

ÉRICA MANGARAVITE

**ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA NO COMPLEXO
Cedrela fissilis (MELIACEAE) ESTIMADAS COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M277e
2012

Mangaravite, Érica, 1987-
Estrutura e diversidade genética no complexo
Cedrela fissilis (Meliaceae) estimadas com marcadores
microsatélites / Érica Mangaravite. – Viçosa, MG, 2012.
viii, 32f. : il. ; (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Luiz Orlando de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 26-32

1. *Cedrela fissilis* - Genética. 2. *Cedrela fissilis* -
Distribuição geográfica. 3. Filogeografia. 4. Genética florestal.
5. Diversidade de plantas - Conservação. 6. Genética de
populações. 7. Microsatélites (Genética). I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento.
II. Título.

CDD 22. ed. 583.77

ÉRICA MANGARAVITE

**ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA NO COMPLEXO
Cedrela fissilis (MELIACEAE) ESTIMADAS COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento para a obtenção do título de *Magister Scientiae*

Aprovada em 5 de Setembro de 2012.

João Augusto Alves Meira Neto

Christina Cleo Vinson
(Coorientadora)

Luiz Orlando de Oliveira
(Orientador)

Aos meus pais, José Carlos e Maria Julia,

Ao namorado, Diego Volpini,

Aos irmãos, Igor e Vitor,

Dedico!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realizar o mestrado em Genética e Melhoramento e de cumprir este trabalho.

À CAPES e ao CNPq, pela concessão de bolsa e financiamento. Ao Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, pelo uso do Sequenciador. Ao Prof. Braz e aos colegas Cristiano e Rogério pela ajuda nas coletas. À Magali, por todo material de *Cedrela* coletado durante o seu doutorado.

Ao professor Luiz Orlando, pela orientação, dedicação, paciência, por todos os ensinamentos e por depositar tanta confiança em mim.

Aos co-orientadores, Christina e Everaldo. Em especial, à Christina, pela dedicação, companheirismo, amizade, paciência e por todos os ensinamentos. A todos os professores que colaboraram com a minha formação acadêmico-profissional neste um ano e meio.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Filogeografia, Juliana, Vanderson, Christina, Thaís, Alberto, Thamyres, Alexander, Ana Paula, Amanda, Hugo, Flávio, Lucas, Gislaine, Lis, Rafaela, Larissa, Camila; aos que não estão mais no laboratório, Silvana, Magali, Lídia, Cassiana e Carol; ao primeiro e único estagiário, Vitor, e aos amigos que adquiri de em Viçosa depois que vim para cá, Bárbara, Luis Felipe, Iara, David, Thomas, Cláudia, Kátia e Brenda; a todos, pelo companheirismo, amizade, pelas boas gargalhadas, pelas confraternizações e ajuda fornecida, direta ou indiretamente, durante o período do meu trabalho, muito obrigada por poder contar com vocês!

Aos amigos que conheci antes de vir para Viçosa, Samuel, Ariádine, Fernanda, Alan e Leandro; muito obrigada pelo estágio, curso, apoio e amizade, colaborando para que a minha vinda para cá desse tudo certo!

Às irmãs acadêmicas e amigas de Alegre, Angélica e Sara, juntamente com os professores Marcia e Adésio, pela amizade e continuação dos trabalhos iniciados na minha graduação.

Aos amigos Thaís (Thatha) e Guilherme, pela companhia e boas risadas! Às minhas amigas de sempre da Sister&cia Franciele (Fran), Michelle (Irmã Mi) e Schalana (Schal), muito obrigada pelo carinho, confiança, companheirismo e pela

amizade eterna. À minha amiga-irmã, Lidiane (Lidi), a irmã que Deus me deu, fonte de amor e sinceridade, muito obrigada pelo companheirismo e pelos dez anos de amizade.

Aos meus irmãos, Igor e Vítor, pela alegria e amor, indispensáveis em minha vida, sou eternamente apaixonada por vocês. À minha cunhada Julyara muito obrigada pelo carinho e amizade!

Ao meu namorado, Diego, por estar ao meu lado nestes sete anos de namoro, me acompanhando e apoiando sempre em todas as minhas decisões. Por ser compreensivo e paciente! Por me mostrar a importância da fé em cada dia! Muito obrigada pela amizade, carinho e principalmente por me mostrar o verdadeiro amor!

Aos meus pais, José Carlos e Maria Julia, pelos exemplos de vida, pelos conselhos, carinho, pelos ensinamentos de fé e honestidade, pelo amor sem tamanho, por sempre me apoiarem e incentivarem meus estudos, pela confiança e pela disposição em me ajudar durante toda a realização do meu trabalho. Eu amo vocês infinitamente, e espero um dia poder retribuir todo o amor!

À Deus! Meu Pai, muito obrigada! Ao Senhor Jesus, obrigada por tantas bênçãos! Pelo seu amor sincero e gratuito, mesmo diante das minhas imperfeições, por me conduzir sempre para a direção certa, colocando pessoas especiais que enchem minha vida de alegria! Obrigada por ter feito TUDO SEMPRE dar certo! Por todos os dons concedidos! Obrigada pelo Teu Espírito Santo que sempre me acompanha, passo a passo, na minha caminhada! Obrigada, Nossa Senhora, Mãesinha linda, pelo amor infinito, pela intercessão de cada dia, pelo seu colo nos momentos em que fraquejei, pelo seu exemplo de fé e serviço! Senhor Deus, o meu pedido de hoje é apenas: ensina-me a Te agradecer!

BIOGRAFIA

ÉRICA MANGARAVITE, filha de José Carlos Soares Mangaravite e Maria Julia de Medeiros Mangaravite, nasceu na cidade de Cachoeiro de Itapemirim, Espírito Santo (ES), em 13 de outubro de 1987.

Concluiu o Ensino Fundamental em 2001, na Escola Estadual de Ensino Fundamental e Médio “Waldemiro Hemerly” em Rio Novo do Sul-ES e o ensino médio em 2004, na Escola de Ensino Médio “Guimarães Rosa”, em Cachoeiro de Itapemirim-ES.

Graduou-se no Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, na modalidade bacharelado, em fevereiro de 2011.

Em março de 2011, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração Genética Vegetal, na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	3
1. Estratégia de Amostragem	3
2. Extração de DNA e análise de marcadores microsatélites	3
3. Análise de dados	7
3.1. <i>Análises dentro de populações</i>	7
3.2. <i>Análises entre populações</i>	7
RESULTADOS.....	9
1. Diversidade genética dos locos microsatélites	9
2. Diferenciação entre populações	9
3. Estrutura genética populacional	12
DISCUSSÃO	19
1. Avaliação da diversidade entre e dentro das populações	19
2. Avaliação da diversidade e estrutura entre e dentro das áreas de distribuição.....	20
3. Implicações para conservação.....	23
CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS.....	26

RESUMO

MANGARAVITE, Érica, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2012. **Estrutura e diversidade genética no complexo *Cedrela fissilis* (Meliaceae) estimadas com marcadores microssatélites.** Orientador: Luiz Orlando de Oliveira. Coorientadores: Christina Cleo Vinson e Everaldo Gonçalves de Barros.

O conhecimento de como a variação genética está dividida nas populações pode ter implicações importantes na biologia evolutiva, ecológica e na conservação. A espécie *Cedrela fissilis* (Meliaceae) é uma espécie arbórea associada à Floresta Estacional e Ombrófila. Além disso, esta espécie é considerada “ameaçada” na lista vermelha de espécies da IUCN devido à perda de habitat e ao alto valor econômico da sua madeira. *C. fissilis* é formada por duas linhagens genealógicas não monofiléticas, compreendendo sequências de *C. odorata* e *C. balansae* e, portanto, denominadas de complexo *C. fissilis*. O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética intra e interpopulacional do complexo *C. fissilis* no Brasil e Bolívia. Oito microssatélites foram utilizados para genotipar 245 indivíduos e foram obtidos elevados valores de heterozigosidades ($H_O=0,73$; $H_E=0,81$), com valores de F_{IS} positivos ($F_{IS}=0,11$), indicando excesso de homozigotos. Para AMOVA, 94,39% da variação foram dentro de populações e 5,61% entre populações e que também refletiu em baixos valores de divergência genética ($F_{ST}=0,075$). As populações da área de distribuição do Atlântico se mostraram ligeiramente mais diversificadas, com 20 dos 37 alelos privados encontrados e apresentaram valor de F_{ST} ($F_{ST}=0,063$) maior que as populações do AC ($F_{ST}=0,022$). Foi constatada fraca estruturação das populações, exibindo um número de grupos igual a oito, sendo maior que o número de linhagens conhecidas, com base em sequências de DNA. A baixa diferença interpopulacional encontrada sugere iguais mecanismos de manejo para conservação. Além disso, algumas populações apresentaram relevância de conservação devido à presença de material genético peculiar e às características de refúgio.

ABSTRACT

MANGARAVITE, Érica, M.Sc., Universidade Federal Viçosa, September, 2012. **Genetic structure and diversity of *Cedrela fissilis* complex (Meliaceae) estimated with microsatellite markers.** Adviser: Luiz Orlando de Oliveira. Co-advisers: Christina Cleo Vinson and Everaldo Gonçalves de Barros.

The knowledge of how genetic variation is partitioned among populations may have important implications in evolutionary, ecology and conservation biology. The *Cedrela fissilis* species (Meliaceae) is a tree associated with Seasonal and Moist Forest. In addition, this species is considered "endangered" on the red list of the IUCN due to the loss of habitat and its high timber value. *C. fissilis* is formed by two phylogenetic lineages that are not a monophyletic clade, comprising sequences of *C. odorata* and *C. balansae*, called *C. fissilis* complex. The aim of this study was to characterize the genetic diversity of *C. fissilis* complex intra and inter populations in Brazil and Bolivia. Eight microsatellites were used to genotype 245 individuals, then it was obtained high values of heterozygosity ($H_O=0.73$, $H_E=0.81$), with positive values of F_{IS} ($F_{IS}=0.11$), indicating excess of homozygotes. For AMOVA, 94.39% of the variation were within populations and 5.61% were among populations which also reflected low levels of genetic divergence ($F_{ST}=0.075$). The populations of the Atlantic range showed slightly more diverse, with 20 of 37 private alleles found. It presented F_{ST} value ($F_{ST}=0.063$) greater than the populations of Amazonic-Chiquitano range ($F_{ST}=0.022$). It has been found weak populations structure showing a number of groups equal to eight and being greater than the number of known phylogenetic lineages based on DNA sequences. The low interpopulation differences found suggest the same mechanisms for conservation management. Furthermore, some populations showed conservation relevance due to the presence of peculiar genetic material and characteristics of refuge.

INTRODUÇÃO

Florestas estacionais caracterizam-se por dupla estacionalidade climática, apresentado um período de estação chuvosa seguido por longo período seco (chegando a mais de cinco meses consecutivos), ou ainda em áreas onde não ocorre período seco, o intenso frio do inverno, com temperaturas médias inferiores a 15° C, provoca seca fisiológica (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000, VELOSO et al., 1991). Estas florestas representam um ecossistema amplamente ameaçado na Bolívia (STEININGER et al., 2001) e no Brasil (FUNDAÇÃO SOS Mata Atlântica; INPE, 2010), cerca de 60% se encontram altamente destruídas na América do Sul (MILES et al., 2006). As causas vão desde mudanças climáticas, passando por fragmentação de habitat, fogo, densidade populacional e agricultura (MILES et al., 2006), sobretudo devido a sua ocorrência em solos altamente férteis (OLIVEIRA-FILHO et al., 1994).

