

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**UM ESTUDO DE SIMULAÇÃO A PARTIR DE DADOS
DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM
FRAGMENTOS DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. NO
BIOMA PAMPA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caetano Miguel Lemos Serrote

**Santa Maria, RS, Brasil.
2015**

**UM ESTUDO DE SIMULAÇÃO A PARTIR DE DADOS DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES EM FRAGMENTOS DE
Luehea divaricata Mart. & Zucc. NO BIOMA PAMPA**

Caetano Miguel Lemos Serrote

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Lia Rejane Silveira Reiniger

**Santa Maria, RS, Brasil.
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Serrote, Caetano Miguel Lemos
UM ESTUDO DE SIMULAÇÃO A PARTIR DE DADOS DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES EM FRAGMENTOS DE *Luehea*
divaricata Mart. & Zucc. NO BIOMA PAMPA / Caetano Miguel
Lemos Serrote.-2015.
97 f.; 30cm

Orientadora: Lia Rejane Silveira Reiniger
Coorientador: Valdir Marcos Stefenon
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2015

1. Marcadores de DNA 2. Simulação em Easypop 3. Modo
Reprodutivo 4. Fluxo Gênico 5. Conservação I. Reiniger,
Lia Rejane Silveira II. Stefenon, Valdir Marcos III.
Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Caetano Miguel Lemos Serrote. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: serrotec@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**UM ESTUDO DE SIMULAÇÃO A PARTIR DE DADOS DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES EM FRAGMENTOS DE *Luehea
divaricata* Mart. & Zucc. NO BIOMA PAMPA**

elaborada por
Caetano Miguel Lemos Serrote

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Florestal

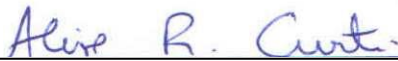
COMISSÃO EXAMINADORA:



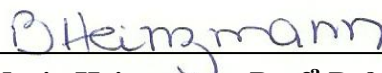
Lia Rejane Silveira Reiniger, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Valdir Marcos Stefenon, Dr. (UNIPAMPA)
(Co-orientador)



Aline Ritter Curti, Dr^a (UFPEL)



Berta Maria Heinzmann, Prof^a Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 21 de agosto de 2015.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

*“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’
Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”*

Geroge Bernard Shaw

Dedico esse trabalho à memória dos meus pais,
Miguel Lemos Serrote e Lúcia Sizela, cujos
feitos com amor, carinho e dedicação,
me transformaram no homem que sou.

Ofereço com o mesmo amor ao meu filho
Daniel para que sirva de inspiração nessa
caminhada rumo à construção de sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu a vida e me dá inspiração para realizar todos os meus sonhos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal de Santa Maria e ao CNPq pelo apoio material e financeiro para minha formação.

A Universidade Lúrio pela liberação e apoio financeiro para a realização desse sonho.

A minha esposa, Angelina, grande amor da minha vida, pelo carinho e dedicação na construção da família que juntos sonhamos. Agradeço também pelo companheirismo, compreensão, cumplicidade, incentivo e paciência. Te amo, Lina!

Aos meus irmãos e demais familiares pelos conselhos valiosos, carinho, apoio moral e financeiro, sobretudo, por poder contar convosco sempre que necessário. Compartilho este sucesso que pertence a toda família.

A minha orientadora, professora Dra. Lia Rejane Silveira Reiniger, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, pelo excelente profissionalismo e rigor, combinados com muita simplicidade, atenção e amizade, ingredientes determinantes para o sucesso deste trabalho. Agradeço pela confiança em mim depositada e pela oportunidade concedida para encarar este desafio importante para meu crescimento na carreira acadêmica.

Ao meu coorientador, professor Dr. Valdir Marcos Stefenon, pela excelente contribuição na realização deste trabalho, pelo tempo a mim dedicado e pela amizade.

Aos amigos, Adriel Oliveira, Aldeize Santos, Carol Weimann, Chimica Francisco, Gonçalves Dauala, Leonardo Costa, Luciano Moura, Noé Hofiço, Paulo Fernando, Quemile Martins, Sabrina Finatto, Taissane Rodrigues, os quais contribuíram imenso para minha adaptação na cidade e na universidade. Obrigado pela parceria.

Aos colegas de Laboratório, Aline Curti, Aline Paim, Amistrong Mafaldo, Carla Moro, Charlene Kunz, Charlene Stefanel, Clarissa Gomes, Enrique Benitez León, Éric Gindri, Iana Somavilla, Karol Buron, Larissa Bittencourt, Leandro Dutra, Leonardo Costa, Marina Scheuer, Silvia Machado, pela disponibilidade em ajudar e ensinar, pelos momentos bons que passamos nessa página de vida de muito aprendizado.

Aos colegas de outros laboratórios e amigos que fiz durante a formação, muito obrigado pelo acolhimento, companheirismo e carinho. Passei com vocês por momentos muito bons os quais irei me lembrar com muito carinho.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

UM ESTUDO DE SIMULAÇÃO A PARTIR DE DADOS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES EM FRAGMENTOS DE *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. NO BIOMA PAMPA

AUTOR: CAETANO MIGUEL LEMOS SERROTE
ORIENTADORA: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de agosto de 2015.

No presente trabalho foram utilizados dados de marcadores de DNA do tipo microssatélites em simulações para estudar padrões genéticos, ecológicos e reprodutivos que contribuíram para a estrutura genética de cinco fragmentos da espécie arbórea florestal *Luehea divaricata* Mart. & Zucc, em desenvolvimento em área brasileira do bioma Pampa. Várias taxas de autofecundação e de migração foram simuladas, tendo como critério de seleção a heterozigosidade observada e a heterozigosidade esperada, com valores de 0,52 e 0,64, respectivamente (com base em marcadores microssatélites). Os resultados permitiram caracterizar a população, quanto ao modo reprodutivo, como mista com predominância de cruzamentos (taxa = 0,7), sugerindo a presença de algum sistema de autoincompatibilidade nessa espécie, o qual reduz, mas não impede a autofecundação. A baixa migração (taxa = 0,02) sugere isolamento por distância entre os fragmentos, que aumentou os coeficientes de endogamia. Com base nos índices de diversidade genética de Nei, apenas 6% da variabilidade genética está distribuída entre os fragmentos e 94%, dentro, devido à elevada taxa de cruzamentos observada. Os parâmetros para conservação genética (População Mínima Viável e Área Mínima Viável), determinados para conservação em curto e longo prazo, sugerem que somente o fragmento da Fazenda Inhatinhum apresentou potencial para persistência em curto prazo. Porém, em longo prazo nenhum dos fragmentos se mostrou viável, necessitando assim de uma intervenção urgente de modo a evitar seu declínio, sendo a criação de corredores ecológicos uma alternativa útil para conectar os fragmentos através do fluxo gênico entre si. A importância dos aplicativos computacionais para a simulação de parâmetros genéticos, ecológicos e reprodutivos populacionais, foi claramente evidente no neste estudo, demonstrando seu potencial na antecipação de fenômenos futuros, permitindo, assim, a identificação de populações prioritárias para a conservação.

Palavras-chave: Simulação em Easypop. Fluxo Gênico. Modo Reprodutivo. Conservação.

ABSTRACT

Master Degree Dissertation
Post-Graduation Course in Forest Engineering
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

A SIMULATION STUDY FROM MICROSATELLITE MARKERS DATA ON *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. FRAGMENTS OF THE PAMPA BIOME

AUTHOR: CAETANO MIGUEL LEMOS SERROTE

ADVISOR: LIA REJANE SILVEIRA REINIGER

Date and Place of Defense: Santa Maria, RS, August 21, 2015.

The objective was to use microsatellite DNA markers in simulations to study genetic, ecological and reproductive patterns that contributed to the genetic structure of five fragments of the forest tree species *Luehea divaricata* Mart. & Zucc, growing in the Pampa biome (Brazil). Various rates of selfing and migration were simulated. Selection criteria included observed and expected heterozygosity, with values of 0,52 and 0,64, respectively (based on microsatellite markers). Reproductive mode was mixed, with a predominance of outcrosses (rate = 0,7), consistent with a self-incompatibility system in this species, which reduced but did not prevent self-fertilization. Migration at the rate of 0,02, implied existence of isolation by distance between fragments, which increased inbreeding coefficients. Based on Nei's gene diversity analysis, only 6% of genetic variability was distributed among fragments, with 94% inside them, due to the high outcrosses observed. Parameters for genetic conservation, namely, Minimum Viable Population and Minimum Viable Area, determined for conservation in the short and long terms, suggested that only the Inhatinhum fragment had the potential to maintain its genetic diversity in the short term. However, in the long term, none of the fragments proved feasible, thus requiring urgent intervention to prevent a decline, with creation of ecological corridors as a useful alternative to connect fragments through gene flow. The importance of computer programs for simulation of genetic, ecological and reproductive population parameters were clearly evident, demonstrating its potential for predicting future phenomena, thereby enabling identification of priority populations for conservation.

Keywords: Easypop Simulation. Gene Flow. Reproductive Mode. Conservation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática dos principais modelos de mutação: A – modelo de sítios infinitos; B – modelo de alelos infinitos; C – modelo de mutação passo a passo. Fonte: Ethier e Griffiths (1987); Walsh (2002).42
- Figura 2 – Modelos de fluxo gênico. A: Modelo de alpondras (stepping stone) uni-dimensional; B: Modelo de alpondras (stepping stone) bi-dimensional; C: Modelo de ilhas; D: Modelo de ilha hierárquico; E: Modelo de isolamento por distância; F: Modelo continente-ilha. Fonte: KIMURA e WEISS (1964); BALLOUX (2001); ZUCCHI (2002); JOMBART et al. (2010).....46
- Figura 3 – Locais identificados de ocorrência natural de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) no Brasil. Fonte: Carvalho (2008).58
- Figura 4 – Localização geográfica dos fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. estudadas. A: Delimitações do Pampa strictu sensu no sul do Brasil, com a área amostral destacada na Figura. B: Localização dos cinco fragmentos de *L. divaricata* plotados nas imagens de satélite do bioma Pampa, usadas na caracterização molecular e simulações do presente estudo. Fonte: Nagel et al. (2015).61
- Figura 5 – Distribuição espacial das cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. com as duas coordenadas geográficas inseridas sobre o mapa. Fonte: adaptado de Nagel et al. (2015).62
- Figura 6 – Comportamento da heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_s) em função da taxa de migração para as autofecundações de 0,3 e 0,5 de cinco fragmentos de *L. divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.67
- Figura 7 – Evolução do número de alelos com o passar das 400 gerações de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.72
- Figura 8 – Comportamento da heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_s) ao longo das gerações de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.73
- Figura 9 – Heterozigosidade observada e esperada considerando a taxa de migração de 1% de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.78

