a ter a mesma extremidade foram ligados adaptadores em reação contendo 2,0 μl de T4 DNA ligase (*Invitrogen*), água, 5,0 μl de tampão 5X (*Invitrogen*), adaptadores *Rsa21* (10 μM) e *Rsa25* (10 μM) e 3,0 μl de DNA digerido. Em seguida esta solução foi incubada a 20° C por duas horas em termociclador. As sequências dos adaptadores

utilizados foram: *Rsa21* 5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3'/ *Rsa25* 5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3'.

O produto da ligação dos adaptadores foi amplificado via reação em cadeia da polimerase (PCR) com o uso do *primer* específico *Rsa21* (10 µM). As etapas da PCR foram: 95°C/4 minutos, 20 ciclos de 94°C/30 segundos, 60°C/1 minuto e 72°C/1 minuto e um ciclo de extensão final 72°C/8 minutos. A observação em gel de agarose comprovou a ligação dos adaptadores.

O restante do produto da amplificação foi purificado através do kit “Quiaquick PCR purification kit” (QIAGEN Cat. # 28106) para a etapa seguinte de seleção dos fragmentos de interesse (enriquecimento da biblioteca). O enriquecimento da biblioteca para dinucleotídeos se deu pelo uso de oligonucleotídeos (sondas) de microssatélites sintetizados (CT₈ e GT₈ – 50µM) biotinizados - composto nitrogenado (vitamina B₈) que funciona como um grupo modificador do DNA amplificado e purificado – os quais anelaram nas regiões contendo as repetições em tandem de dinucleotídeos no DNA da espécie. Através do uso de estreptavidina, uma proteína tetramérica, que age como um anticorpo com alta afinidade à biotina, houve a seleção dos fragmentos de DNA de interesse por meio do uso de “beads” magnéticas e imã, (Salles *et al.* 2003; Souza *et al.* 2012). As “beads” foram magnetizadas por agitação e ressuspensas por acréscimo de SSC 0,5X (solução de NaCl e Citrato Trissódico Di-hidratado) e o DNA purificado foi hibridizado com o acréscimo de SSC 20X e 3,0 µl de cada oligo de microssatélite biotinado (50 µM) Biotina - (CT)₈ e Biotina - (GT)₈.

Os fragmentos selecionados foram reamplificados via PCR utilizando o *primer Rsa21* sob as seguintes condições de amplificação: um ciclo de 95°C/1 minuto, 25 ciclos de 94°C/40 segundos, 60°C/1 minuto e 72°C/2 minutos e um ciclo final de 72°C/5 minutos. A verificação controle do enriquecimento pela observação de bandas não preferenciais foi feita em gel de agarose 1%. A seguir foi feita a ligação dos fragmentos de interesse ao sítio de policlonagem do vetor *pGEM-T* (Promega) através de reação de PCR contendo 6,0 µl do produto amplificado, 1,0 µl de plasmídeo e 1,5 µl de DNA ligase, incubada a 4°C *overnight*, a qual gerou o DNA recombinante. Na próxima etapa ocorreu a incorporação do vetor de clonagem+inserto no interior de células competentes de *Escherichia coli* (XL1-blue), transformadas por eletroporação em cuveta a uma voltagem de 2.500V.

As células transformadas foram cultivadas em meio LB (Bacto tripton e

extrato de levedura) contendo ampicilina e adição de IPTG (Isopropylthio-B-D-Galactoside) e X-Gal (5bromo-4-cloro-3-indolyl-b-D-galactosideo). Em seguida as células em meio foram incubadas *overnight* a 37°C para a verificação da etapa de transformação por meio de teste histoquímico. Para que as colônias ficassem azuis e, portanto, indicassem a presença ou ausência dos insertos no interior dos vetores, as placas foram colocadas em geladeira por duas horas. Com a inserção dos fragmentos no interior do vetor, estes perderam a capacidade de hidrolisar um substrato cromatogênico (IPTG e X-Gal) e geraram colônias brancas. A confirmação da inserção dos insertos se deu por PCR utilizando *primer* específico (*Rsa I*) e o DNA clonado sob as seguintes condições: 95°C/4 minutos; 30 ciclos – 94°C /30 segundos, 60°C /45 segundos e 72°C /1 minuto e extensão final a 72 °C /8 minutos. Em seguida foi feita a verificação dos produtos amplificados em gel de agarose 1,5% TAE 1X corado com brometo de etídeo, a qual possibilitou identificar de 2 a 3 bandas de tamanhos distintos.

III.3.2. Seleção e sequenciamento dos clones positivos

Os clones recombinantes-positivos, ou seja, que continham o inserto, foram selecionados nas placas pela coloração branca e cultivados em meio Circle Grow, contendo ampicilina, em placa deep well, para posterior extração do DNA plasmidial. O controle desta etapa foi feito em gel de agarose 1% e a observação de duas a quatro bandas entre as amostras – da banda mais baixa para a mais alta: coil, linearizada, supercoil e dímero. Para o preparo dos fragmentos para o sequenciamento, os insertos foram amplificados em reação contendo 2,0 µl de Tampão Save Money (MgCl₂ e Tris-HCl), 4,0 µl de DNA plasmidial, 1,0 µl de um dos *primers* (T7 ou Sp6) e 2,0 µl de Big Dye (vs.3.1) em volume final de 10 µl com o seguinte programa no termociclador: um ciclo de 96°C/2 minutos, seguido de 35 ciclos a 96°C/45 segundos, 50°C/30 segundos e 60°C/4 minutos.

As amostras foram purificadas e sequenciadas em sequenciador ABI 377 XL (*Applied Biosystems*), seguindo as instruções do fabricante.

III.3.3. Desenho dos iniciadores (*primers*)

Nesta etapa foi necessário primeiramente obter as sequências consenso, ou *contig*, utilizando o programa *CAP3* (Huang & Madan 1999). Em seguida foram

eliminados dos *contigs* os trechos do adaptador (*Rsa21* 5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3') e do vetor *pGEM-T* no *Word* e *VecScreen* (2005), respectivamente. No programa *WebSat* (Martins *et al.* 2009) os microssatélites foram visualizados e em seguida as sequências foram analisadas no programa *PRIMER3* (Koressaar & Remm 2007). A escolha dos pares de *primers* fundamentou-se sobretudo em temperaturas de fusão próximas nas duas sequências que flanqueiam o DNA microssatélite para favorecer a etapa de anelamento e na riqueza de C e G nas sequências.

Os *primers* escolhidos foram analisados no programa *Gene Runner* (Hastings Software Inc. Hastings, NY, USA <http://www.generunner.com>), para verificar valores de dG, *hairpin loops*, *dimers*, *bulge loops*, *internal loops*, os quais podem tornar os *primers* inadequados para amplificação. Finalizando esta etapa os *primers* foram analisados no Genbank (Benson *et al.* 2004) para verificar se já haviam sequências semelhantes em sua base de dados. Após esse procedimento os *primers* selecionados foram sintetizados pela empresa *Macrogem Inc.*

III.3.4. Caracterização dos locos microssatélites

Inicialmente foi realizada etapa para a otimização das condições de amplificação dos marcadores microssatélites desenvolvidos para *S. glazioviana*. Para tal foram realizadas PCRs para testar a amplificação dos pares de *primers* sintetizados. Em cada teste utilizaram-se seis amostras de DNA (dois indivíduos adultos de cada uma das três populações amostradas).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 13,0 µl contendo: 2,0 µl de água ultra pura; 1,4 µl de tampão NH₄ (10X); 1,0 µl de MgCl₂ (50 mM); 1,2 µl de BSA (Bovine Serum Albumine); 0,8 µl de dNTP's (2,5 mg/ml); 4,3 µl de *primers* não-marcados (*foward* + *reverse* - 0,9 µM); 0,3 µl de Taq Polimerase (5u/µl) e 2,0 µl de DNA (2,5 ng/µl), em um termociclador Veriti (*Life Technologies*, Inc). O seguinte programa foi utilizado na PCR: um ciclo a 95°C/5 minutos, 30 ciclos - 94°C/1 minuto, temperatura de anelamento dos primers/1 minuto e 72°C/um minuto, e um ciclo final de extensão a 72°C/10 minutos. Os pares de *primers* foram inicialmente testados à temperatura de anelamento de 56 °C. Posteriormente, dependendo dos resultados da amplificação, a temperatura de anelamento foi ajustada para mais ou

para menos. Durante a otimização das condições de amplificação dos locos SSR, também foram feitos ajustes nas concentrações de MgCl₂ e BSA na reação.

Após a etapa de otimização da PCR, para os marcadores que apresentaram produtos específicos, bandas fortes e sem indícios de bandas secundárias, foram sintetizados *primers* com a adição de fluoróforos (6-FAM, NED e VIC - somente na posição 5' do *primer forward*). A adição do fluoróforo a um dos *primers* possibilita o reconhecimento dos produtos amplificados (alelos) sob eletroforese capilar em sequenciador de DNA.

O *mix* da PCR para amplificação dos locos microssatélites utilizando os *primers* marcados continha um volume final de 10,0 µl com: 1,6 µl de água ultra pura; 1,0 µl de tampão NH₄ (10X); 2,0 µl de MgCl₂ (50 µM); 2,0 µl de BSA (2,5 mg/ml); 0,8 µl de dNTP's (2,5 mg/ml); 0,3 µl de *primers* (10 µM), 0,3 µl de Taq DNA Polimerase (5u/µl) e 2,0 µl de DNA (2,5 ng/µl). O termociclador foi programado sob as seguintes condições: um ciclo a 94°C/5 minutos; 30 ciclos – 94°C/1 minuto; temperatura de anelamento otimizada de cada par de *primer* /1 minuto e 72°C/1 minuto e um ciclo final a 72°C/60 minutos. As concentrações de BSA e MgCl₂ na reação foram ajustadas, quando necessário, visando melhorar a qualidade da amplificação.

Para a análise de polimorfismos e caracterização dos locos microssatélites foi utilizado DNA de 96 indivíduos (32 por população) de *S. glazioviana*, utilizando o protocolo de amplificação descrito no parágrafo anterior. As análises foram realizadas em sequenciador de DNA 3500 XL (*Life Technologies Inc*). Para tal o *mix* com volume final de 10 µl continha: 1,0 µl do produto amplificado; 0,3 µl de *GeneScan*TM – 500 LIZ® (*Life Technologies*) e 8,7 µl de *HiDi Formamide*TM (*Life Technologies Inc*). A análise dos produtos amplificados (alelos) foi feita por meio do programa *GeneMapper 4.0* (*Life Technologies Inc*).

III.3.5. Estimativas dos parâmetros genéticos para a caracterização dos locos microssatélites

A caracterização dos locos microssatélites polimórficos se deu com base na genotipagem dos 96 indivíduos das três populações amostradas de *S. glazioviana*, conforme descrito anteriormente. Foram estimados os seguintes parâmetros de diversidade genética: número de alelos por loco (A), frequência de alelos,

heterozigosidade esperada (H_E) em equilíbrio de Hardy-Weinberg e heterozigosidade observada (H_O) e o índice de fixação (F), por loco e a média para o conjunto dos locos analisados, utilizando-se o programa *GenAlEx v.6.1*. (Peakall & Smouse 2012).

A equação para cálculo da frequência dos alelos, realizada loco a loco, seguiu:

$$p_i = \frac{2n_{ii} + n_{ij}}{2n},$$

em que n_{ii} é número de genótipos homozigotos e n_{ij} é número de genótipos heterozigotos.

Para estimar a heterozigosidade esperada (H_E , Nei 1978) e observada (H_O) e o índice de fixação (F), as seguintes equações foram utilizadas:

$$H_E = 1 - \sum p_i^2,$$

Em que p_i é a estimativa da frequência do i -ésimo alelo,

$$H_O = \frac{n_{ij}}{l},$$

em que n_{ij} é o número de indivíduos heterozigotos e l é o número total de indivíduos.

O índice de fixação foi estimado por: $F = 1 - \frac{H_O}{H_E}$.

Para avaliar o poder discriminatório dos marcadores desenvolvidos foi realizada estimativa individual, para cada loco, da Probabilidade de identidade (PI), a qual avalia a probabilidade de dois indivíduos não aparentados tomados ao acaso terem o mesmo genótipo:

$$PI = 2(\sum p_i^2)^2 - \sum p_i^4$$

e por meio da análise combinada (IC), para todos os locos em conjunto:

$$IC = \prod PI_i$$

Também foi estimada a Probabilidade de exclusão de paternidade (Q) (Weir, 1996), que avalia a probabilidade de um indivíduo, amostrado ao acaso na população, não possuir o mesmo perfil genético que o pai de uma determinada progênie, para um loco específico:

$$Q = \sum_i p_i (1 - p_i)^2 - 1/2 \sum_i \sum_{j \neq i} p_i^2 p_j^2 (4 - 3p_i - 3p_j),$$

onde p_i e p_j são as frequências de dois alelos de uma determinada população e através de análise combinada (QC) para todos os locos:

$$QC = 1 - \prod (1 - Q_i),$$

em que Q_i é o valor da probabilidade de exclusão de paternidade de um determinado loco.

Para investigar a herança mendeliana dos locos SSR foi utilizado o método proposto por Gillet e Hattemer (1989), o qual é baseado em comparações de genótipos maternos heterozigotos com a segregação de seus alelos em progênies de polinização aberta. Este método assume que os locos apresentam segregação regular e seus alelos obedecem à clássica herança Mendeliana, que se baseia em três requisitos: i) segregação meiótica regular durante a produção dos óvulos; ii) fertilização aleatória dos óvulos por cada tipo de pólen; iii) ausência de seleção entre o evento de fertilização e o momento da genotipagem das progênies. O modelo também assume que existe uma relação de codominância entre todos os alelos, sendo requerido que as seguintes condições sejam atendidas: 1) Todas as progênies de uma árvore materna devem possuir um alelo materno; 2) Em casos de uma árvore mãe heterozigota (por exemplo, $A_i A_j$, $i \neq j$): a) cada indivíduo (descendentes) deve possuir um dos alelos da árvore materna, A_i ou A_j ; b) o número de descendentes heterozigotas $A_i A_j$ (n_{ij}) espera-se que seja igual à soma de progênies homozigotas $A_i A_i$ (n_{ii}) e $A_j A_j$ (n_{jj}), ou $n_{ij} = n_{ii} + n_{jj}$; c) o número de descendentes heterozigotas $A_i A_k$ (n_{ik}) espera-se que seja igual a número de descendentes heterozigotas $A_j A_k$ (n_{jk}), ou $n_{ik} = n_{jk}$, sendo $k \neq i, j$. Com base neste modelo e utilizando-se a única progênie de polinização aberta amostrada procedeu-se a comparação da segregação observada de alelos na progênie de locos heterozigotos na árvore materna, com o esperado pela hipótese de segregação regular Mendeliana 1:1, pelo teste G (Sokal & Rohlf 1981):

$$G = 2 \left[n_{ij} \ln \left(\frac{n_{ij}}{E(n)} \right) + (n_{ii} + n_{jj}) \ln \left(\frac{(n_{ii} + n_{jj})}{E(n)} \right) \right],$$

em que, \ln é o logaritmo natural e $E(n)$ é o número esperado de genótipos A_iA_j (n_{ij}) e $A_iA_i + A_jA_j$ ($n_{ii} + n_{jj}$), baseado na equação: $E(n) = 0,5(n_{ij} + n_{ii} + n_{jj})$, ou utilizando a equação:

$$G = 2 \left[n_{ik} \ln \left(\frac{n_{ik}}{E(n)} \right) + n_{jk} \ln \left(\frac{n_{jk}}{E(n)} \right) \right],$$

em que, $E(n)$ é o número esperado de genótipos A_iA_k (n_{ik}) e A_jA_k (n_{jk}), estimado por: $E(n) = 0,5(n_{ik} + n_{jk})$. Adicionalmente, utilizou-se a correção de Bonferroni para múltiplos testes (95%, $\alpha = 0,05$) para evitar falsos positivos.

Para confirmar a independência de segregação entre alelos de diferentes locos foi realizado um teste de ligação entre pares de locos, utilizando-se informações genéticas da árvore matriz heterozigota para dois locos e observando a segregação em sua progênie. Neste caso, a hipótese nula (H_0) é de segregação mendeliana regular 1:1:1:1. A hipótese de segregação regular entre pares de locos foi aceita ou rejeitada com base em um teste G de máxima verossimilhança realizado para cada progênie (Sokal & Rohlf 1981):

$$G = 2 \left[n_{ik} \ln \left(\frac{n_{ik}}{E(n)} \right) + n_{il} \ln \left(\frac{n_{il}}{E(n)} \right) + n_{jk} \ln \left(\frac{n_{jk}}{E(n)} \right) + n_{jl} \ln \left(\frac{n_{jl}}{E(n)} \right) \right],$$

em que, n_{ik} , n_{il} , n_{jk} e n_{jl} são os números observados de genótipos A_iB_k , A_iB_l , A_jB_k e A_jB_l , respectivamente, $E(n)$ é o número esperado de genótipos A_iB_k , A_iB_l , A_jB_k e A_jB_l , respectivamente, \ln é o logaritmo natural, e $E(n)$ é calculado como: $E(n) = 0,25(n_{ik} + n_{il} + n_{jk} + n_{jl})$. A correção de Bonferroni para múltiplos testes (95%, $\alpha = 0,05$) foi utilizada também para evitar falsos positivos.

O teste de desequilíbrio genotípico foi realizado para as árvores adultas, visto que o desequilíbrio genotípico é esperado em progênies porque todos os descendentes recebem um alelo materno, o que gera um desequilíbrio genotípico aparente. O teste de desequilíbrio genotípico foi realizado utilizando o programa *FSTAT* 2.9.3.2 (Goudet 2002). A hipótese H_0 foi testada e a probabilidade do teste foi utilizada para determinar o desequilíbrio entre todos os pares de locos. Para evitar falsos positivos, utilizou-se também a correção de Bonferroni (95% de probabilidade, $\alpha = 0,05$).

III.4. Transferibilidade dos microssatélites para outras espécies de *Swartzia*

Foram realizados testes de transferibilidade dos marcadores SSR desenvolvidos para *S. glazioviana* para as seguintes espécies congêneres: *S. apetala* Raddi var. *apetala*, *S. flaemingii* Raddi, *S. langsdorffii* Raddi, *S. macrostachya* Benth., *S. myrtifolia* var. *elegans* (Schott) R.S. Cowan, e *S. simplex* var. *continentalis* Urb. Na escolha das espécies levou-se em consideração a disponibilidade de material no Banco de DNA do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, bem como o interesse na realização de estudos genéticos futuros com estas espécies. Assim, as amostras de DNA das espécies de *Swartzia* utilizadas nos testes foram obtidas do Banco da DNA do JBRJ, com exceção de *S. langsdorffii*, cujo DNA foi extraído de folhas frescas coletadas de três indivíduos adultos cultivados no interior do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Para a extração, quantificação e diluição, do DNA de *S. langsdorffii*, foram utilizados os mesmos protocolos mencionados anteriormente.

Os testes de transferibilidade dos marcadores foram feitos via PCR utilizando inicialmente amostras de DNA de dois indivíduos de cada uma das seis espécies estudadas. O protocolo de amplificação e o programa da PCR foram os mesmos utilizados na etapa de otimização dos *primers* SSR não marcados, conforme descritos anteriormente. Inicialmente foi testada a amplificação de todos os locos na temperatura de anelamento padrão dos *primers* de 56 °C. Em seguida, dependendo dos resultados obtidos, foram testadas, para cada loco, diferentes temperaturas de anelamento dos *primers* (48 a 63°C) utilizando um termociclador com gradiente de temperatura, visando obter a temperatura ótima de anelamento.

Os marcadores que tiveram as temperaturas de anelamento otimizadas, para cada espécie, foram posteriormente analisados quanto aos polimorfismos, em um sequenciador de DNA 3500 XL (*Life Technologies Inc.*), conforme anteriormente descrito. As estimativas dos tamanhos dos diferentes alelos foi feita utilizando o programa *GeneMapper 4.1* (*Life Technologies Inc.*).

*III.5. Caracterização da diversidade, estrutura genética, sistema de cruzamento e fluxo gênico em populações de *S. glazioviana**

*III.5.1. Diversidade genética nas populações de *S. glazioviana**

As estimativas de diversidade genética foram realizadas individualmente e em conjunto para as três populações amostradas de *S. glazioviana* (Tabela 1) (32 indivíduos/população) e para uma progênie com 44 indivíduos pertencente à população 3 (Encosta Rua Vitória). Os seguintes parâmetros genéticos foram estimados com base na análise de 10 locos SSR: número de alelos privados ($n_{Privados}$), número médio de alelos por loco (k), riqueza alélica (R), utilizando um método de rarefação (El Mousadik & Petit 1996), heterozigosidades observada (H_O) e esperada (H_E) segundo as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A ocorrência de endogamia foi investigada pelo índice de fixação (F). A significância estatística dos valores de F foi testado pela utilização de reamostragens por permutação Monte Carlo de alelos entre indivíduos. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *FSTAT* (Goudet 1995).