O conhecimento de como a variação genética está dividida entre e dentro das populações pode ter implicações importantes não só na biologia evolutiva e ecológica, mas também na biologia da conservação (BALLOUX et al., 2002). A diversidade genética é um fator importante para a sobrevivência das populações em ambientes variáveis, e é reconhecida como um componente fundamental da biodiversidade (MACE et al., 1996). Estudar diversidade genética em espécies arbóreas é fundamental, devido à importância que elas apresentam na estruturação dos ecossistemas e, principalmente, pelo fato de espécies ou populações, com reduzida diversidade genética, apresentarem risco de sobrevivência diante de adversidades bióticas ou abióticas.

O gênero *Cedrela* pertence à família Meliaceae, é monofilético e compreende 17 espécies de árvores decíduas que ocorrem na América do Sul e Central. No Brasil, a espécie *C. fissilis* Vell. apresenta distribuição ampla, ocorrendo em diversos tipos florestais, de florestas estacionais semidecíduas a florestas de galeria e vegetação do cerrado (PENNINGTON; MUELLNER, 2010). Popularmente conhecida como cedro branco, *C. fissilis* apresenta características de alternância na condição de heliófita ou esciófita (LORENZI, 2002). Considerando o grupo sucessional, cedro é uma espécie que se comporta como secundária inicial ou secundária tardia. Ocorre tanto na floresta primária, principalmente nas bordas da mata ou clareiras, como na floresta secundária (CARVALHO, 2003). Com a perda de habitat somada ao alto valor econômico de sua madeira, a espécie *C. fissilis* se encontra “ameaçada A1acd+2cd” na lista vermelha de

espécies ameaçadas da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) (IUCN, 2012).

Garcia et al. (2011) exploraram as relações filogenéticas e filogeográficas do gênero *Cedrela* utilizando sequências da região completa dos espaçadores internos transcritos (ITS) dos genes nucleares de RNA ribossomal 18S-26S e de três regiões cloroplastídicas (espaçadores trnT-trnL; espaçadores trnS-trnG; e genes psbB, psbT e psbN). Foi constatado que a espécie *C. fissilis* é formada por duas linhagens genealógicas distintas, separadas pelo Cerrado, uma localizada a oeste e outra a leste deste domínio. Além disso, esta espécie não forma um clado monofilético, compreendendo sequências de *C. odorata* e *C. balansae*. A espécie *C. odorata* é formada por diferentes entidades não bem delimitadas (MUELLNER et al., 2009), e a presente neste clado de *C. fissilis* é a que ocorre no Brasil.

Marcadores moleculares microssatélites são ferramentas importantes e que vem sendo amplamente utilizadas para estudos de diversidade genética de populações, filogeografia, taxonomia e filogenia, mapeamento genético, genômica funcional, seleção assistida, testes de paternidade e genética forense. Microssatélites (LITT; LUTY, 1989) são pequenas sequências, de um a seis pares de base, repetidas em tandem, que também são chamadas de SSR (*Simple Sequence Repeats*, JACOB et al., 1991) ou STR (*Short Tandem Repeats*, EDWARDS et al., 1991). Apresentam distribuição randômica e dispersa ($10^4 - 10^5$) no genoma (TAUTZ, 1993); são bastante abundantes em plantas (DELSENY et al., 1983; TAUTZ; RENZ, 1984), são multi-aleléticos, com alto grau de polimorfismo de comprimento (ZANE et al., 2002); são codominantes, a maioria seletivamente neutros (CHARLESWORTH et al., 1994) e apresentam alta taxa de mutação (SCHLÖTTERER, 2000). Com isso, estes marcadores são altamente informativos e muito eficientes (ver Kalia et al. (2011) para detalhes deste tipo de marcador).

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar a diversidade genética intra e interpopulacional do complexo *Cedrela fissilis* no Brasil e Bolívia, bem como realizar inferências filogeográficas. Como objetivos específicos responder às seguintes questões: (1) Como a diversidade genética está particionada entre e dentro de populações? (2) Como a diversidade genética ocorre entre e dentro dos grupos regionais? Há alguma correspondência da estrutura genética obtida por marcadores microssatélites com as linhagens genealógicas reveladas por estudos filogeográficos precedentes? (3) Quais as implicações para conservação da espécie?

MATERIAL E MÉTODOS

1. Estratégia de Amostragem

Os indivíduos de *Cedrela fissilis* estudados serão denominados de complexo *C. fissilis*, uma vez que se trata de um grupo não monofilético (GARCIA et al, 2011). Foram utilizados 245 indivíduos amostrados no Brasil e Bolívia. O tamanho médio foi de 13,61 indivíduos por população. Sete populações foram coletadas na área de distribuição Amazônico-Chiquitano (AC), situado a oeste do Cerrado, oito na área de distribuição do Atlântico, a leste do Cerrado, e três populações na região central, equidistantes às duas áreas (Figura 1; Tabela 1). Indivíduos distantes até 50 km foram agrupados em uma mesma população, excetuando a população de Tocantins em que indivíduos foram agrupados com até 75 km de distância.

2. Extração de DNA e análise de marcadores microssatélites

Foram coletadas folhas jovens de sete populações, armazenadas em sílica e extraídas segundo o protocolo de Cota-Sánchez et al. (2006) com as modificações de Riahi et al. (2010), demais onze populações estavam presentes na coleção utilizada por Garcia et al. (2011).

Onze marcadores microssatélites foram utilizados para genotipar as populações em estudo. Oito marcadores (Ced2, Ced18, Ced41, Ced44, Ced54, Ced65, Ced95 e Ced131) foram obtidos de bancos públicos (NCBI, 2011) e três marcadores (CF26, CF34 e CF66) foram descritos por Gandara (2009). Uma vez que o *primer* CF66 fornece dois locos (CF66A e CF66B), foram obtidos 12 locos (Tabela 2). As reações de polimerase em cadeia (PCR) foram conduzidas em sistema multiplex (multiplex Ced41-Ced54-Ced95-Ced131) e pseudomultiplex (duplex Ced2-Ced65; duplex Ced18-CF26; duplex CF66-CF34; e simplex Ced44) com volume final de 12 μ L, contendo 10 ng de DNA, 1X tampão (10 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1% Triton X-100), 0,2 μ M de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mg/mL de BSA (*Bovine Serum Albumin*, Invitrogen), 0,2 mM de dNTPs e 0,5 U de Taq DNA Polimerase (Phoneutria Biotecnologia). O programa utilizado no termociclador (Vapo Protect Eppendorf Thermal Cycler) foi o descrito por Gandara (2009) e consiste de 96°C por 2

minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e, por fim, 72°C por 7 minutos.

O *primers forwards* de cada par foram marcados com as fluorescências 6-FAM, HEX (MWG-Biotech) e NED (Applied Biosystems) para a realização de genotipagem (Tabela 2). Os fragmentos foram mensurados no sequenciador 96 capilares ABI PRISM 3130x1 DNA Analyser (Applied Biosystems) utilizando o tamanho padrão Rox 500 (Applied Biosystems). Os fragmentos foram analisados no software GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems). Informações obtidas por dois *primers* não foram utilizadas; dados do *primer* Ced95 foram removidos por excesso de dados perdidos (55,51%) e dados do *primer* CF34, que revelaram perfil tetraploide. A porcentagem média de dados perdidos nos dez locos restantes foi de 9,88%, variando de 0,41% (CF66A) a 28,57% (Ced44).

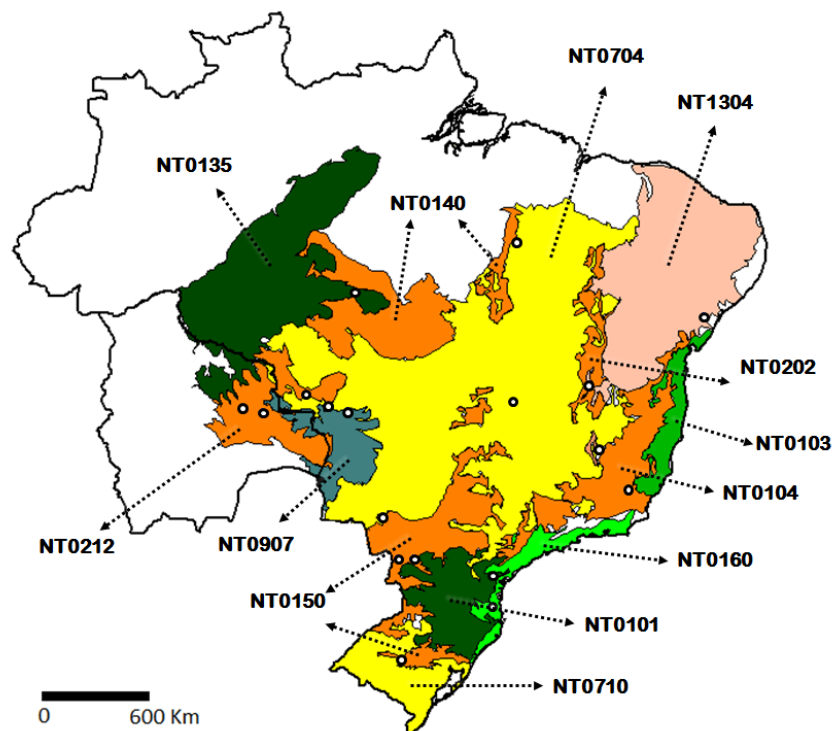


Figura 1. Distribuição geográfica das 18 populações do complexo *Cedrela fissilis* (círculos brancos) e formações vegetais associadas. Ecorregiões terrestres (OLSON et al., 2001) são as seguintes: NT0101, *Araucaria moist forest*; NT0103, *Bahia coastal forest*; NT0104, *Bahia interior forests*; NT0135, *Madeira-Tapajós moist forest*; NT0150, *Paraná-Paraíba interior forests*; NT0160, *Serra do Mar coastal forests*; NT0202, *Atlantic dry forests*; NT0212, *Chiquitano dry forests*; NT0704, *Cerrado*; NT0710, *Uruguayan savanna*, NT1304, *Caatinga*; NT0140, *Mato Grosso seasonal forest* e NT0907, *Pantanal*. Código de cores: verde: Floresta Ombrófila; laranja: Floresta Estacional; amarelo: Savana; rosa: Caatinga e azul: Pantanal.

Tabela 1. Populações do complexo *Cedrela fissilis* amostradas, com seus respectivos códigos, ecorregiões, coordenadas geográficas e tamanho amostral. Código de cores: verde: Floresta Ombrófila; laranja: Floresta Estacional.

Ecorregião	População (código)	Tamanho amostral	Latitude	Longitude
Área de distribuição Amazônico-Chiquitano (AC)				
NT0135	Alta Floresta/MT (ALT)	21	-09 53' 56,97"	-56 09' 16,12"
NT0212	Cáceres/MT (CAC)	4	-16 04' 35,43"	-57 36' 14,96"
NT0212	Concepción e San Ramón/Bolívia (BO1)	15	-16 07' 51,87"	-62 00' 19,71"
NT0212	Figueirópolis D'Oeste/MT (FIG)	22	-15 26' 43,80"	-58 44' 25,73"
NT0212	San Ignacio e Carmen Ruiz/Bolívia (BO2)	10	-16 22' 16,99"	-60 57' 25,61"
NT0705	Tocantins (TOC)	9	-07 12' 26,92"	-47 45' 49,04"
NT0907	Poconé/MT (POC)	22	-16 19' 08,50"	-56 31' 52,50"
Área de distribuição Cerrado				
NT0705	Brasília/DF (BRA)	2	-15 46' 47,00"	-47 55' 47,00"
NT0150	Itaporã/MS (ITA)	9	-22 00' 09,68"	-54 42' 52,59"
NT0202	Januária/MG (JAN)	9	-15 11' 22,56"	-44 12' 24,48"
Área de distribuição do Atlântico				
NT0160	Blumenau/SC (BLU)	18	-26 55' 07,51"	-49 03' 57,69"
NT0150	Campinhos/PR (CAM)	7	-25 2' 17,00"	-49 5' 26,00"
NT0104	Caparaó/MG (CAP)	35	-20 31' 45,60"	-41 55' 14,10"
NT0150	Palotina/PR (PAL)	26	-24 18' 34,29"	-53 54' 32,15"
NT0150	Santa Maria/MS (SMA)	5	-29 43' 03,94"	-53 43' 29,04"
NT0150	Três Barras do Paraná/PR (TBP)	13	-24 18' 34,29"	-53 07' 37,28"
NT0704	Diamantina/MG (DIA)	8	-18 24' 33,60"	-43 29' 24,70"
NT1304	Sergipe (SER)	10	-11 10' 24,55"	-38 00' 50,14"
TOTAL		245		

Tabela 2. Informações sobre dez locos de microssatélites utilizados: fonte, loco, sequências dos *primers*, repetição de microssatélites, fluorescência utilizada na marcação dos *primers*, o número total de alelos por loco (N_A) e a amplitude alélica em pares de base (pb).