Figura 10 – Heterozigosidade observada e esperada considerando a taxa de migração de 90% de cinco fragmentos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.....	78
Figura 11 – Diferenças entre as heterozigosidades (H_s-H_o) e índices de fixação em função do número de gerações de cinco fragmentos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.....	79
Figura 12 – Plotagem das estatísticas F de Wright para uma taxa de migração de 0,02 de cinco fragmentos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.....	80
Figura 13 – Plotagem das estatísticas F de Wright para uma taxa de migração de 0,9 de cinco fragmentos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema de análise de variância molecular (AMOVA) para locos com dois alelos.	33
Tabela 2 – Estimativas de heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_s) geradas por simulações no programa EASYPOP (BALLOUX, 2001) sob diferentes taxas de autofecundação e de migração, de cinco fragmentos de <i>L. divaricata</i> Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul.	64
Tabela 3 – Estimativas de heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_s) geradas por simulações no programa EASYPOP (BALLOUX, 2001), em função de diferentes taxas de autofecundação, taxas de migração, números de locos e números de estados alélicos possíveis, de cinco fragmentos de <i>L. divaricata</i> Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul.	66
Tabela 4 – Valores de heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_s) em função de diferentes taxas de migração, obtidos em simulações no programa EASYPOP (BALLOUX, 2001), de cinco fragmentos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul, considerando a taxa de autofecundação de 0,3, número de locos igual a 10 e número de estados alélicos possíveis igual a 50.	68
Tabela 5 – Número de indivíduos no fragmento (N), número de alelos (N_a), riqueza alélica (A_r), H_s = heterozigosidade esperada (H_s), F_{is} =coeficiente de endogamia dentro do fragmento e taxa de cruzamento aparente (\hat{t}_a) de fragmento de <i>Luehea divaricata</i> Mart & Zucc., obtidos a partir de dados de marcadores microssatélites e análises no programa FSTAT.....	72
Tabela 6 – Índices de diversidade genética de Nei entre e dentro de cinco fragmentos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul.	73
Tabela 7 – Estatísticas de estrutura genética sob diversas abordagens, geradas pelo programa FSTAT para cinco fragmentos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.	75
Tabela 8 – Estimativas de F_{ST} (diagonal superior) e fluxo gênico (diagonal inferior) par a par de cinco fragmentos de <i>Luehea divaricata</i> Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.	76

Tabela 9 – Validação das estatísticas de Cockerham com base em reamostragens e erro padrão de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015. 81

Tabela 10 – Parâmetros para conservação genética da população de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015. 82

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1– Entrada de dados no software EASYPOP para as simulações.....	96
Apêndice 2 – Lista de aplicativos computacionais comumente usados em genética de populações.....	98

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Sistemas reprodutivos em plantas	19
3.2	Importância da variabilidade genética	22
3.3	Os efeitos genéticos da fragmentação florestal.....	23
3.4	Evolução de marcadores moleculares	25
3.5	Estrutura genética populacional.....	28
3.5.1	Caracterização da estrutura genética de populações	29
3.5.2	A estatística R_{ST} para dados microssatélites	35
3.6	O Equilíbrio de Hardy – Weinberg.....	38
3.6.1.	A deriva genética	39
3.6.2.	Seleção.....	39
3.6.3	Mutação.....	40
3.6.4.	O fluxo gênico	43
3.7	População mínima viável e o tamanho efetivo populacional	49
3.8	Simulação de dados genéticos	52
3.8.1	O EASYPOP	54
3.8.2	O FSTAT.....	55
3.9	Descrição da espécie em estudo	56
4	METODOLOGIA	59
4.1	Simulações	59
4.2	Parâmetros Genéticos para a Conservação de Populações Naturais de <i>L. divaricata</i>	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	Seleção de Modelos	64
5.2	Caracterização dos fragmentos	68
5.3	Estrutura genética dos fragmentos	71
5.4	Parâmetros para a Conservação Genética	81
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

A crescente destruição e conseqüente fragmentação de habitats pela ação do Homem, que tem como principais causas o aumento global da população humana, o crescente desenvolvimento tecnológico e a exploração agropecuária desregrada, têm preocupado governantes e especialistas há várias décadas. Pelo fato de resultar na redução do tamanho e aumento do isolamento espacial de populações, podem desencadear processos ecológicos e genéticos com conseqüências potencialmente desastrosas, representando assim, a maior ameaça para a manutenção e viabilidade das populações naturais de plantas (LOWE et al., 2005; QUESADA et al., 2013).

Torna-se então imperativa a necessidade de uma abordagem mais integrativa para este problema, que combina ecologia e genética de populações. Espécies tropicais são particularmente muito vulneráveis aos efeitos da degradação do habitat devido às suas características demográficas e reprodutivas que incluem baixa densidade de ocorrência, sistemas complexos de autoincompatibilidade, altas taxas de polinização cruzada e interações íntimas com polinizadores e dispersores de sementes. Teoricamente, alterações populacionais associadas à degradação de habitats conduzem a uma erosão genética e aumento na divergência genética entre populações devido ao efeito da deriva genética aleatória, endogamia elevada e reduzido fluxo gênico, podendo, também, afetar a viabilidade da população a curto e longo prazos. Em curto prazo, as populações perturbadas têm aumentada sua susceptibilidade a doenças e pragas, perda de alelos de incompatibilidade e fixação de alelos deletérios. Em longo prazo, a perda de variabilidade genética pode conduzir à redução na capacidade das populações em responder a alterações nas pressões de seleção. A variabilidade genética é reconhecida como a componente chave para a sustentabilidade das espécies, pois fornece matéria-prima para a adaptação, evolução e sobrevivência de populações arbóreas, especialmente sob mudanças ambientais e ataque por doenças (RAJORA; MOSSELLER, 2001; LOWE et al., 2005).

Sugestões de estratégias para a conservação resultaram no estabelecimento do conceito de população mínima viável, o tamanho de uma população abaixo do qual os efeitos genéticos são mais severos, tornando o risco de extinção de espécies extremamente elevado. Porém,

esse parâmetro é variável e dependente de aspectos reprodutivos, demográficos e genéticos, que devem ser estudados com vista ao seu estabelecimento. Devido ao custo e disponibilidade de amostras genéticas, falta de conhecimento das variantes causais que contribuem para os fenótipos observados e intratabilidade matemática de modelos evolutivos complexos, simulações de computador têm sido amplamente utilizadas para, entre várias aplicações, prever resultados sob cenários genéticos reais e estimar parâmetros de modelos evolutivos (FLATHER, 2011; PENG et al., 2013).

Inúmeros programas já foram desenvolvidos para realizar simulação de dados genéticos e ecológicos. No presente trabalho recorreram-se a simulações com o programa EASYPOP (BALLOUX, 2001) para estudar os padrões genéticos, ecológicos e reprodutivos que melhor explicam a estrutura genética de cinco fragmentos da espécie arbórea florestal *Luehea divaricata* Mart. & Zucc, em desenvolvimento em área brasileira do bioma Pampa, os quais foram obtidos com base em marcadores de DNA do tipo microssatélites e, deste modo, entender sua história evolutiva e fornecer subsídios para o planejamento visando a sua conservação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Contribuir para a conservação dos recursos genéticos de fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., por meio de simulações de parâmetros genéticos empregando programas computacionais.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar e selecionar as estimativas de taxas de autofecundação e migração que melhor se ajustem aos dados obtidos a partir de análises com marcadores microssatélites em fragmentos de *Luehea divaricata*, por meio de simulações computacionais.
- Estimar parâmetros genéticos populacionais de utilidade para o planejamento de programas de conservação de fragmentos naturais de *Luehea divaricata* no bioma Pampa, baseado em dados de simulação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são revisados temas relacionados ao sistema reprodutivo em plantas, fragmentação do habitat e efeitos associados, variabilidade genética, marcadores moleculares, estrutura genética e sua respectiva caracterização, o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e fatores evolutivos a ele associados, parâmetros para a conservação dos recursos genéticos e a importância das simulações em aplicativos computacionais. Será dada maior atenção aos trabalhos com *Luehea divaricata* Mart. & Zucc., ou à família a qual pertence (Malvaceae) com vista a contribuir para a conservação de populações naturais dessa espécie arbórea florestal no bioma Pampa.

3.1 Sistemas reprodutivos em plantas

O sistema de reprodução refere-se à forma como as populações de uma espécie recombina seus genes a cada geração para formar a população descendente, determinando, desse modo, como a variabilidade genética de uma espécie se organiza no espaço e no tempo. O conhecimento do sistema reprodutivo das espécies que compõem uma dada formação florestal permite definir estratégias eficientes para a conservação de recursos genéticos (SEBBENN, 2002; BREIER, 2008).

No caso de populações vegetais, florestais em particular, devem ser conhecidas características básicas da biologia reprodutiva da espécie, incluindo-se época de floração e frutificação, principais agentes polinizadores e dispersores, e sistemas de cruzamento. Espécies que se reproduzem predominantemente por cruzamentos apresentam menor divergência genética entre populações do que espécies que se reproduzem predominantemente por autofecundação, porque as fecundações cruzadas recombina a variabilidade genética a cada geração e favorecem a dispersão dos genes via pólen a distâncias mais longas (BREIER, 2008).

Conforme o modo de reprodução sexual predominante, populações naturais de espécies florestais podem ser classificadas em autógamas, alógamas ou mistas. Existem diversos critérios para classificar uma espécie quanto ao modo reprodutivo, sendo que, de

acordo com a classificação comumente utilizada, quando, em suas populações, predomina a autofecundação (acima de 95% das fecundações que ocorrem), a espécie é classificada como autógama; quando predomina a fecundação cruzada (acima de 95%), ela é alógama; espécies intermediárias ou mistas possuem uma taxa de autofecundação entre 5 e 95% e são, normalmente, tratadas no melhoramento como alógamas (DESTRO; MONTALVÁN, 1999).

A grande maioria das espécies de angiospermas é hermafrodita, com flores bissexuais que contêm órgãos reprodutivos tanto androicos como ginoicos (estames e gineceu respectivamente), e somente 6% delas são dioicas (BAWA et al., 1985; MATSUNAGA et al., 2003), o que, neste caso, implica, obrigatoriamente, em alogamia. Apesar de não haver separação espacial dos órgãos sexuais na maioria das angiospermas, as espécies arbóreas tropicais geralmente apresentam sistema misto de reprodução com predomínio de cruzamentos (taxa média estimada em 0,88), embora parte dos cruzamentos ocorra de forma não aleatória, mas, sim, entre árvores aparentadas (cruzamentos endogâmicos) e de forma sistemática entre as mesmas árvores (cruzamentos biparentais), gerando progênie compostas por misturas de irmãos de autofecundação, irmãos germanos ou completos, além de meios irmãos. Esse fato se deve a adaptações evolutivas desenvolvidas por essas espécies para evitar a autofecundação e conservar a variação genética (SEBBENN, 2002; SOBIERAJSKI et al., 2006).

Dentre os vários mecanismos que favorecem a fecundação cruzada, a autoincompatibilidade é considerada o mais frequente (FRANKEL; GALUN, 1977). A autoincompatibilidade é um mecanismo genético-fisiológico que consiste na impossibilidade de produção de zigoto pela autofecundação ou pela fecundação de plantas que apresentam os mesmos alelos de incompatibilidade (SOBIERAJSKI et al., 2006). Brewbaker (1959) registrou sua ocorrência em, pelo menos, 71 famílias e em 250 de 600 gêneros estudados. Um dos primeiros estudos do sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais, levado a cabo por Bawa (1974), através de polinização controlada e observações sobre a biologia floral das espécies, comprovou que 79,4% possuíam algum mecanismo de autoincompatibilidade. Estudos realizados em cinco diferentes tipos de florestas neotropicais indicaram uma percentagem variando entre 76 a 86% de espécies autoincompatíveis (GIBBS, 1990).