III.5.2. Estrutura genética das populações

A diferenciação genética entre as três populações e entre pares de populações de árvores adultas foi estimada pelo índice de diferenciação genética entre populações padronizada ($G_{ST(Hedrick)}$) de Hedrick (2005): $G_{ST(Hedrick)} = G_{ST}(1 + H_s)/(1 - H_s)$, em que, G_{ST} é a estimativa da diferenciação genética de Nei (1973) e H_s é a heterozigosidade média esperada nas populações, parâmetros estes estimados também utilizando o programa *FSTAT* (Goudet 1995).

III.5.3. Análise da estrutura genética espacial intrapopulacional

A análise da distribuição espacial (EGE) intrapopulacional dos genótipos das árvores adultas das três populações foi realizada utilizando-se a estimativa do coeficiente de coancestria entre pares de árvores (θ_{xy}) proposto de J. Nason e descrito em Loiselle *et al.* (1995). O coeficiente θ_{xy} mede a extensão da similaridade entre os indivíduos X e Y, relativo à similaridade genética média entre dois indivíduos

aleatórios da amostra (Hardy & Vekemans 2002). Este coeficiente é definido para cada k -ésimo alelo do l -ésimo loco em cada par de indivíduos, x e y , como:

$$\hat{\theta}_{xy} = \left[\frac{\sum_l \sum_k (p_{xlk} - \bar{p}_{lk})(p_{ylk} - \bar{p}_{lk})}{\sum_l \sum_k \bar{p}_{lk}(1 - \bar{p}_{lk})} \right] + \left[\frac{1}{\sum_l (2n_l - 1)} \right],$$

em que p_{xlk} e p_{ylk} são as frequências do alelo k no loco l no indivíduo x e y , respectivamente (assumindo valores de zero, 0,5 e 1 em homozigotos para alelos alternativos, heterozigotos e indivíduos homozigotos para o alelo em consideração, respectivamente). \bar{p}_{lk} é a frequência média do alelos k no loco l na população amostrada, em que n_l é o número de alelos existentes no loco l (número de indivíduos multiplicados pelo nível de ploidia, menos o número de alelos não amplificados). Para visualizar a estrutura genética espacial, os valores de θ_{xy} foram calculados para a média de pares de indivíduos dentro das classes de distância determinadas. Para testar se os valores médios eram significativamente diferentes de zero, o intervalo de confiança a 95% de probabilidade foi calculado para cada valor observado em cada classe de distância, usando permutação (1000) de indivíduos entre diferentes classes de distância. O intervalo de confiança foi usado para construir o correlograma. Estas análises foram conduzidas utilizando o programa SPAGEDI versão 1.3.

Para comparar a extensão da EGE entre as populações, utilizou-se a estatística S_p (Vekemans & Hardy, 2004): $S_p = -b_k / (1 - \theta_1)$, em que θ_1 é o coeficiente médio de coancestria calculado entre os indivíduos da primeira classe de distância e b_k é o declínio da curva de regressão do coeficiente de coancestria sobre o logaritmo da distancia espacial entre os indivíduos. Para testar a significância estatística da EGE, a posição dos indivíduos foi permutada 1.000 vezes para obter a distribuição de frequências de b_k sobre a hipótese H_0 de que θ_1 e $\ln(d_{xy})$ não eram correlacionados.

III.5.4 Análise do tamanho efetivo populacional

O parentesco entre adultos da população Encosta Rua Vitória foi inferido pela estimativa do coeficiente de coancestria de grupo: $\Theta = (0,5n(1 + F) + \sum_i^n \sum_{i \neq j}^n \theta_{xy}) / n^2$ (Lindgren *et al.* 1997), no qual n é o tamanho da amostra, F é o coeficiente de

endogamia da amostra e θ_{xy} é a coancestria entre pares de indivíduos. O coeficiente de coancestria para cada par de árvores adultas foi calculado utilizando o programa *SPAGeDi 1.3* (Hardy & Vekemans 2002) e o tamanho N_e foi calculado com base em Cockerham (1969): $N_e = 0,5/\Theta$.

III.5.5 Análise do sistema de cruzamento

O sistema de cruzamento de uma progênie de *S. glazioviana*, amostrada da população Encosta Rua Vitória foi investigado utilizando-se os modelos: misto de reprodução (Ritland & Jain 1981) e de cruzamentos correlacionados (Ritland 1989), implementados no programa *MLTR* (Ritland 2002). Os parâmetros estimados foram: a) taxa de cruzamento multilocos (t_m); b) taxa de cruzamento unilocos (t_s); c) taxa de cruzamento entre aparentados ($t_m - t_s$) e d) a correlação multilocos de paternidade ($r_{p(m)}$). O erro padrão dos parâmetros foi estimado por 1000 reamostragens *bootstrap*. Estes parâmetros foram utilizados para estimar o número efetivo de árvores efetivamente polinizadoras ($N_{ep} = 1/r_{p(m)}$) e o coeficiente médio de coancestria (Θ) entre plantas dentro de progênies, calculado pela seguinte expressão: $\Theta = 0,125(1 + F_p)[4s + t_m(1 + r_{p(m)})]$, em que F_p é o coeficiente de endogamia na população parental e s é a taxa de autofecundação, $s = 1 - t_m$ (Sebbenn 2006). O tamanho efetivo médio dentro da progênie foi estimado por: $N_e = 0,5\{\Theta[(n-1)/n] + (1 + F_o/2n)\}$ (Cockerham 1969), em que n é o tamanho amostral e F_o é o coeficiente médio de endogamia das progênies, estimado por meio do índice de fixação. O número de árvores matrizes para a coleta de sementes foi calculado assumindo que o objetivo é reter na amostra total o tamanho efetivo de referência de 150, $m = N_{e(\text{referência})} / N_e$ (Sebbenn 2003). Esta estimativa é feita com base em três suposições: i) as árvores-matriz não são parentes; ii) as árvores-matriz não recebem sobreposição de pólen (cada árvore-matriz cruzou-se com um conjunto diferente de doadores de pólen); e iii) as árvores-matriz selecionadas não coincidem com outra. Assim, indivíduos parentes na progênie somente ocorrerão dentro de progênie, mas não entre diferentes progênies amostradas.

III.5.6. Análise do fluxo, distância e padrão de dispersão de pólen

O fluxo contemporâneo de pólen foi estimado utilizando-se análise de paternidade implementada no programa *CERVUS 3.0* (Marshall *et al.* 1998; Kalinowski *et al.* 2007). A partir dos genótipos de toda a população adulta reprodutiva e das sementes, associado ao conhecimento da posição espacial de cada membro da população (coordenadas x e y), foram estimadas as distâncias de dispersão de pólen.

O fluxo gênico crítico, o qual representa a probabilidade de encontrar um candidato compatível como pai ou mãe de um juvenil dentro da população, quando o verdadeiro pai encontra-se fora da população, foi calculado utilizando o método de Dow e Ashley (1996). Para determinar os putativos doadores de pólen, foram utilizados todos os adultos reprodutivos na população, os quais foram considerados como candidatos a pais.

A paternidade foi determinada com base na estatística Δ (Marshall *et al.* 1998), definida como a diferença entre o “*LOD score*” do primeiro provável candidato a pai e o “*LOD score*” do segundo candidato mais provável. A significância de Δ foi determinada com os testes de paternidade simulados pelo programa *CERVUS*. O Δ crítico foi determinado para o nível de confiança de 80% como sugerido por Marshall *et al.* (1998), utilizando 50.000 repetições, 0,01 como a proporção de erros de genotipagem, 70% como a proporção de doadores de pólen amostrados (visto o alto grau de isolamento espacial das populações). O número mínimo de locos assumidos para determinar a paternidade de uma semente foi fixado em sete. Se uma semente não tinha nenhum potencial doador de pólen dentro da população esta foi considerada como tendo o doador de pólen localizado fora da população, ou seja, o pólen é migrante. Também foi assumida a possibilidade de ocorrer autofecundações.

A taxa de imigração de pólen e sementes (m) foi calculada como a proporção de sementes que não tiveram um candidato a pai determinada dentro das populações ($n_{migrante}$) em relação ao total de sementes genotipadas (n_{total}) dentro das populações, $m = n_{migrante} / n_{total}$ (Burczyk *et al.* 2004; Smouse & Sork 2004). Como todas as árvores das populações tinham o seu genótipo determinado e sua posição espacial conhecida, em termos de coordenadas x e y , a progênie que teve o pai determinado dentro da população foi utilizada para determinar as distâncias mínima, máxima, média e

mediana e o desvio padrão de dispersão de pólen. A distância de dispersão de pólen (D) foi calculada pela distância Euclidiana entre dois pontos ($\hat{D} = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2}$), em que x_1 e x_2 são as coordenadas espaciais x das árvores matrizes e dos doadores de pólen, determinados pela análise de paternidade como pais das sementes, respectivamente, e y_1 e y_2 são as coordenadas espaciais y das árvores matrizes e doadores de pólen determinados pela análise de paternidade, respectivamente.

Também foi estimada a taxa de autofecundação por análise de paternidade. A área de polinização efetiva (A_{ep}) foi calculada para as populações assumindo uma área circular ao redor desta ($A_{ep} = 2\pi\sigma^2$, Levin 1998). O raio circular de polinização (r_{ep}) foi estimada de acordo com Austerlitz & Smouse (2001).

$$r_{ep} = \sqrt{A_{ep}/3,1415}$$

IV. RESULTADOS

IV.1. Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA genômico total de *S. glazioviana*, utilizando protocolo CTAB modificado com adição de proteinase K, permitiu a obtenção de um DNA de boa qualidade, cujas concentrações variaram de 6,5 a 100 ng/μl. A boa qualidade do DNA extraído pode ser atestada pela ausência de sinais de degradação na análise feita em gel de agarose 1% (Figura 2).

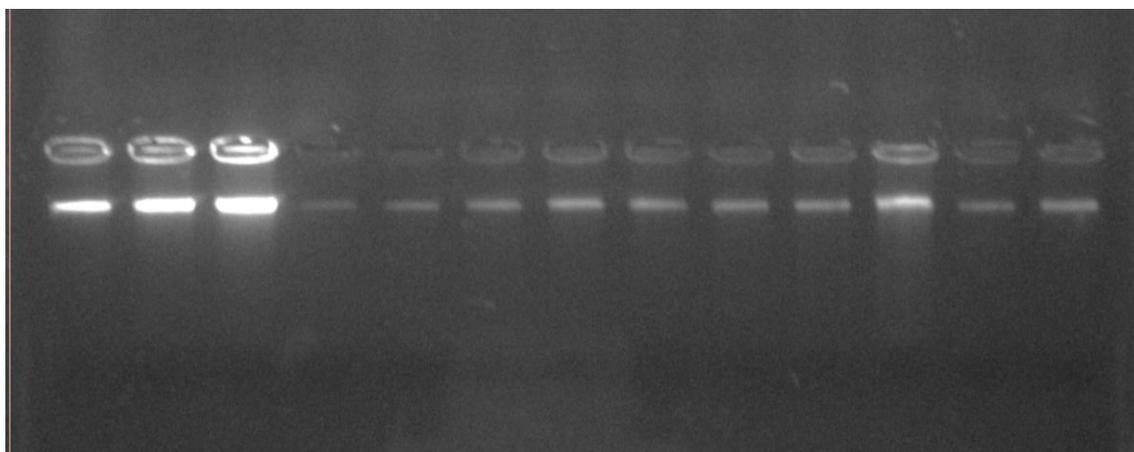


Figura 2. Quantificação do DNA genômico total extraído de folhas de indivíduos de três populações de *S. glazioviana*, em gel de agarose 1%, corado com GelRed. Nos três primeiros poços observa-se DNA do fago λ nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/μl, respectivamente. Os dez poços seguintes referem-se a amostras de DNA extraído de 10 indivíduos das três populações de *S. glazioviana*.

IV.2. Construção da Biblioteca Genômica e desenho dos iniciadores (*primers*)

A construção da biblioteca genômica foi bem sucedida para as etapas de enriquecimento, transformação e clonagem, resultando no sequenciamento de 96 clones positivos e na obtenção de 64 sequências consenso (67%).

Na etapa de desenho dos *primers*, após a deleção das sequências dos adaptadores e do vetor *pGEM-T*, foi possível detectar a presença de sequências repetidas (microssatélites) em 38 das 64 sequências (~37%) analisadas, sendo que 70% dos microssatélites eram constituídos de dinucleotídeos perfeitos e 30%

imperfeitos ou compostos. No total foram desenhados 20 pares de *primers* (21%). As 18 sequências restantes que continham elementos repetitivos (19%) apresentaram pequeno número de repetições e/ou encontravam-se no início ou fim das sequências, o que impossibilitou o desenho dos *primers*. Na tabela 2 são apresentadas as características dos 20 pares de *primers* microssatélites desenhados para *S. glazioviana*.

IV.3. Screening dos *primers*

Os 20 pares de *primers* microssatélites desenhados para *S. glazioviana* foram sintetizados e utilizados na etapa de otimização das condições de amplificação dos locos correspondentes. Dos 20 pares de *primers* testados, 16, ou seja, 80% tiveram as condições de amplificação otimizadas e foram selecionados para marcação com fluoróforos para a análise de polimorfismos. Na etapa de otimização da PCR utilizando estes 16 *primers* marcados, obtiveram-se resultados satisfatórios na amplificação de 13 locos. Na figura 4 são apresentados os produtos obtidos na amplificação destes 13 locos microssatélites, para quatro indivíduos de *S. glazioviana*.

Tabela 2. Características de 20 marcadores microssatélites isolados para *S. glazioviana*. A identificação do loco SSR, a sequência de cada par de *primer forward* e *reverse*, a unidade de repetição do loco microssatélite, as temperaturas de anelamento (Ta) testadas por loco e o tamanho do fragmento em pares de bases (pb).

Loco SSR	Sequência 5' – 3'	Unidade de repetição	Ta (°C)	Tamanho (pb)
Sgl01	F: CGCTCTCATTTCCTCCATTC R: TGTGAGCACACTCTTGTCG	(CT) ₇ T ₂ (CT) ₉	46-58 °C	193
Sgl02	F: TGCCTTGTCCTCTCTCTCT R: CGTGGACTAGCCTGTCTCAA	(CT) ₁₇ (CA) ₁₂	44-59 °C	224
Sgl03	F: GCCGAACTCATTCAATAGGTG R: CGTGGACTAGCACATCTAACG	(TC) ₂₁	44-65 °C	177
Sgl04	F: CTCCTACTGCAAACAAGCA R: TAGGGGCTGCTACTCTACCTG	(CT) ₂₂	47-61 °C	233
Sgl05	F: AGATGCTCCTAACGCAGAGTG R: GAGGCAGCGGTTCAAAC	(TC) ₆ C(CT) ₁₄	46-65 °C	156
Sgl06	F: GCGAGTCACCAAACATAGCA R: GAGGAATACAAGGCAGAATCG	(TC) ₂₅	46-65 °C	188
Sgl07	F: CGGTTTCTTGGTGGCTTTA R: GCGTGGACTACCCCATATTC	(CT) ₁₀ T(AC) ₈	45-60 °C	162
Sgl08	F: CCTGTTTCATTTAGTTCCTCCA R: CTCTTGCTTACCCGTGGACT	(GA) ₁₁	45-60 °C	228
Sgl09	F: GAGGTTGGAGCTGGAGAGAG R: CGCGTGGACTAGCAACAT	(GA) ₁₀	45-58 °C	170
Sgl10	F: CTAACAAACGCCACCCTTTT R: CGAGAGTAGCACCACCACAT	(AG) ₈ G(GA) ₆	53-63 °C	226
Sgl11	F: TGCTCCTGCCAAACTCATC R: TCTGGGCGTTTGTCTGAGT	(GA) ₂₀	56 e 58 °C	209
Sgl12	F: ATGAGCCGTGACAGAGTTG R: TCATGGGGAAGTGTCTG	(AG) ₁₉	56-60 °C	180
Sgl13	F: TCTGTGGTGGTGTGCTCTTC R: CCTTATCCCTATCCTCCCTTG	(TC) ₁₉	56 e 58 °C	189
Sgl14	F: TCCATCAAACACAACCACAG R: CGAGAGAAAAGGATGATGATG	(AG) ₁₅	56-64 °C	163
Sgl15	F: TGCCATTCCACATATCAGC R: GACAACACAGCCACTAGAATCA	(GA) ₁₅	56 e 57 °C	185
Sgl16	F: GTGTGCTGTGTGGATATGTGG R: CCTGTGATAGGGAATCTGCTG	(AG) ₁₉	56-58 °C	224
Sgl17	F: AGAAGGGGAAATGGGTAAGT R: GAAAGTTTTGCTGGGATGCT	(AG) ₁₆	56-63 °C	226
Sgl18	F: CAGCCACTGACTTCACATTTT R: AGGGCCTTAGTGGAATTTTAC	(CT) ₁₂ G(TC) ₆	56 °C	162
Sgl19	F: GAGTTGGGAGCTTGGTTGAG R: CTCCTTCTGGACGCGAAGA	(CT) ₁₇	56-67 °C	188
Sgl20	F: CAGGTGGGCTGCATACAATA R: GGACCCTTTGAGACAGTTTCG	(CT) ₂₀	56-60 °C	185

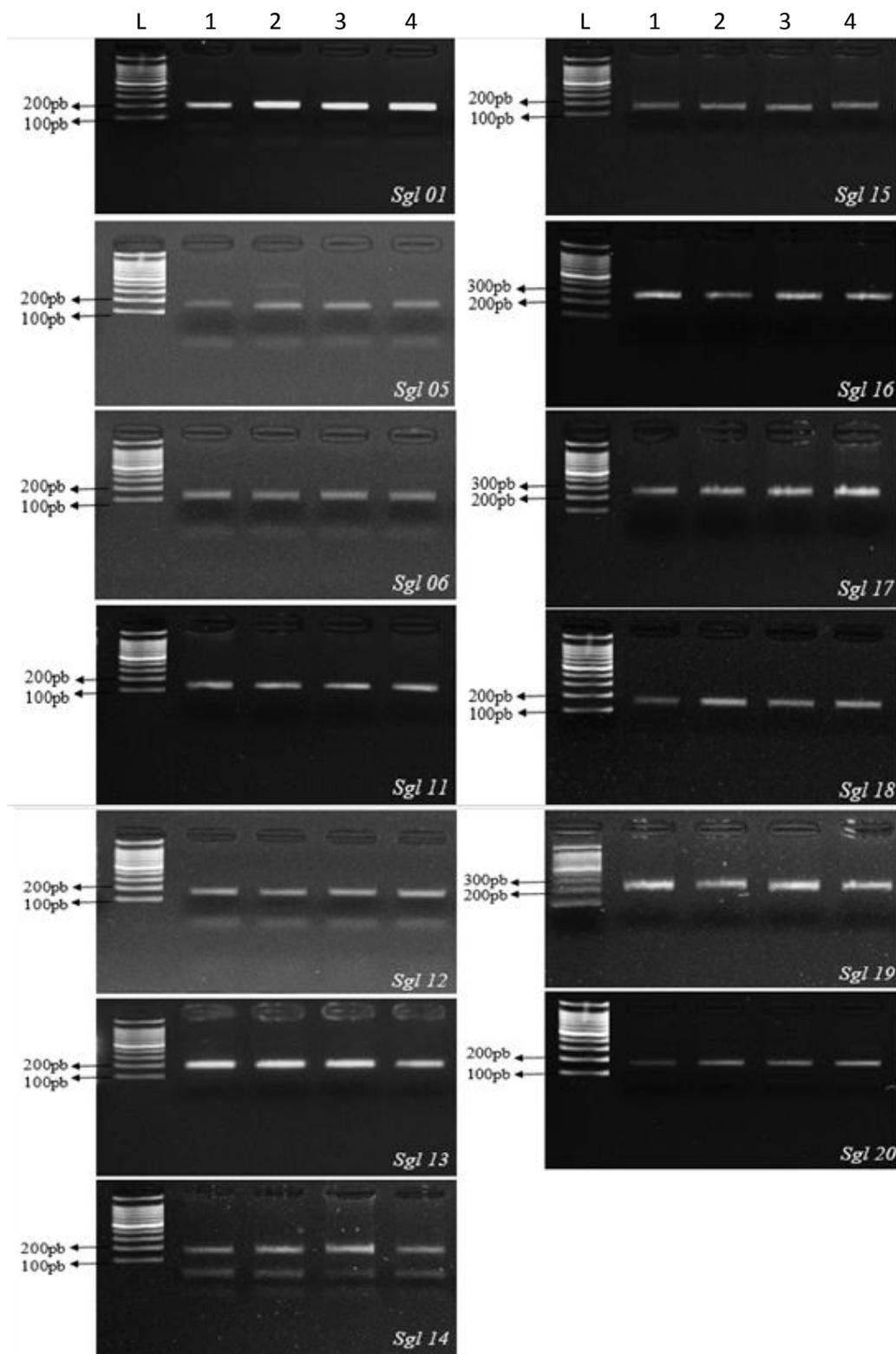


Figura 3. Produtos resultantes da amplificação de 13 locos microssatélites (*Sgl01*, *Sgl05*, *Sgl06*, *Sgl11* e *Sgl12*, *Sgl13*, *Sgl14*, *Sgl15*, *Sgl16*, *Sgl17*, *Sgl18*, *Sgl19* e *Sgl20*) de *S. glazioviana*, em gel de agarose 2%. A primeira coluna mostra DNA Ladder 1Kb para inferência dos tamanhos dos produtos amplificados. As demais colunas em cada gel referem-se aos produtos amplificados para quatro diferentes indivíduos de *S. glazioviana*.