Fonte	Loco	Sequencia do <i>primer</i> (5'-3')	Repetição	Fluorescência	N_A	Amplitude alélica (pb)
NCBI, 2011	Ced2	F: TTTGCTTTGAGAAACCTTGT R: AACTTTCGAATTGGTTAAGG	(GA) ₂₀	6-FAM (MWG-Biotech)	30	131-241
	Ced44	F: ACTCCATTAAGTCCATGAA R: ATTTTCATTCCCTTTTAGCC	(TG) ₁₄ (AG) ₁₇	6-FAM (MWG-Biotech)	29	162-224
	Ced54	F: GATCTCACCCACTTGAAAAA R: GTCATATTTGAGAGGCATT	(GA) ₁₅ (AG) ₆ G(GA) ₅	6-FAM (MWG-Biotech)	18	172-218
	Ced18	F: CAAAGACCAAGATTTGATGC R: ACTATGGGTGGCACAACACTAC	(GA) ₂₃	HEX (MWG-Biotech)	21	113-161
	Ced41	F: TCATTCTTGGATCCTGCTAT R: GTGGGAAAGATTGTGAAGAA	(TC) ₁₈	HEX (MWG-Biotech)	23	110-158
	Ced65	F: GAGTGAGAAGAAGAATCGTGATAGC R: GAGGTTCGATCAGGTCTTGG	(GA) ₇ (CA) ₁₄	HEX (MWG-Biotech)	15	157-193
	Ced131	F: CTCGTAATAATCCCATTCCA R: GGAGATATTTTGGGGTTTT	(CT) ₁₆	NED (Applied Biosystems)	24	66-128
Gandara, 2009	CF26	F: CCAAATCCAGAGGAGAG R: GTTCTGCTTCATCGAAGG	(AG/TC) ₁₃ *	6-FAM (MWG-Biotech)	23	139-187
	CF66A	F: CAGCAGTTCTGAAACAGTAA R: ATTCAGCAACTTGAGAGC	(AG/TC) ₁₃ *	6-FAM (MWG-Biotech)	28	113-175
	CF66A		(AG/TC) ₁₃ *		24	199-253

Legenda: (*) Oligonucleotídeo que enriqueceu a biblioteca utilizada, a repetição exata não foi citada pelo autor (GANDARA, 2009).

3. Análise de dados

3.1. Análises dentro de populações

Para análises descritivas de diversidade genética foi utilizado o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2001). Foram computadas, em cada população, número médio de alelos por locos ($A/loco$); número de alelos privados ($A_{PRIV.}$); heterozigosidade esperada (H_E); heterozigosidade observada (H_O); coeficiente de endogamia (F_{IS}) (WRIGHT, 1951); desequilíbrio de ligação nos locos; além do desvio de zero das proporções de genótipos em EHW, avaliado por permutações alélicas dentro das populações segundo o teste exato de Fisher descrito por Weir (1996). A frequência de alelos nulos e erros de pontuação foi estimado usando o software MICROCHECKER v. 2.2.3 (OOSTERHOUT et al., 2004).

3.2. Análises entre populações

Os parâmetros de Weir e Cockerham (1984) foram estimados: índices de fixação dentro das populações (F_{IS}); índice de fixação total (F_{IT}) e divergência genética entre populações (F_{ST}); além do índice G_{ST} (NEI, 1973) e a estimativa R_{ST} (SLATKIN, 1995) utilizando o software F_{STAT} 2.9.3.2 (GOUDET, 1995). Estes índices foram estimados para as 18 populações e também, separadamente, para as diferentes áreas de distribuição Amazônico-Chiquitano (AC), Central e Atlântico, mencionados na Tabela 1. Para estas análises foi utilizado o método de reamostragem *bootstrap*, com 95% de intervalo de confiança, com 1000 permutações. O índice G_{ST} é análogo ao F_{ST} , que assume um modelo de alelo infinito. Já o R_{ST} , que também avalia divergência entre populações, é baseado no tamanho do alelo. Espera-se que R_{ST} seja maior que F_{ST} se o modelo de mutação *stepwise*, existente para microssatélite, contribuir para diferenciação.

A diferenciação das populações por análises de variância molecular (AMOVA), para diferenças intra e interpopulacional, foi obtida no software Arlequin v. 3.1 (EXCOFFIER et al., 2006). Também foi realizada AMOVA com dados particionados nos três grupos AC, Centro e Atlântico (Tabela 1). A significância foi testada com 1000 permutações.

Foi obtida uma matriz de pares de F_{ST} (WEIR; HILL, 2002) entre as 18 populações calculadas no software Arlequin v. 3.1 (EXCOFFIER et al., 2006). O fluxo gênico médio foi estimado assumindo que $Nm=[1/(F_{ST} -1)]/4$ (WHITLOCK; MCCAULEY, 1999) e o número absoluto de migrantes ($M=2Nm$) entre populações também foi estimado com base em F_{ST} , usando o programa Arlequin v.3.1 (EXCOFFIER et al., 2006).

As relações genéticas entre populações foram avaliadas através de uma árvore de *Neighbor-Joining* gerada com base na distância genética D_A (NEI et al., 1983) utilizando o software Populations 1.2.30 (LANGELLA, 1999). A significância da melhor topologia foi estimada com 1000 permutações.

A inferência de grupos genéticos, nos indivíduos do complexo *C. fissilis* utilizados, foi feita com uma abordagem Bayesiana *Monte Carlo Markov Chain* (MCMC), implementando o software STRUCTURE v 2.2 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2007). Foram utilizados valores *default* para a maioria dos parâmetros do software como recomendado no manual do usuário. Especificamente, foi escolhido o modelo *Admixture* e correlação de frequências alélicas entre populações, por ser considerada a melhor por Falush et al. (2003). Foram realizadas 10 corridas, o *burnin* foi um conjunto de 500 000 replicações seguidas por 1 000 000 de passos de MCMC para um número de grupos variando de $K=2$ a $K=10$. Para a obtenção do melhor K , o critério utilizado foi ambos $\ln [\Pr (X|K)]$ (PRITCHARD et al., 2000) e ΔK , como sugerido por Evanno et al. (2005).

Para examinar a existência de grupos entre os indivíduos, Análises de Componentes Principais (*PCA*) foram realizadas a partir dos valores de cada K nos indivíduos, sendo utilizado o programa GENES (CRUZ, 2008). As três principais componentes foram plotadas em gráfico 3D no programa SigmaPlot v. 12.0.

RESULTADOS

1. Diversidade genética dos locos microssatélites

Os *primers* Ced65 e CF26 apresentaram alelos nulos com frequência de 0,1890 e 0,1981, respectivamente, sendo desconsiderados das análises seguintes. Nenhum loco desviou as proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg e os testes de probabilidade de desequilíbrio de ligação em todas as populações não mostraram associações entre os locos. Foram identificados 197 alelos nos oito locos avaliados, variando de 18 a 30 alelos cada, com uma média de 24,62 alelos por loco (Tabela 2). Com exceção das populações SER e ALT, todas as populações apresentaram alelos privados, que somam um total de 37. A região do Atlântico apresentou mais alelos exclusivos ($A_{PRIV.}=20$) que as demais regiões AC ($A_{PRIV.}=13$) e Central ($A_{PRIV.}=4$). A heterozigosidade observada variou de 0,5 (BRA) a 0,84 (TBP), com média (\pm DP) de 0,73 (\pm 0,079) e foi pouco inferior à heterozigosidade esperada, que variou de 0,56 (BRA) a 0,88 (TBP), com média (\pm DP) de $0,81 \pm 0,073$, mostrando a elevada diversidade genética encontrada. Analisando as populações em grupos, a heterozigosidade observada na região do Atlântico ($H_O=0,75$) foi maior que as obtidas nas regiões AC ($H_O=0,72$) e Central ($H_O=0,67$). Em relação à heterozigosidade esperada, a região Central apresentou menor valor ($H_E=0,67$) em relação às demais ($H_O=0,82$). Os coeficientes de endogamia (F_{IS}) foram positivos para todas as 18 populações, variando de 0,04 (TBP) a 0,21 (ALT) com uma média de 0,11, indicando excesso de homozigotos. Este coeficiente foi maior nas regiões AC e Central ($F_{IS}=0,12$) que o obtido na região Atlântico ($F_{IS}=0,09$) (Tabela 3).

2. Diferenciação entre populações

Os índices de diversidades mostraram pouca distinção entre as 18 populações avaliadas ($G_{ST}=0,085$; $F_{ST}=0,075$; $R_{ST}=0,1154$) e endogamia presente ($F_{IS} = 0,102$). Os índices estimados foram diferentes entre os três grupos. A região Central apresentou maior endogamia ($F_{IS}=0,123$) e diferenciação ($F_{ST}=0,147$), mas que pode não ter significado biológico devido ao reduzido número de populações e por considerar uma população com apenas dois indivíduos (BRA), assim, a diferenciação entre AC e

Atlântico apresenta maior relevância. A área de distribuição AC apresentou baixa distância genética entre as populações ($F_{ST}=0,022$) enquanto que foi constatado maior coeficiente de endogamia ($F_{IS}=0,121$), inferindo maior número de cruzamento entre aparentados, o que torna as populações mais homogêneas quando comparadas com as populações do Atlântico. Estas, por sua vez, apresentaram menor coeficiente de endogamia ($F_{IS}=0,088$) e maior índice de diferenciação entre populações ($F_{ST}=0,063$) e ainda é um valor baixo. Avaliando as 18 populações, pôde-se observar um R_{ST} maior ($R_{ST}=0,1154$) que o F_{ST} ($F_{ST}=0,075$), bem como para as populações agrupadas de acordo com a região, o que exhibe uma contribuição do modelo de mutação *stepwise* para diferenciação existente (Tabela 4).

A análise de variância molecular (AMOVA) considerando dois níveis hierárquicos indicou elevada variação dentro de população (94,39%, $\Phi_{ST}=0,056$, $P<0,001$). Do mesmo modo, a AMOVA com três níveis hierárquicos, em que as populações foram agrupadas em área de distribuição (Amazônico-Chiquitano, Central e Atlântico), apresentou índices de fixação baixos, significativos ($\Phi_{ST}=0,069$, $\Phi_{SC}=0,033$ e $\Phi_{CT}=0,037$; $P<0,001$) e também com maior variância dentro de populações (93,02%). Posteriormente, a AMOVA foi calculada separadamente para cada grupo e em todos foi apresentada maior diversidade dentro de populações. O Atlântico exibiu 94,17% ($\Phi_{ST}=0,058$; $P<0,001$) da variação dentro e a região Central com 88,55% ($\Phi_{ST}=0,114$; $P<0,001$), que é menor e corrobora o maior F_{ST} mencionado anteriormente. A região AC apresentou 101,01% de variação dentro das populações indicando que estas populações sejam mais semelhantes entre elas ($\Phi_{ST}= -0,010$; $P<0,001$) (Tabela 5).