Os sistemas de autoincompatibilidade (AI) são, geralmente, controlados por um único loco principal (o gene S), com muitas formas alélicas alternativas, os quais podem estar associados a outros genes que não contribuem para a especificidade da AI, mas parecem

participar de sua expressão. Existem dois tipos principais de autoincompatibilidade em espécies vegetais: a gametofítica (AIG), em que a especificidade do pólen é gerada pelo alelo S do genoma haploide do grão do pólen (gametófito), e a esporofítica (AIE), em que a especificidade é gerada pelo genótipo diploide da planta adulta (esporófito) que deu origem ao grão de pólen. A AIE pode ser homomórfica, quando não existem modificações florais que acompanham o processo, ou heteromórfica, quando, com o processo de AI, ocorrem modificações florais. Esses sistemas são geneticamente controlados por mecanismos que previnem a germinação do próprio pólen sobre o estigma, ou impedem o desenvolvimento do tubo polínico até o ovário, caracterizando, neste caso, sistemas de autoincompatibilidade pré-zigótica (GIBBS; BIANCHI, 1999). Existe, porém, um sistema diferenciado de autoincompatibilidade no qual frutos provenientes de flores autopolinizadas são abortados, determinando um sistema de autoincompatibilidade tardia ou pós-zigótica (DE NETTANCOURT, 1997; SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

Os mecanismos de AI para alguns grupos de plantas já foram descritos, cuja reação engloba desde o impedimento da germinação do pólen até o rompimento do tubo polínico. Em ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl.), por exemplo, o determinante feminino da AIG é uma ribonuclease (S-RNase) expressa no gineceu, onde as proteínas, localizadas principalmente na parte superior do estilete, atuam ao inibir ou degradar o RNA do tubo polínico que compartilha o mesmo alelo S do gineceu. Por sua vez, o determinante do alelo S do pólen é uma proteína F-box (*SFB-S-haplotype-specific F-box*) que, geralmente, atua como componente ligante da ubiquitina, envolvida em uma via de degradação proteica, mediada pela ubiquitina de S-RNases de pólen oriundo de cruzamento. Em uma situação de incompatibilidade, a S-RNase do gineceu degrada o RNA do pólen, o que impede o crescimento do tubo polínico (DE CONTI et al., 2013). Além da autoincompatibilidade, a machoesterilidade (incapacidade da planta hermafrodita ou monoica de produzir pólen viável ou até mesmo de não diferenciar estames) e a heterostilia, que consiste na diferença de comprimento entre estiletos e filetes da mesma flor, favorecem a fecundação cruzada (FRANKEL; GALUN, 1977).

Na família Malvaceae, entretanto, há um importante mecanismo que favorece a autofecundação, com os estames unidos aos seus filamentos em uma cobertura estaminal que rodeia o gineceu, através do qual deve passar o gineceu jovem para chegar a sua maturidade funcional. Como o pólen é descarregado no estigma receptivo na medida em que passa pela coluna estaminal, a autopolinização é efetivada em grande parte. Entretanto, muitas espécies

da família são protândricas (os estames amadurecem antes dos ovários) e algumas possuem nectários, existindo, assim, diversas formas de evitar a autopolinização mesmo na presença dessa morfologia floral peculiar (ELLIOTT, 1958).

3.2 Importância da variabilidade genética

As pesquisas mais recentes sobre a conservação dos recursos naturais têm focado no estudo da variabilidade genética existente entre e dentro de populações, pois a população é a unidade básica para a conservação da biodiversidade no nível de espécies individuais. A variabilidade genética permitiu o sucesso evolutivo de espécies no passado, sendo igualmente fundamental na sua sobrevivência e reprodução nas condições atuais. Quanto maior o número de alelos em uma população, maior será a diversidade de combinações alélicas, permitindo à população sobreviver e produzir descendentes sob uma ampla gama de condições ambientais (SILVA et al., 2014; VINSON et al. 2015).

O aumento na resistência de bactérias a antibióticos, insetos a pesticidas, plantas daninhas a herbicidas, e espécies arbóreas à poluição do ar, são exemplos de estudos dignos de nota sobre o quão os homens estão alterando as trajetórias evolutivas. Esses exemplos também ilustram que, na presença dos três requisitos para a evolução natural (isto é, a espécie é geneticamente variável para uma característica, tal característica influencia na sobrevivência ou no sucesso reprodutivo da espécie, e as diferenças nessa característica são herdáveis), a presença de variabilidade genética fornece a base da adaptação e resiliência em longo prazo de uma população (SCHABERG et al., 2008).

Assim, a conservação da variabilidade genética é determinante para a futura evolução e adaptabilidade das populações locais e da espécie no geral, pois a evolução atua sobre uma variabilidade existente na população, permitindo a seleção natural de preservar os indivíduos com maior aptidão às condições ambientais correntes (SILVA et al., 2014). No próximo tópico será feita uma abordagem do efeito contrário, ou seja, quando a variabilidade genética é reduzida em ecossistemas sob fragmentação.

3.3 Os efeitos genéticos da fragmentação florestal

A destruição de florestas tropicais tornou-se sinônimo de perda de espécies, pois apesar das florestas tropicais úmidas ocuparem 7% da superfície terrestre, estima-se que contenham mais de 50% do total das espécies existentes em nível mundial. Os ecossistemas das florestas tropicais são facilmente degradados porque seus solos são, com frequência, rasos e pobres em nutrientes e estão sujeitos à erosão devido à alta densidade pluviométrica. Além de estarem sendo destruídos rapidamente, os habitats que antes ocupavam grandes áreas, são com frequência divididos em porções menores, pelas estradas, ferrovias, campos agrícolas, cidades e outras atividades humanas. A fragmentação do habitat é o processo pelo qual grande e contínua área é reduzida tanto em termos de área, quanto dividida em dois ou mais fragmentos, podendo desencadear processos ecológicos e genéticos com consequências potencialmente desastrosas (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; ALTER et al., 2007).

Vários estudos apontam que a fragmentação florestal afeta a fenologia, os padrões de polinização e o sucesso reprodutivo de espécies florestais (SIH; BALTUS, 1987; KEARNS et al., 1998; FUCHS et al., 2002; LOWE et al., 2005; QUESADA et al., 2013). Fucks et al. (2002) observaram, em populações contínuas de *Pachira quinata*, níveis menores de parentesco entre indivíduos, maior tendência de cruzamentos e maior quantidade de doadores de pólen, comparadas às populações fragmentadas. A redução no tamanho da população pode reduzir a densidade de árvores reprodutivas, limitando, assim, a disponibilidade de pólen. O isolamento de unidades populacionais pode, também, alterar a atividade dos polinizadores pela redução na densidade de recursos alimentares potenciais e pelo aumento na distância entre esses recursos. Por exemplo, o aumento na densidade floral pode atrair mais polinizadores e induzir polinizadores individuais a visitar mais flores enquanto a redução dos recursos florais resulta em longas distâncias de viagem entre áreas de repouso e de alimentação. Quando a distância entre plantas é maior que a área de vida dos polinizadores (área necessária para o suprimento de suas necessidades vitais e reprodutivas), sua densidade diminui nas áreas perturbadas e resulta em menos visitas de polinizadores, limitando o potencial de dispersão, o que resulta no aumento das taxas de cruzamentos biparentais e de autofecundação.

Além de isolar reprodutivamente indivíduos que contêm apenas uma pequena amostra do conjunto gênico da população original, a fragmentação florestal pode causar contínua

perda de alelos devido à deriva genética (tópico desenvolvido na sequência), caso a população remanescente permaneça isolada por várias gerações, reduzindo, assim, a diversidade de combinações alélicas e a conseqüente flexibilidade adaptativa da população em face de alterações climáticas, aumentando a probabilidade de seu declínio. Por outro lado, associada a uma grande variabilidade genética está incluída uma carga genética, uma proporção de alelos deletérios recessivos que se encontram mascarados pela dominância em indivíduos heterozigotos e que, quando herdados em homozigose resultam em mortalidade, menor crescimento, defeitos e instabilidade no desenvolvimento, reduzido potencial reprodutivo, maior suscetibilidade a doenças, reduzida habilidade de resistência ao estresse e reduzida habilidade competitiva intra e interespecífica (ALLARD, 1971; SOUZA et al., 2004; RIDLEY, 2006).

Pinto (1995) destacou a importância da carga genética para a evolução das espécies, a qual depende da existência constante de variabilidade genética, o que torna inevitável a produção de indivíduos mal adaptados. A carga genética seria, então, o preço que uma população precisaria pagar para ter o privilégio da evolução. Em outras palavras, a garantia de sobrevivência de uma população em longo prazo passa pela produção constante de alguns indivíduos não tão adaptados às condições presentes, mas que, por acaso, possam estar pré-adaptados a certo ambiente no futuro. Assim, o aumento nas taxas de autofecundação (alelos de autoincompatibilidade podem ser perdidos pela deriva) e de cruzamentos biparentais devido ao isolamento reprodutivo de populações pequenas aumenta a expressão de alelos deletérios pelo aumento da endogamia, resultando na depressão por endogamia. Enquanto uma área grande de habitat pode ter sustentado uma única população grande, é possível que nenhum de seus fragmentos possa sustentar o suficiente uma subpopulação para que ela sobreviva por um longo período (RIDLEY, 2006; VINSON et al., 2015).

Estudos em genética de populações avançaram significativamente na década de 1960, a partir do desenvolvimento de técnicas de marcadores moleculares, fornecendo hoje uma gama de ferramentas passíveis de serem utilizadas em trabalhos de caracterização da variabilidade genética. Esse tema será abordado a seguir.

3.4 Evolução de marcadores moleculares

Diversas técnicas moleculares permitem determinar a variação presente em uma espécie e em suas populações. Entre essas técnicas, incluem-se aquelas destinadas à detecção de variação de sequências de DNA, conhecidas como marcadores moleculares. Elas permitem identificar variabilidade nas sequências de DNA dos indivíduos analisados a um nível de resolução superior ao polimorfismo passível de detecção ao nível morfológico e reduzem a enorme complexidade do genoma estudado à análise mendeliana dos segmentos de DNA detectados (os dados moleculares obtidos permitem estimar parâmetros genéticos úteis para um amplo espectro de estudos, desde identidade genética e construção de mapas genéticos até análises filogenéticas e evolucionárias) (FERREIRA, 2001; PEREZ-SWEENEY, 2004).

Com o desenvolvimento da eletroforese de isoenzimas, pela associação entre eletroforese de proteínas e coloração histoquímica (HUNTER; MARKET, 1957), tornou-se possível obter, rapidamente, grandes quantidades de dados de frequência gênica de populações naturais e maiores níveis de diferenciação genética. O termo isoenzima (ou isozima) foi introduzido por Market e Moller (1959) para designar formas moleculares múltiplas de enzimas, que ocorrem em um mesmo organismo e em membros da mesma espécie. Estudos bioquímicos usando a eletroforese de proteínas, que são os produtos primários dos genes, possuem a vantagem de serem de derivação genética conhecida, normalmente o produto direto de um único loco gênico, e que, em quase todos os casos, a estrutura molecular é exclusivamente determinada geneticamente, sem influência ambiental (THORPE e SOLÉ-CAVA, 1994).