IV.4. Caracterização dos locos microssatélites

Todos os 13 locos SSR cujas condições da PCR foram otimizadas apresentaram polimorfismos quando analisados sob eletroforese capilar em sequenciador automático de DNA. No entanto, três deles (*Sgl06*, *Sgl13* e *Sgl14*) apresentaram baixa resolução na leitura dos alelos no sequenciador, dificultando a identificação precisa dos alelos e por isso estes locos não foram considerados na etapa de caracterização.

Os 10 locos polimórficos restantes apresentaram alta diversidade com um total de 123 alelos, variando de 9 a 17 alelos por loco, com média de 12,3 alelos por loco. A heterozigosidade observada variou de 0,479 a 0,789, com média de 0,672 e a heterozigosidade esperada variou de 0,714 a 0,890 (média = 0,825) (Tabela 3). Na figura 4 são apresentados eletroferogramas, os quais ilustram a variabilidade alélica observada em diferentes locos SSR nas populações amostradas de *S. glazioviana*. Observa-se também a diferença entre indivíduos homozigotos e heterozigotos para os locos analisados.

A probabilidade de exclusão de paternidade (Q) variou de 0,213 a 0,477 por loco individual e a exclusão de paternidade combinada (QC) considerando o conjunto dos locos foi de 0,999995. A probabilidade de identidade genética (I) variou de 0,022 a 0,120, e a combinada (IC) foi de $2,245 \times 10^{-14}$. Somente dois locos (*Sgl11* e *Sgl17*) não desviaram significativamente do equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com o coeficiente de endogamia (*F*).

Tabela 3. Caracterização de 10 locos microssatélites desenvolvidos para *S. glazioviana*. N: amostragem; A: número de alelos por loco; H_O: heterozigosidade observada; H_E: heterozigosidade esperada; Q: probabilidade de exclusão de paternidade; QC: probabilidade de exclusão de paternidade combinada; I: probabilidade de identidade genética; IC: probabilidade de identidade genética combinada e F: índice de fixação. Teste de significância (X₂) baseado em 1.000 permutações (ns: não significativo; *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,0001).

Loco	Tamanho dos alelos (pb)	N	A	Ho	He	Q	I	F
Sgl01	172-192	95	10	0,705	0,874	0,242	0,028	0,193***
Sgl05	142-162	94	11	0,479	0,842	0,298	0,042	0,432***
Sgl11	180-204	96	12	0,719	0,714	0,447	0,120	-0,007ns
Sgl12	154-190	95	16	0,789	0,886	0,216	0,022	0,109***
Sgl15	169-195	92	11	0,511	0,694	0,477	0,112	0,264***
Sgl16	204-228	96	16	0,771	0,857	0,261	0,031	0,100***
Sgl17	207-225	96	09	0,792	0,760	0,426	0,090	-0,041ns
Sgl18	143-165	96	09	0,698	0,852	0,282	0,038	0,181**
Sgl19	171-195	92	13	0,739	0,890	0,213	0,022	0,169***
Sgl20	157-193	95	16	0,516	0,882	0,226	0,024	0,415***
Média		94,7	12,3	0,672	0,825	QC= 0,999995	IC= 2,245 x10⁻¹⁴	0,182

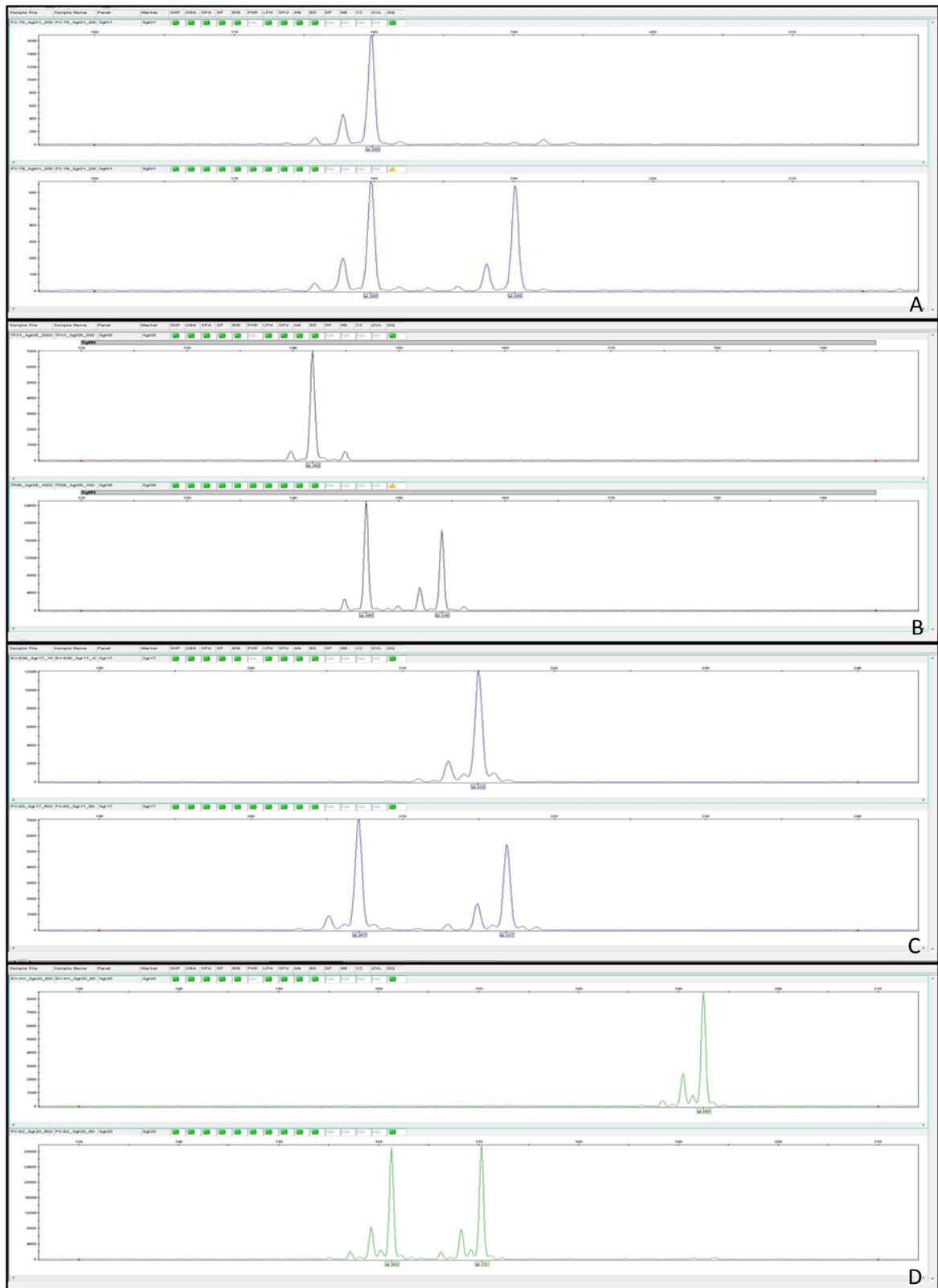
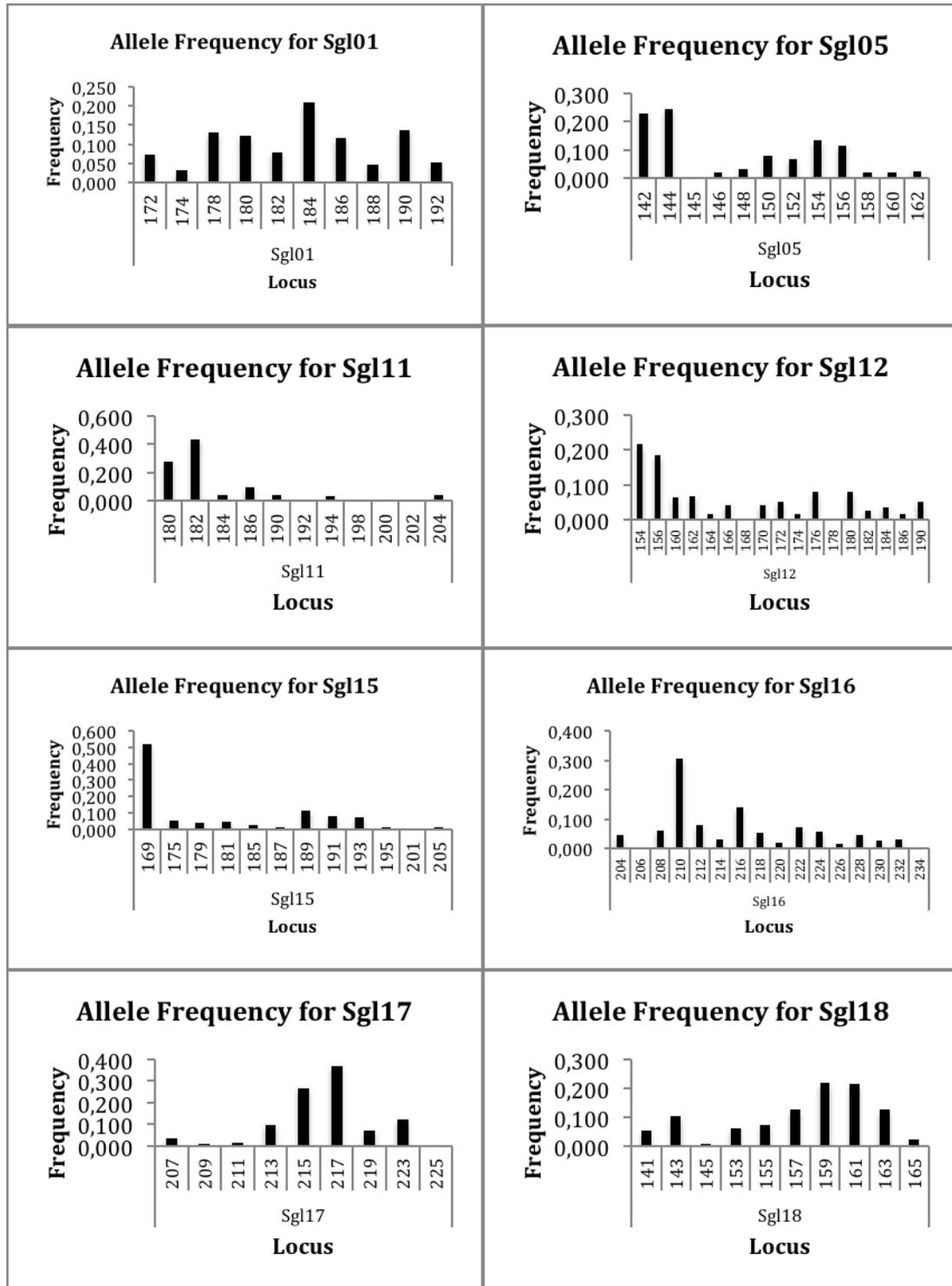


Figura 4. Eletroferogramas resultantes da genotipagem de dois indivíduos de *S. glazioviana* para quatro locos de DNA microssatélites em sequenciador 3500 XL (Life Technologies Inc). A) *Sgl01* (6-FAM); B) *Sgl05* (NED); C) *Sgl17* (6-FAM) e D) *Sgl20* (VIC).

A frequência dos alelos foi variável para todos os locos analisados com alguns alelos apresentando baixa frequência como o esperado para amostragens finitas, enquanto outros foram mais frequentes (Figura 5).



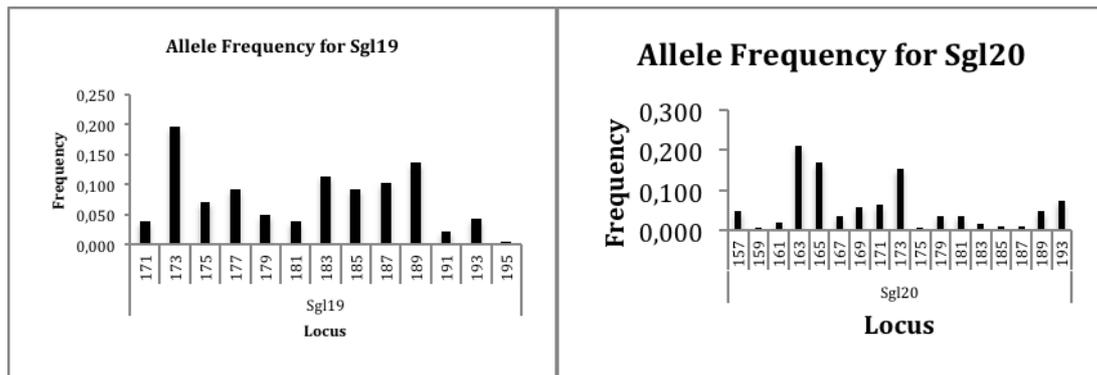


Figura 5. Frequências dos alelos observados para dez locos microssatélites desenvolvidos para *S. glazioviana*.

A análise dos parâmetros de diversidade genética e endogamia nas populações separadamente indicou excesso significativo de homozigotos em sete locos na população Trilha do Forno, seis locos na população Praia das Conchas e em oito locos na população Encosta Rua Vitória (Tabela 4).

Todos os locos em que a árvore mãe era heterozigota (exceção do loco *Sg17*) segregaram de acordo com a herança Mendeliana 1:1 (Tabela 5), indicando que estes locos podem ser considerados marcadores genéticos bastante informativos.

Tabela 4. Diversidade genética e índice de fixação (F) com base na análise de 10 locos SSR para três populações de *S. glazioviana*. H_O : Heterozigosidade observada e H_E : heterozigosidade esperada. Teste de significância (X_2) baseado em 1.000 permutações (n.s.: não significante; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

População		Locos										Média
		Sgl01	Sgl05	Sgl11	Sgl12	Sgl15	Sgl16	Sgl17	Sgl18	Sgl19	Sgl20	
Trilha do Forno - Arraial do Cabo	H_O	0,875	0,531	0,781	0,968	0,438	0,875	0,906	0,625	0,500	0,613	0,711
	H_E	0,700	0,822	0,717	0,818	0,529	0,879	0,740	0,800	0,856	0,822	0,768
	F	-0,250	0,354	-0,090	-0,182	0,173	0,005	-0,225	0,219	0,416	0,254	0,067
	p	ns	***	ns	ns	***		ns	***	***	***	
Praia das Conchas – Cabo Frio	H_O	0,656	0,290	0,813	0,781	0,500	0,719	0,656	0,594	0,750	0,406	0,617
	H_E	0,841	0,777	0,694	0,855	0,825	0,825	0,713	0,809	0,812	0,808	0,796
	F	0,220	0,626	-0,170	0,086	0,394	0,128	0,080	0,266	0,076	0,497	0,220
	p	***	***	ns	*	***	***	*	***	*	***	
Encosta Rua Vitória – Cabo Frio	H_O	0,581	0,613	0,563	0,625	0,594	0,719	0,813	0,875	0,938	0,531	0,685
	H_E	0,855	0,678	0,687	0,884	0,591	0,776	0,782	0,869	0,876	0,830	0,783
	F	0,321	0,097	0,181	0,293	-0,005	0,074	-0,039	-0,007	-0,070	0,360	0,120
	p	***	*	***	***	ns	*	ns	ns	ns	***	

Tabela 5. Teste de herança Mendeliana 1:1 para 10 locos microssatélites em uma progênie de *Swartzia glazioviana*.

Loco	Genótipo materno	n_1	$n_{ij} : n_{ii} + n_{jj}$	G_1 (GL= 1)	n_2	$n_{ik} : n_{jk}$	G_2 (GL= 1)
<i>Sgl01</i>	172/190	31	14:17	0,29	15	6:9	0,60
<i>Sgl05</i>	144/146	20	5:15	5,23	25	16:9	1,99
<i>Sgl11</i>	180/184	25	12:13	0,04	21	10:11	0,05
<i>Sgl12</i>	154/164	35	22:13	2,34	4	3:1	NE
<i>Sgl15</i>	189/205	27	9:18	3,06	14	9:5	1,16
<i>Sgl16</i>	210/224	24	11:13	0,17	22	9:13	0,73
<i>Sgl17</i>	223/223	-	-	NE	-	-	NE
<i>Sgl18</i>	143/153	29	10:19	2,84	13	9:4	1,97
<i>Sgl19</i>	177/189	37	22:15	1,33	7	3:4	NE
<i>Sgl20</i>	165/173	40	24:16	1,61	1	1:0	NE

n_1 e n_2 = tamanho da amostra; G_1 e G_2 = estatísticas G de máxima verossimilhança para a hipótese de $n_{ij} = n_{ii} + n_{jj}$ e $n_{ik} = n_{jk}$, respectivamente. * Significativo após a correção de Bonferroni para $\alpha = 0,05$ ($\chi^2 = 6,63$). NE = não estimado.

O teste de ligação entre pares de locos detectou ligação após a correção de Bonferroni apenas para dois pares de locos (*Sgl15xSgl19* e *Sgl15xSgl20*), sugerindo ligação física entre estes locos (Tabela 6).

Tabela 6. Teste G de máxima verossimilhança para a hipótese de segregação independente (1:1:1:1) entre pares de locos em uma progênie de *Swartzia glazioviana*.

Locos	n	G	Locos	n	G	Locos	n	G
<i>Sgl01xSg05</i>	45	1,36	<i>Sgl11xSg12</i>	39	10,79	<i>Sgl16xSg18</i>	41	4,50
<i>Sgl01xSg11</i>	46	8,74	<i>Sgl11xSg15</i>	41	9,40	<i>Sgl16xSg19</i>	44	5,68
<i>Sgl01xSg12</i>	39	4,31	<i>Sgl11xSg16</i>	46	7,16	<i>Sgl16xSg20</i>	41	8,24
<i>Sgl01xSg15</i>	41	10,24	<i>Sgl11xSg18</i>	41	11,00	<i>Sgl18xSg19</i>	39	3,87
<i>Sgl01xSg16</i>	46	2,47	<i>Sgl11xSg19</i>	44	5,43	<i>Sgl18xSg20</i>	49	2,87
<i>Sgl01xSg18</i>	41	5,29	<i>Sgl11xSg20</i>	41	9,30	<i>Sgl19xSg20</i>	39	8,10
<i>Sgl01xSg19</i>	44	4,02	<i>Sgl12xSg15</i>	35	11,18			
<i>Sgl01xSg20</i>	41	3,06	<i>Sgl12xSg16</i>	39	4,91			
<i>Sgl05xSg11</i>	45	3,35	<i>Sgl12xSg18</i>	36	11,25			
<i>Sgl05xSg12</i>	38	1,26	<i>Sgl12xSg19</i>	38	7,18			
<i>Sgl05xSg15</i>	40	4,49	<i>Sgl12xSg20</i>	35	11,36			

cont. – Tabela 6

Sgl05xSg16	45	9,95	Sgl15xSg16	41	8,91
Sgl05xSg18	40	2,63	Sgl15xSg18	37	5,80
Sgl05xSg19	43	2,19	Sgl15xSg19	39	20,54*
Sgl05xSg20	40	6,62	Sgl15xSg20	36	15,91*

* Significativo após a correção de Bonferroni para $\alpha= 0,05$, $P= 0,00014$ ($\chi^2= 15,91$). G= Teste G para três graus de liberdade.

O teste de desequilíbrio genotípico entre pares de locos foi realizado nas amostras de 96 árvores adultas. Após a correção de Bonferroni, 16 pares de locos na população Trilha do Forno, três pares na população Praia das Conchas e 11 pares na população Encosta Rua Vitória apresentaram valores significativos, sugerindo desequilíbrio genotípico (Tabela 7). A ligação entre locos causa desequilíbrio de ligação, mas entre os dois locos que apresentaram aparente ligação (Tabela 7) apenas o par *Sg15xSg19* apresentou desequilíbrio na população 1, o que sugere que estes locos não estão ligados, pois caso contrário a ligação seria observada nas três populações.