Entre as 153 comparações de pares de F_{ST} (WEIR; HILL, 2002) entre populações, 35,29% não foram significativos ($P<0,05$). Os pares significativos variaram de 0,026 (PAL x CAP) a 0,2405 (BRA x CAC). As populações BRA (F_{ST} variado de 0,1334 a 0,2405) e SER (F_{ST} variado de 0,0843 a 0,2302) se mostraram mais divergente das demais. Entretanto, BRA apresenta apenas dois indivíduos, este índice pode não refletir a realidade biológica para demais indivíduos desta população. Avaliando os pares de F_{ST} entre os grupos, menores valores foram observados nos pares entre populações da área de distribuição AC, com apenas um valor significativo (0,0300, POC x ALT), e populações área de distribuição do Atlântico, com média 0,08533, enquanto as populações da região central se mostraram mais diversificadas, com média 0,157 entre elas (Tabela 6). A análise do número absoluto de migrantes, também apresentada na tabela 6, entre as populações da região AC variou de 13,333 (ALT x CAC) a 225,985

(CAC x FIG), com média de 76,825; entre as populações do Atlântico, variou 2,256 (DIA x SER) a 1174,788 (TBP x PAL), com média 61,037, indicando a maior possibilidade de fluxo entre as populações do AC, mesmo com o elevado valor estimado de migrantes entre as populações TBP e PAL do Atlântico, ultrapassando mil indivíduos. Este número pode ser explicado devido à baixa distância genética entre elas ($F_{ST}=0,004$), apesar de não significativa, e também à proximidade física entre estas populações (79 km). Quando comparado os valores de $2Nm$ entre populações de grupos diferentes, é revelado maior número de migrantes entre as populações da região Central com as do AC ($Nm_{\text{médio}}=14,330$) em relação às populações da região Central com as do Atlântico ($Nm_{\text{médio}}=10,529$), sendo menor ainda o valor médio para os pares entre populações do AC e Atlântico ($Nm_{\text{médio}}=8,951$). Ponderando todos os pares obtidos, observou-se a ausência de muitos destes para as comparações com a população TOC, provavelmente devido ao maior número de pares de F_{ST} não significativos. Visualizando de maneira geral, estes valores mínimos (1,579; CAC x BRA) e máximos (1174,788; TBP x PAL) encontrados, corroboram os valores máximos e mínimos de pares de F_{ST} , respectivamente, uma vez que quanto menor a distância genética entre duas populações, maior tende a ser número de migrantes entre elas.

Outra análise realizada gerou uma melhor árvore de distância em que a separação das duas regiões AC e Atlântico foi dada com elevado *bootstrap* (98). Também é possível visualizar que a população ITA, que se encontra na região Central, se mostrou entre as duas regiões e mais próxima da área de distribuição do Atlântico. Nesta árvore, as populações BLU e CAM, e as populações DIA e TBP, foram agrupadas com *bootstrap* mais altos, 79 e 62, respectivamente. Os demais agrupamentos entre populações não foram nítidos, com valores de *bootstrap* menores que 60. Nesta árvore foram retiradas cinco populações (SMA, TOC, BRA, SER e JAN) devido ao excesso de dados perdidos presente que tornavam os valores de *bootstrap* baixos (Figura 2).

3. Estrutura genética populacional

Para avaliar a estrutura das populações, foi utilizado o programa STRUCTURE v 2.2 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2007). A convergência das análises de agrupamento, seguindo o modelo *Admixture*, obtida por $[\text{Pr}(X|K)]$ (PRITCHARD et al., 2000) gerou um $K=9$ (média de $\ln[\text{Pr}(X|K)] = -8516,6 \pm 13,64$), enquanto o método sugerido por Evanno et al. (2005) através de ΔK convergiu para $K=8$ (média de $\ln[\text{Pr}(X|K)] = -8556,0 \pm 30,13$) (Figura 3). Isso mostra a formação de grupos não muito clara, evidenciando a alta diversidade genética dentro das populações (Figura 4A). Considerando $K=2$, foi encontrada a presença de grupos de acordo com as regiões (verde, AC e azul, Atlântico) (Figura 4B). As populações dos indivíduos Centrais ITA e BRA apresentaram, em $K=2$, material de ambas as regiões. À medida que o número de K aumenta, é encontrada maior variabilidade dentro das populações, e as regiões Amazônico-Chiquitano e Atlântico, ainda que ligeiramente, vão se mantendo, com compartilhamento de alelos entre elas (Figura 4). Considerando $K=8$, como mostrado na Figura 5, foi possível visualizar que as populações ITA e BRA, apresentam em sua composição tanto material do AC (verde) quanto do Atlântico (azul). Semelhante a este fato, a população SER, apesar de localizada no Atlântico, também apresentou, inicialmente ($K \leq 4$, Figura 3A), material genético de ambas as regiões, todavia em $5 \leq K \leq 9$, SER passa a ser um material praticamente exclusivo e uniforme. Igualmente, outras populações apresentam genótipos diferentes e homogêneos, como nas populações ALT e POC com indivíduos de coloração roxa, material que também foi exibido em alguns indivíduos de BO1, BO2 e JAN. Dentro da área de distribuição do AC, foi possível observar a presença de três materiais distintos (representados em verdes claro, médio e escuro) que ocorreram em todas as populações. O mesmo foi obtido para o Atlântico (azuis claro, médio e escuro), entretanto de maneira mais homogênea para algumas populações. Na população CAP predominou um material único e bastante homogêneo (azul escuro). Entretanto, alguns indivíduos foram bastante diferentes dentro da população CAP e bastante semelhante às populações BLU e CAM (azul claro). Identificando estes indivíduos de CAP, foi observado que eles se encontraram nas regiões de maiores altitudes ($>1200\text{m}$) do Parque Nacional do Caparaó (Figura 6).

Com o objetivo de sintetizar os dados dos oito grupos obtidos no STRUCTURE, realizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando as

três principais componentes, que explicou 64,2% dos dados. A partir do gráfico em 3D (Figura 7) foi possível visualizar os grupos AC (triângulo verde) e Atlântico (quadrado azul) separados. Além disso, indivíduos do Centro (círculos amarelos) se mostraram difundidos entre os indivíduos do Atlântico e AC. Esta análise revelou ainda um afastamento da população CAP (triângulo azul claro) dos demais indivíduos da população do Atlântico.

Tabela 3. Características das 18 populações amostradas, para oito locos polimórficos de microssatélite: tamanho médio da amostra sobre todos os locos (n); número médio de alelos por locos ($A/loco$); número de alelos privados ($A_{PRIV.}$); heterozigosidade esperada (H_E); heterozigosidade observada (H_O); e coeficiente de endogamia (F_{IS}) (WRIGHT, 1951). Os códigos das populações estão identificados na Tabela 1.

População	n	$A/loco$	$A_{PRIV.}$	H_E	H_O	F_{IS}
Área de distribuição Amazônico-Chiquitano						
ALT	18,88	10,13	0	0,83	0,66	0,21
CAC	3,75	4,75	1	0,79	0,67	0,18
BO1	13,38	9,13	2	0,79	0,72	0,10
FIG	19,50	13,13	3	0,86	0,77	0,10
BO2	9,00	8,13	1	0,82	0,69	0,16
TOC	8,50	7,83	1	0,81	0,76	0,07
POC	20,13	11,38	5	0,84	0,80	0,05
Média	13,30	9,21	(13)*	0,82	0,72	0,12
Área de distribuição Central						
BRA	1,88	2,38	1	0,56	0,50	0,16
ITA	7,63	7,13	1	0,80	0,71	0,13
JAN	6,50	6,25	2	0,85	0,81	0,07
Média	5,34	5,25	(4)*	0,74	0,67	0,12
Área de distribuição do Atlântico						
BLU	17,50	10,88	3	0,80	0,76	0,06
CAP	33,25	13,75	8	0,83	0,77	0,07
PAL	22,50	13,13	2	0,86	0,76	0,13
SMA	3,75	4,50	2	0,80	0,77	0,05
TBP	12,75	9,63	2	0,88	0,84	0,04
CAM	6,38	6,88	1	0,84	0,74	0,13
SER	9,63	6,00	0	0,69	0,62	0,11
DIA	7,63	7,88	2	0,83	0,73	0,13
Média	14,17	9,08	(20)*	0,82	0,75	0,09
MÉDIA	12,36	8,49	(37)**	0,81	0,73	0,11

Legenda: (*) Refere-se a soma dos alelos privados para cada região; (**) refere-se a soma total de alelos privados.

Tabela 4. Índices de diversidade genética G_{ST} (NEI, 1973); F_{IT} , F_{ST} e F_{IS} (WEIR; COCKERHAM, 1984) e R_{ST} (SLATKIN, 1995) obtidos no F_{STAT} para diferentes grupos de dados.

Grupo (tamanho)	G_{ST}	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	R_{ST}
Todas (18)	0,085	0,169**	0,075**	0,102**	0,1154
Amazônico-Chiquitano (7)	0,017	0,140**	0,022**	0,121*	0,0506
Central (3)	0,126	0,252**	0,147**	0,123**	0,1312
Atlântico (8)	0,066	0,144**	0,063**	0,088**	0,0755

Legenda: Estatisticamente significativo (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$.

Tabela 5. AMOVA para estrutura genética de populações com dois e três níveis hierárquicos.

Fonte de variação	GL	Soma de quadrados	Componente de variância	Índice de Fixação	Variância (%)	Valor-P
Dois níveis hierárquicos						
Entre populações	17	121,286	0,16428 Va	$\Phi_{ST}=0,056$	5,61	<0,001
Dentro de populações	472	1304,796	2,76440 Vb		94,39	<0,001
Total	489	1426,082	2,92868			
Três níveis hierárquicos						
Entre as três áreas de distribuição	2	42,266	0,11221 Va	$\Phi_{CT}=0,037$	3,78	<0,001
Entre populações dentro das áreas de distribuição	15	79,020	0,09515 Vb	$\Phi_{SC}=0,033$	3,20	<0,001
Dentro de populações	472	1304,796	2,76440 Vc	$\Phi_{ST}=0,069$	93,02	<0,001
Total	489	1426,082	2,97175			
Análise dentro da área de distribuição do Amazônico-Chiquitano						
Entre populações	6	11,669	-0,02712 Va	$\Phi_{ST}=-0,010$	-1,01	<0,001
Dentro de populações	199	540,302	2,71509 Vb		101,01	<0,001
Total	205	551,971	2,68797			
Análise dentro da área de distribuição Central						
Entre populações	2	11,244	0,28925 Va	$\Phi_{ST}=-0,114$	11,45	<0,001
Dentro de populações	37	82,806	2,23799 Vb		88,55	<0,001
Total	39	94,050	2,52724			
Análise dentro da área de distribuição do Atlântico						
Entre populações	7	56,107	0,17867 Va	$\Phi_{ST}=0,058$	5,83	<0,001
Dentro de populações	236	681,688	2,88851 Vb		94,17	<0,001
Total	243	737,795	3,06718			

Tabela 6. Tabela de matriz de pares de F_{ST} (WEIR; HILL, 2002) entre populações (metade inferior) e número absoluto de migrantes ($M=2Nm$) entre populações (metade superior) estimado com base em F_{ST} . Os códigos das populações estão identificados na Tabela 1.