Na eletroforese, a taxa de migração de uma molécula depende de vários fatores, incluindo seu tamanho e a carga elétrica. Uma substituição de um aminoácido em uma molécula de proteína pode alterar sua carga líquida, ou causar alterações conformacionais e, deste modo, alterar a taxa de migração no gel de eletroforese. Desse modo, mutações nas regiões do DNA codificadoras para uma proteína particular, resultarão em diferença de mobilidade em eletroforese, ou seja, na formação de uma nova proteína. Através do produto direto do gene, os marcadores moleculares enzimáticos (bioquímicos) vêm sendo utilizados em pesquisas populacionais e evolutivas de diversos organismos no nível intraespecífico, possibilitando avaliar o grau de variabilidade genética dentro e entre populações, assim como estimar os níveis de fluxo gênico entre populações (THORPE; SOLE-CAVA, 1994; LOXDALE; LUSHAI, 1998).

Na década de 1980, foram desenvolvidos marcadores moleculares em nível de DNA, os quais não são afetados por processos ambientais e biológicos. Teoricamente, qualquer fragmento de DNA pode ser utilizado como marcador molecular, desde que revele polimorfismo entre indivíduos. Seu número é ilimitado, desprovidos de efeito epistático (interação de locos diferentes codificando para uma mesma característica) ou pleiotrópico (um mesmo loco condicionando várias características) (NASS et al., 2001).

Botstein et al. (1980) propuseram a técnica de Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), que é capaz de diferenciar indivíduos através de variações nos nucleotídeos causadas por mutações, pela hibridização dos fragmentos com sequências homólogas de DNA (sondas) marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência. As enzimas de restrição existem naturalmente em bactérias e um grande número – mais de 2,3 mil – dessas enzimas é conhecido. Qualquer enzima de restrição corta a fita de DNA em locais específicos, geralmente com 4 a 8 pares de bases, denominados sítios de restrição ou de clivagem. A enzima de restrição *EcoRI*, por exemplo, reconhece a sequência de bases ...GAATTC... e a cliva entre a G inicial e a primeira A. Assim, se o DNA de dois indivíduos difere e um possui a sequência GAATTC em um dado sítio, enquanto o outro possui uma sequência diferente, como, por exemplo, GTATTC, a incubação do DNA desses indivíduos com *EcoRI* irá resultar na clivagem do DNA somente do primeiro indivíduo e não do segundo. A diferença entre os dois indivíduos poderá, então, ser detectada no comprimento dos fragmentos de DNA: o padrão do comprimento dos fragmentos será diferente para os dois indivíduos (BOTSTEIN et al., 1980; RIDLEY, 2006).

Apesar de serem codominantes, os marcadores RFLP envolvem uma técnica muito cara e laboriosa, o que motivou o desenvolvimento de técnicas de marcadores baseados em amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como: DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (RAPD), Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP), Sequências Internas Simples Repetidas (ISSR), Microsatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSR) e Etiquetas de Sequência Expressa (EST) – SSR, que são comumente usados para avaliar a variabilidade genética em espécies vegetais, incluindo as florestais. O desenvolvimento dessas ferramentas para as análises genéticas em nível molecular possibilitou analisar com maiores detalhes a origem evolucionária dos genomas vegetais, assim como acessar o grau de variabilidade genética relatado em grupos de plantas (KARDOLUS et al., 1998).

Os marcadores microssatélites (SSR) consistem de sequências curtas de nucleotídeos repetidas na mesma ordem, lado a lado (em *tandem*), cujo nível de polimorfismo produzido é devido à variação no número de unidades de repetição em um determinado loco. Os genomas eucariotos são densamente povoados por sequências simples repetidas, consistindo de dois a seis nucleotídeos repetidos em *tandem*. As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de *primers* ou iniciadores específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Resultantes de suas altas taxas mutacionais, alelos polimórficos ocorrem sempre que em um genoma esteja faltando a sequência repetida ou naqueles que têm uma deleção ou uma inserção que modifique a distância entre as repetições, permitindo a comparação do material genético de indivíduos diferentes (ZUCCHI, 2002; BORÉM; CAIXETA, 2006; RODRIGUES et al., 2010).

A hipervariabilidade dos microssatélites é mantida, principalmente, pelo pareamento errôneo dos filamentos polinucleotídicos durante a replicação do DNA, com o deslize (*slipage*) da enzima DNA polimerase. O número de repetições pode aumentar ou diminuir, caso ocorra adição ou perda de uma ou mais unidades de repetição pela DNA polimerase e se houver falha na atividade exonucleásica dessa enzima. Por possuírem elevada reprodutibilidade e serem de herança codominante, esses marcadores vêm sendo bastante utilizados para a estimativa de parâmetros genéticos de populações vegetais e para a compreensão de padrões de fluxo gênico e parentesco. Porém, sua utilização em espécies florestais é limitada pela dificuldade de desenvolver iniciadores para essas espécies devido à exigência de um conhecimento prévio do genoma a ser estudado, ao elevado custo e tempo necessário para seu desenvolvimento (MORGANTE; OLIVIERI, 1993; GOULÃO; OLIVEIRA, 2001; ELLEGREN 2004).

Pesquisas em genética de populações por meio do emprego de marcadores moleculares buscam analisar o modo de distribuição da variabilidade genética, identificando se a variação é maior entre ou dentro de populações, fenômeno conhecido como estruturação genética. A estruturação genética, que é assunto do próximo tópico, serve como guia no ato de amostragem para coleta de material genético e, também, no planejamento e estabelecimento de áreas de conservação florestal.

3.5 Estrutura genética populacional

Uma população, sob um prisma genético, é um conjunto de indivíduos de uma mesma espécie que apresentam uma continuidade no tempo e uma capacidade de se cruzar ao acaso, ou seja, de trocar alelos entre si; essa definição exclui, portanto, as plantas autógamas, as quais não trocam alelos entre si (ou o fazem em proporções muito baixas). As propriedades genéticas das populações são determinadas a partir do conhecimento de suas frequências gênicas e genóticas (PINTO, 1995).

A distribuição heterogênea (não aleatória) dos alelos e genótipos no espaço e no tempo, resultante de forças evolutivas, é denominada *estrutura genética* e pode influenciar significativamente os processos genéticos e ecológicos das espécies, resultando, assim, em agregados de genótipos específicos. O nível de alteração genética entre populações naturais é de importância crítica para o entendimento de muitos processos biológicos, como a diferenciação genética e a manutenção da variabilidade genética em condições de fragmentação de populações (HAMRICK, 1982; SHAPCOTT, 1995; ZUCCHI, 2002; STEFENON, 2010).

A análise espacial da divergência genética entre populações locais sempre desempenhou um papel central na genética de populações e biologia evolutiva. A divergência genética pode aumentar com a distância geográfica tanto porque a variação ambiental (e efeitos seletivos associados) torna-se mais heterogênea em grandes distâncias, ou porque as baixas taxas de fluxo gênico não restringem a divergência pela deriva aleatória. Estimativas do fluxo gênico histórico em populações naturais possuem importantes consequências para o planejamento de estratégias de conservação, recuperação de áreas degradadas ou planejamento de programas de melhoramento genético (DINIZ-FILHO; TELLES, 2000; STEFENON, 2010).

Em uma população grande e fusionada existe um número menor de homozigotos do que a média para o conjunto de populações subdivididas e em equilíbrio. A frequência elevada de homozigotos em populações subdivididas é denominada *efeito Wahlund*, que mede o efeito da subdivisão na endogamia, traduzida pelo aumento da homozigosidade e a consequente diferenciação genética entre as subpopulações. Nessa condição, o fluxo gênico adquire grande importância para homogeneização das frequências gênicas. A extensão do

fluxo gênico entre populações locais determina seu potencial para a diferenciação genética e a compreensão do seu papel evolutivo é fundamental para o manejo de espécies ameaçadas de extinção. Taxas moderadas a altas de fluxo gênico entre as populações evitam seu isolamento reprodutivo, mantendo, assim, a variabilidade genética (SLATKIN, 1985; STORFER, 1999; RIDLEY, 2006).

3.5.1 Caracterização da estrutura genética de populações

Os estudos ligados à genética de populações visam descrever e analisar a distribuição da variabilidade genética total dentro e entre as populações, partindo das frequências alélicas e genotípicas, tendo como princípio o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, um tópico a ser desenvolvido na sequência. Os resultados de tais estudos constituem um passo importante para entender que fatores evolutivos estão atuando nessas populações e sua respectiva magnitude, de modo a desenhar estratégias apropriadas para a conservação dos recursos genéticos. Os parâmetros comumente usados para caracterizar as populações genéticas incluem: número de alelos por loco (riqueza alélica) ou total, número de alelos efetivos, raros ou privados, conteúdo de informação polimórfica, heterozigosidade observada e esperada, coeficiente de endogamia ou índice de fixação e riqueza genotípica (índice de Shannon-Wiever) (SÁNCHEZ, 2008).

O número total de alelos existente na população constitui-se em um parâmetro populacional importante por estar relacionado à capacidade de as populações se adaptarem às alterações ambientais. Quanto maior o número de alelos na população, maior a diversidade de combinações possíveis que originam diferentes genótipos capazes de se adaptar a determinadas condições do ambiente. Por exemplo, determinados genótipos podem ser bem adaptados a condições de geada, ao passo que outros se adaptam ao estresse hídrico (seca ou alagamento), resistentes ao ataque de pragas ou doenças, aumentando, assim, a probabilidade de persistência das populações em um ambiente em constantes alterações de maneira estocástica (aleatória) (VINSON et al., 2015).

Uma medida relativa da quantidade de alelos é a riqueza alélica, a qual corresponde ao número médio de alelos segregando em um loco dentro de uma população, mas pode ser também abordada em termos de número médio de alelos por loco. Esse parâmetro permite comparar a variabilidade genética de populações com diferente tamanho amostral (baseado no

menor tamanho amostral entre as populações) e é expresso pela equação (SANCHEZ-MAZAS et al., 2012):

$$Ar = \sum_{i=1}^k \left[1 - \frac{\binom{2N - N_i}{2n}}{\binom{2N}{2n}} \right], \text{ adaptada da equação original de Hurlbert (1971)}$$

para o cálculo da riqueza de espécies:

$$E(S_n) = \sum_i \left[1 - \frac{\binom{N - N_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right]$$

Em que Ar é a riqueza alélica (do inglês, *allelic richness*), K é o número de alelos na amostra, N_i o número de ocorrências do i -ésimo alelo entre os $2N$ genes amostrados e n o tamanho da amostra (número total de indivíduos amostrados).

Além de comparar a variabilidade genética entre diferentes populações, a riqueza alélica pode ser um indicador de uma redução no tamanho populacional ou de gargalos passados. Além disso, é uma medida relevante em uma perspectiva de longo prazo, pois os limites da seleção são determinados mais pela composição inicial das frequências alélicas do que pela heterozigosidade. Como um componente da variabilidade genética, fornece informação importante para a escolha de populações prioritárias em programas de manejo e conservação. (PETIT et al., 1998; GREENBAUM et al., 2014).