Tabela 7. Desequilíbrio genotípico entre pares de locos microssatélites em árvores adultas de três populações de *Swartzia glazioviana*.

Pares de locos	Pop1 – Trilha do Forno	Pop2 – Praia das Conchas	Pop3 – Encosta Rua Vitória
Sg01 X Sg05	0,00111	0,00259	0,00074
Sg01 X Sg11	0,05667	0,19444	0,00370
Sg01 X Sg12	0,00037*	0,00815	0,00074
Sg01 X Sg15	0,38741	0,00222	0,00333
Sg01 X Sg16	0,00037*	0,00074	0,00111
Sg01 X Sg17	0,03407	0,00852	0,00630
Sg01 X Sg18	0,00815	0,00185	0,00037*
Sg01 X Sg19	0,00074	0,00185	0,00037*
Sg01 X Sg20	0,05037	0,00630	0,00037*
Sg05 X Sg11	0,04407	0,05778	0,10222
Sg05 X Sg12	0,00074	0,00889	0,00037
Sg05 X Sg15	0,01481	0,33815	0,00111
Sg05 X Sg16	0,00037*	0,02815	0,00037*
Sg05 X Sg17	0,00074	0,50630	0,01259
Sg05 X Sg18	0,00074	0,00815	0,00296
Sg05 X Sg19	0,00111	0,11704	0,00037*
Sg05 X Sg20	0,00074	0,19630	0,00074
Sg11 X Sg12	0,04148	0,45889	0,11407
Sg11 X Sg15	0,10037	0,04963	0,30852
Sg11 X Sg16	0,00037*	0,40852	0,45444

cont. – Tabela 7

Sg11 X Sg17	0,01074	0,04704	0,00852
Sg11 X Sg18	0,02222	0,43444	0,00074
Sg11 X Sg19	0,00037*	0,01148	0,07444
Sg11 X Sg20	0,00333	0,48074	0,00111
Sg12 X Sg15	0,00037*	0,04185	0,02852
Sg12 X Sg16	0,00037*	0,00037*	0,00037*
Sg12 X Sg17	0,00741	0,01963	0,00185
Sg12 X Sg18	0,00074	0,00222	0,00074
Sg12 X Sg19	0,00037*	0,00370	0,00037*
Sg12 X Sg20	0,01185	0,00222	0,00370
Sg15 X Sg16	0,00037*	0,01296	0,00148
Sg15 X Sg17	0,40815	0,00704	0,34259
Sg15 X Sg18	0,00111	0,01926	0,08963
Sg15 X Sg19	0,00037*	0,01889	0,03481
Sg15 X Sg20	0,02778	0,02667	0,05852
Sg16 X Sg17	0,00074	0,00815	0,00037*
Sg16 X Sg18	0,00037*	0,00074	0,01111
Sg16 X Sg19	0,00037*	0,00519	0,00037*
Sg16 X Sg20	0,00037*	0,00037*	0,00222
Sg17 X Sg18	0,00259	0,01519	0,01852
Sg17 X Sg19	0,00148	0,00963	0,02593
Sg17 X Sg20	0,00630	0,00037*	0,00074
Sg18 X Sg19	0,00037*	0,01148	0,00037*
Sg18 X Sg20	0,00037*	0,00074	0,00259
Sg19 X Sg20	0,00037*	0,01704	0,00407

Os valores representam as probabilidades após 1.200 permutações. O valor limite de significância após a correção de Bonferroni: $P = 0,00037$ ($\alpha = 0,05$).

IV.5. Transferibilidade dos microssatélites de *S. glazioviana* para outras espécies do gênero

Os testes de amplificação dos 10 locos de *S. glazioviana* realizados para as seis espécies de *Swartzia* apresentaram uma eficiência de amplificação de 76% (Tabela 8). Os valores de polimorfismos encontrados foram os seguintes: 91% para *S. apetala* var. *apetala*, 45% para *S. flaemingii* e *S. simplex* var. *continentalis*, 73% para *S. langsdorffii* e *S. macrostachya*, e finalmente 64% para *S. myrtifolia* var. *elegans*.

Tabela 8. Amplificação cruzada e análise de polimorfismos para 10 locos microssatélites desenvolvidos para *S. glazioviana* e testados em outras seis espécies de *Swartzia*.

Loco	<i>S. apetala</i> (n= 3)	<i>S. flaemengii</i> (n= 2)	<i>S. langsdorffii</i> (n= 3)	<i>S. macrostachya</i> (n= 3)	<i>S. myrtifolia</i> var. <i>elegans</i> (n= 5)	<i>S. simplex</i> var. <i>continentalis</i> (n= 2)
Sgl01	+/4	+/2	+/3	-	+/6	+/2
Sgl05	+/3	+/?	+/2	+/4	+/3	+/1
Sgl06	+/4	-	+/1	+/?	+/5	+/2
Sgl11	+/3	+/4	+/4	+/5	+/5	+/3
Sgl12	+/4	-	+/2	+/4	+/1	+/1
Sgl15	+/3	+/2	-	+/4	-	-
Sgl16	+/4	+/4	+/2	+/3	+/5	+/3
Sgl17	+/2	+/3	+/1	+/5	-	-
Sgl18	+/4	+/?	+/2	+/?	+/2	+/2
Sgl19	-	+/?	+/3	+/4	+/1	+/1
Sgl20	+/3	+/2	+/3	+/2	+/4	+/1

n = número de indivíduos testados. O símbolo + representa a amplificação positiva. O número indicado após / representa o número de alelos observados na amplificação do loco.

IV.6. Caracterização da diversidade e estrutura genética, sistema de cruzamento e fluxo gênico em populações de *S. glazioviana*

IV.6.1 Diversidade genética

Todas as três populações de *S. glazioviana* estudadas apresentaram alta riqueza alélica. No total foram detectados 92, 96, 67 alelos (total 123 alelos) nas populações Trilha do Forno, Praia das Conchas e Encosta Rua Vitória, respectivamente (Tabela 9). Na progênie analisada foram observados 48 alelos. As três populações apresentaram um total de 29 alelos privados, sendo que para a progênie não foram observados alelos privados. O número de alelos por loco variou de 4-12 nos adultos com média de 12,3 e de 3-7 na progênie com média de 4,8 alelos por loco. As populações Trilha do Forno ($k = 92$) e Praia das Conchas ($k = 96$) foram as que apresentaram maior número de alelos e de alelos privados ($N_{privados} = 12$ e 13, respectivamente) e evidentemente maior riqueza alélica (R). A heterozigosidade observada variou de 0,290 a 0,969 com média de 0,642 nos adultos e de 0,536 a 0,717 com média de 0,653 na progênie. A heterozigosidade esperada variou de 0,424 a 0,894 e média de 0,776 nos adultos e de 0,497 a 0,715 com média de 0,595 na progênie. O índice de fixação médio foi significativamente maior que zero para as populações Praia das Conchas e Encosta Rua Vitória (Tabela 9).

Tabela 9. Diversidade genética e índice de fixação (F) analisadas individualmente para cada uma das três populações de adultos e uma progênie amostrada de *Swartzia glazioviana*, com base na análise de dez locos microssatélites. N_t é número total de indivíduos adultos e progênies amostrados nas três populações; n é o tamanho amostral; $n_{Privado}$ é o número de alelos privados; k é o número total de alelos; R é a riqueza alélica para 28 indivíduos genotipados nos dez locos; H_o é a heterozigosidade observada; H_e é a heterozigosidade esperada. $P_{2^\circ\text{Parente}}$ é a probabilidade de não excluir o segundo parente (quando um dos parentes é conhecido); $P_{\text{Parent-Pair}}$ é a probabilidade de não excluir o par de parentes; Q_{Identity} é probabilidade de identidade.

Loco	Total		Adultos – População Trilha do Forno							Adultos – População Praia das Conchas						
	N_t	k	n	k	$n_{privado}$	R	H_o	H_e	F	n	k	$n_{privado}$	R	H_o	H_e	F
Sgl01	141	10	32	8	1	7,7	0,876	0,709	-0,235	32	9	2	9,9	0,656	0,858	0,235
Sgl05	139	11	32	10	0	9,8	0,531	0,838	0,366*	31	10	1	9,8	0,290	0,798	0,636*
Sgl11	142	12	32	8	3	7,6	0,781	0,727	-0,074	32	7	2	6,9	0,813	0,704	-0,155
Sgl12	134	16	31	12	1	11,5	0,969	0,830	-0,167	32	11	1	10,8	0,781	0,870	0,102
Sgl15	133	11	32	5	0	5,0	0,438	0,539	0,188	28	11	3	11,0	0,501	0,847	0,409*
Sgl16	142	16	32	12	3	11,7	0,875	0,894	0,021	32	12	1	11,6	0,719	0,840	0,144
Sgl17	142	9	32	8	1	7,6	0,906	0,749	-0,210	32	7	1	6,8	0,656	0,726	0,096
Sgl18	137	9	32	6	0	6,0	0,625	0,816	0,234	32	8	1	7,9	0,594	0,826	0,281*
Sgl19	136	13	28	12	1	12,0	0,500	0,878	0,431*	32	10	0	9,6	0,750	0,826	0,092
Sgl20	136	16	31	11	2	10,9	0,613	0,839	0,269	32	11	1	10,5	0,407	0,828	0,509*
Média	-	12,3	-	9,2	-	9,0	0,712	0,782	0,090	-	9,6	-	9,4	0,617	0,812	0,241*
SD	-	2,8	-	2,6	-	2,5	0,192	0,105	0,247	-	1,8	-	1,7	0,171	0,055	0,232
Total	-	123	-	92	12	-	-	-	-	-	96	13	-	-	-	-

Loco	Adultos – População Encosta Rua Vitória										Progênie – População Encosta Rua Vitória						
	n	k	$N_{privado}$	R	H_o	H_e	F	$P_{2^\circ\text{Parente}}$	$P_{\text{parent-pair}}$	Q_{identity}	n	K	$N_{privado}$	R	H_o	H_e	F
Sgl01	31	7	0	7,0	0,581	0,848	0,315*	0,293	0,127	0,038	46	5	0	4,9	0,630	0,639	0,014
Sgl05	31	6	0	6,0	0,549	0,687	0,201	0,531	0,327	0,135	45	7	0	5,9	0,667	0,715	0,067
Sgl11	32	4	0	3,9	0,406	0,424	0,042	0,527	0,326	0,132	46	5	0	4,5	0,717	0,652	-0,100
Sgl12	32	9	2	8,7	0,625	0,838	0,254	0,232	0,082	0,024	39	5	0	4,4	0,666	0,549	-0,214
Sgl15	32	5	0	4,9	0,562	0,553	-0,017	0,615	0,414	0,196	41	5	0	4,8	0,561	0,527	-0,064
Sgl16	32	9	0	8,8	0,688	0,731	0,059	0,391	0,188	0,068	46	5	0	4,9	0,717	0,682	-0,052
Sgl17	32	5	0	4,9	0,531	0,613	0,133	0,421	0,237	0,080	46	3	0	2,9	0,761	0,497	-0,532*
Sgl18	32	7	0	6,9	0,843	0,803	-0,050	0,264	0,105	0,031	41	6	0	5,3	0,536	0,631	0,150
Sgl19	32	6	0	5,9	0,688	0,776	0,114	0,250	0,096	0,028	44	4	0	3,6	0,659	0,562	-0,172
Sgl20	32	9	2	8,6	0,500	0,775	0,355*	0,329	0,151	0,048	41	3	0	2,7	0,610	0,500	-0,220
Média	-	6,7	-	6,6	0,598	0,705	0,152*	-	-	-	-	4,8	-	4,4	0,653	0,595	-0,096
SD	-	1,8	-	1,8	0,121	0,137	0,138	-	-	-	-	1,2	-	1,0	0,071	0,078	0,190
Total	-	67	4	-	-	-	-	4,17x10 ⁻⁵	3,0x10 ⁻⁸	5,28x10 ⁻⁵	-	48	0	-	-	-	-

* $P < 0,05$.

IV.6.2 Estrutura genética das populações de *S. glazioviana*

A estatística $G_{ST(Hedrick)}$ de Hedrick (2005) foi significativamente maior do que zero e alta entre as três populações ($G_{ST(Hedrick)} = 0,521$), sugerindo que a maior parte da diversidade genética esta distribuída entre as três populações (Tabela 10). A diferenciação genética estimada entre pares de populações foi também significativamente maior do que zero e alta, variando de 0,302 a 0,465 (Tabela 10), sugerindo que estas populações apresentam substancial nível de isolamento genético, o que levou a diferenciação em suas frequências alélicas.

Tabela 10. Divergência genética ($G_{ST(Hedrick)}$) padronizada de Hedrick (2005) entre pares de populações de adultos e uma progênie de *Swartzia glazioviana*.

	$G_{ST(Hedrick)}$
Adultos três Pops	0,521*
Adultos Pop 1 x Adultos Pop 2	0,336*
Adultos Pop 1 x Adultos Pop 3	0,380*
Adultos Pop 2 x Adultos Pop 3	0,465*
Adultos Pop 3 x Progênie Pop 3	0,302*

Pop1 – Trilha do Forno, Pop2 – Praia das Conchas e Pop3 – Encosta Rua Vitória. * $P < 0,05$.

IV.6.3. Estrutura genética espacial intrapopulacional

Foi observado um padrão de estruturação genética espacial nas três populações de *S. glazioviana*. Nas três populações, o aumento da distância entre indivíduos adultos tanto reduziu a estruturação espacial quanto o coeficiente de coancestria (Figura 7). Observou-se uma estrutura genética espacial significativa até a distância aproximada de 280 m (Figura 6 e Tabela 11), indicando que indivíduos distantes entre si até estas distâncias possam ser aparentados.

Essa estruturação em *S. glazioviana* é significativa na população Trilha do Forno até 40 m para cruzamento entre meios-irmãos, e nas duas outras populações até 30 m de distância, para cruzamentos entre primos de primeiro grau na população Praia das Conchas e entre meios-irmãos na população Encosta Rua Vitória (Figura 6).

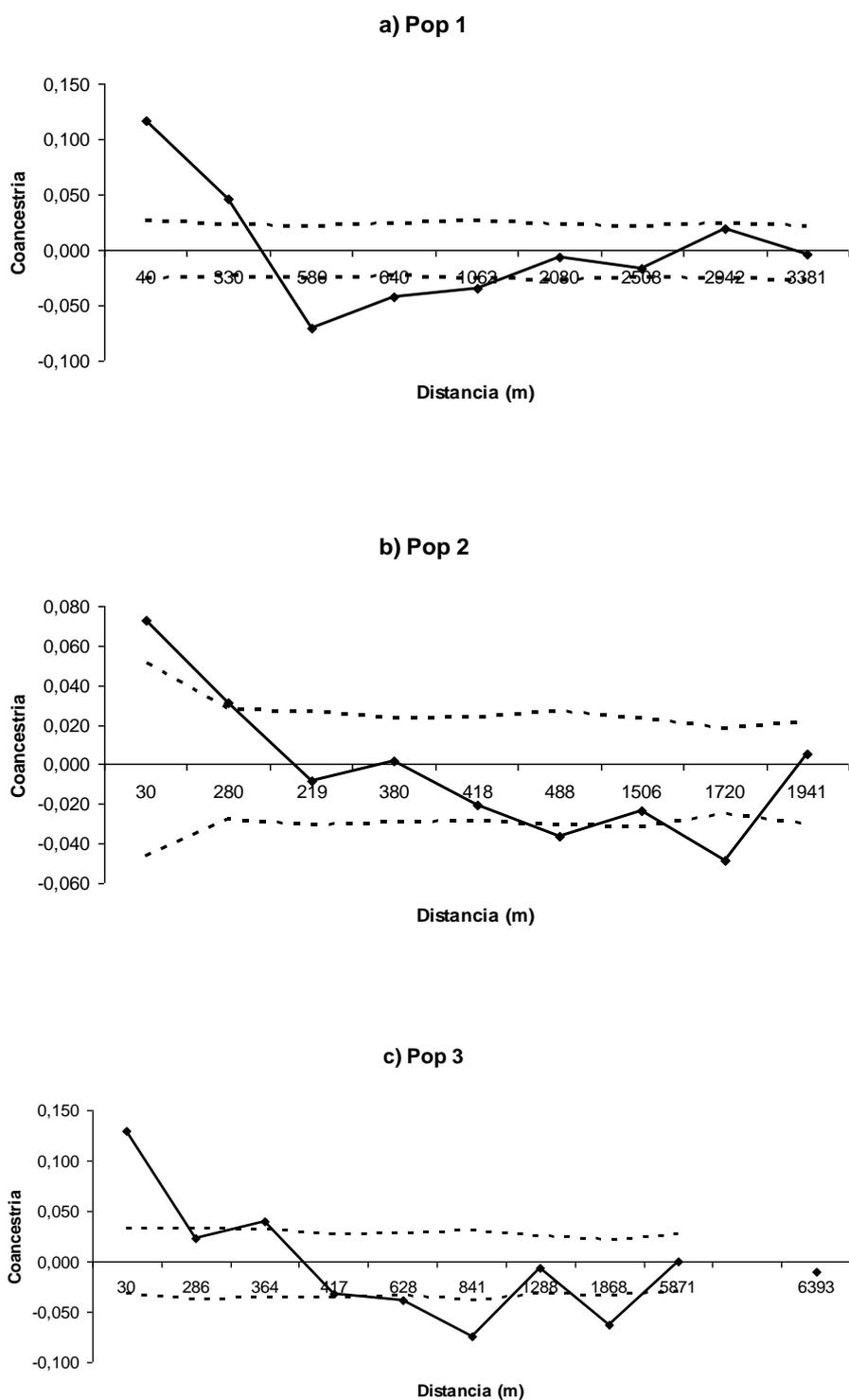


Figura 6. Estrutura genética espacial intrapopulacional em três populações de *Swartzia glazioviana*. A linha contínua refere-se à estimativa do coeficiente de coancestria médio e as linhas pontilhadas referem-se à estimativa do intervalo de confiança do erro à 95% de probabilidade da hipótese de ausência de estrutura genética espacial ($H_0: \theta_{xy} = 0$). a) Pop 1 = Trilha do Forno, b) Pop 2=Praia das Conchas e c) Pop 3 = Encosta Rua Vitória.

Tabela 11. Estimativa de parâmetros da estrutura genética espacial para adultos de três populações de *Swartzia glazioviana*.

Amostra	n	Primeira classe de distancia (m)	θ_1	b_k (SE)	S_p
Pop 1	32	0-40	0,117*	-0,0212 (0,0052)*	0,024
Pop 2	32	0-30	0,073*	-0,0110 (0,0027)*	0,012
Pop 3	32	0-30	0,129*	-0,0234 (0,0024)*	0,027

θ_1 é o coeficiente de coancestria na primeira classe de distancia; b_k é o declínio da curva de regressão do coeficiente de coancestria sobre o logaritmo da distancia espacial entre pares de indivíduos; S_p é a estatística que mede a extensão da estrutura genética espacial na primeira classe de distancia. Pop1 – Trilha do Forno, Pop2 – Praia das Conchas e Pop3 – Encosta Rua Vitória. * $P < 0,05$.

IV.6.4. Tamanho efetivo populacional

A coancestria média do grupo de árvores adultas dentro da população Encosta Rua Vitória foi baixa, porém positiva (0,035) (Tabela 12). O número efetivo populacional, que indica o número de indivíduos não aparentados e não endogâmicos de uma população, resultou em 45% do total de indivíduos em cada uma das três populações amostradas de *S. glazioviana*. O tamanho efetivo da população (15), portanto, ficou abaixo do tamanho efetivo ideal (<50), o que sugere potencial evolutivo baixo.

Tabela 12. Número censo, coancestria de grupo, tamanho efetivo da população e relação entre o tamanho efetivo e o número censo na população Encosta Rua Vitória de *S. glazioviana*.

Parâmetros	Estimativas
Número censo: N	32
Mínima coancestria entre pares de indivíduos: θ_{ij}	-0,280
Máxima coancestria entre pares de indivíduos: θ_{ij}	0,657
Coancestria média do grupo: Θ	0,035
Tamanho efetivo: N_e	15
N_e / N	0,45

IV.6.5. Sistema de cruzamento

A estimativa da taxa de cruzamento multiloco foi alta, mas significativamente menor do que a unidade ($t_m = 0,892$), indicando que ocorreram algumas autofecundações, que esta árvore matriz não é auto-incompatível e que existe endogamia dentro da progênie.