	ALT	CAC	BO1	FIG	BO2	TOC	POC	BRA	ITA	JAN	CAP	BLU	CAM	SMA	TBP	PAL	DIA	SER
ALT		13,333	25,727	96,102	35,241	-	16,187	2,053	10,487	14,308	4,914	3,574	5,767	11,315	7,238	5,909	3,421	2,633
CAC	0,0361		30,23	224,985	28,671	-	15,984	1,579	11,061	5,743	4,727	3,431	6,597	18,262	9,116	6,467	2,882	2,237
BO1	0,019	0,0163		63,127	52,695	-	62,127	1,69	13,422	6,149	4,86	3,406	6,066	11,956	6,733	5,784	3,112	2,363
FIG	0,0051	0,0022	0,0079		334,361	-	-	2,112	63,36	9,115	5,619	3,72	6,503	-	11,841	9,584	4,741	2,923
BO2	0,014	0,0171	0,0094	0,0015		-	-	1,939	18,802	13,025	6,386	3,716	6,775	-	10,332	10,466	4,488	2,5
TOC	-0,0885	-0,1217	-0,0768	-0,0596	-0,0956		-	2,653	-	4,273	-	-	-	-	-	-	-	19,817
POC	0,0300*	0,0303	0,0079	-0,0281	-0,0037	-0,1486		3,153	15,121	86,571	8,965	4,798	15,474	110,507	11,675	9,268	4,645	3,203
BRA	0,1958*	0,2405*	0,2284*	0,1914*	0,2050*	0,1586*	0,1369*		1,932	2,053	2,315	3,043	2,524	1,635	3,248	2,828	2,655	1,672
ITA	0,0455*	0,0432	0,0359*	0,0078	0,0259	-0,089	0,0320*	0,2056*		6,682	10,122	5,699	29,855	38,231	39,852	14,824	6,183	2,848
JAN	0,0338*	0,0801*	0,0752*	0,0520*	0,037	0,1048*	0,0057	0,1958*	0,0696*		-	24,067	7,146	4,641	-	15,437	7,383	5,43
CAP	0,0924*	0,0957*	0,0933*	0,0817*	0,0726*	-0,0349	0,0528*	0,1776*	0,0471*	-0,002		7,152	12,997	-	10,983	18,754	7,085	3,433
BLU	0,1227*	0,1272*	0,1280*	0,1185*	0,1186*	-0,0026	0,0944*	0,1411*	0,0807*	0,0203	0,0653*		74,813	67,927	7,029	8,644	4,146	2,796
CAM	0,0798*	0,0705*	0,0761*	0,0714*	0,0687*	-0,0072	0,0313*	0,1654*	0,0165	0,0654*	0,0371*	0,0066		-	24,224	16,209	7,998	2,802
SMA	0,0423	0,0266	0,0401*	-0,0108	-0,0105	-0,0393	0,0045	0,2342*	0,0129	0,0973*	-0,0147	0,0073	-0,0191		-	-	35,067	3,764
TBP	0,0646*	0,0520*	0,0691*	0,0405*	0,0462*	-0,1143	0,0411*	0,1334*	0,0124	-0,0348	0,0435*	0,0664*	0,0202	-0,0353		1174,788	15,362	3,316
PAL	0,0780*	0,0718*	0,0796*	0,0496*	0,0456*	-0,0458	0,0512*	0,1503*	0,0326*	0,0314*	0,0260*	0,0547*	0,0299*	-0,0029	0,0004		11,12	3,298
DIA	0,1275*	0,1478*	0,1384*	0,0954*	0,1003*	-0,0474	0,0972*	0,1585*	0,0748*	0,0634*	0,0659*	0,1076*	0,0588*	0,0141	0,0315*	0,0430*		2,256
SER	0,1596*	0,1827*	0,1746*	0,1461*	0,1667*	0,0246	0,1350*	0,2302*	0,1493*	0,0843*	0,1271*	0,1517*	0,1514*	0,1173*	0,1310*	0,1317*	0,1814*	

Legenda: (*) Significativo ($P < 0,05$); (-) Estimativas não calculadas.

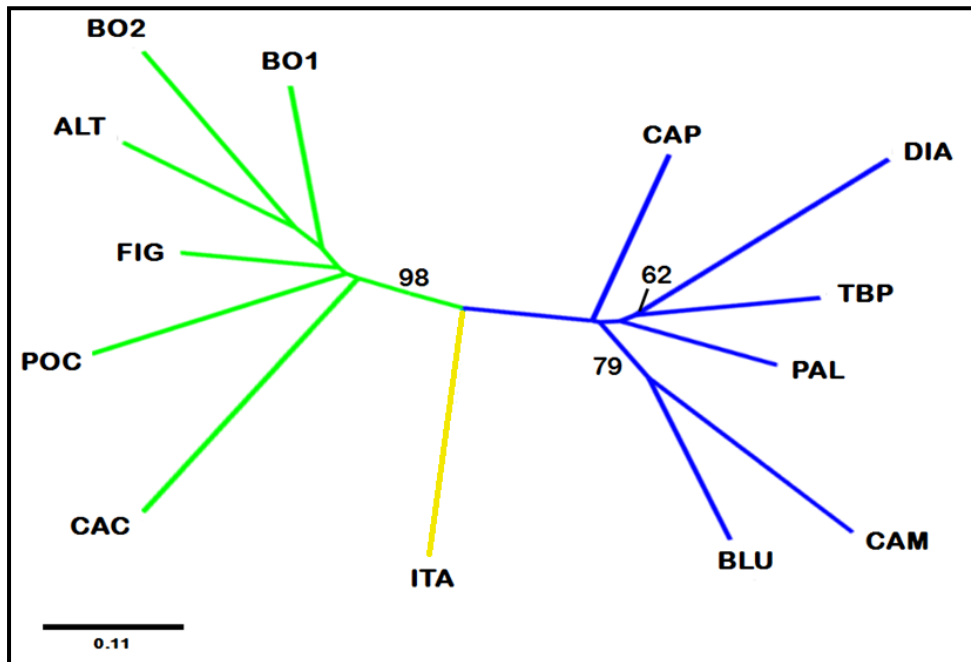


Figura 2. Árvore não enraizada de *Neighbor-Joining* gerada com base na distância genética D_A (NEI et al., 1983). Em verde, populações Amazônico-Chiquitano, em azul escuro, populações do Atlântico e, em amarelo, população da região Central. São mostrados os valores de *bootstrap* maiores que 60. As populações SMA, TOC, BRA, SER e JAN foram retiradas devido a excesso de dados perdidos, o que reduzia o *bootstrap*.

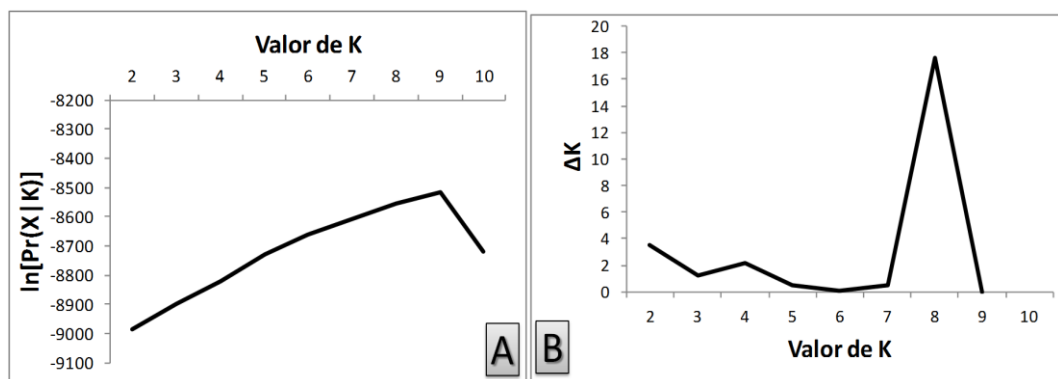


Figura 3. Gráficos obtidos com os valores de (A) $\ln [\text{Pr}(X|K)]$ e (B) ΔK para visualização dos melhores K, 9 e 8, respectivamente.

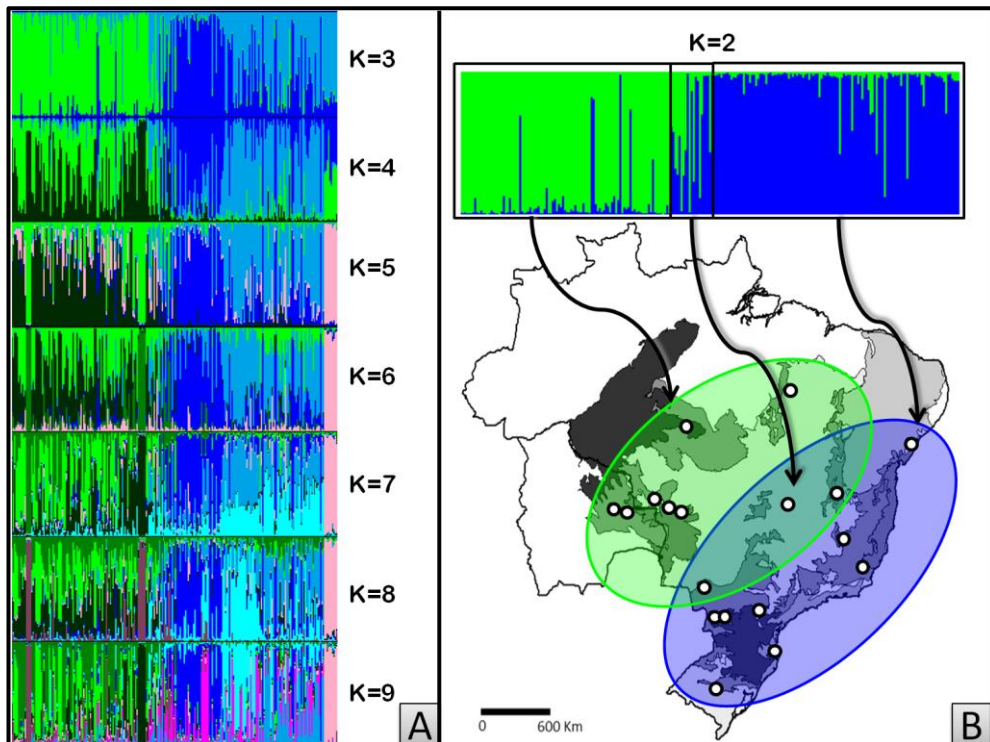


Figura 4. (A) Gráficos obtidos pela análise no STRUCTURE, com K variando de 3 a 9, cada grupo é representado por uma cor, cada indivíduo é uma representado por uma barra vertical. (B) Destaque do gráfico com K=2, mostrando a distribuição dos indivíduos do Atlântico-Chiquitano (verde), Atlântico (azul) e da região Central.

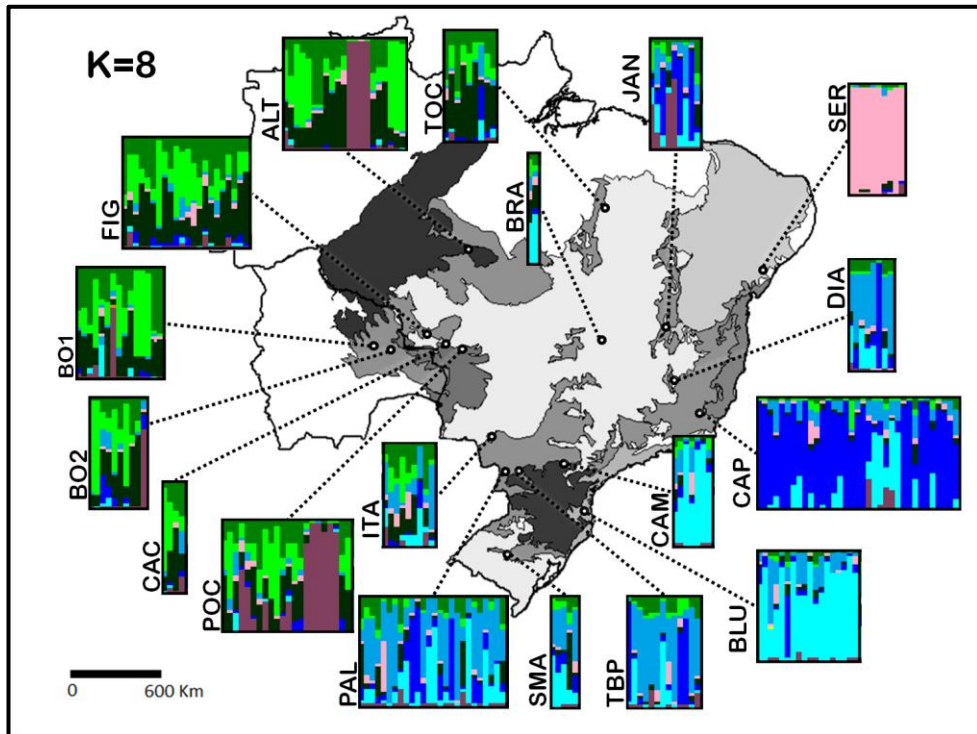


Figura 5. Distribuição das 18 populações com seus respectivos gráficos obtidos pela análise no STRUCTURE, para K=8, cada grupo é representado por uma cor, cada indivíduo é uma representado por uma barra vertical.