Outro parâmetro usado na caracterização de uma população é a heterozigosidade, que pode ser definida para um dado loco ou como uma média de um conjunto de locos analisados (amostrados). A heterozigosidade de um loco é definida como a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto naquele loco, em uma população. Subdivide-se em heterozigosidade observada (a proporção de indivíduos heterozigotos observados em uma população estudada) e heterozigosidade esperada (equivalente à heterozigosidade observada, considerando-se que as populações estão em completo equilíbrio). A heterozigosidade esperada (H_S) é também definida como uma fração estimada de todos os indivíduos que poderiam ser heterozigóticos em um dado loco, com base nas frequências alélicas, sendo que

o desvio em relação à heterozigosidade observada (H_O) pode ser um indicativo da atuação de fatores evolutivos (seleção, migração, deriva e mutação) (ARAÚJO, 2004).

Para estudar populações estruturadas, Nei (1977) definiu níveis hierárquicos de heterozigosidade a partir de frequências alélicas em termos de heterozigosidade média observada por indivíduo dentro de subpopulações (H_O), heterozigosidade média esperada dentro de subpopulações com cruzamentos aleatórios (H_S) e heterozigosidade esperada na população total com cruzamentos aleatórios, sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_T):

$$H_O = \frac{\sum \sum x_{il}}{ls} \quad H_S = 1 - \frac{\sum \sum x_{ilk}^2}{ls} \quad H_T = 1 - \frac{\sum \left(\frac{\sum x_{ilk}}{s} \right)^2}{l}$$

sendo:

x_{il} = frequência de heterozigotos do loco l na população i

x_{ilk} = frequência do alelo k do loco l na população i

s = número de populações

l = número de locos

Conhecidas como estatísticas de Nei, permitem quantificar a variabilidade genética entre e dentro de populações através da heterozigosidade gênica ou alélica. Baseia-se na partição da variabilidade genética total (H_T) nos seus componentes entre (D_{ST}) e dentro (H_S) de populações:

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

Assim, a variabilidade relativa entre populações (G_{ST}) e a variabilidade relativa dentro das populações (G_{IS}) são dadas, respectivamente, por:

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T} = \frac{D_{ST}}{H_T}$$

$$G_{IS} = \frac{H_S}{H_T} \quad \text{ou} \quad G_{IS} = 1 - G_{ST}$$

Ainda no âmbito de análise genética de populações estruturadas, as estatísticas F de Wright (1965) e os coeficientes de coancestralidade de Cockerham (COCKERHAM, 1969; WEIR; COCKERHAM, 1984), são outras abordagens comumente usadas. Com base nos níveis hierárquicos da heterozigosidade, as estatísticas F permitem caracterizar a distribuição da variabilidade genética entre populações (F_{ST}), o coeficiente de endogamia dentro das populações (F_{IS}) e o índice de fixação global (F_{IT}):

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_O}{H_S}; \quad F_{IT} = 1 - \frac{H_O}{H_T} \quad e \quad F_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T}$$

$$1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$$

Se o valor de F_{ST} , for igual a 0 (zero), as populações têm frequências alélicas idênticas. No outro extremo, um valor de F_{ST} igual a 1 (um) é indicativo de que as populações fixaram alelos diferentes. Quanto ao índice de fixação (F_{IS}), se o valor for igual a 0 (zero), a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg; se for superior a 1 (um), existe carência de heterozigotos na população; se for igual a 1 (um), existe ausência total de heterozigotos; se for inferior a 0 (zero), significa um excesso de heterozigotos (seleção favorável a heterozigotos) (ZUCCHI, 2002).

Por sua vez, Cockerham (1969) abordou as estatísticas F para quantificar o grau de parentesco entre pares de alelos, com base na análise de variância das frequências alélicas, conhecida como Análise de Variância Molecular (AMOVA). A Tabela 1 apresenta um esquema de AMOVA, considerando-se três níveis de hierarquia para indivíduos diploides (s = populações, n = indivíduos e g = número de alelos, igual a 2 em organismos diploides):

Tabela 1 – Esquema de análise de variância molecular (AMOVA) para locos com dois alelos.

FONTE DE VARIACÃO	GL	SQ	QM	E(QM)
Entre populações	$s - 1$	SQ_P	QM_P	$\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2 + 2n\sigma_P^2$
Entre indivíduos dentro de populações	$s(n - 1)$	SQ_I	QM_I	$\sigma_G^2 + 2\sigma_I^2$
Genes dentro de indivíduos	$ns(g - 1)$	SQ_G	QM_G	σ_G^2
TOTAL	$2ns - 1$			

Fonte: ZUCCHI (2002).

Os componentes de variância podem então ser definidos da seguinte maneira:

$\sigma_P^2 = p(1 - p)\theta$; $\sigma_I^2 = p(1 - p)(F - \theta)$ e $\sigma_G^2 = p(1 - p)(1 - F)$, para populações, indivíduos dentro de populações e alelos dentro de indivíduos, respectivamente, e que podem ser reescritas para os parâmetros das estatísticas F nos seguintes termos:

$$\theta = F_{ST} = \frac{\sigma_P^2}{\sigma_T^2}; \quad F = F_{IT} = \frac{\sigma_I^2 + \sigma_P^2}{\sigma_T^2}; \quad e \quad f = F_{IS} = \frac{\sigma_I^2}{\sigma_I^2 + \sigma_G^2}$$

Desse modo:

F_{ST} de Wright: é o coeficiente de coancestralidade e representa a probabilidade de que dois indivíduos, pertencentes a subpopulações diferentes, possuam um alelo idêntico por descendência; θ de Cockerham, parâmetro análogo, é uma medida de correlação de gametas entre subpopulações.

F_{IS} de Wright: coeficiente de endogamia dentro de subpopulações mede a probabilidade de que dois alelos em um dado loco, presentes no mesmo indivíduo sejam idênticos por descendência; análogo ao f de Cockerham, medida de correlação de gametas devido à endogamia dentro de subpopulações.

F_{IT} de WRIGHT: é o coeficiente de endogamia referente aos indivíduos em relação ao conjunto de populações e reúne a informação dos índices de fixação F_{ST} e F_{IS} ; mede o desvio das frequências genóticas da população em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, resultante de cruzamentos não aleatórios na população total, incluindo a endogamia em todos os níveis; a estatística de Cockerham análoga é o F , que é a correlação entre dois gametas que formam um zigoto no conjunto das subpopulações.

As estatísticas F podem ser redefinidas e relacionadas com os coeficientes de coancestria nos seguintes moldes:

$$F_{IS} = \frac{F_{IT} - F_{ST}}{1 - F_{ST}} = \frac{F - \theta}{1 - \theta} \quad F_{ST} = \frac{F_{ST} - F_{IS}}{1 - F_{IS}} = \frac{\theta - f}{1 - f}$$

$$F_{IT} = \frac{F_{IT} - F_{IS}}{1 - F_{IS}} = \frac{F - f}{1 - f}$$

Como padrão de qualificação da diferenciação de populações, é usada uma escala para F_{ST} e G_{ST} , identificando-se, assim, populações com diferenciação baixa (0 a 0,05), intermediária (0,05 a 0,15), alta (0,15 a 0,20) e super alta (maior que 0,20) (HARTL; CLARK, 2010).

O coeficiente de endogamia intrapopulacional (F_{IS}) é útil para estimar, de maneira indireta, a taxa de cruzamento, permitindo classificar uma população conforme o modo reprodutivo em autógama (taxa de cruzamento entre 0 e 0,05), mista (taxa de cruzamento entre 0,05 e 0,95) e alógama (taxa de cruzamento entre 0,95 e 1). Partindo da relação entre a taxa de cruzamento e o coeficiente de endogamia proposta por Nei e Syakudo (1958):

$\hat{F} = (1 - \hat{t}_{eq}) / (1 + \hat{t}_{eq})$, a taxa de cruzamentos aparente, também denominada por taxa de cruzamentos de equilíbrio pode ser estimada:

$$\hat{t}_{eq} = (1 - \hat{F}) / (1 + \hat{F})$$

A taxa de cruzamento obtida dessa maneira é denominada *aparente* por ser proveniente de dados de apenas uma geração e ser estimada a partir do índice de fixação intrapopulacional, o que torna a estimativa dependente da pressuposição do Equilíbrio de Wright (que assume a autofecundação como a única causa de endogamia na população), além de assumir uma constância nas taxas de cruzamento ao longo do tempo. Trata-se, então, de uma abordagem indireta da taxa de cruzamento, portanto, uma estimativa menos robusta (RITLAND; JAIN, 1981; MORAES; MONTEIRO, 2002; ZUCCHI, 2002).

Entre os métodos diretos para determinação da taxa de cruzamento, o modelo de Ritland é o mais aceito em todo mundo e permite a determinação da taxa de cruzamento real (ou multiloco), baseado na estrutura de progênies. Com base no método de máxima verossimilhança é obtida uma equação que permite estimar, além da taxa de cruzamento, as frequências gênicas, através da segregação simultânea de alelos em vários locos analisados com marcadores moleculares. As proporções genotípicas observadas na progênie de um genótipo materno conhecido são ajustadas às proporções esperadas sob um modelo misto de reprodução, sabendo-se que cada progênie é derivada de óvulos que cruzam com probabilidade t para um conjunto de pólen cuja frequência gênica é p e da autofecundação com probabilidade $(1 - t)$. Como t e p são desconhecidos, as duas estimativas devem ser determinadas simultaneamente (RITLAND; JAIN, 1981).

3.5.2 A estatística R_{ST} para dados microssatélites

As medidas tradicionais de diferenciação genética, nomeadamente, a variabilidade genética entre populações (F_{ST}), a diversidade genética entre populações (G_{ST}) e a correlação genética de gametas entre populações (θ), se baseiam nos modelos de mutação IAM (em que os eventos de mutação geram novos alelos não presentes anteriormente na população) ou KAM (em que as mutações conduzem a qualquer um dos k estados alélicos pré-existent) (GOODMAN, 1997). No caso de microssatélites, em que a maioria das mutações envolve adição ou subtração de unidades de repetição, essas estatísticas se tornam inapropriadas. Slatkin (1995) demonstrou que o F_{ST} tende a subestimar o verdadeiro grau de diferenciação quando aplicado a dados de microssatélites, pois alelos microssatélites de igual comprimento (isto é, com igual número de repetições) são normalmente mais relacionados entre si do que aqueles de comprimentos diferentes (com diferente número de repetições), ocultando, assim, alguma informação mais detalhada acerca da relação entre alelos (F_{ST} faz a diferenciação

levando em consideração apenas o número de unidades de repetição de microssatélites entre indivíduos) (VALDES et al., 1993; SLATKIN, 1995; RODRIGUES et al., 2010; VALLE et al., 2011).