A diferença entre a taxa de cruzamento multiloco e uniloco ($t_m - t_s$), que mede a taxa de cruzamento entre parentes foi baixa e não significativamente diferente de zero na população (Tabela 13). A correlação de paternidade multiloco entre e dentro de frutos ($r_{p(m)}$) foi baixa, o que sugere que muitas árvores ($N_{ep} = 33$) atuaram como doadoras de pólen.

Devido à autofecundação e aos cruzamentos correlacionados, a estimativa do coeficiente de coancestria dentro da progênie ($\Theta = 0,156$) foi maior do que a esperada em progênies de meios-irmãos (0,125) e indica que existem diferentes graus de parentescos entre plantas dentro de progênies, como meios irmãos, irmãos completos e irmãos de autofecundação e cruzamento. Conseqüentemente, o tamanho efetivo de variância entre e dentro de frutos (N_e), foi menor do que o esperado em populações panmíticas ($N_e = 4$).

Tabela 13. Sistema de cruzamento em uma progênie oriunda da população Encosta Rua Vitória de *Swartzia glazioviana* (95% IC é o intervalo de confiança a 95% calculado por 1.000 reamostragens *bootstraps*).

Parâmetro	Média (IC a 95%)
Índice de fixação da matriz: F	-0,200 (0,201 a -0,199)
Taxa de cruzamento multiloco: t_m	0,892 (0,832 a 0,952)
Taxa de cruzamento unilocos: t_s	0,874 (0,827 a 0,921)
Taxa de cruzamento entre parentes: $t_m - t_s$	0,018 (-0,023 a 0,059)
Correlação multilocos de paternidade: $r_{p(m)}$	0,030 (0,017 a 0,043)
Número efetivo de doadores de pólen: N_{ep}	33,3 (23,3 a 58,8)
Coancestria dentro de progênies: Θ	0,156 (0,139 a 0,174)
Tamanho efetivo de variância: N_e	3,05 (2,76 a 3,40)
Número de árvores matrizes para a coleta de sementes: m	49 (44 a 54)

Os resultados desta simples progênie também mostram que para reter o tamanho efetivo de 150 em amostras de progênies coletadas de polinização aberta é necessário amostrar sementes de pelo menos 49 árvores matrizes. Ressalta-se que estas árvores matrizes devem estar localizadas espacialmente distantes em pelo menos 280 m, ou seja, a distância da EGE, para evitar a coleta de sementes em árvores parentes.

IV.6.6. Fluxo e dispersão de pólen

Das 46 sementes de *S. glazioviana* amostradas na população Encosta Rua Vitória um putativo parental paterno foi encontrado para 28 indivíduos (61%) (Tabela 14), sugerindo taxa de imigração de pólen ($m_{pólen}$) de 36% nas sementes. Para as sementes que tiveram o pai encontrado dentro da população, a distância de dispersão de pólen variou de 1 a 590 m (Figura 7). A área efetiva de polinização (A_{ep}) foi alta, resultando em um raio efetivo de polinização (r_{ep}) de 912 m.

Tabela 14. Análise de dispersão de sementes e pólen em uma população de *S. glazioviana*, na região dos Lagos, RJ

Parâmetros	Estimativas
Tamanho amostral: n	44
Número de pólen imigrantes	16
Taxa de imigração de pólen: m	0,36
Número de sementes com pai determinado dentro da população	28
Número de sementes originadas de autofecundação	9
Taxa de autofecundação: s	0,20
Distância média de dispersão de pólen: δ (m)	489
Desvio padrão da distância de dispersão de pólen (m)	257
Distância mediana de dispersão de pólen (m)	586
Distância mínima de dispersão de pólen (m)	1
Distância máxima de dispersão de pólen (m)	590
Área efetiva de polinização: A_{ep} (ha)	42
Raio efetivo de polinização: r_{ep} (m)	912

V. DISCUSSÃO

V.1. Desenvolvimento de marcadores de DNA microssatélites para *S. glazioviana*

O método para o desenvolvimento de marcadores microssatélites de DNA, através de enriquecimento de biblioteca genômica, desenvolvido por Billotte *et al.* (1999) com modificações de Sousa *et al.* (2012), mostrou bons resultados para *S. glazioviana*. Foram sequenciados 96 clones positivos, sendo que 37% das sequências continham microssatélites. Caracterizaram-se 21% destes, sendo 50% locos polimórficos. Resultados similares referentes à caracterização de locos microssatélites por meio deste método (Billotte *et al.* 1999) foram reportados em alguns estudos. Para a espécie arbórea do Cerrado, *Kielmeyera coriacea* (Caddah *et al.* 2009) foram isolados 22 pares de *primers* e 50% amplificaram com boa qualidade e mostraram-se polimórficos. Para as espécies de importância econômica *Stylosanthes capitata* (herbácea tropical) e *Brachiaria humidicola* (gramínea forrageira), dos 52 *primers* isolados, 27% mostraram-se polimórficos (Santos *et al.* 2009) e de 38 *primers*, o polimorfismo foi verificado em 27 deles (Jungmann *et al.* 2009), respectivamente. O desenvolvimento de marcadores de DNA para a Verbenaceae *Lippia alba* (Santos *et al.* 2012) encontrou microssatélites em 38 sequências, 11 destes foram caracterizados e oito mostraram-se polimórficos. Para a espécie típica do cerrado brasileiro *Qualea grandiflora* (Vochisiaceae) 288 clones foram sequenciados e obtiveram-se oito marcadores polimórficos (Ritter *et al.* 2012). Torna-se claro, portanto a eficiência do protocolo de enriquecimento empregado para o desenvolvimento de marcadores de DNA em estudos populacionais, o que foi confirmado no presente estudo.

Estudos conduzidos para o desenvolvimento de marcadores de DNA microssatélites utilizando diferentes protocolos de enriquecimento de biblioteca genômica, para espécies arbóreas tropicais, igualmente mostram resultados próximos em relação ao número de *primers* isolados e caracterizados e à diversidade genética encontrada (Lin *et al.* 2011, Pereira *et al.* 2011, Nemati *et al.* 2012, Oliveira *et al.* 2012, Ritter *et al.* 2012, Santos *et al.* 2012, entre outros). Portanto, o método de obtenção de marcadores microssatélites pelo enriquecimento de bibliotecas genômicas parece ser altamente indicado para a obtenção de bons marcadores microssatélites.

A diversidade genética encontrada para os locos SSR desenvolvidos para *S. glazioviana* foi alta em termos de número de alelos por loco ($A= 12,3$), heterozigosidade observada ($H_O= 0,672$) e heterozigosidade esperada ($H_E= 0,825$) e similar aos níveis observados para outras espécies arbóreas tropicais (Duminil *et al.* 2011, Ferreira-Ramos *et al.* 2011, Feres *et al.* 2012, entre outros).

O índice de fixação foi significativo para alguns dos dez locos desenvolvidos para *S. glazioviana*. O desvio significativo para o equilíbrio de Hardy-Weinberg indicando deficiência de heterozigotos pode estar relacionado à amostragem não aleatória, à ocorrência de reprodução vegetativa e/ou à dispersão barocórica que direciona o recrutamento das plântulas próximas à planta-mãe (observação em campo – ANEXO III), uma vez que ambas as características favorecem cruzamentos preferenciais. Em estudos utilizando microssatélites, a amostragem não aleatória e os cruzamentos preferenciais são apontados como a causa para o maior número de homozigotos encontrados (García de León *et al.* 1997).

A avaliação do poder discriminatório dos locos mostrou para a probabilidade de identidade genética (I) uma variação de 0,022 a 0,120 e a identidade genética combinada (IC) foi de $2,245 \times 10^{-14}$. A probabilidade de exclusão de paternidade (Q) variou de 0,213 a 0,447 e a probabilidade de exclusão de paternidade combinada (QC) foi de 0,999995. Estes resultados demonstram o alto poder discriminatório dos marcadores SSR desenvolvidos para *S. glazioviana* e estão de acordo com resultados encontrados para outras espécies arbóreas como *Aspidosperma polyneurm* (QC= 0,9999 - (Ferreira-Ramos *et al.* 2011); *Anadenanthera colubrina* (QC= 0,999 - Feres *et al.* 2012), *Plathymenia reticulata* (QC= 0,99 - Oliveira *et al.* 2012); *Theobroma grandiflorum* (IC= $3,551859 \times 10^{-8}$ e QC= 0,9897 - Alves *et al.* 2013); *Araucaria angustifolia* (QC= 0,988 - Bittencourt & Sebbenn 2007); *Swietenia macrophylla* e *Khaya senegalensis* (IC= $1,44 \times 10^{-15}$ e QC= 0,9999977; IC= $1,22 \times 10^{-7}$ e QC= 0,9999994, respectivamente – Lemes *et al.* 2011); *Teobroma grandiflorum*, *T. subincanum* e *T. sylvestre* (IC= $6,6 \times 10^{-8}$ e QC= 0,9982; IC= $2,6 \times 10^{-9}$ e QC= 0,9862; IC= $5,1 \times 10^{-8}$ e QC= 0,9974 – Lemes *et al.* 2007), confirmando assim a qualidade e o alto poder informativo desses locos em análises de parentesco e fluxo gênico para a espécie.

A verificação da segregação mendeliana nos locos, a existência de ligação e desequilíbrio de ligação (DL) entre pares de locos é de extrema importância para o uso destes em estudos de genética de populações, assim como para análises de fluxo

gênico e sistema de cruzamento (Danner *et al.* 2013). Aqui, todos os locos desenvolvidos para *S. glazioviana* segregaram de acordo com a herança mendeliana codominante (1:1), sendo os valores do teste G baixos (variando de 0,04 a 5,23). Logo, os dez marcadores caracterizados para *S. glazioviana* podem ser considerados marcadores genéticos.

Para a maioria dos locos SSR houve a ausência de ligação para o teste G de máxima verossimilhança para a hipótese de segregação independente (1:1:1:1). No entanto, observou-se ligação entre os dois pares de locos (*Sgl15xSgl19* e *Sgl15xSgl20*).

O teste de desequilíbrio de ligação foi significativo para 30 combinações entre os locos nas três populações analisadas de *S. glazioviana*, indicando desequilíbrio genotípico. O desequilíbrio genotípico pode ser causado por diversos fatores como sistema de cruzamento (auto-fecundações, cruzamento entre parentes e cruzamentos correlacionados), seleção natural, efeito gargalo, efeito fundador, propagação vegetativa e deriva genética, que são processos que ocorrem em populações naturais (Futuyma 2009), mas também pode ser um artefato originário da miscigenação de subpopulações com frequências alélicas diferenciadas (Hartl & Clark 2010).

Somente para o par *Sgl15x19* foi apontado além da ligação, o desequilíbrio de ligação, mas só para a população Trilha do Forno, o que descarta a possibilidade tanto de ligação como de DL, pois o DL teria que ser inferido para as três populações para confirmar tal hipótese (ver Carneiro *et al.* 2012).

Os resultado para análise de ligação entre pares de locos possivelmente estão relacionados à amostragem de somente uma progênie (ver Tarazi *et al.* 2010). Torna-se importante repetir estes testes incluindo mais progênies, para se confirmar os resultados obtidos. Tarazi *et al.* (2010) sugerem ajustar a amostragem de progênies com a média de alelos para obter boas estimativas.

Em média a transferibilidade de marcadores microssatélites polimórficos entre espécies de um mesmo gênero em Eudicotiledôneas resulta em 60% de eficiência na amplificação desses marcadores (Barbará *et al.* 2007). A taxa de transferibilidade dos locos microssatélites desenvolvidos para *S. glazioviana* para outras seis espécies do gênero (*S. apetala*, *S. flaemengii*, *S. langsdorfii*, *S. macrostachya*, *S. myrtifolia* var. *elegans*, e *S. simplex* var. *continentalis*) foi de 76%, mostrando também uma alta porcentagem de polimorfismo para cada uma das espécies investigadas. Resultados semelhantes foram reportados para transferibilidade

de marcadores SSR entre espécies do gênero *Glycine*, no qual 15 de 31 pares de *primers* amplificaram para *G. microphylla*, *G. clandestina* e *G. falcata* (Peakall *et al.* 1998), para três espécies de *Teobroma*, 74% dos locos amplificaram e 47% foram polimórficos para cada espécie (Lemes *et al.* 2007), assim como para várias espécies de *Brassica* (Lowe *et al.* 2002) e para duas espécies de *Armeria* (García-Fernadéz *et al.* 2012).

As estimativas dos parâmetros genéticos obtidas para os marcadores microssatélites desenvolvidos neste estudo para *S. glazioviana* atestam a utilidade destes marcadores em estudos sobre diversidade e estrutura genética de populações, sistema de cruzamento e fluxo gênico, estudos estes que poderão fornecer informações relevantes para fomentar ações práticas que visem a conservação efetiva das populações de *S. glazioviana*.

V.2. Caracterização da diversidade, estrutura genética, sistema de cruzamento e fluxo gênico em três populações de *S. glazioviana*

O número total de alelos nos dez locos SSR analisados para as três populações de *S. glazioviana* foi de 123. Este alto número de alelos permite discriminar os genótipos para análise de paternidade. A heterozigosidade média esperada (H_e) nas três populações revelam alta diversidade genética para a espécie, quando comparado a outras espécies arbóreas (Asuka *et al.* 2005, André *et al.* 2008, Atangana *et al.* 2009, Feres *et al.* 2012, entre outros).

A diferença observada entre as médias da heterozigosidade esperada (H_e) e a heterozigosidade observada (H_o) sugere excesso de homozigotos nas três populações de *S. glazioviana*. Estes resultados foram confirmados pelo significativo índice de fixação (F) nas populações Praia das Conchas e Encosta Rua Vitória, indicando desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estes resultados podem estar relacionados à pequena amostragem populacional, ou ao efeito Wahlund, quando o índice de fixação é estimado para toda a população e superestima a homozigosidade, mas, no entanto, há estruturação genética espacial na população (Sebbenn *et al.* 2010; Bittencourt & Sebbenn 2007).

Entretanto, algumas características da espécie parecem corroborar os resultados encontrados, por exemplo, o fato de *S. glazioviana* ser hermafrodita, o que favoreceria a autofecundação e a ocorrência de endogamia. Outra característica é a

presença de reprodução vegetativa e de dispersão de sementes barocórica que podem favorecer cruzamentos entre aparentados e igualmente aumentar o número de indivíduos endogâmicos. Por outro lado a reprodução vegetativa pode ser um mecanismo que minimize os efeitos da perda de habitat, neste caso, o aumento do número de homozigotos. Assim, a espécie estaria aumentando o tempo entre as gerações, deixando de investir, no momento presente, em novos indivíduos que tenderiam a ser homozigotos (Aguilar *et al.* 2008).

A diversidade genética da progênie avaliada não divergiu da diversidade observada nas três populações de *S. glazioviana*. Além disso, o índice de fixação médio para a progênie demonstrou excesso de heterozigotos, indicando um resultado oposto ao observado para as populações de adultos. Tal resultado sugere seleção contra homozigotos entre a fase de sementes e a fase adulta em *S. glazioviana*, como também reportado para duas espécies de eucaliptos: *Eucalyptus rhodantha* e *Eucalyptus argutifolia* (Sampson *et al.* 1989; Kennington *et al.* 1997, respectivamente). No entanto, devido ao fato destes dados referirem-se à somente uma progênie, há a necessidade de verificar se estes resultados se mantêm para outras populações bem como para outras progênies já coletadas, as quais serão estudadas num futuro próximo.

Ainda foi detectado um total de 29 alelos privados nas três populações, o que para a conservação *ex situ* da espécie pode ser interessante do ponto de vista da recombinação e formação de novos genótipos (Danner *et al.* 2013).

A estatística $G_{ST(Hedrick)}$ mostrou significativa e alta diferenciação genética entre as populações de *S. glazioviana*, bem como o efetivo isolamento genético entre as mesmas (0,521), confirmando assim que existe alta frequência de indivíduos aparentados dentro das populações na região estudada. A associação dos resultados de diferenciação genética e diversidade genética entre as populações de *S. glazioviana* no presente estudo revela o possível comprometimento da conectividade funcional entre as populações e o prejuízo para o fluxo gênico contemporâneo, em função do favorecimento de cruzamentos dentro das populações e entre indivíduos parentes. Dayanandan *et al.* (1999) comparando populações de florestas contínuas e fragmentadas de *Carapa guianensis* (Meliaceae) também obtiveram valores significativos de diferenciação genética e verificaram a restrição de fluxo gênico entre as populações causado pela fragmentação florestal.

A dispersão das sementes próximas à planta-mãe, como observado em campo para *S. glazioviana*, reflete a distribuição espacial agregados indivíduos da espécie. (Kageyama *et al.* 2003). Esta distribuição favorece, como já mencionado, o cruzamento entre indivíduos aparentados. O padrão de estruturação genética espacial observado para as três populações de *S. glazioviana*, para a primeira classe de distância (30-40 m) e para o coeficiente de coancestria (θ), parece refletir a distribuição espacial dos indivíduos (em agregados) de *S. glazioviana* nas populações.

O número efetivo da população Encosta Rua Vitória, indicou que as 32 plantas representam apenas 15 indivíduos não parentes e endogâmicos de uma população de *S. glazioviana*. O tamanho efetivo foi menor do que o número censo devido a existência de parentesco e endogamia na população, o que aumenta a frequência de alelos idênticos por descendência e reduz o tamanho efetivo.

A taxa de cruzamento multilocos ($t_m=0,892$) para *S. glazioviana* foi alta e equivalente à encontrada para outras espécies arbóreas (*Tabebuia roseo-alba*, Feres *et al.* 2012 e *Entandrophragma cylindricum*, Lourmas *et al.* 2007, Lemes *et al.* 2007). Igualmente a taxa de cruzamento unilocos ($t_s=0,874$) foi alta. A taxa de cruzamento entre indivíduos aparentados ($t_m-t_s=0,018$) foi baixa para este indivíduo (uma progênie analisada apenas) e para este episódio reprodutivo. A correlação de paternidade ($r_{p(m)}=0,030$) foi baixa, indicando praticamente a ausência de cruzamentos biparentais na progênie avaliada. O número efetivo de doadores de pólen foi alto (33) se comparado às espécies *Araucaria angustifolia* (Bittencourt & Sebbenn 2008) e *Hymenaea stigonocarpa* (Moraes & Sebbenn 2010), indicando a necessidade de aumento do número de progênies analisadas no futuro.

Para fins de conservação *ex situ*, sugere-se coletar sementes de pelo menos 49 indivíduos de *S. glazioviana* e que a distância mínima entre estes seja superior a 30 m nas populações Praia das Conchas e Encosta Rua Vitória e 40 m para a população Trilha do Forno. Tais medidas visam evitar a coleta de sementes resultantes de cruzamentos entre indivíduos aparentados, bem como manter o número efetivo de 150 indivíduos por população.

A alta taxa de imigração de pólen (36%) observada na população estudada de *S. glazioviana* foi similar à encontrada para *Hymenaea stigonocarpa* (Moraes & Sebbenn 2010), outra espécie de Leguminosae. Também foram encontrados altos valores para a distância média de dispersão de pólen (489 m), a área efetiva de polinização (42 ha) e o raio efetivo de polinização (912 m), indicando não haver isolamento reprodutivo

da matriz avaliada na população Encosta Rua Vitória. O teste de Kolmogorov-Smirnov que compara a curva da frequência de dispersão de pólen e a curva da frequência dos indivíduos da população não explica o padrão de cruzamento encontrado, provavelmente porque nem todos os indivíduos adultos coletados no estudo terem sido genotipados e, por conseguinte, não estarem representados no teste de Kolmogorov-Smirnov, o que poderia explicar a refutação da hipótese acima testada.