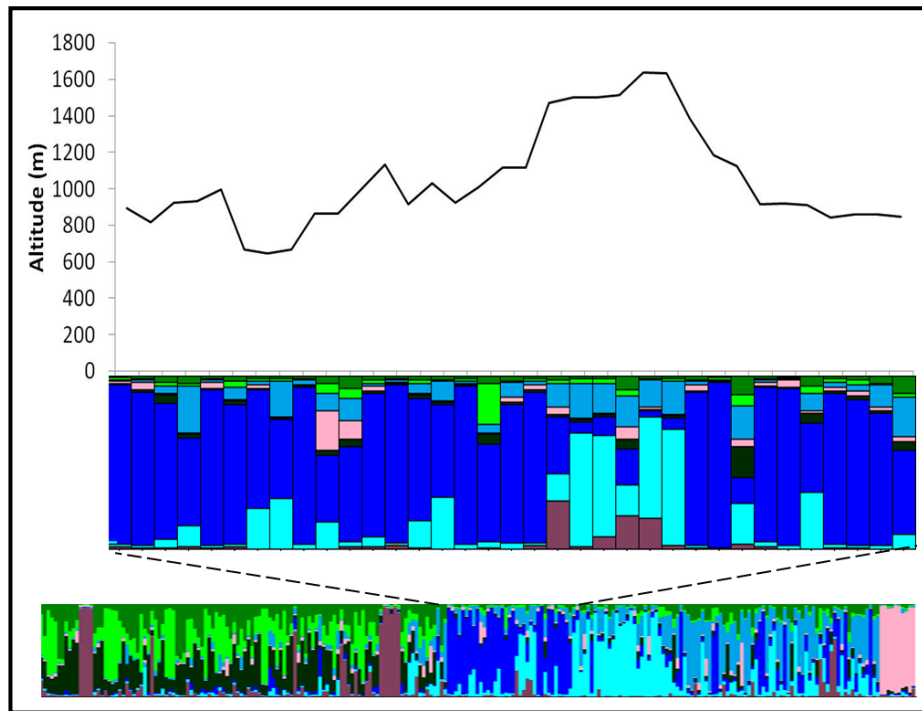


Figura 6. Destaque dos 35 indivíduos da população CAP, comparando com a altitude (m) em que eles ocorrem no Parque Nacional do Caparaó.

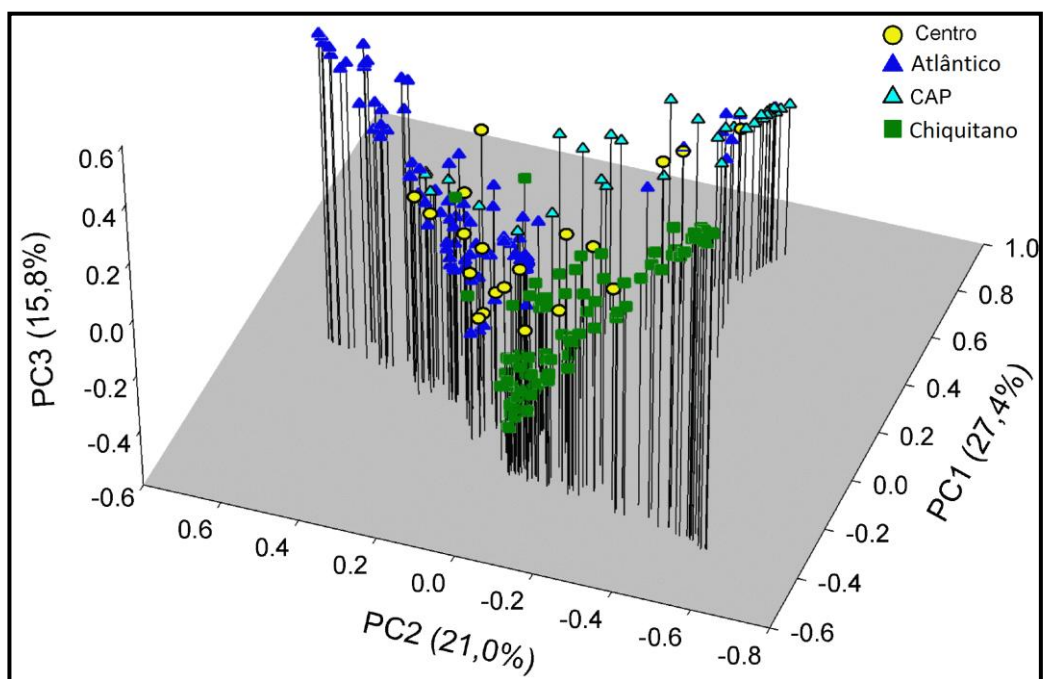


Figura 7. Análise de Componentes Principais obtidas com os valores de oito grupos gerados pelo STRUCTURE de cada indivíduo.

DISCUSSÃO

1. Avaliação da diversidade entre e dentro das populações

As análises com dados de microssatélites mostraram elevada diversidade genética dentro das populações ($H_E=0,81$), sendo maior que o valor obtido, também utilizando marcador microssatélite, em populações de outras espécies da família Meliaceae: *Swietenia humilis* ($H_E=0,528$, WHITE; POWELL, 1997; $H_E=0,548$, WHITE et al., 1999); *Carapa guianensis* ($H_E=0,644$, DAYANANDAN et al., 1999; $H_E=0,69$, VINSON et al., 2005; $H_E=0,71$, CLOUTIER et al., 2007); *Swietenia macrophylla* ($H_E=0,781$, LEMES et al., 2003; $H_E=0,657$, NOVICK et al., 2003; $H_E=0,518$, CÉSPEDES et al., 2003; $H_E=0,799$, LEMES et al., 2007; $H_E=0,639$ e $H_E=0,176$, LEMES et al., 2010); e *Khaya senegalensis* ($H_E=0,636$, SEXTON et al., 2010; $H_E=0,739$, KARAN et al., 2012). Por outro lado, valores maiores de heretozigosidade com análises de microssatélites foram encontrados por Sánchez (2008), em *Cedrela odorata* da Mesoamérica ($H_E=0,88$), e por García et al. (2004), em *Entandrophragma cylindricum* ($H_E=0,85$). De acordo com Hamrick et al. (1979), elevados níveis de variação genética são esperados em espécies com ampla distribuição, altos níveis de reprodução cruzada e fecundidade, sistemas de polinização por vento, longos tempos de geração, e que ocorram em habitats que representam antigos estágios de sucessão. Estas características são descritas para *C. fissilis*, exceto pela polinização que pode ser por mariposas e abelhas, sendo a dispersão das sementes pelo vento (CARVALHO, 1994).

Apesar da alta diversidade genética observada em populações do complexo *C. fissilis* no Brasil e Bolívia, os indivíduos demonstraram algum nível de endogamia como indicado pelo excesso de homozigotos e, conseqüentemente, positivos valores de F_{IS} encontrado nas populações estudadas, sendo maiores nas populações da área de distribuição do AC. Segundo Frankham et al. (2002), deficiência de heterozigotos indica que as populações não estão cruzando aleatoriamente, e isso pode ser esperado para estes dados devido as elevadas distâncias entre as populações.

A diversidade entre as populações encontrada foi menor na região AC ($F_{ST}=0,012$; $G_{ST}=0,008$) em relação às do Atlântico ($F_{ST}=0,061$; $G_{ST}=0,058$) o que também foi observado na AMOVA. Este cenário sugere maior proximidade nas

populações do grupo do AC. De modo geral, a diversidade genética entre populações foi baixa ($F_{ST}=0,075$; $G_{ST}=0,085$), com 1,49% de variância observada na AMOVA, não sendo evidenciada, portanto, estrutura genética entre elas. Algumas populações de Meliaceae apresentaram diferenciação interpopulacional semelhante a encontrada neste trabalho, em populações de *Cedrela odorata* da Mesoamérica ($F_{ST}=0,08$, SÁNCHEZ, 2008); e de *Swietenia macrophylla* ($F_{ST}=0,097$, LEMES et al., 2003). Outras populações apresentaram maior diferenciação, em *C. odorata* do Peru ($F_{ST}=0,20$, TORRE et al., 2008;); e de *Swietenia macrophylla* ($F_{ST}=0,117$, NOVICK et al., 2003; $F_{ST}=0,176$, LEMES et al., 2010). Por outro lado, algumas populações de Meliaceae apresentaram elevada proximidade interpopulacional, refletida em baixos valores de F_{ST} , o valor neste trabalho foi maior que o encontrado em *Swietenia humilis* ($F_{ST}=0,036$, WHITE; POWELL, 1997; $F_{ST}=0,032$, WHITE et al., 1999); em *Carapa guianensis* ($R_{ST}=0,017$, DAYANANDAN et al., 1999); e em *Swietenia macrophylla* ($F_{ST}=0,063$, CÉSPEDES et al., 2003). Esta baixa diferenciação evidenciada entre populações pode ser dada devida à grande escala geográfica abrangida (HAMRICK et al., 1979) com a presença de elevados a moderado níveis de fluxo gênico histórico entre populações (FUCHS; HAMRICK, 2010) associado a migrações mais contemporâneas entre regiões.

2. Avaliação da diversidade e estrutura entre e dentro das áreas de distribuição

A obtenção de elevado número de grupos na análise no STRUCTURE pode ser dada à utilização de um marcador robusto, com taxa mutacional superior a taxa de substituição de bases (SCHLÖTTERER, 2000) corroborando a existência de um material mais diversificado quando comparado com a duas linhagens genealógicas obtidas, a partir de sequências nucleares e cloroplastídicas, por Garcia et al. (2011). Outros fatores podem ter influenciado no elevado K, tais como a hibridização, que apresenta importância na variabilidade existente (ROBERTSON et al., 2010), e a poliploidia, que também tem papel na existência de biodiversidade (ROBERTSON et al., 2010; BESNARD et al., 2008). Ambas as características aumentam o polimorfismo intraindividual, assim como o observado por Garcia et al. (2011) e, portanto é provável que ocorram no complexo *C. fissilis*. O presente trabalho constatou ainda a existência de um *primer* que gerava dois locos distintos e não ligados (CF66A e CF66B) e outro (CF34) que, apresentando de três ou quatro alelos concomitantemente, é característico

de loco tetraplóide (dados não mostrados), aumentando as inferências de poliploidia. Outra particularidade é dada pela longevidade da árvore. Uma vez que a idade das árvores coletadas não foi mensurada, é plausível que sejam de gerações distintas e, portanto, agregaram uma maior diversidade genética (WHITE et al., 2007). Entretanto, sintetizando estes oito grupos em três componentes principais, foi possível observar a presença dos dois grupos Atlântico e AC, regionalmente distribuídos como mencionado por Garcia et al. (2011).