Além do modelo de mutação, as taxas de mutação consideradas desempenham um papel igualmente preponderante. Em uma população ideal [modelo de migração de Wright (1931)], assumindo que a mutação segue o modelo de alelos infinito, F_{ST} é uma função decrescente de $N^*(m+\mu)$, o produto do tamanho da população local e a soma das taxas de migração e de mutação. Porém, a taxa de mutação no modelo de alelos infinitos é muito baixa e pode ser negligenciada, tornando o F_{ST} uma função apenas do tamanho populacional e do número de migrantes. Por outro lado, devido às taxas de mutação elevadíssimas dos locos microssatélites (cerca de 10^{-3} por geração), que evoluem segundo o modelo de mutação passo a passo (SMM), seu padrão de mutação não deve ser negligenciado em estatísticas de diferenciação genética, pois seria perdida alguma informação adicional acerca das relações entre alelos (GOODMAN, 1997; BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002).

Por essa razão, foi derivada a estatística R_{ST} por Slatkin (1995) e Goodman (1997), como uma adaptação da estatística F_{ST} para locos microssatélites e que permite analisar com maior precisão as relações entre populações, independente da taxa de mutação. Slatkin (1995) chegou à seguinte expressão:

$$R_{ST} = \frac{\bar{S} - S_w}{\bar{S}}$$

em que \bar{S} é a variância no tamanho de alelos na população total e S_w é a variância no tamanho de alelos dentro das subpopulações.

Uma vez que \bar{S} e S_w são proporcionais às variâncias dentro e entre populações, R_{ST} corresponde, então, à fração da variância total do tamanho alélico que se encontra entre populações. Desse modo, o valor de R_{ST} é idêntico ao θ definido por Cockerham (1969), que é também um componente da variância interpopulacional, diferindo apenas na abordagem: R_{ST} leva em consideração também o tamanho de alelos, ao passo que θ se baseia apenas na identidade ou não identidade de estado alélico (SLATKIN, 1995).

Por sua vez, Goodman (1997) observou que a expressão derivada por Slatkin (1995), pode resultar em estimativas não acuradas de R_{ST} para um conjunto de dados reais, pois os dados de populações naturais carecem de correção para diferenças no tamanho amostral entre populações e na magnitude de variância de tamanhos de alelos entre locos. Quando os tamanhos amostrais diferem entre populações, aquelas de menor tamanho contribuem menos para a variância total do que as amostras de maior tamanho. De igual modo, quando existem diferenças acentuadas nas variâncias de tamanho de alelos entre locos, aqueles com menor variância (locos menos variáveis) contribuirão menos no valor final de R_{ST} , mesmo se, individualmente, exibam altos níveis de diferenciação. Assim, aquele autor derivou a seguinte expressão, através da ponderação para essas diferenças, características de populações naturais:

$$\rho = \frac{\sum_I \sigma_B^2}{\sum_I \sigma_B^2 + \sigma_W^2}$$

em que: $\rho = R_{ST}$ é a medida de diferenciação genética entre populações; σ_B^2 é a variância do tamanho de alelos entre populações; e σ_W^2 corresponde à variância do tamanho de alelos dentro de populações.

Contudo, nenhum dos modelos parece se encaixar perfeitamente em todos os locos microssatélites. Consequentemente, ambos os estimadores tradicionais de diferenciação (estatísticas F) e os estimadores de diferenciação específicos de microssatélites (estatísticas R) são comumente usados em estudos com marcadores microssatélites (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002).

Devido à fragmentação a que as populações naturais são sujeitas, surge, então, a necessidade de estudar seu impacto sobre uma população de cruzamentos aleatórios, denominadas panmíticas. O desvio de panmixia pode ser testado através do modelo de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, assunto abordado no próximo tópico.

3.6 O Equilíbrio de Hardy – Weinberg

No âmbito da coleta e conservação da variabilidade genética, o estabelecimento de estratégias seguras carece de pesquisas sobre o modo de distribuição dos genes nos indivíduos. A lei de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) tem sido usada há mais de um século servindo para uma melhor compreensão das características genéticas das populações:

Na ausência de fatores evolutivos (seleção, migração, deriva e mutação) atuando sobre uma população, as proporções alélicas permanecem inalteradas, e as proporções genotípicas atingem um equilíbrio estável, mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo (REIS et al., 2011, p. 835).

Conforme demonstrado por Ridley (2006), as frequências genotípicas de Hardy-Weinberg são alcançadas após uma única geração de cruzamentos aleatórios a partir de quaisquer frequências genotípicas iniciais, desde que satisfeitas as condições de equilíbrio.

A condição de equilíbrio pressupõe uma população infinita (ou suficientemente grande) com cruzamentos aleatórios (panmixia), sendo apenas uma idealização, pois (i) por maior que seja, toda população é uma entidade finita e (ii) cruzamentos aleatórios seriam aplicados a sistemas em que cada indivíduo da população possui a mesma probabilidade de gerar descendentes, com cada gameta feminino tendo igual probabilidade de ser fertilizado por qualquer gameta masculino, uma condição não aplicável a populações naturais devido à ocorrência constante de seleção natural (gerando indivíduos incapazes de se reproduzir) e cruzamentos preferenciais e endogâmicos. Deste modo, o modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg é útil para quantificar os efeitos dos fatores evolutivos e de atividades humanas sobre os ecossistemas naturais (SANCHEZ, 2008).

O teste de qui quadrado (χ^2) pode ser usado para comparar as frequências observadas e as frequências esperadas, com vistas a verificar se determinada população se encontra ou não em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A seguir serão discutidos os efeitos dos fatores evolutivos na alteração do equilíbrio de Hardy-Weinberg, os quais incluem a mutação e a migração, fenômenos que são o objeto do presente estudo com fragmentos de *Luehea divaricata*.

3.6.1. A deriva genética

Em qualquer população, os genes transmitidos para uma geração seguinte são amostras dos genes existentes na geração corrente; sendo assim, uma variação no tamanho da amostragem em gerações que se sucedem pode alterar as frequências gênicas. Quanto menor o tamanho da população, tanto maior será a variação nas frequências gênicas, acelerando, assim, em direção à fixação ou extinção de um determinado alelo, o efeito extremo da deriva genética (HELLBERG et al., 2002).

Um caso particular da influência da amostragem aleatória é o *efeito do fundador*, definido por Mayr (1963) como: “o estabelecimento de uma nova população por uns poucos fundadores originais (em um caso extremo, por uma única fêmea fertilizada), que contêm só uma pequena fração da variação genética total da população parental”. Pode ocorrer pela (i) colonização de um pequeno número de indivíduos de um local previamente desabitado pelas suas espécies, ou (ii) variação em tamanho de uma população já estabelecida em uma área, passando por um “gargalo genético”, no qual apenas uns poucos indivíduos sobrevivem e, mais tarde, se expandindo novamente, quando o período favorável retorna (RIDLEY, 2006).

Uma teoria moderna da deriva genética, *a teoria da coalescência*, permite traçar a ancestralidade de um determinado gene e construir uma árvore genealógica dos genes (para um loco particular) em uma amostra populacional, até o ponto em que todos os genes possuem um único ancestral comum. Com base no princípio do “ancestral comum mais recente”, relações entre espécies podem ser visualizadas através de um diagrama ramificado. Técnicas cladísticas (inferência baseada em caracteres morfológicos) ou sequências moleculares são usadas na filogenia, buscando identificar com qual outra espécie (ou grupo de espécies) uma determinada espécie, ou um determinado grupo de espécies, compartilha o ancestral comum mais recente, resultando, assim, um diagrama no formato de árvore – dendrograma (FU; LI, 1999; RIDLEY, 2006).

3.6.2. Seleção

A luta pela sobrevivência impulsiona o aumento nas taxas reprodutivas dos seres vivos, de modo a garantir a perpetuação da espécie sob condições adversas do ambiente. O excesso reprodutivo resulta em competição, de tal forma que aqueles indivíduos que menos se

adaptam sofrem os efeitos da seleção natural, traduzida em mortalidade ou no baixo potencial reprodutivo. A seleção atua sobre uma variabilidade limitada, através de um processo de eliminação, conservando apenas os indivíduos melhor adaptados às condições sob as quais as populações vivem. Apenas uma fração do número de indivíduos produzidos em qualquer grupo tem a chance de sobreviver e deixar descendentes, devido a sua adaptação ao ambiente (WRIGHT, 1931; RIDLEY, 2006).

Fisher demonstrou que numa população diploide e em equilíbrio, a seleção em favor de um homozigoto resultaria, inevitavelmente, na eliminação do outro. Por outro lado, se o heterozigoto for mais adaptado que qualquer um dos homozigotos resulta um equilíbrio estável em um polimorfismo balanceado. Nessas condições, a sobrevivência de novas mutações tem chances muito pequenas e depende mais do acaso do que da seleção. Assim, grandes populações seriam reservatórios de variabilidade genética desde que mutações recorrentes (repetitivas) possuam uma maior chance numérica de sobreviver em baixas frequências. A seleção atuando sobre populações grandes é o principal mecanismo evolutivo na natureza, superando a deriva aleatória (FISHER, 1918; PROVINE, 1990).

A importância da seleção natural sobre a evolução está relacionada com o conceito de *carga genética*, proposto por Kimura e que sustentou a teoria neutra. A carga genética é definida como a fração de uma população que deixa de sobreviver ou de se reproduzir devido aos genes desvantajosos que ela possui. Uma determinada população irá conter vários genótipos, e cada genótipo possui um determinado valor adaptativo (a probabilidade de sobrevivência desde o nascimento até a vida adulta). Ao genótipo com o valor adaptativo mais elevado é atribuído o valor adaptativo relativo de um. A soma dos produtos entre os valores adaptativos dos genótipos pela respectiva frequência na população resulta no valor adaptativo médio de toda população, cuja diferença para um corresponde à carga genética da população. Se todos os indivíduos da população possuírem o genótipo ótimo, o valor adaptativo é um e a carga genética é zero. Se todos, menos um, possuírem um genótipo de valor adaptativo zero, o valor adaptativo médio da população é zero e a carga genética é um (RIDLEY, 2006).

3.6.3 Mutação

As moléculas no DNA de um organismo não são estáticas. Com frequência, as bases nitrogenadas de seus nucleotídeos estão expostas aos agentes, naturais ou artificiais, que

provocam modificações em sua estrutura ou composição química. Uma mutação é definida como qualquer alteração casual e hereditária no conjunto gênico de um organismo, não explicável pela recombinação da variabilidade genética preexistente. Todos os seres vivos sofrem mutações como resultado de funções celulares normais ou interações aleatórias com o ambiente. Uma mutação pontual, ou seja, uma alteração em um único par de bases nitrogenadas do DNA (substituição) ou em poucos pares de bases (adição/inserção, deleção ou translocação) pode originar uma proteína alterada conforme o códon resultante da nova sequência de bases. Uma mutação pontual pode resultar do mau funcionamento do sistema celular que replica ou repara o DNA, inserindo uma base incorreta na cadeia polinucleotídica que está sendo sintetizada ou de uma interferência química sobre uma das bases do DNA (ZAHA et al., 2014).

Uma mutação irreversível de um gene na taxa u por geração altera a frequência gênica (q) numa taxa $\Delta q = -uq$. Com mutação reversa na taxa v , a alteração na frequência gênica é $\Delta q = -uq + v(1-q)$. Na ausência de outros fatores, um equilíbrio é atingido entre as duas taxas de mutação quando $\Delta q = 0$, dando $q = v/(u+v)$ (WRIGHT, 1931).