CONCLUSÕES

- Foram desenvolvidos, caracterizados e validados dez marcadores de DNA microssatélites altamente informativos para *S. glazioviana*;
- A transferibilidade dos marcadores SSR desenvolvidos para *S. glazioviana* para as espécies *S. apetala*, *S. flaemengii*, *S. langsdorfii*, *S. macrostachya*, *S. myrtifolia* var. *elegans*, e *S. simplex* var. *continentalis*, foi eficiente, inclusive quanto à capacidade de detectar polimorfismos para estas espécies;
- Os resultados sugerem que os locos segregam de acordo com o esperado pelas leis mendelianas, em geral não estão ligados, sendo que alguns pares dos locos SSR analisados nos adultos das três populações amostradas, apresentaram desequilíbrio de ligação;
- Os parâmetros genéticos estimados para a análise da diversidade genética: mostraram a alta diversidade verificada nos locos microssatélites investigados, bem como nas populações de *S. glazioviana*. As probabilidades de identidade genética (I) e de exclusão de paternidade (Q) estimadas para os locos microssatélites desenvolvidos para *S. glazioviana*, indicaram seu alto poder informativo e discriminatório, importantes para a aplicação desses marcadores em análise de parentesco e fluxo gênico;
- As três populações amostradas de *S. glazioviana* apresentam estruturação intrapopulacional;
- As análises preliminares sobre o sistema de cruzamento mostraram uma alta taxa de cruzamento ($tm = 0,892$), sugerindo a existência de sistema de cruzamento misto em *S. glazioviana*, no entanto, esses dados precisam ser melhor investigados com o aumento do número de progênies analisadas;
- A alta taxa de imigração de pólen (36%), assim como a distância média de dispersão de pólen (489 m) e a área efetiva de polinização (42 ha) indicam a

ocorrência de fluxo gênico entre as populações de *S. glazioviana* na área de estudo, no entanto, assim como para o sistema de cruzamento, estes dados precisam ser melhor investigados com o aumento da amostragem de populações e progênies;

- Por fim, o estudo mostrou que os dez marcadores de DNA microssatélites desenvolvidos para *S. glazioviana* são ferramentas úteis para estudos sobre a genética de populações e sua utilização forneceu informações relevantes para a conservação efetiva das populações desta espécie ameaçada.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. 2000. **Caiçaras na Mata Atlântica: Pesquisa científica versus planejamento e gestão ambiental**. São Paulo: Annablume, FAPESP.
- ARAÚJO, DSD. 2009. **A vegetação e a flora da região de Cabo Frio**. Disponível em: <<http://scholar.google.com.br/scholar?q=A+vegeta>>. Acesso em: 30 set. 2013.
- AGUILAR, R.; ASHWORTH, L.; GALETTO, L.; AIZEN, M.A. 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. **Ecology Letters** 9: 968-980.
- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOBO, J. 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology** 17: 5177-5188.
- ALVES, R.M.; SEBBENN, A.M.; ARTERO, A.S.; CLEMENT, C.; FIGUEIRA, A. 2007. High levels of genetic divergence and inbreeding in populations of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Tree Genetics & Genomes** 3: 289-298.
- ALVES, R.M.; SILVA, C.R.S.; SILVA, M.S.C.; SILVA, D.C.S.; SEBBENN, A.M. 2013. Diversidade genética em coleções amazônicas de germoplasma de Cupuaçuzeiro [*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. **Revista Brasileira de Fruticultura** 35(3): 818-828.
- ANDRÉ, T.; LEMES, M.R.; GROGAN, J.; GRIBEL, R. 2008. Post-logging loss of genetic diversity in a mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) population in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology Management** 255(2): 340-345.
- APG II. 2008. Stevens, P.F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since].
- ASHLEY, MV. 2010. Plant parentage, pollination, and dispersal: How DNA microsatellites have altered the landscape. **Critical Reviews in Plant Science** 29: 148-161.
- ASUKA, Y.; TOMARU, N.; MUNEHARA, Y.; TANI, N.; TSUMURA, Y.; YAMAMOTO, S. 2005. Half-sib family structure of *Fagus crenata* saplings in an old-growth beech–dwarf bamboo forest. **Molecular Ecology** 14: 2565–2575.
- ATANGANA, A.R.; BEAULIEU, J.; KHASA, D.P. 2009. Wild genetic diversity preservation in a small-sized first generation breeding population of *Allanblackia floribunda* (Clusiaceae). **Tree Genetics & Genomes** doi 10.1007/s11295-009-0234-9.

- AUSTERLITZ, F., SMOUSE, P.E., 2001. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape. II. Relation between Φ_{fi} , pollen dispersal and interfemale distance. **Genetics** 157: 851-857.
- BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M.; BERED, F.; FAY, M.F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology** doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03439.x.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASSO, C.L.F. 1984. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v. 2. Viçosa: UFV, 377 p.
- BENSON, D.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.; OSTELL, J.; WHEELER, D. 2004. Genbank: update. **Nucleic Acids Research** 32: D23–D26.
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits** 54: 277-288.
- BISCAIA, A.E.; KANASHIRO, M.L.; SEBBENN, A.M. 2008. Long-pollen Movement and Deviation of Random Mating in a Low-density Continuous Population of a Tropical Tree *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. **Biotropica**, 40: 462-470.
- BITTENCOURT, J.M.; SEBBENN, A.M. 2007. Patterns of pollen and seed dispersal in a small fragmented population of a wind pollinated *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity** 99: 580-591.
- BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. 2008. Pollen movement and spatial genetic structure in a continuous forest of wind-pollinated *Araucaria angustifolia*, inferred from paternity and TWOGENER analysis. **Conservation Genetics** 9: 855-868.
- BOHRER, C.B.A.; DANTAS, H.G.R.; CRONENBERGER, F.M.; VICENS, R.S.; ANDRADE, S.F. 2009. Mapeamento da vegetação e do uso do solo no centro de diversidade vegetal de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** 60(1): 001-023.
- BURCZYK, J.; DIFAZIO S.P.; ADAMS W.T. 2004. Gene flow in forest trees: how far do genes really travel. **Forest Genetics** 11: 1-14.
- CADDAH, M.K.; CAMPOS, T.; SFORÇA, D.A.; SOUSA, A.C.B.; AMARAL, M.C.E.; BITTRICH, V.; SOUZA, A.P. 2009. Microsatellite markers isolated from polyploid *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. (Clusiaceae) from an enriched genomic library. **Conservation Genetics** 10(5): 1533-1535.
- CARDOSO, C.C.; MOUTINHO, C.H.P.; MELO, L.O.; SOUSA, L.K.V.S.; SOUZA, M.R. 2012. Caracterização físico-mecânica de madeiras amazônicas com aptidão tecnológica para comercialização. **Revista de Ciências Agrárias** 55(3): 176-183.
- CARNEIRO, F.S.; LACERDA, A.E.B.; LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; KANASHIRO,

- M.; SEBBENN, A.M. 2012. Mendelian inheritance, linkage and genotypic disequilibrium in microsatellite loci isolated from *Hymenaea courbaril* (Leguminosae). **Genetic Molecular Research** 11(3): 1942-1948.
- COCKERHAM, C.C. 1969. Variance of gene frequencies. **Evolution** 23: 72-84.
- COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, 10: 349–356.
- COLLEVATTI, R.G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S.F.; HAY, J.D. 2010. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated Neotropical tree. **Tree Genetics & Genomes** 6: 555-564. doi: 10.1007/s11295-010-0271-4.
- DANNER, M.A.; RIBEIRO, J.Z.; ZANETTE, F.; BITTENCOURT, J.V.M.; SEBBENN, A.M. 2013. Mendelian segregation in eight microsatellite loci from hand- and open-pollinated progenies of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae). **Silvae Genetica** 62: 1–2.
- DANTAS, H.G.R.; LIMA, H.C.; BOHRER, C.B.A. 2009. Mapeamento da vegetação e da paisagem do município de Armação de Búzios, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** 60 (1): 025-038.
- DANTAS, M.E.; SHINZATO, E.; MEDINA, A.I.M.; SILVA, C.R.; PIMENTEL, J.; LUMBRERAS, J.F.; CALDERANO, S.B.; CARVALHO FILHO, A. 2000. **Diagnóstico geoambiental do Estado do Rio de Janeiro**. Brasília: CPRM.
- DARWIN, C. 1859-1872. **A origem das espécies**. Editora Martin Claret 2007, 632 p.
- DAYANANDAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K. KESSELI, R. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology** 8: 1585–1592.
- DOW, B.D.; ASHLEY, M.V. 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of sampling in bur oak, *Quercus macrocarpa*. **Molecular Ecology** 5: 615-627.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **Focus** 12: 13-15.
- DUMINIL, J.; KOFFI, G.K.; DEBOUT, G.; SEBASTIANI, F.; VENDRAMIN, G.G.; HEUERTZ, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S.C.; HERDY, O.J. 2011. Isolation of SSR markers for two African Tropical tree species, *Erythrophleum suaveolens* and *E. ivorensense* (Caesalpinioideae). **AJB Primer notes & Protocols in the plant Sciences** 106-108 doi:10.3732/ajb.1000482.
- ELLEGREN, H. 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews** 5: 435-445.

- EL MOUSADICK, A.; PETIT, E. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa*) (L) endemic to morocco. **Theoretical and Applied Genetics** 92: 832-839.
- FERES, J.M.; GUIDUGLI, M.E.; MESTRINER, M.A.; SEBBENN, A.M.; CIAMPI, A.Y.; ALZATE-MARIN, A.L. Microsatellite diversity and effective population size in a germplasm bank of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Leguminosae), an endangered tropical tree: recommendations for conservation. **Genetic Resource Crop Evolution** doi 10.1007/s10722-008-9402-2.
- FERES, J.M.; MONTEIRO, M.; ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. 2012. Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* (Leguminosae), a Neotropical tree species. **AJB Primer notes & protocols in the plant Sciences** 154-156 doi:10.3732/ajb.1100446.
- FERES, J.M.; SEBBENN, A.M.; GUIDUGLI, M.C.; MESTRINER, M.A.; MORAES, M.L.T.; ALAZTE-MARIN, A.L. 2012. Mating system parameters at hierarchical levels of fruits, individuals and populations in the Brazilian insect-pollinated tropical tree, *Tabebuia roseo-alba* (Bignoniaceae). **Conservation Genetics** 13: 393-405.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília (EMBRAPA-CERNAGEM). 222p.
- FERREIRA-RAMOS, R.; MONTEIRO, M.; ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B.; MARTINEZ, C.A.; MESTRINER, M.A.; ALZATE-MARIN, A.L. 2011. Microsatellite markers for *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae), an endangered Tropical tree Species. **AJB Primer notes & protocols in the plant Sciences** 300-302 doi:10.3732/ajb.1100222.
- FONSECA-KRUEL, V.S.; ARAUJO, D.S.D.; SÁ, C.F.C.; PEIXOTO, A.L. 2009. Quantative ethnobotany of a resting forest fragment in Rio de Janeiro, Brazil. **Rodriguésia** 60(1): 187-202.
- FONSECA-KRUEL, V.S. & PEIXOTO, A.L. 2004. Etnobotânica na reserva extrativista marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasílica** 18: 177-190.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos da Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, SP: SBG (Sociedade Brasileira de Genética), 280p.
- FUTUYMA, D.J. 2009. **Biologia evolutiva**. 3 ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, p. 712.
- FUTUYMA, D.J. 2002. **Biologia evolutiva**. 2 ed. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPQ, 646 p.

- GAINO, A.P.S.C.; SILVA, A.M.; MORAES, M.A.; ALVES, P.F.; MORAES, M.L.T.M.; FREITAS, M.L.M.F.; SEBBENN, A.M. 2010. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree *Myracrodruon urundeuva*. **Conservation Genetics** 11:1631-1643. doi: 10.1007/s10592-010-0046-3.
- GAINO, A.P.S.C.; SILVA, J.M.; JOLIVET, C.; MORAES, M.L.T. 2010. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity** 1–12.
- GARCÍA DE LEÓN, F.J.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. 1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Molecular Ecology**, 6: 51-62.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; LARA-ROMERO, C.; SEGARRA-MORAGUES, G.; IRIONDO, J.M.; WIDMER, A.; ESCUDERO, A. 2012. Characterization of microsatellites in the mountain plant *Armeria caespitosa* (Plumbaginaceae) and transferability to congeners. **AJB Primer notes & Protocols in the plant Sciences** 292-294 doi:10.3732/ajb.1200006.
- GERJ**, Governo do Estado do Rio de Janeiro. 2008. Decreto nº 41.612 de 23 de dezembro de 2008. Dispõe sobre a definição de restingas no estado do Rio de Janeiro e estabelece a tipologia e a caracterização ambiental da vegetação de restinga. Disponível em: <<http://www.marica.com.br/2009/1202restinga.htm>>. Acesso em: 03 de julho de 2012.
- GILLET, E.; HATTEMER, H.H. 1989. Genetic analysis of isoenzyme phenotypes using single tree progenies. **Heredity** 63: 135-141.
- GOUDET, J. 1995. FSTAT (Version 2.9.3.2.): A computer program to calculate *F*-statistics. **Heredity** 86: 485-486.
- GOUDET, J. 2002. FSTAT (Version 2.9.3.2.): A computer program to calculate *F*-statistics. **Heredity** 86: 485-486.
- GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROLL, S.B. 2011. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 712 p.
- HARDY, O.J. & VEKEMANS, X. 2002. SPAGeDI: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes** 2: 618-620.
- HARTL, D.L. & CLARK, A.G. 2010. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 660 p.
- HEDRICK, P.W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution** 59:1633–1638.

- HERRERÍAS-DIEGO, Y.; QUESADA, M.; STONER, K.E.; LOBO, J. Effects of forest fragmentation on phenological patterns and reproductive success of the Tropical Dry Forest tree *Ceiba aesculifolia*. **Conservation Biology** 20(4): 1111-1120.
- HUANG, X. & MADAN, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research** 9, 868-877.
- IBAMA**, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2012. Ecossistemas florestais e ecossistemas associados de Mata Atlântica. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/ecossistemasMataatlantica.htm>>. Acesso em: 03 fev. 2014.
- IBRAIMO, M.M.; SCHAEFER, C.E.G.R.; KER, J.C.; LANI, J.L.; ROLIM-NETO, F.C.; ALBUQUERQUE, M.A.; MIRANDA, V.J. 2004. Gênese e micromorfologia de solos sob vegetação xeromórfica (Caatinga) na Região dos Lagos (RJ). **Revista Brasileira Ciência do Solo**. 28: 695-712.
- INEA**, Instituto Estadual do Ambiente. 2012. A Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.inea.rj.gov.br/mata/conteudo.asp>>. Acesso em: 03 fev. 2014.
- IUCN 2014**. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 24 July 2014.
- JUNGMANN, L.; VIGNA, B.B.Z.; PAIVA, J.; SOUSA, A.C.B.; VALLE, C.B.; LABORDA, P.R.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. 2009. Development of microsatellite markers for *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. **Conservation Genetics** 1: 475-479.
- JUMP, A.S.; PENUELAS, J. 2006. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. **Proceeding National Academy Science USA** 103: 8096-8100.
- KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; SOUZA, L.M.I. 1998. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **IPEF** 12(32): 65-70.
- KAGEYAMA, P.Y.; SEBBENN, A.M.; RIBAS, L.A.; GANDARA, F.B.; CASTELLEN, M.; PERECIM, M.B.; VENCOVSKY, R. 2003. Diversidade em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Florestalis** 64: 93-107.
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; C.MARSHALL, T. 2007. Revising how computer program Cervus accommodates genotyping error increase success in paternity assignment. **Molecular Ecology** 16: 1099-1106.
- KENNINGTON, W.J.; JAMES, S.H. 1996. The effect of small population size on the mating system of a rare clonal mallee, *Eucalyptus argutifolia* (Myrtaceae). **Heredity** 78: 252-260.

- KIRKBRIDE, J.H. & WIERSEMA, J.H. 1997. *Bobgunnia*, a new African genus of tribe Swartzieae (Fabaceae, Faboideae). **Brittonia** 49: 1-23.
- KORESSAAR, T. & REMM, M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. **Bioinformatics** 23(10):1289-91.
- KREMER, A.T.; JENNIFER, L.I.; ASHLEY, M.V.; HOWE, H.F. 2008. The paradox of forest fragmentation genetics. **Conservation Biology** 22: 878-885.
- KUMAR, P.; GUPTA, V.K.; MISRA, A.K.; MODI, D.R.; PANDEY, B.K. 2009. Potential of molecular markers in plant biology. **Plants Omics Journal** 2(4): 141-162.
- LANDER, T.A.; BOSHIER, D.H. & HARRIS, S.A. 2010. Fragmented but not isolated: Contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered Chilean tree. **Biological Conservation** 143: 2583-2590.
- LEMES, M.R.; ESASHIKA, T.; GAOUE, O.G. 2011. Microsatellites for Mahoganies: Twelve new loci for *Swietenia macrophylla* and its high transferability to *Khaya senegalensis*. **American Journal of Botany** 98(8): e207-e209.
- LEMES, M.R.; GRIBEL, R.; PROCTOR, J.; GRATTAPAGLIA, D. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. **Molecular Ecology**, 12: 2875–2883.
- LEMES, M.R.; GRATTAPAGLIA, D.; GROGAN, J.; PROCTOR, J.; GRIBEL, R. 2007. Flexible mating system in a logged population of *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae): implications for the management of a threatened neotropical tree species. **Plant Ecology**, 192(2).
- LEMES, M.R.; MARTINIANO, T.M.; REIS, V.M.; FARIA, C.P.; GRIBEL, R. 2007. Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for three species of *Theobroma* (Sterculiaceae) from the Brazilian Amazon. **Genetic Resource Crop Evolution** 54: 1653-1657.
- LEVIN, D.A. 1998. The paternity pool plants. **American Naturalist** 132: 309-317.
- LEWIS, G; SCHRIRE, B; MACKINDER, B; LOCK, M. 2005. **Legumes of the World**. Kew, Richmond: Royal Botanic Gardens.
- LIN, Y.; ZENG, L.; ZHANG, Q.; WANG, Y.; TANG, S. 2011. Development of markers in *Kmeria septentrionalis* (Magnoliaceae), an endangers chinese tree. **AJB Primer notes & protocols in the plant Sciences** 158-160 doi:10.3732/ajb.1100039.

- LITT, M. & LUTTY, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle of actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44: 397 - 401.
- LOURMAS, M.; KJELLBERG, F.; DESSARD, H.; JOLY, H.; CHEVALLIER, M-H. 2007. Reduced density due to logging and its consequences on mating system and pollen flow in the African mahogany *Entandrophragma cylindricum*. *Heredity* 99: 151–160.
- LOWE, A.J.; JONES, A.E.; RAYBOULD, A.F.; TRICK, M.; MOULE, C.L.; EDWARDS, K.J. 2002. Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle. *Molecular Ecology Notes* 2: 7–11.
- MANSANO, V.F.; LIMA, J.R. 2007. O gênero *Swartzia* Schreb. (Leguminosae, Papilionoideae) no Estado do Rio de Janeiro. *Rodriguésia* 58: 469-483.
- MARQUI, S.R.; LEMOS, R.B.; SANTOS, L.A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; SCORZONI, L.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; YOUNG, M.C.M.; TORRES, L.M.B. 2008. Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. *Química Nova* 31(4): 828-831.
- MARTINS, W.S.; LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F.S.; BERTIOLI, D.J. 2009. WebSat - A Web Software for MicroSatellite Marker Development, *Bioinformatics* 3(6): 282-283
- MARSHALL, T.C., SLATE, J., KRUK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- MAYR, E. 2009. **O que é a evolução**. Rio de Janeiro: Rocco, 342 p.
- MMA, Ministério do Meio Ambiente. 2008. Instrução nominativa nº 6 de 23 de outubro de 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf>. Acesso em: 03 mai. 2014.
- MONDINI, L.; NOORANI, A.; PAGNOTTA, M.A. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity* 1: 19-35.
- MORAES, M.L.T. & SEBBENN, A.M. 2010. Pollen dispersal between isolated trees in the Brazilian Savannah: A case study of the Neotropical tree *Hymenaea stigonocarpa*. *Biotropica* 1-8.
- MOURA, T.M.; SEBBENN, A.M.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; OLIVEIRA, G.C.X.; KAGEYAMA, P.Y. 2009. Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanun* spp. Do Cerrado, estimados por meio de locos microssatélites. *Scientia florestalis* 37(82): 143-150.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

- NEMATI, Z.; ZEINALABEDINI, M.; MARDI, M.; PIRSEYEDIAND, S.M.; MARASHI, S.H.; NEKOUI, S.M.K. 2012. Isolation and characterization of a first set of polymorphic microsatellite markers in saffron, *Crocus sativus* (Iridaceae). **AJB Primer notes & protocols in the plant Sciences** 340-343 doi:10.3732/ajb.1100531.
- OLIVEIRA, DMT. 2001. Morfologia comparada de plântulas e plantas jovens de leguminosas arbóreas nativas: espécies de Phaseoleae, Sophoreae, Swartzieae e Tephrosieae. **Revista Brasileira Botânica** 24: 85-97.
- OLIVEIRA, F.A.; TARAZI, R.; MENEZES, I.P.P.; BERG, C.V.; TSAI, S.M.; F.A. 2012. Microsatellite markers for *Plathymenia reticulata* (Leguminosae). **AJB Primer notes & protocols in the plant Sciences** 391-393 doi:10.3732/ajb.1200051.
- PAULINO, J.V.; MANSANO, V.F.; TEIXEIRA, S.P. 2013. Eludating the unusual floral features of *Sawrtzia dipetala* Willd. Ex Vogel, a Neotropical legume tree. **Botanical Journal of the Linnean Society** 173: 303-320.
- PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. 1998. Cross-Species Amplification of Soybean (*Glycine max*) Simple Sequence Repeats (SSRs) Within the Genus and Other Legume Genera: Implications for the Transferability of SSRs in Plants. **Molecular Biology and Evolution** 15(10): 1275-1287.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics** 28: 2537-2539.
- PEREIRA, O.J. 2003. Restinga: origem, estrutura e diversidade. In: **Desafios da Botânica Brasileira no Novo Milênio: Inventário, Sistematização e Conservação da Diversidade Vegetal**. Belém: MPEG, UFRA; Embrapa, Brasil: Museu Paraense Emílio Goeldi. p. 177-179.
- PEREIRA, M.F.; BANDEIRA, L.F.; BLANCO, A.J.V.; COELHO, A.S.G.; CIAMPI, A.Y.; FRANCESCHINELLI, E.V. 2011. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Cabralea canjerana* (Meliaceae). **AJB Primer notes & protocols in the plant Sciences** 10-12 doi:10.3732/ajb.1000336.
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** 142 (6): 1141-1153.
- RIBEIRO, R.D.; LIMA, H.C. 2009. Riqueza e distribuição geográfica de espécies arbóreas da família Leguminosae e implicações para conservação no centro de diversidade vegetal de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** 60(1): 111-127.