Algumas populações apresentaram material de ambas as regiões, tais como BRA, ITA e SER. Isto pode ter sido provável por estarem localizadas em regiões de encontro ou migração entre as duas linhagens descritas por Garcia et al. (2011). Os indivíduos de BRA, que ocorrem na região central do Cerrado, podem ter sido um remanescente dado pela tentativa de migração entre as duas regiões durante períodos mais secos (PRADO; GIBBS, 1993), além disso, BRA apresentou-se bastante afastada de todas as populações, tanto do AC (média de 1157 km) quanto do Atlântico (média de 1012 km), praticamente equidistante às regiões das duas linhagens. Devido à presença de apenas dois indivíduos, se faz necessária maior investigação em populações a cerca destes dois indivíduos para confirmação dos fatos. A presença de refúgios nas regiões centrais e sudeste do Atlântico, a partir dos quais as linhagens migraram para o Nordeste, através de uma rota litorânea (CARNAVAL et al., 2009), pode explicar a ocorrência de material do Atlântico na população SER, justificando também as maiores distâncias genéticas (pares de F_{ST}) de SER com as populações da área de distribuição Amazônico-Chiquitano. Ademais, a presença de migração do Atlântico para o Sul através de uma rota central (CARNAVAL et al., 2009), pode explicar o encontro das linhagens na população ITA. Outras populações também apresentaram algum compartilhamento de material entre as linhagens, com predomínio de uma ou outra, provavelmente provocado por uma dispersão recente entre as regiões.

As análises de microssatélites mostraram que as populações localizadas a leste do Cerrado, apresentaram maior diversidade genética e foram menos homogêneas, quando comparadas com as populações a oeste do Cerrado, tanto para as análises descritivas, apresentando maior $A_{PRIV.}$, H_E , H_O , e menor F_{IS} , quanto para a AMOVA, os índices de fixação, análise no STRUCTURE e de PCA. Essa diferenciação entre as regiões foi obtida ainda mais nitidamente por Garcia et al. (2011) com base em sequências de ITS e cpDNA. A presença de elevada diversidade, para a região do Atlântico, sugere (1) associação a uma região de refúgio, conservando-se estável em

flutuações climáticas, mantendo a diversidade genética presente. Estudo baseado em modelos paleoclimáticos predisse a presença de refúgio florestal histórico na região do Atlântico no Pleistoceno (CARNAVAL; MORITZ, 2008). A diversidade desta linhagem pode sugerir, alternativamente, (2) que essa região seja de recolonização, recebendo imigrantes de refúgios adjacentes (TZEDAKIS et al., 2002). Nesta região, a população CAP apresentou o maior número de alelos privados, podendo ser justificado pelo grande tamanho populacional, como também constatado por Lemes et al. (2010) para populações de *Swietenia macrophylla* da Amazônia e América Central. Além disso, como observado no gráfico de PCA, a população CAP mostrou-se afastada dos demais indivíduos da região do Atlântico, o que pode ser consequência da grande variação na altitude. Regiões de elevação apresentam maiores diversidade e isolamento populacional (SHI et al., 2011); são prováveis barreiras a polinizadores (GILLIES et al., 1997); e, segundo Cavers et al. (2003) em estudo com populações de *C. odorata* na Costa Rica, o fluxo gênico ocorre inicialmente ao redor das montanhas, o que provavelmente explica a manutenção de um material único nesta população.

A área de distribuição AC apresentou diversidade menor, apesar de ainda elevada, quando comparada com as populações da área de distribuição do Atlântico, visualizada através dos valores de heterozigosidades. Essa reduzida diversidade também foi constatada na linhagem do AC no complexo *C. fissilis* para sequências de ITS e cpDNA (GARCIA et al., 2011). Corroborando Oliveira et al. (2010), estudos de filogeografia molecular em *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae) mostraram que, nesta mesma região de Floresta Estacional do AC, populações sofreram algum gargalo genético ou foram fonte de único parental, gerando reduzida variabilidade. Estudos mostraram que a composição florística das florestas secas da região de AC durante o Pleistoceno diferiu da composição atual (ANHUF et al., 2006), indicando que estas florestas atuais tenham origem contemporânea (BURBRIDGE et al., 2004; MAYLE, 2004), e que provavelmente estas populações sejam migrações recentes ou sofreram algum gargalo populacional.

3. Implicações para conservação

A maioria das espécies e populações ameaçadas possui diversidade genética menor quando comparadas com espécies não ameaçadas com grande tamanho populacional (FRANKHAM et al., 2002). Entretanto, este conceito não se aplica para a espécie *C. fissilis*, uma vez que apresenta importância econômica devido a qualidade da sua madeira, apresenta perda de habitat ocorrendo em florestas altamente exploradas, e se encontra “ameaçada A1acd+2cd” na lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) (IUCN, 2008).

A diversidade genética mensurada apresentou indivíduos com elevado valor para conservação, uma vez que a diversidade é importante para a sobrevivência da espécie, sobretudo na presença de fatores adversos, bióticos e abióticos. Como também constatado, a existência de baixa diferença interpopulacional infere a presença de iguais mecanismos de manejo para conservação das populações estudadas. Ademais, de maneira mais pontual, algumas regiões podem ser destacadas para conservação devido à presença de material genético peculiar, como a população SER. Outras populações do Atlântico, sobretudo a população CAP, também apresentaram relevância de conservação devido às características de refúgio.

Outro fator importante a ser considerado para manutenção da espécie é existência de mudanças climáticas. Flutuações climáticas durante o Paleoceno e o Plioceno são conhecidas por terem sido uma força motriz para a formação de padrões espaciais de Meliaceae (MUELLNER et al., 2006). Recentemente, alguns estudos de modelagem mostraram os efeitos negativos de mudanças climáticas atuais em espécies de *C. odorata* da Costa Rica (ESMAIL; OELBERMANN, 2011) e *C. montana* de Florestas Yungas do Sul da Bolívia (PACHECO et al., 2010). Além disso, mudanças na temperatura global podem afetar o comportamento dos polinizadores, e em um cenário ainda pior, aumentar a frequência de fogo em regiões com árvores isoladas, como mencionado por Sánchez (2008), para *C. odorata* da Costa Rica.

Segundo Muellner et al. (2010), a diversidade no gênero *Cedrela* foi dada aparentemente no Oligoceno e início do Mioceno, sendo mais intensificada ao final do Mioceno e início do Plioceno. Entretanto, estas plantas sofreram uma forte pressão de seleção para tolerância ao frio após sobreviverem à última glaciação, há milhões de anos, com a implicação de que os genes tolerantes ao calor, bem como muitas espécies, possam ter sido eliminados (COLWELL; RANGEL, 2010). Portanto, mesmo sendo a

mesma espécie que ocorria no Plioceno a que ocorre atualmente (i.e. *Cedrela*), terão, as árvores atuais, a mesma diversidade genética, sobretudo os genótipos resistentes ao calor, das árvores do Plioceno? Aparentemente, as temperaturas esperadas para o próximo século são ainda maiores às estimadas para os períodos com as temperaturas mais elevadas do Paleoceno–Eoceno (CUI et al., 2011). Segundo Corlet (2011), não está claro se, durante um aquecimento em que as plantas nunca foram submetidas, as espécies de árvores tropicais possuirão as adaptações necessárias para tais condições. Todavia, mesmo na falta destes esclarecimentos de tolerância térmica, são necessárias recomendações práticas para conservação (CORLLET, 2011), pois, por menor que seja a perda da diversidade genética, não se podem mensurar as consequências geradas para a espécie neste contexto de mudanças climáticas.

CONCLUSÕES

- ✓ Populações do complexo *C. fissilis* do Brasil e Bolívia, por meio de marcadores microssatélites, apresentaram elevada diversidade genética intrapopulacional e baixa distância interpopulacional;
- ✓ As populações da área de distribuição Amazônico-Chiquitano apresentaram menor diversidade, maior endogamia e menores distâncias genéticas. Já as populações da área de distribuição do Atlântico apresentaram maior diversidade, menor endogamia e maiores distância genéticas, ainda que baixas;
- ✓ Foi constatada a baixa estruturação das populações, sendo exibido um número de grupos ($K=8$), com base em marcadores microssatélites, maior que o número de linhagens conhecidas, com base em sequências de DNA;
- ✓ A baixa diferença interpopulacional infere a presença de iguais mecanismos de manejo para conservação das populações estudadas, sendo as populações SER e CAP as mais relevantes para conservação devido à presença de material genético peculiar e às características de refúgio, respectivamente.
- ✓ Cerrado se constitui uma barreira para o fluxo gênico as áreas de distribuição

REFERÊNCIAS

- ANHUF, D.; LEDRU, M. -P.; BEHLING, H.; DA CRUZ JR, F. W.; CORDEIRO, R. C.; VAN DER HAMMEN, T.; KARMANN, I.; MARENGO, J. A.; DE OLIVEIRA, P. E.; PESSEDA, L.; SIFFEDINE, A.; ALBUQUERQUE, A. L.; DA SILVA DIAS, P. L. 2006. Paleo-environmental change in Amazonian and African ra-orest during the LGM. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology** 239, 510-527.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N., 2002 The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology** 11, 155–165.
- BESNARD, G.; GARCIA-VERDUGO, C.; CASAS, R. R.; TREIER, U. A.; GALLAND, N.; VARGAS, P. 2008. Polyploidy in the Olive Complex (*Olea europaea*): Evidence from Flow Cytometry and Nuclear Microsatellite Analyses. **Annals of Botany**. 101, 25-30.
- BURBRIDGE, R. E.; MAYLE, F. E.; KILLEEN, T. J. 2004. Fifty-thousand-year vegetation and climate history of Noel Kempff Mercado National Park, Bolivian Amazon. **Quaternary Research**. 61, 215-230.
- CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C. F. B.; RODRIGUES, M. T.; MORITZ, C. 2009. Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. **Science**, 323, 785-789.
- CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. 2008. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal Biogeography**. 35, 1187-1201.
- CARVALHO, P. E. R. 1994. **Espécies Florestais Brasileiras**. Recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. EMBRAPA-CNPQ, Brasília. 640p.
- CARVALHO, P. E. R. 2003. **Espécies Arbóreas Brasileiras**, Vol. 1, Ed. Embrapa Florestas. 1040 p.
- CAVERS, S.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J. 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. **Molecular Ecology** 12, 1451-1460.
- CÉSPEDES, M.; GUTIERREZ, M. V.; HOLBROOK, N. M.; ROCHA, O. J. 2003. Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica. **Molecular Ecology**. 12, 3201-3212.
- CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**. 371, 215–220.
- CLOUTIER, D.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A. Y.; SHOEN, D. J. 2007. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in an Amazonian tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology** 16, 797-809.

- COLWELL, R. K.; RANGEL, T. F. 2010. A stochastic, evolutionary model for range shifts and richness on tropical elevational gradients under Quaternary glacial cycles. **Philos. Trans. R. Soc. B** 365, 3695–3707.
- CORLETT, R. T. 2011. Impacts of warming on tropical lowland rainforests. **Trends in Ecology and Evolution**. 26 (11). 606-613.
- COTA-SÁNCHEZ, J. H.; REMARCHUK, K.; UBAYASENA, K. 2006. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. **Plant Molecular Biology Reporter**. 24, 161-167.
- CRUZ, C. D. . 2008. **Programa Genes - Diversidade Genética**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV. v. 1. 278 p.
- CUI, Y. et al. 2011. Slow release of fossil carbon during the Palaeocene– Eocene Thermal Maximum. **Nature Geoscience**. 4, 481–485.
- 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.
- DELSENY, M.; LAROCHE, M.; PENON, P. 1983. Detection of sequences with Z-DNA forming potential in higher plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 116, 113–120.
- EDWARDS, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H. A.; CASKEY, C. T. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics** 49,746–756.
- ESMAIL, S. E.; OELBERMANN, M. 2011. The impact of climate change on the growth of tropical agroforestry tree seedlings. **Agroforestry Systems** 83,235–244.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**. 14, 2611–2620
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. 2006. ARLEQUIN version 3.01: an integrated software package for population genetics data analysis. **Bern: University of Bern, Zoological Institute**.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, 164, 1567–1587.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**. 7, 574–578.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. 2002. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge, UK. Cambridge University Press. 617 p.
- FUCHS, E. J.; HAMRICK, J. L. 2010. Genetic Diversity in the Endangered Tropical Tree, *Guaiaecum sanctum* (Zygophyllaceae). **Journal of Heredity** 101 (3), 284-291.