A. Modelos de mutação

Inferências em genética de populações dependem dos modelos de mutação assumidos e as taxas em que elas ocorrem. Os principais modelos de mutação estudados são descritos a seguir:

Modelo de sítios infinitos: introduzido por Kimura (1969; 1971) e aprofundado por diversos pesquisadores, assume que (i) um vasto (praticamente infinito) número de sítios para mutação estão disponíveis (o número de nucleotídeos que compõem o genoma é tão grande, porém a taxa de mutação por sítio é tão baixa), de tal maneira que (ii) sempre que um mutante aparece, representa uma mutação em um novo (diferente) sítio. Ethier e Griffiths (1987) propuseram um esquema tendo como exemplo três genes mutantes ($y_1, x_0, x_1, x_2, \dots$), ($y_4, y_3, y_2, x_0, x_1, x_2, \dots$) e ($y_5, y_2, x_0, x_1, x_2, \dots$), obtidos do gene selvagem (x_0, x_1, \dots), partindo do modelo padrão com os genes mutantes $(\dots, 1, 1, 0, 0, 0, 0, \dots)$, $(\dots, 1, 0, 1, 1, 1, 0, 0, \dots)$ e $(\dots, 1, 0, 1, 0, 0, 1, 0, \dots)$ do gene selvagem $(\dots, 1, 0, 0, 0, 0, 0, 0, \dots)$. Em ambos os modelos pode se inferir que os três genes possuem um ancestral comum, cinco sítios segregantes e uma árvore genealógica (condensada) na forma apresentada na Figura 1A.

Modelo de alelos infinitos: Assume que toda mutação cria um novo alelo, nunca observado previamente (Figura 1B). Ao contrário do modelo anterior, não é especificada a relação entre os diferentes alelos (RUVINSKY; GRAVES, 2005). Um caso especial desse modelo é o modelo de k-alelo (KAM), limitado a um número finito (k) de estados alélicos, em que cada alelo pode mutar para qualquer dos outros k-1 possíveis alelos com igual probabilidade (BALLOUX, 2001).

Modelos de mutação passo a passo (SMM): Na sua forma mais simples, o modelo assume que a mutação atua no aumento ou diminuição da mobilidade de um alelo em uma unidade. Originalmente descrito por Ohta e Kimura (1973), é considerado o modelo de evolução dos tamanhos de alelos microssatélites, segundo Shriver et al. (1993) e Valdes et al. (1993). Existem diversos modelos de mutação passo-a-passo, desde os de único passo (SSM), que assumem que todas as alterações são derivadas de uma única repetição, como aqueles de múltiplos passos, em que as alterações são derivadas de mais de uma repetição (Figura 1C), conforme descritos por Estoupe et al. (2002).

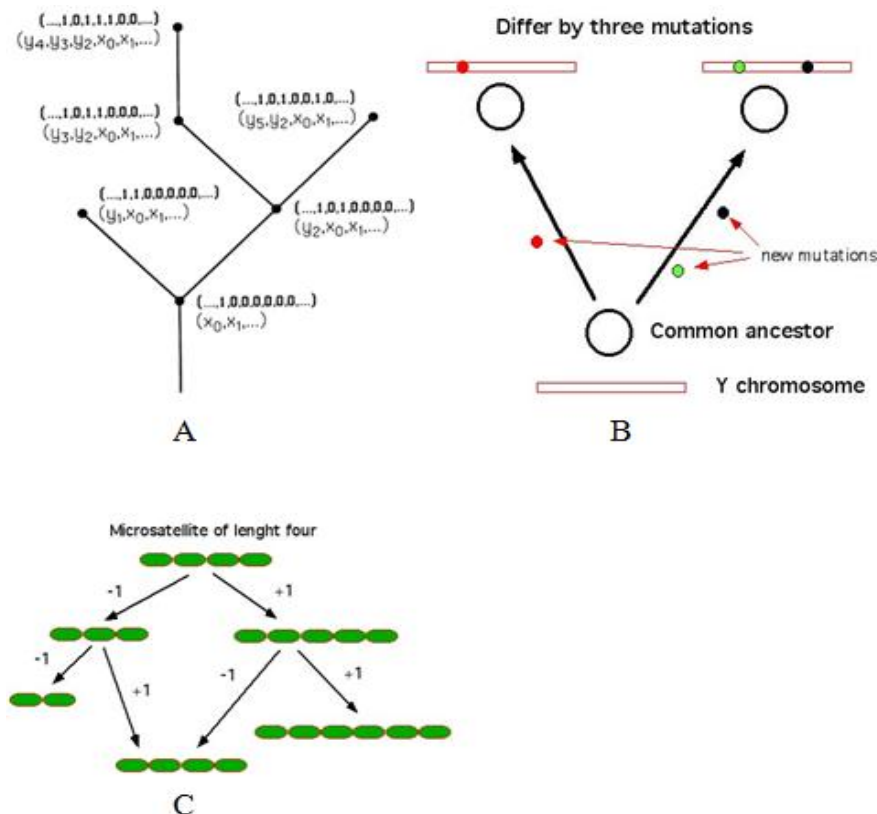


Figura 1 – Representação esquemática dos principais modelos de mutação: A – modelo de sítios infinitos; B – modelo de alelos infinitos; C – modelo de mutação passo a passo. Fonte: Ethier e Griffiths (1987); Walsh (2002).

3.6.4. O fluxo gênico

Corresponde à entrada ou saída de genes, capaz de alterar a composição gênica original em uma determinada população. Segundo Hellberg et al. (2002), o fluxo gênico é o número de migrantes entre populações por geração, sendo, assim, importante para conectar reprodutivamente populações isoladas reprodutivamente. Modelos padrão da genética populacional não estimam as taxas de migração diretamente, mas, sim, a partir do produto da proporção de indivíduos que migram por geração (m) e o tamanho populacional efetivo (N_e). Somente aqueles migrantes com sucesso reprodutivo após migração contribuem para o fluxo gênico, devido à impossibilidade em se fazer inferências com as técnicas genéticas para os indivíduos sob pressão de seleção ou desprovidos de potencial reprodutivo. Por isso, na definição de Neigel (1997), são incluídos os efeitos de todos os movimentos de gametas, propágulos e indivíduos que efetivamente trocam genes, na distribuição espacial. Wright (1931) idealizou um modelo segundo o qual, uma população infinita, e com uma frequência média q_m para um dado gene, é composta por subgrupos, cada um trocando a proporção m de suas populações com uma amostra aleatória de toda população, em que a variação nas frequências para cada subgrupo é dada por: $\Delta q = -m(q - q_m)$. Porém, esse modelo é bastante artificial, considerando-se que, em populações naturais, subgrupos tendem a trocar mais genes com subgrupos vizinhos e, assim, Δq será apenas uma fração daquela esperada pelo modelo de ilhas ideal.

A variação genética existente entre populações de uma espécie resulta de um balanço entre forças evolutivas que tendem a produzir diferenciação genética local – como a deriva e a seleção natural – e a força que tende a promover uma homogeneização genética entre as populações – o fluxo gênico. Por isso, a maior parte dos programas de conservação tem seu enfoque na redução das barreiras para distribuição de genes nas populações de modo a minimizar a perda de genes. Tais barreiras podem ser fisiológicas e/ou de distância, muitas vezes criadas pela fragmentação de populações, resultando na restrição do fluxo de genes entre as subpopulações, propiciando, assim, a endogamia e deriva genética. Assim, o fluxo gênico em populações naturais de plantas, tanto pelo movimento de organismos individuais (sementes, rizomas ou estolões), como pelo movimento de gametas (pólen), é fundamental na homogeneização das frequências alélicas entre populações pequenas, de modo a que se comportem como uma grande população com cruzamentos aleatórios, mesmo que separadas geograficamente. Com frequências alélicas que, antes do fluxo eram diferentes, depois do

fluxo se tornam homogêneas entre si, minimizando, desse modo, os efeitos da deriva genética (SLATKIN, 1985; ZUCCHI, 2002).

O princípio invocado por Tobler (1970, p.236) e conhecido como a primeira lei da geografia, é utilizado para explicar a influência da distância geográfica sobre a diferenciação genética entre populações: “invoco a primeira lei da geografia: todas as coisas estão relacionadas entre si, no entanto, as coisas mais próximas estão mais relacionadas que as distantes”.

Com base nesse princípio, o fluxo gênico entre populações é inversamente proporcional à distância geográfica existente entre elas. O teste de Mantel (1970) tem sido usado para testar a correlação de duas matrizes, uma com estimativas da distância genética e a outra com a distância geográfica entre as populações. Uma correlação positiva e significativa é indicativa do cumprimento da primeira lei da geografia. Uma correlação negativa ou a ausência de correlação indica o não cumprimento da lei, que pode acontecer quando o fluxo ocorre mais entre populações mais distantes e menos em populações próximas (normalmente resultado de intervenção humana), ausência generalizada (ou taxas baixíssimas) de fluxo entre populações por mais próximas que elas sejam geograficamente, sistemas de autoincompatibilidade, ou quando as populações são suficientemente grandes, de tal maneira que possuem todos os alelos e a troca de genes não leva a uma alteração genética significativa nelas. O fluxo gênico entre populações é realizado sob diferentes modelos, os quais são descritos a seguir.

A. Modelos de fluxo gênico

a) Modelo de alpondras (*stepping stone*) uni-dimensional: As populações, nesse modelo, são ordenadas ao longo de uma linha, cada população recebendo migrantes apenas de populações vizinhas (Figura 2A). Se m é a taxa de migração, na i -ésima geração, uma proporção de $m/2$ migrará para a população $i-1$ e $m/2$ para a população $i+1$. A proporção de indivíduos que permanecem na população é dada por $(1-m)$ (BALLOUX, 2001; KIMURA; WEISS, 1964).

b) Modelo de alpondras (*stepping stone*) bi-dimensional: É a extensão do modelo anterior para duas dimensões, consistindo de um arranjo retangular (Figura 2B) onde cada população (exceto aquelas na borda) está conectada a quatro outras populações. A proporção de

indivíduos que permanece na população é dada por $(1-m)$ (BALLOUX, 2001; KIMURA; WEISS, 1964).

c) Modelo de ilhas: O fluxo corre aleatoriamente entre todas as populações do grupo (Figura 2C). Este é o modelo de ilhas clássico de Wright, em que s subpopulações com N indivíduos reprodutivos trocam genes entre si na mesma proporção e que qualquer migrante possui a mesma probabilidade de alcançar qualquer uma das s subpopulações, sendo essa probabilidade igual a $m/(s-1)$. A probabilidade de dado indivíduo não migrar é dada por $1-m$ (BALLOUX, 2001; KIMURA; WEISS, 1964; JOMBART et al.; 2010).

d) Modelo de ilha hierárquico: Uma extensão do modelo de ilhas clássico para dois níveis hierárquicos (Figura 2D). Existem diferentes grupos de ilhas com uma taxa de migração (m_1) dentro do conjunto de ilhas e uma taxa de migração (m_2) entre as ilhas. Se a migração ocorre entre grupos de ilhas, a probabilidade de alcançar qualquer grupo é a mesma, independentemente do tamanho do grupo. A probabilidade de migração para qualquer indivíduo é m_1+m_2 . Como $1-(m_1+m_2)$ é a probabilidade de não migrar, então (m_1+m_2) deve ser inferior a um (BALLOUX, 2001; KIMURA; WEISS, 1964).

e) Modelos espaciais: Incluem modelos de isolamento por distância, como o esquematizado na Figura 2E, no qual o fluxo ocorre localmente entre vizinhos, em uma população de distribuição uniforme. Necessita da indicação do número de dimensões do espaço, sobre as quais deverão ser fornecidas todas as coordenadas populacionais (BALLOUX, 2001; KIMURA; WEISS, 1964; ZUCCHI, 2002).

f) Modelo continente-ilha: Baseado no modelo de ilhas assume migração unidirecional de uma fonte grande continental com uma frequência alélica fixada para uma população menor isolada; migração no sentido oposto pode ocorrer, porém, em proporção muito baixa, insuficiente para alterar significativamente as frequências alélicas da população que recebe os migrantes devido ao seu tamanho elevado (ZUCCHI, 2002; JOMBART et al.; 2010) (Figura 2F).