- RITLAND, K. & JAIN, S. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. **Heredity** 47: 35-52.
- RITLAND, K. 1989. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**. 43: 848-859.
- RITLAND K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using n independent loci. **Heredity**. 88: 221-228.
- RITTER, L.M.O.; BAJAY, M.M.; MONTEIRO, M.; SOUZA, R.G.V.C.; MORENO, M.A.; KAGEYAMA, P.Y. 2012. Development of microsatellite markers for *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), a typical species of the Cerrado. **AJB Primer notes & protocols in the plant Sciences** 97-98 doi:10.3732/ajb.1100405
- SALLES, G.; BUSO, C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S. 2003. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Embrapa**, Circular técnica 20, Brasília. 11 p.
- SAMPSON, J.F.; HOPPER, S.D.; JAMES, S.H. 1989. The mating system and population genetic structure in a bird-pollinated mallee, *Eucalyptus rhodantha*. **Heredity** 63: 383-393.
- SANTOS, F.R.C.; LIMA, P.F.; PRIOLLI, R.H.G.; SIQUEIRA, W.J.; COLOMBO, C.A. 2012. Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci in *Lippia alba* (Verbenaceae). **AJB Primer notes & protocols in the plant Sciences** 301-303 doi:10.3732/ajb.1100578.
- SANTOS, M.O.; KARIA, C.T.; RESENDE, M.S.; CHIARI, L.; JUNGSMANN, L.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in the tropical forage legume *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. **Conservation Genetics Resources** doi 10.1007/s12686-009-9010-2.
- SCHLÖTTERER, C. 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nature Reviews** 5: 63-69.
- SCHLÖTTERER, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma Focus** 109:365-371
- SEBBENN, AM; CARVALHO, ACM; FREITAS, MLM; MORAES, SMB; GAINO, APSC; SILVA, JM; JOLIVET, C; MORAES, MLTM. 2010. Low level of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity** doi: 10.1038/hdy.2010.33.
- SEBBENN, A.M. 2003. Número de populações para conservação genética *in situ* de espécies arbóreas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo 15: 45-51.

- SEBBENN, A.M.; SIQUEIRA, A.C.F.; KAGEYAMA, P.Y.; MACHADO, J.A. 1998. Parâmetros genéticos na conservação da cabreúva - *Myroxylon peruiferum* L.F. Allemão. **Scientia Forestalis** 53: 31-38
- SEBBENN, A.M. 2006. Sistemas de reprodução em espécies tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. *In*: A.R. Higa & L.D. Silva (coord.). **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. FUPEF do Paraná, Curitiba, p. 93-138.
- SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters** 9: 615-629.
- SHARMA, A.; NAMDEO, A.G.; MAHADIK, K.R. 2008. Molecular markers: new prospects in plant genome analysis. **Pharmacognosy Reviews** 2(3): 23-34.
- SMOUSE, P.E.; SORK, V.L. 2004. Measuring pollen flow in forest trees: an exposition of alternative approaches. **Forest Ecology and Management** 197: 21-38
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. New York: Freeman. ISBN 0-7167-2411-1 1981.
- SOUZA, AP; ZUCCHI, MI; VINCENTZ, M; SILVA, GT; DURIGAN, M. 2012. **Apostila: Microsatélites para estudos genéticos em eucariotos**. Campinas: Universidade estadual de Campinas/Instituto de Biologia/Pós-graduação em Biologia Vegetal/Laboratório de Análise Genética e Molecular – CBMEG – UNICAMP. 50 p.
- TARAZI, R.; SEBBENN, A.M.; MOLLINARI, M.; VENCOVSKY, R. 2010. Mendelian inheritance, linkage and linkage disequilibrium in microsatellite loci of *Copaifera langsdorffii* Desf. **Conservation Genetic Resources** 2:201–204.
- TORKE, B.M.; MANSANO, V.F. 2009. A phylogenetically based sectional classification of *Swartzia* (Leguminosae-Papilionoideae). **Taxon** 58: 913-924.
- VECSCREEN. National Center for Biotechnology Information (US). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3831/>> Acesso em: 03 agost. 2013.
- WEBER, J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n×(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics** 7: 524-530.
- WEIR, B. 1996. **Genetic data analysis**. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates. 447p.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology** 11: 1-16.

ANEXOS

ANEXO I – Dados dos indivíduos adultos de *S. glazioviana* coletados

Tabela 15. Coordenadas geográficas, circunferência à altura do peito (CAP), diâmetro à altura do peito (DAP) e altura de todos os indivíduos de *S. glazioviana* coletados para as três populações amostradas (Trilha do Forno, Praia das Conchas e Encosta Rua Vitória).

Local de coleta	População	Indivíduo	Coordenada X	Coordenada Y	CAP (cm)	DAP (cm)	Altura (m)
Trilha do Forno	1	1	22 58'09,0"S	42 00'57,0"W	10,00	3,18	2,50
Trilha do Forno	1	2	22 58'09,1"S	42 00'57,0"W	10,00	3,18	2,50
Trilha do Forno	1	3	22 58'09,1"S	42 00'56,8"W	10,00	3,18	2,00
Trilha do Forno	1	4	22 58'09,1"S	42 00'56,9"W	7,00	2,23	1,70
Trilha do Forno	1	5	22 58'08,2"S	42 00'57,8"W	8,50	2,71	1,30
Trilha do Forno	1	6	22 58'08,5"S	42 00'58,2"W	8,50	2,71	2,50
Trilha do Forno	1	7	22 58'08,5"S	42 00'58,2"W	9,00	2,86	2,00
Trilha do Forno	1	8	22 58'08,4"S	42 00'58,3"W	12,00	3,82	2,70
Trilha do Forno	1	9	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	10,00	3,18	2,50
Trilha do Forno	1	10	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	7,50	2,39	2,10
Trilha do Forno	1	11	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	8,00	2,55	2,50
Trilha do Forno	1	12	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	10,00	3,18	3,00
Trilha do Forno	1	13	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	7,00	2,23	2,50
Trilha do Forno	1	14	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	8,00	2,55	1,80
Trilha do Forno	1	15	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	7,00	2,23	1,90
Trilha do Forno	1	16	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	6,00	1,91	1,90
Trilha do Forno	1	17	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	5,00	1,59	1,90
Trilha do Forno	1	18	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	8,00	2,55	1,70
Trilha do Forno	1	19	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	7,00	2,23	3,00
Trilha do Forno	1	20	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	4,00	1,27	2,00
Trilha do Forno	1	21	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	5,00	1,59	2,80
Trilha do Forno	1	22	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	7,00	2,23	1,20
Trilha do Forno	1	23	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	4,00	1,27	1,20
Trilha do Forno	1	24	22 58'08,4"S	42 00'58,6"W	3,00	0,95	1,20
Trilha do Forno	1	25	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	8,00	2,55	3,00
Trilha do Forno	1	26	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	8,00	2,55	2,70
Trilha do Forno	1	27	22 58'08,5"S	42 00'58,4"W	7,00	2,23	2,50
Trilha do Forno	1	28	22 58'07,8"S	42 01'00,1"W	9,00	2,86	2,20
Trilha do Forno	1	29	22 58'07,8"S	42 01'00,3"W	9,50	3,02	1,70
Trilha do Forno	1	30	22 58'07,8"S	42 01'00,3"W	8,00	2,55	1,60
Trilha do Forno	1	31	22 58'01,0"S	42 00'58,2"W	10,50	3,34	1,90
Trilha do Forno	1	32	22 57'57,3"S	42 00'56,8"W	8,00	2,55	1,20
Trilha do Forno	1	33	22 57'57,3"S	42 00'56,6"W	6,00	1,91	2,00
Trilha do Forno	1	34	22 58'06,6"S	42 00'58,2"W	5,00	1,59	1,20
Trilha do Forno	1	35	22 58'11,5"S	42 00'51,7"W	15,00	4,77	1,65
Trilha do Forno	1	36	22 58'11,5"S	42 00'51,6"W	10,50	3,34	3,00
Trilha do Forno	1	37	22 58'11,6"S	42 00'51,4"W	11,00	3,50	1,75
Trilha do Forno	1	38	22 58'12,4"S	42 00'50,3"W	8,00	2,55	2,00
Trilha do Forno	1	39	22 58'13,0"S	42 00'48,5"W	6,00	1,91	1,65
Trilha do Forno	1	40	22 58'03,5"S	42 01'04,1"W	7,50	2,39	3,00
Trilha do Forno	1	41	22 58'03,6"S	42 01'04,2"W	5,50	1,75	1,20

Trilha do Forno	1	42	22 58'03,6"S	42 01'04,2"W	4,50	1,43	1,20
Trilha do Forno	1	43	22 58'06,7"S	42 00'58,2"W	9,00	2,86	3,00
Trilha do Forno	1	44	22 58'06,7"S	42 00'58,2"W	6,00	1,91	2,50
Trilha do Forno	1	45	22 58'06,7"S	42 00'58,1"W	6,00	1,91	3,00
Trilha do Forno	1	46	22 58'01,0"S	42 00'58,2"W	11,50	3,66	3,00
Trilha do Forno	1	47	22 57'58,0"S	42 00'56,8"W	4,00	1,27	1,20
Trilha do Forno	1	48	22 57'58,0"S	42 00'56,9"W	5,00	1,59	2,80
Trilha do Forno	1	49	22 57'57,8"S	42 00'56,6"W	4,00	1,27	1,65
Trilha do Forno	1	50	22 57'57,8"S	42 00'56,7"W	5,50	1,75	1,90
Praia das Conchas	2	51	22 52'22,5"S	41 58'53,0"W	7,00	2,23	2,00
Praia das Conchas	2	52	22 52'18,3"S	41 58'48,9"W	3,00	0,95	1,75
Praia das Conchas	2	53	22 52'18,3"S	41 58'48,9"W	6,00	1,91	1,70
Praia das Conchas	2	54	22 52'18,3"S	41 58'48,9"W	7,00	2,23	1,70
Praia das Conchas	2	55	22 52'18,3"S	41 58'48,9"W	6,00	1,91	1,80
Praia das Conchas	2	56	22 52'18,2"S	41 58'49,1"W	7,00	2,23	1,90
Praia das Conchas	2	57	22 52'18,2"S	41 58'49,1"W	9,50	3,02	1,90
Praia das Conchas	2	58	22 52'18,2"S	41 58'49,1"W	6,00	1,91	2,00
Praia das Conchas	2	59	22 52'18,1"S	41 58'49,2"W	6,00	1,91	1,70
Praia das Conchas	2	60	22 52'17,9"S	41 58'49,2"W	8,00	2,55	2,00
Praia das Conchas	2	61	22 52'17,9"S	41 58'49,1"W	6,50	2,07	2,00
Praia das Conchas	2	62	22 52'17,8"S	41 58'49,0"W	8,50	2,71	1,70
Praia das Conchas	2	63	22 52'18,0"S	41 58'48,7"W	4,50	1,43	1,60
Praia das Conchas	2	64	22 52'17,9"S	41 58'48,7"W	3,50	1,11	2,00
Praia das Conchas	2	65	22 52'17,9"S	41 58'49,1"W	3,00	0,95	1,90
Praia das Conchas	2	66	22 52'17,9"S	41 58'49,1"W	9,20	2,93	2,50
Praia das Conchas	2	67	22 52'17,7"S	41 58'49,6"W	8,00	2,55	1,20
Praia das Conchas	2	68	22 52'17,7"S	41 58'49,6"W	5,00	1,59	1,20
Praia das Conchas	2	69	22 52'17,6"S	41 58'49,5"W	6,00	1,91	1,20
Praia das Conchas	2	70	22 52'17,7"S	41 58'49,6"W	5,50	1,75	1,20
Praia das Conchas	2	71	22 52'17,6"S	41 58'49,6"W	5,00	1,59	1,20
Praia das Conchas	2	72	22 52'18,3"S	41 58'49,8"W	1,00	0,32	1,20
Praia das Conchas	2	73	22 52'17,7"S	41 58'49,7"W	3,00	0,95	1,20
Praia das Conchas	2	74	22 52'17,6"S	41 58'49,6"W	1,50	0,48	1,20
Praia das Conchas	2	75	22 52'18,1"S	41 58'48,6"W	3,00	0,95	1,70
Praia das Conchas	2	76	22 52'18,1"S	41 58'48,6"W	1,50	0,48	1,20
Praia das Conchas	2	77	22 52'18,1"S	41 58'48,6"W	1,50	0,48	1,20
Praia das Conchas	2	78	22 52'18,0"S	41 58'48,6"W	8,00	2,55	2,50
Praia das Conchas	2	79	22 52'18,1"S	41 58'48,6"W	7,50	2,39	2,50
Praia das Conchas	2	80	22 52'18,0"S	41 58'48,6"W	7,00	2,23	4,00
Praia das Conchas	2	81	22 52'21,8"S	41 58'52,8"W	9,50	3,02	3,00
Praia das Conchas	2	82	22 52'21,8"S	41 58'52,8"W	12,50	3,98	3,10
Praia das Conchas	2	83	22 52'22,2"S	41 58'53,1" W	6,00	1,91	1,80
Praia das Conchas	2	84	22 52'20,9"S	41 58'54,5"W	2,00	0,64	1,20
Praia das Conchas	2	85	22 52'20,9"S	41 58'54,5"W	2,00	0,64	1,20
Praia das Conchas	2	86	22 52'20,9"S	41 58'54,5"W	5,00	1,59	1,50
Praia das Conchas	2	87	22 52'20,9"S	41 58'54,5"W	3,00	0,95	1,60
Praia das Conchas	2	88	22 52'21,0"S	41 58'54,6"W	3,00	0,95	1,20

Praia das Conchas	2	89	22 52'21,0"S	41 58'54,6"W	5,00	1,59	1,70
Praia das Conchas	2	90	22 52'21,0"S	41 58'54,6"W	5,00	1,59	1,20
Encosta Rua Vitória	3	91	22 51'21,0"S	41 59'39,9"W	5,00	1,59	3,00
Encosta Rua Vitória	3	92	22 51'20,8"S	41 59'40,1"W	6,00	1,91	2,00
Encosta Rua Vitória	3	93	22 51'20,9"S	41 59'40,0"W	4,00	1,27	2,00
Encosta Rua Vitória	3	94	22 51'20,6"S	41 59'39,6"W	7,00	2,23	2,00
Encosta Rua Vitória	3	95	22 51'19,5"S	41 59'37,9" W	3,50	1,11	1,60
Encosta Rua Vitória	3	96	22 51'19,6"S	41 59'38,0" W	4,00	1,27	1,70
Encosta Rua Vitória	3	97	22 51'23,4"S	41 59'42,5"W	6,00	1,91	2,50
Encosta Rua Vitória	3	98	22 51'20,8"S	41 59'40,0"W	7,50	2,39	2,50
Encosta Rua Vitória	3	99	22 51'20,8"S	41 59'40,0"W	7,00	2,23	2,00
Encosta Rua Vitória	3	100	22 51'20,6"S	41 59'40,0"W	5,00	1,60	2,00
Encosta Rua Vitória	3	101	22 51'21,1"S	41 59'39,9"W	4,50	1,43	1,70
Encosta Rua Vitória	3	102	22 51'20,7"S	41 59'39,8"W	3,50	1,11	2,00
Encosta Rua Vitória	3	103	22 51'20,0"S	41 59'38,9"W	4,00	1,27	2,50
Encosta Rua Vitória	3	104	22 51'19,6"S	41 59'38,0" W	5,00	1,60	3,00
Encosta Rua Vitória	3	105	22 51'19,6"S	41 59'38,0" W	8,50	2,71	1,80
Encosta Rua Vitória	3	106	22 51'19,6"S	41 59'38,0" W	7,00	2,23	3,00
Encosta Rua Vitória	3	107	22 51'23,3"S	41 59'42,4"W	6,00	1,91	3,00
Encosta Rua Vitória	3	108	22 51'20,4"S	41 59'39,4"W	5,00	1,60	2,50
Encosta Rua Vitória	3	109	22 51'19,6"S	41 59'38,0"W	4,00	1,27	2,50
Encosta Rua Vitória	3	110	22 51'20,4"S	41 59'39,2"W	6,00	1,91	2,00
Encosta Rua Vitória	3	111	22 51'20,4"S	41 59'39,2"W	6,50	2,07	2,50
Encosta Rua Vitória	3	112	22 51'23,2"S	41 59'42,5"W	6,00	1,91	3,00
Encosta Rua Vitória	3	113	22 51'23,2"S	41 59'42,6"W	9,00	2,86	3,00
Encosta Rua Vitória	3	114	22 51'20,6"S	41 59'39,6"W	4,00	1,27	2,20
Encosta Rua Vitória	3	115	22 51'20,6"S	41 59'39,6"W	5,00	1,59	1,78
Encosta Rua Vitória	3	116	22 51'20,3"S	41 59'39,6"W	6,00	1,91	1,70
Encosta Rua Vitória	3	117	22 51'20,2"S	41 59'39,3"W	4,00	1,27	1,70
Encosta Rua Vitória	3	118	22 51'20,2"S	41 59'39,4"W	4,00	1,27	3,00
Encosta Rua Vitória	3	119	22 51'20,2"S	41 59'39,2"W	9,00	2,86	2,50
Encosta Rua Vitória	3	120	22 51'20,4"S	41 59'37,7"W	8,00	2,55	3,50
Encosta Rua Vitória	3	121	22 51'20,3"S	41 59'40,0"W	9,00	2,86	1,80
Encosta Rua Vitória	3	122	22 51'20,3"S	41 59'40,1"W	12,00	3,82	4,00
Encosta Rua Vitória	3	123	22 51'20,3"S	41 59'39,9"W	8,00	2,55	2,50
Encosta Rua Vitória	3	124	22 51'20,7"S	41 59'39,9"W	8,00	2,55	2,50
Encosta Rua Vitória	3	125	22 51'20,7"S	41 59'39,7"W	6,00	1,91	3,00
Encosta Rua Vitória	3	126	22 51'20,6"S	41 59'39,7"W	7,00	2,23	3,00
Encosta Rua Vitória	3	127	22 51'19,7"S	41 59'38,1"W	3,00	0,95	2,50
Encosta Rua Vitória	3	128	22 51'19,7"S	41 59'38,1"W	3,00	0,95	2,50
Encosta Rua Vitória	3	129	22 51'19,6"S	41 59'38,2"W	6,00	1,91	4,00
Encosta Rua Vitória	3	130	22 51'19,6"S	41 59'37,9"W	9,00	2,86	2,50
Encosta Rua Vitória	3	131	22 51'19,6"S	41 59'37,9"W	8,50	2,71	4,00
Encosta Rua Vitória	3	132	22 51'19,5"S	41 59'37,9"W	1,50	0,48	1,90
Encosta Rua Vitória	3	133	22 51'10,8"S	41 59'56,7" W	6,50	2,07	3,00
Encosta Rua Vitória	3	134	22 51'09,7"S	41 59'56,0"W	10,50	3,34	4,60
Encosta Rua Vitória	3	135	22 51'09,1"S	41 59'56,0"W	3,50	1,11	1,70

ANEXO II – Protocolo para extração de DNA de tecidos foliares de *S. glazioviana*, de acordo com Doyle & Doyle (1987), modificado por Ferreira & Grattapaglia (1998).