FUNDAÇÃO SOS Mata Atlântica; INPE, 2010. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica. Período de 2008-2010.** Relatório Parcial. Fundação SOS Mata Atlântica and Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São Paulo.

GANDARA, F. B. 2009. **Diversidade genética de populações de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae)) no Centro-Sul do Brasil.** Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 87p.

GARCIA, F.; NOYER, J.-L.; RISTERUCCI, A.-M.; CHEVALLIER, M.-H. 2004. Genotyping of Mature Trees of *Entandrophragma cylindricum* with Microsatellites. **Journal of Heredity**. 95 (5), 454-457.

GARCIA, M. G., SILVA, R. S.; CARNIELLO, M. A.; VELDMAN, J. W.; ROSSI, A. A. B.; OLIVEIRA, L. O. 2011. Molecular evidences of cryptic speciation, historical range expansion, and recent intraspecific hybridization in the Neotropical seasonal forest tree *Cedrela fissilis* (Meliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 61, 639-649.

GILLIES, A. C. M.; CORNELIUS, J. P.; NEWTON, A. C.; NAVARRO, C.; HERNÁNDEZ, M.; WILSON, J. 1997. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. **Molecular Ecology** 6, 1133-1145.

GOUDET J. 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity** 86, 485-486.

HAMRICK, J. L.; LINHART, Y. B.; MITTON, J. B. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 10,173-200.

HERNÁNDEZ, G.; BUONAMICI, A.; WALKER, K.; VENDRAMIN, G. G.; NAVARRO, C.; CAVERS, S. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cedrela odorata* L. (Meliaceae), a high value neotropical tree. **Conservation Genetics** 9, 457-459.

IUCN 2012. **IUCN Red List of Threatened Species.** Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>.

JACOB, H. J.; LINDPAINNESR, K.; KUSUMIR, E. L.; BUNKERY, K.; MAO, I. P.; GANTENV, D.; DZAU, J.; LANDER, E. S. 1991. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell** 67,213-224.

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**. 177, 309-334.

KARAN, M.; EVANS, D. S.; REILLY, D.; SCHULTE, K.; WRIGHT, C.; INNES, D.; HOLTON, T. A.; NIKLES, D. G.; DICKINSON, G. R. 2012. Rapid microsatellite marker development for African mahogany (*Khaya senegalensis*, Meliaceae) using next-generation sequencing and assessment of its intra-specific genetic diversity **Molecular Ecology**. 12, 344-353.

- LANGELLA O. 1999. **Populations**, 1.2.30. Disponível em: <[http://www. bio-oramics.org/~tryphon/populations/](http://www.bio-oramics.org/~tryphon/populations/)>
- LEMES, M. R.; DICK, C. W.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J.; CAVERS, S.; GRIBEL, R.. 2010. Chloroplast DNA Microsatellites Reveal Contrasting Phylogeographic Structure in Mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) from Amazonia and Central America. **Tropical Plant Biology**, 3, 40-49.
- 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),169-179.
- 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.
- LEWIS, P. O.; E ZAYKIN, D. 2001. **GDA** – Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c). Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
- LITT, M.; LUTY, J. A. 1989 A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics** 44, 397–401
- LORENZI, H. 2002. **Árvores Brasileiras - manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, Vol. 01, 4ª edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 384 p.
- MACE, G. M.; SMITH, T. B.; BRUFORD, M. W.; WAYNE, R. K. 1996. An overview of the issues. In: Molecular genetic approaches in conservation. Eds. Smith, T. B.; Wayne, R. K. **Oxford University Press**, New York, 3-12.
- MAYLE, F. E. 2004. Assessment of the Neotropical dry forest refugia hypothesis in the light of palaeoecological data and vegetation model simulations. **Journal of Quaternary Science** 19, 713-720.
- MILES, L.; NEWTON, A. C.; DEFRIES, R. S.; RAVILIOUS, C.; MAY, I.; BLYTH, S.; KAPOS, V.; GORDON, J. E. 2006. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 3, p. 491-505.
- MUELLNER, A. N.; PENNINGTON, T. D.; CHASE, M. W. 2009 .Molecular phylogenetics of Neotropical Cedreleae (mahogany family, Meliaceae) based on nuclear and plastid DNA sequences reveal multiple origins of “*Cedrela odorata*”. **Molecular Phylogenetic Evolution** 52, 461–469.
- MUELLNER, A. N.; PENNINGTON, T. D.; KOECKE, A. V.; RENNER, S. S. 2010. Biogeography of *Cedrela* (Meliaceae, Sapindales) in Central And South America. **American Journal of Botany**, 97, 511-518.

MUELLNER, A. N.; SAVOLAINEN, V.; SAMUEL, R.; CHASE, M. W. 2006. The mahogany family “out-of-Africa”: Divergence time estimation, global biogeographic patterns -erred from plastid rbcL DNA sequences, extant, and fossil distribution of diversity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 40, 236–250.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. 2011. *Cedrela fissilis* microsatellite. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=Cedrela%20fissilis%20microsatellite>> Acesso em: 20 de setembro de 2011.

NEI, M. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences, PNAS, USA**. 70, n. 12, 3321-3323.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data II. Gene frequency data. **Journal of Molecular Evolution** 19, 153–170.

NOVICK, R. R.; DICK, C. W.; LEMES, M. R.; NAVARRO, C.; CACCONE, A.; BERMINGHAM, E. 2003. Genetic structure of Mesoamerican populations of big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) -erred from microsatellite analyses. **Molecular Ecology**. 12,2885-2893.

OLIVEIRA, L. O.; ROSSI, A. A. B.; MARTINS, E. R.; BATISTA, F. R. C.; SILVA, R. S. 2010. Molecular phylogeography of *Carapichea ipecacuanha*, an amphitropical shrub that occurs in the understory of both semideciduous and evergreen forests. **Molecular Ecology**. 19, 1410–1422.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L.; 2000. Patterns of floristic differentiation among atlantic forests in southeastern Brazil and the -luence of climate. **Biotropica**, 32, 793-810.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; SCOLFORO, J. R. S.; MELLO, J. M. 1994. Composição florística e estrutura de um remanescente de floresta semidecidual montana em Lavras, MG. **Revista Brasileira de Botânica** 17, 167-182.

OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E.; WIKRAMANAYAKE, E. D.; BURGESS, N. D.; POWELL, G. V. N.; UNDERWOOD, E. C.; D’AMICO, J. A.; ITOUA, I.; STRAND, H. E.; MORRISON, J. C.; LOUKS, C. J.; ALLNUTT, T. F.; RICKETTS, T. H.; KURA, Y.; LAMOREUX, J. F.; WETTENGEL, W. W.; HEDAO, P.; KASSEM, K. R. 2001. Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on earth. **BioScience** 51, 933–938.

OOSTERHOUT, C. V.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data **Molecular Ecology Notes**. 4, 535–538

PACHECO, S.; MALIZIA, L. R.; CAYUELA, L. 2010. Effects of climate change on subtropical forests of South America. **Tropical Conservation Science**. 3 (4),423-437.

PENNINGTON, T. D.; MUELLNER, A. N., 2010. **A Monograph of Cedrela (Meliaceae)**. Milborne Port: DH Books. Sherborne, UK. 112p.

- PRADO, D. E.; GIBBS, P. E. 1993. Patterns of species distribution in the dry seasonal forest of South America. **Ann. Mo. Bot. Gard.** 80, 902-927.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155, 945–959.
- RIahi, M.; ZARRE, S.; MAASSOUMI, A. A.; ATTAR, F. E.; OSALOO, S. K. 2010. An inexpensive and rapid method for extracting papilionoid genomic DNA from herbarium specimens. **Genetics and Molecular Research**. 9 (3), 1334-1342.
- ROBERTSON, A.; RICH, T. C. G.; ALLEN, A. M.; HOUSTON, L.; ROBERTS, C.; BRIDLE, J. R.; HARRIS, S. A.; HISCOCK, S. J. 2010. Hybridization and polyploidy as drivers of continuing evolution and speciation in *Sorbus*. **Molecular Ecology**. 19, 1675-1690.
- SÁNCHEZ, L. G. H. 2008. **Genetic diversity and mating system analysis of *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) populations under different human dominated landscapes and primary forests.** Tesis de *Magister Scientiae* en Manejo y Conservación de Bosques Naturales y Biodiversidad. Turrialba, Costa Rica. 74p.
- SCHLÖTTERER C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma** 109, 365–371.
- SEXTON, G. J.; FRERE, C. H.; DIETERS, M. J.; GODWIN, I. D.; PRENTIS, P. J. 2010. Development and characterization of microsatellite loci for *khaya senegalensis* (meliaceae). **American Journal of Botany**. e111-e113.
- SHI, M-M.; MICHALSKI, S. G.; CHEN, X.-Y.; DURKA, WALTER. 2011. Isolation by Elevation: Genetic Structure at Neutral and Putatively Non-Neutral Loci in a Dominant Tree of Subtropical Forests, *Castanopsis eyrei*. **Plos One**. 6 (6) e21302.
- SLATKIN, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics** 139, 457–462.
- STEININGER, M. K.; TUCKER, C. J.; TOWNSHEND, J. R. G.; KILLEEN, T. J.; DESCH, A.; BELL, V.; ERSTS, P. 2001. Tropical Deforestation in the Bolivian Amazon. **Environmental Conservation**. 28, 127-134.
- TAUTZ, D. 1993 Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: PENA, S. D. J.; CHAKRABORTY, R.; EPPLIN, J. T.; JEFFREYS, A. J. (eds) DNA fingerprinting: state of the science. **Birkhäuser Verlag, Basel**, pp 21–28.
- TAUTZ, D.; RENZ, M. 1984 Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Res** 12, 4127–4138.
- TORRE, A.; LÓPEZ, C.; YGLESIAS, E.; CORNELIUS, J. P. 2008. Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian Amazon. **Forest Ecology and Management**. 255, 3340339.

- TZEDAKIS, P. C.; LAWSON, I. T.; FORGLEY, M. R.; HEWITT, G. M. 2002. Buffered tree population changes in a Quaternary refugium: evolutionary implications. **Science** 297, 2044–2047.
- VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. 1991. **Classificação da Vegetação Brasileira, Adaptada de um Sistema Universal**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro.
- VINSON, C. C.; AZEVEDO, V. C. R.; SAMPAIO, I.; CIAMPI, A. Y. 2005. Development of microsatellite markers for *Carapa guianensis* (Aublet), a tree species from the Amazon forest. **Molecular Ecology Notes** 5, 33-34
- WEIR, B. S. 1996. Genetic Data Analysis II: Methods for discrete population genetic data. **Sinauer Associates, Sunderland**. 445p.
- WEIR, B. S.; HILL, W. G. 2002. Estimating F-statistics. **Annu Rev Genet.** 36, 721-750.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lancaster, v. 38, n. 6, p. 1358-1370.
- WHITE, G. M.; BOSCHER, D. H.; POWELL, W. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. **Molecular Ecology**. 8, 1899-1909.
- WHITE, G. M.; POWELL, W. 1997. Isolation and characterisation of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, 6, 851–860.
- WHITE, T. L.; ADAMS, W. T.; NEALE, D. B. 2007. **Forest Genetics**. CABI: London, UK. 682p.
- WHITLOCK, M.C.; MCCAULEY, D.E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \approx 1/(4Nm + 1)$. **Heredity**, v.82, p. 117-125.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. **Annual Eugenics**. 15, 223-354.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**. 11, 1-16.