Materiais utilizados

- ✓ Um tubo com fundo em U para cada amostra;
- ✓ Três tubos *ependorfs* para cada amostra;
- ✓ Marcador permanente ponta fina;
- ✓ Tesoura;
- ✓ Pinça;
- ✓ *Beads* (1 pequena e 1 média por amostra);
- ✓ Imã;
- ✓ Macerador;
- ✓ Tubo *Falcon*;
- ✓ Banho-maria;
- ✓ Suporte para tubos no banho-maria;
- ✓ Raque para tubos;
- ✓ Centrífuga;
- ✓ Vórtex;
- ✓ Pipetas (20-100 μ l; 50-200 μ l e 200-1.000 μ l)
- ✓ Ponteiros 200 μ l e 1000 μ l.

Reagentes utilizados

- ✓ Tampão de extração CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) 2X
- ✓ 2- β -mercaptoetanol (2 μ l/ml de CTAB 2%)
- ✓ Proteinase K (0,5 mg/ml)
- ✓ CIA (clorofórmio: álcool isoamílico) 24:1
- ✓ Isopropanol absoluto (100%)
- ✓ NaCl 2 M
- ✓ Etanol 70%
- ✓ Etanol absoluto (100%)
- ✓ Tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 0,5 mM EDTA pH 8,0) + RNase (10 μ g/ml)

Método

- 01) Identificar os tubos com fundo em U com o marcador permanente;
- 02) Pesar em torno de 40 mg de folha e cortá-las usando pinça e tesoura, previamente esterilizadas, em pedaços bem pequenos, colocando cada amostra em um tubo U;
- 03) Colocar as *beads* (1 pequena e outra média) com auxílio de pinça nos tubos U e macerar o material por 2 minutos na frequência 30 (Retsch MM400);
- 04) Bater levemente os tubos U em uma superfície para que o material macerado acumulado nas tampas dos tubos se concentre no fundo do tubo e as *beads* possam ser mais facilmente retiradas sem grandes perdas de material macerado;
- 05) Retirar as *beads* usando o imã;
- 06) Acrescentar a cada tubo U 700 µL de tampão de extração CTAB 2%, previamente misturado com o 2-β-mercaptoetanol (2 µl/ml de tampão CTAB 2%) e com a proteinase K (0,5 mg/ml), pré-aquecidos em banho-maria por 10 min em tubo *Falcon*;
- 07) Incubar as amostras em banho-maria, usando o suporte, a 60°C por 30 minutos e de 10 em 10 minutos inverter os tubos U para que a suspensão fique homogênea; retirar os tubos U do banho-maria e deixá-los esfriar na raque em bancada;
- 08) Fazer a primeira extração com CIA (24:1). Colocar 600 µl em cada tubo U e agitá-los por 5 minutos, invertendo-os;
- 09) Centrifugar as amostras a uma velocidade de 13.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos;
- 10) Pipetar a fase superior (aquosa) para tubos *ependorfs* previamente identificados;
- 11) Repetir os passos 8, 9 e 10;
- 12) Adicionar 400 µL de isopropanol frio (-20°C) aos tubos contendo a fase aquosa. Misturar devagar;
- 13) Incubar o material a uma temperatura de -20°C durante 2 horas;
- 14) Centrifugar por 10 minutos a 7.500 rpm;
- 15) Verificar onde se encontra o *pellet* e retirar o excesso de isopropanol invertendo cuidadosamente os tubos em descarte na capela;
- 16) Acrescentar 1.000 µl de etanol 70%, deixando o *pellet* imerso por 10 minutos;
- 17) Retirar o etanol invertendo cuidadosamente o tubo em descarte;
- 18) Ressuspender o *pellet* em 500 µl de NaCl 2 M, no vórtex;
- 19) Deixar o *pellet* ressuspensando até o dia seguinte à temperatura ambiente;

- 20) Vortexar;
- 21) Deixar pelo menos 30 minutos em geladeira a 4°C;
- 22) Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm;
- 23) Recuperar o sobrenadante com cuidado, evitando puxar junto os polissacarídeos (viscosidade no fundo), bastante atenção nessa etapa;
- 24) Reprecipitar com 400 µl por amostra de isopropanol frio (-20°C) e misturar devagar;
- 25) Incubar em *freezer* a -20°C por 30 minutos;
- 26) Centrifugar por 10 minutos a 7.500 rpm;
- 27) Verificar onde se encontra o *pellet* e retirar o excesso de isopropanol invertendo os tubos com cuidado;
- 28) Acrescentar 1.000 µl de etanol 70%, deixando o *pellet* imerso por 10 minutos;
- 29) Retirar o etanol invertendo com muito cuidado os tubos;
- 30) Repetir os passos 28 e 29;
- 31) Colocar 1.000 µl de etanol absoluto (100%) e deixar por 3 minutos;
- 32) Retirar o máximo de etanol possível e deixar secar na capela até o dia seguinte;
- 33) Ressuspender o *pellet* com 100 µl de tampão TE acrescido de RNase;
- 34) Incubar a 37°C por 2 horas para digestão com a RNase. Vortexar de 30 em 30 minutos;
- 35) Armazenar o material extraído em *freezer* ou em geladeira, dependendo de quando será usado.

ANEXO III – Protocolo de germinação de sementes de *Swartzia glazioviana*

O período de frutificação ocorre geralmente entre Janeiro e Maio, sendo este último o mês mais indicado para coleta de sementes por apresentarem-se maduras e tornarem a germinação mais eficaz.

Os frutos, assim que coletados devem ser armazenados em sacos de papel (Kraft) e transportados até o laboratório. A abertura dos frutos se dá com auxílio de pequena faca permitindo a retirada das sementes que devem ser desinfetadas em hipoclorito 2% por 1 minuto e três lavagens posteriores em água destilada. Imediatamente após, estas devem ser colocadas para germinar em bandejas tendo como substrato vermiculita em germinador a 25 °C e fotoperíodo 8 horas luz/16 horas escuro. A cada dois dias é necessário fazer a rega. A partir do início da segunda semana a protrusão da raiz deverá ser observada bem como no início do segundo mês deve-se observar a parte aérea emergindo. As plântulas devem ser realocadas em casa de vegetação, em tubetes contendo terra. A irrigação deve ser diária, podendo variar de acordo com a temperatura local, em regiões mais frias pode haver intervalos maiores do que dois dias. O crescimento das plântulas é lento.

ANEXO IV - Resumo publicado nos Anais do II Simbioma (Simpósio sobre Biodiversidade da Mata Atlântica).

Estudo de frutos e sementes de *Swartzia glazioviana* (Taub.) Glaz.

Janaína Spoladore^{1,2}, Elton John de Lório¹, Vidal Mansano de Freitas¹, Valderes Bento Sarnaglia¹

1 - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rua Pacheco Leão, 2040, Solar da Imperatriz, Horto, Rio de Janeiro – RJ, Brasil. CEP: 22460-030.

2 - Autor para correspondência: janaspoladore@yahoo.com.br

Introdução

A dinâmica de uma população está diretamente ligada ao desempenho reprodutivo de uma espécie, desde o processo de florescimento até as etapas de estabelecimento dos regenerantes. Tais processos são dependentes de condições climáticas e ecológicas que interferem nos eventos de florescimento, polinização, formação de frutos e sementes, dispersão, predação e capacidade e condições de germinação (Dogteron *et al.* 2000; Cunningham 2000; Silva *et al.* 2002, Tsuda & Almeida 2012).

Dentre os variados fatores expostos que interferem no desempenho reprodutivo, a predação é um fator que pode interferir na variação do tamanho e da estrutura populacional e na expressão da variação genética, principalmente em populações de plantas com poucos indivíduos e baixa produção de frutos (Janzen 1971, Radosevich *et al.* 1997).

Swartzia glazioviana (Taub.) Glaz. (Leguminosae, Papilionoideae) é uma espécie arbórea de pequeno porte, medindo até três metros de altura que tem como caracteres diagnósticos cálice internamente lanoso, gineceu glabro, fruto do tipo legume nucóide, sementes esverdeadas não ariladas, dorsiventralmente achatadas e folhas com estípulas persistentes (Mansano & Lima 2007). A espécie floresce de novembro a janeiro e frutifica de janeiro a maio (Mansano & Lima 2007). *S. glazioviana* encontra-se ameaçada de extinção devido à gradual perda de habitat por degradação antrópica da região dos Lagos, habitat endêmico da espécie no estado do Rio de Janeiro (MMA 2008).

O presente trabalho tem o intuito de analisar dados referentes à produção de frutos e sementes, predação e germinação para compreender etapas do desempenho reprodutivo de *S. glazioviana*.

Material e Métodos

Foram analisadas populações de duas localidades no município de Cabo Frio na Região dos Lagos, do estado do Rio de Janeiro. Um dos locais apresenta-se nas coordenadas 22°51'18.52"S e 42°59'38.16"W com 5,4 ha e o outro, distante do primeiro em 2,3 km, nas coordenadas 22°52'20.48"S e 42°58'42.47"W com 6,6 ha (dados Google Earth TM), a elevação varia do nível do mar até cerca de 500 metros

(Ribeiro & Lima, 2009). A Região dos Lagos tem como limite a leste e sul o Oceano Atlântico, a oeste a Serra do Mato Grosso e a norte os limites superiores da Lagoa de Araruama e os cursos inferiores dos rios Una e São João (Ribeiro & Lima, 2009). O clima peculiar da região, Bsh (de acordo com Köppen), é árido quente com temperaturas variando entre 23-25°C até 40°C no verão (Ribeiro & Lima, 2009). O solo apresenta elevada salinidade (35%), devido à baixa pluviosidade e quantidade de água doce e à intensa evaporação (Ibraimo *et al.* 2004). Uma diversidade de ambientes caracteriza a região, sendo que os solos apresentam considerável variabilidade vertical e horizontal de propriedades pedológicas (Ibraimo *et al.* 2004). As fisiografias predominantes são as planícies arenosas costeiras, os depósitos alúvios-colúvios, as lagoas, os morros baixos das penínsulas e as encostas (Ribeiro & Lima 2009).

A coleta dos frutos foi realizada em março de 2013 em ambas as localidades. Foram contados todos os frutos coletados que apresentaram sementes, assim como todas as sementes observadas no interior dos frutos. As sementes foram consideradas predadas sempre que se constatou a presença de larvas em seu interior e, portanto, em estágio de deterioração. Posteriormente foi feito o beneficiamento das sementes não predadas e desinfestação. A desinfestação foi feita em hipoclorito 2% por 1 minuto e três lavagens consecutivas em água destilada. Após esse procedimento as sementes foram acondicionadas em recipientes com areia lavada em casa de vegetação. Consideraram-se sementes perdidas, aquelas que após serem colocadas em casa de vegetação, apresentavam endosperma totalmente liquidificado e portanto sem potencial para a germinação.

Resultados e Discussão

Os frutos de *S. glazioviana* (Figura 1) começaram a ser observados a partir do mês de fevereiro de 2013. Foram coletados, em março de 2013, frutos de 66 indivíduos, 61 da encosta da Rua Vitória (área 1) e 5 da Praia das Conchas (área 2), 240 e 25 frutos respectivamente, totalizando 265 frutos. O número de sementes nos frutos variou de 1-11, totalizando 671 sementes (Figura 1), 590 da área 1 e 81 da área 2. Houve coleta em dois momentos, definidas como lote 1 e 2, respectivamente, no primeiro lote coletaram-se 53 frutos e 212 no segundo lote.

O valor médio de frutos por indivíduo foi de 4,6 e o de sementes por fruto foi de 2,4; 107 frutos apresentaram uma única semente. O número de frutos e sementes pode ser influenciado por diversos fatores, dentre eles os mecanismos de polinização, predação, limitação de recursos e tamanho da população, o que pode influenciar muito no desempenho reprodutivo da espécie (Cunningham 2000). A causa do baixo número de frutos e sementes (Freitas & Oliveira 2002) necessita de investigação em *S. glazioviana*. Apesar de a produção de sementes estar diretamente ligada ao número de indivíduos, o baixo número de sementes pode ser um indicativo de um baixo investimento em quantidade e maior em qualidade, como observado em espécies de outros grupos taxonômicos (Silva & Pinheiro 2002). No entanto, a baixa conversão de flores em frutos não pode ser descartada, conforme observado em *Copaifera langsdorffii* Desf. (Freitas & Oliveira 2002).

Os frutos foram predados de duas formas: por larvas, que se alimentam das sementes gradualmente sem romper o pericarpo e por um predador que rompe o pericarpo e retira as sementes inteiras (Figura 2 e 3). A porcentagem de sementes

predadas foi de 9,01%. Os predadores ainda não foram identificados, no entanto, pode-se inferir que as larvas pertencem à ordem Coleoptera, insetos com larvas predadoras relatados em diversos trabalhos com leguminosas (Figueiredo *et al.* 2008, Lomônaco 1994; Sari & Ribeiro-Costa 2005; Silva *et al.* 2007; Freitas & Oliveira 2002).

Do primeiro lote de sementes nenhuma teve sucesso na germinação, possivelmente devido ao estado prematuro de maturação. As sementes do segundo lote estão em processo de germinação e desenvolvimento do eixo hipocótilo-radícula.

Devido à baixa produção de frutos e sementes, pode-se inferir que o número de sementes disponíveis após a predação pode ser um fator limitante para o desempenho reprodutivo da espécie e afetar o recrutamento da população, conforme observado em outros estudos (Cunningham 2000; Silva *et al.* 2002). Estudos referentes à diversidade genética e fluxo gênico estão sendo conduzidos nas áreas de coleta de frutos de *S. glazioviana* e devem corroborar resultados preliminares referentes à predação e sucesso reprodutivo da espécie.

Agradecimentos

Agradecemos aos alunos de Iniciação Científica do JBRJ, Tarlile Barbosa Lima e Cássio Flavio Fonseca de Lima pelo auxílio nas coletas, ao Doutor Antonio Carlos da Silva Andrade, por disponibilizar a casa de vegetação e aos técnicos do Horto do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Paulo Cesar Costa da Silva e Jorge Ronaldo Simão Rodrigues, pela colaboração no processo de acompanhamento de germinação das sementes.

Referências Bibliográficas

- Cunningham, S.A. 2000. What determines the number of seed produced in a flowering event? A case study of *Calyptranthes ghiesbreghtiana* (Arecaceae). **Australian Journal of botany** **48**: 659-665.
- Dogterom, M.H., Winston, M.L. & Mukal, A. 2000. Effect of pollen load size and source (self, outcrossing) on seed and fruit production in highbush blueberry cv. "Bluecrop" (*Vaccinium corymbosum*, Ericaceae). **American Journal of Botany** **87**: 1584-1591.
- Figueiredo, P.S., Girnos, E.C., Santos, L.S. 2008. Predação e parasitismo em sementes de duas populações de *Parkia platycephala* Benth, em áreas de cerrado no nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, p.245-251.
- Freitas, C.V. & Oliveira, P.E. 2002. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica** **25**: 311-321.
- Google Earth. Aplicativo acessado em: julho de 2012.
- Ibraimo, M.M., Schaefer, C.E.G.R., Ker, J.C., Lani, J.L., Rolim-Neto, F.C., Albuquerque, M.A., Miranda, V.J. 2004. Gênese e micromorfologia de solos sob vegetação xeromórfica (Caatinga) na Região dos Lagos (RJ). **Revista Brasileira Ciência do Solo** **28**: 695-712.
- Janzen, D.H. 1971. Seed predation by animals. **Annual Review of Ecology and Systematic** **2**: 465-492.

- Lomônaco, C. 1994. Predação de sementes de leguminosas por bruquídeos (Insecta: Coleoptera) na Serra dos Carajás, Pará, Brasil. **Acta Botânica Brasílica** 8 (2): 121-127.
- Mansano, V.F. & Lima, J.R. 2007. O gênero *Swartzia* Schreb. (Leguminosae, Papilionoideae) no Estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia** 58: 469-483.
- MMA, Ministério do Meio Ambiente. 2008. Instrução nominativa nº 6 de 23 de outubro de 2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/ascom_boletins/_arquivos/83_19092008034949.pdf>. Acesso em 03 de maio de 2012.
- Radosevich, S., Holt, J. & Ghera, C. 1997. **Weed Ecology**: implications for weed managements. 2.ed. New York: John Wiley & Sons. 588p.
- Ribeiro, R.D. & Lima, H.C. 2009. Riqueza e distribuição geográfica de espécies arbóreas da família Leguminosae e implicações para conservação no centro de diversidade vegetal de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia** 60 (1): 111-127.
- Sari, L.T. & Ribeiro-Costa, C.S. 2005. Predação de sementes de *Senna multijuga* (Rich.) H.S. Irwin & Barneby (Caesalpinaceae) por bruquíneos (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology** 34 (3): 521-525.
- Silva, A.L.G., Ormond, W.T. & Pinheiro, M.C.B. 2002. Sucesso Reprodutivo de *Senna australis* (Vell.) Irwin & Barneby (Fabaceae - Caesalpinioideae). **Boletim do Museu Nacional – Nova Série Botânica** 120: 1-12.
- Silva, L.A., Maimoni-Rodella, R.C.S.; Rossi, M.N. 2007. A preliminary investigation of pre - dispersal seed predation by *Acanthoscelides schrankiae* Horn (Coleoptera: Bruchidae) in *Mimosa bimucronata* (DC.) Kuntze trees. **Neotropical Entomology** 36, 197-202.
- Tsuda, E.T., Almeida, V.P. 2012. Estudo do potencial reprodutivo de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) em um fragmento de Cerrado no município de Sorocaba, SP. **Revista Eletrônica de Biologia** 5 (1): 64-80. ISSN 1983-7682.

Figuras



Figura 1. Fotografia de frutos de sementes de *S. glazioviana* em seu habitat natural. A. Frutos; B. Fruto aberto mostrando sete sementes viáveis.



Figura 2. Frutos predados de *S. glazioviana*. A seta em vermelho indica a porção rompida do fruto.



Figura 3. Frutos de *S. glazioviana* predados nas árvores.

**MICROSATELLITE MARKERS FOR CONSERVATION GENETICS OF
SWARTZIA GLAZIOVIANA (TAUB.) GLAZ. (LEGUMINOSAE), AN
ENDEMIC AND THREATENED TREE SPECIES OF THE BRAZILIAN
ATLANTIC FOREST**

Janaína Spoladore^{1,2}, Vidal de Freitas Mansano^{1,2}, Luan Carlos Dias de Freitas¹,
Alexandre Magno Sebbenn³ & Maristerra Rodrigues Lemes^{1,2}

¹Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Diretoria de Pesquisas, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, ²Programa de Pós Graduação em Botânica Tropical, Escola Nacional de Botânica, ¹Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, ³Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, Piracicaba, SP, Brasil. janspoladore@gmail.com

Swartzia glazioviana is an endemic tree of the seasonal forests in the central coast of Rio de Janeiro state, Brazil. This species occurs in patches and vegetative propagation is speculated as a possible mode of reproduction. The populations of *S. glazioviana* are highly threatened due to habitat destruction and fragmentation, which may compromise their viability as evolutionary units by reduction of its sizes and levels of genetic diversity. The present work reports the development and characterization of eight microsatellite markers for *S. glazioviana* aiming to provide informative tools for population and conservation genetics studies. For isolation of SSR loci a genomic library enriched for CT and GT repeats was constructed. Total genomic DNA was extracted from leaves of an adult of *S. glazioviana* and cleaved with *Afa*I. Fragments containing microsatellites were selected using magnetic beads linked to streptavidin. Enriched DNA was ligated into a *pGEM-T* Easy cloning vector and transformed into *Escherichia coli*. Microsatellite repeats were found in 38 (40%) of 96 sequenced clones and primers were designed for 20 clones using *Primer3*. Of the 20 designed primers, ten amplified clearly interpretable PCR on agarose gels. Eight out of 20 showed polymorphisms in a 3500XL sequencer (Life Technologies). The eight polymorphic SSR loci were characterized by genotyping 96 adults of *S. glazioviana* collected from three populations. We found 94 alleles over eight SSR loci (mean = 11.7). The mean observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities were 0.674 and 0.785, respectively. The fixation index (F) was significantly higher than zero (0.138), suggesting inbreeding due self-fertilization or mating among relatives. The genetic differentiation among the populations was low ($F_{ST}= 0,063$; $R_{ST}= 0,084$). The combined probability of genetic identity was 3.3×10^{-11} and combined probability of paternity exclusion was 0.999994, indicating the highly individual discriminative

power of the loci. Preliminary analysis showed successful transferability of these SSR markers for other species of *Swartzia* (*S. flaemingii*, *S. macrostachya* and *S. langsdorffii*). These microsatellites will allow precise estimates of gene flow and mating system, thus providing important insights into population and conservation genetics of *S. glazioviana*. (CNPq, FAPERJ)

Palavras-chave: Population genetics, SSR loci, Conservation.