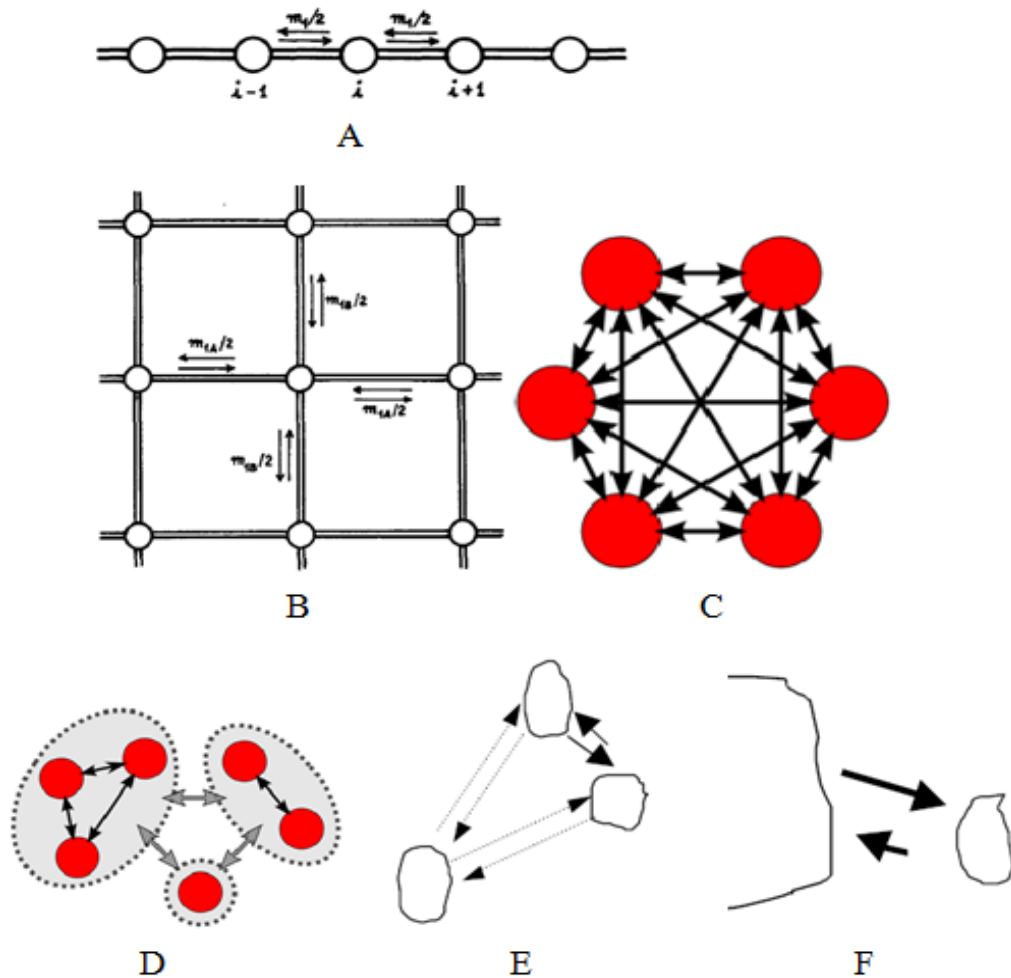


Figura 2 – Modelos de fluxo gênico. A: Modelo de alpodras (*stepping stone*) unidimensional; B: Modelo de alpodras (*stepping stone*) bi-dimensional; C: Modelo de ilhas; D: Modelo de ilha hierárquico; E: Modelo de isolamento por distância; F: Modelo continente-ilha. Fonte: Kimura e Weiss (1964); Balloux (2001); Zucchi (2002); Jombart et al. (2010).

B. Estimação do fluxo gênico

O fluxo gênico é um dos principais parâmetros populacionais estimados nos trabalhos que objetivam a conservação da variabilidade genética, pois é o único fator evolutivo que diminui a estruturação de populações, distribuindo novos genes criados pela mutação e permitindo combinações alélicas em populações geograficamente isoladas. Em populações vegetais o fluxo gênico envolve, em uma primeira abordagem, a dispersão de pólen, o sucesso na fertilização de um óvulo por esse pólen e, finalmente, o estabelecimento da semente resultante. Em outra abordagem, envolve a dispersão de semente e seu estabelecimento na nova população. O tamanho da população que recebe o migrante também desempenha um

papel crucial no seu sucesso reprodutivo. Essa complexidade toda na sua abordagem torna a taxa de fluxo gênico um parâmetro de difícil mensuração (SLATKIN, 1987; ENNOS, 1994).

Medidas diretas e indiretas foram desenvolvidas para quantificar o fluxo gênico em plantas. As estimativas diretas (que quantificam o fluxo gênico contemporâneo) são centradas quase exclusivamente no fluxo gênico via pólen, utilizando marcadores genéticos para classificar o pólen com sucesso reprodutivo como sendo local ou externo, pela análise da exclusão de paternidade. Taxas de migração via pólen são, então, calculadas como a proporção do pólen externo em relação ao total do pólen com sucesso reprodutivo. A desvantagem desses métodos é a subestimação da taxa do fluxo gênico total, pela sua incapacidade de fornecer qualquer informação relativa ao fluxo de sementes que ocorre entre populações vegetais. Os avanços na área da genética molecular têm proporcionado técnicas que permitem medir a diferenciação de populações não somente por marcadores genéticos nucleares, mas também por marcadores nos genomas de organelas como o cloroplasto e a mitocôndria, ainda assim, sujeitos a restrições (ENNOS, 1994; ZUCCHI, 2002).

Medidas diretas representantes da dispersão por pólen e semente incluem o movimento de agentes dispersores, porém, evidências apontam que o movimento do polinizador sub-representa a real movimentação gênica devido ao alto carregamento de pólen. Outra desvantagem é que, apesar da dispersão por sementes ter grande potencial para documentar o fluxo gênico, não fornece informações sobre o sistema reprodutivo, uma vez que espécies autógamas com movimento a longa distância de liberação de pólen podem ter menor fluxo gênico que aquelas predominantemente alógamas com liberação local de pólen. Além disso, movimentos de agentes dispersores não fornecem nenhuma informação a respeito do sucesso do grão de pólen na fertilização ou sobre a sobrevivência e estabelecimento das sementes (LEVIN; KERSTER, 1974; ZUCCHI, 2002; VINSON et al., 2015).

Já as medidas indiretas (SLATKIN, 1985), as quais quantificam o fluxo gênico histórico, ou aparente, são baseadas em dados sobre estrutura genética populacional (F_{ST} , G_{ST} ou distribuição de alelos raros) obtidos a partir de análises com marcadores moleculares. Ajustando-se esses dados aos modelos de diferenciação sob um balanço entre migração e deriva genética, estimativas quantitativas de Nm , o produto do tamanho populacional efetivo e a taxa de migração, podem ser calculadas. Apesar de ser uma medida importante da efetividade do fluxo gênico na contraposição dos efeitos da deriva, Nm não distingue o fluxo gênico por pólen e semente. Com base no modelo de ilhas, Wright (1951) derivou a seguinte expressão:

$$F_{ST} = \frac{1}{4Nm + 1}$$

ou:

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right)$$

em que F_{ST} é a medida de diferenciação genética entre populações, N é o tamanho da população, m , a taxa de migração (proporção de migrantes) e, Nm , o número de migrantes por geração.

Conforme mencionado, o fluxo gênico obtido dessa maneira é chamado de histórico, passado ou aparente, pois admite estrutura genética populacional sob modelo de ilhas de Wright, assume equilíbrio entre migração-deriva, pressupõe que o tamanho populacional e a taxa de migração são uniformes e constantes no tempo e no espaço e que todas as populações contribuem igualmente na troca de genes. Apesar do modelo de ilhas ser o mais convencional, não reflete o movimento contemporâneo dos genes ou as alterações no processo de dispersão entre populações, mas fornece informações valiosas sobre efeitos cumulativos de fluxo gênico na estrutura genética de populações (SORK *et al.*, 1999).

Um valor de Nm inferior a um significa que o fluxo gênico não é suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética, resultando, assim, na diferenciação populacional; por outro lado, Nm superior a um indica que o fluxo gênico é a força evolutiva predominante na determinação das frequências alélicas, resultando na homogeneização das populações (menor diferenciação populacional). A relação inversa entre F_{ST} e Nm observada na equação indica que o aumento no número de migrantes por geração reduz a diferenciação entre populações e vice-versa (SLATKIN, 1985; ZUCCHI, 2002).

Slatkin propôs outro método indireto para estimar o número de migrantes por geração (Nm), o qual leva em consideração a frequência dos alelos privados, ou seja, alelos exclusivos a uma ou poucas populações. O método se baseia no fato de que o logaritmo de Nm é linearmente relacionado ao logaritmo da frequência média dos alelos privados (pl) (SLATKIN, 1985; ZUCCHI, 2002):

$$\ln(pl) = a \ln(Nm) + b$$

em que a e b são constantes dependentes do tamanho das amostras.

3.7 População mínima viável e o tamanho efetivo populacional

O estabelecimento de prioridades para a conservação de espécies e de objetivos quantitativos de manejo passa pela estimação dos riscos aleatórios de extinção enfrentados pelas populações isoladas. Os primeiros trabalhos sobre a estimativa de risco de extinção tiveram seu foco na Análise de Viabilidade Populacional (AVP) e outros métodos relacionados que visavam estimar o tamanho limiar, abaixo do qual os riscos de extinção seriam considerados extremamente altos. Foi, então, proposto o conceito de *População Mínima Viável* (PMV), que visa compreender a viabilidade (sobrevivência) em longo prazo de populações, relacionada com a probabilidade de extinção, sob a premissa de que populações maiores são mais aptas que aquelas menores para conter os efeitos estocásticos que ameaçam as populações em extinção (KAGEYAMA; LEPSCH-CUNHA, 2001; FLATHER, 2011). Segundo Shaffer (1981), população mínima viável pode ser definida como o menor tamanho necessário para que uma população ou espécie tenha uma probabilidade predeterminada de persistência para um dado período de tempo.

As primeiras análises de estocasticidade genética resultaram nos chamados números mágicos 50 e 500, que foram utilizados amplamente nas definições de tamanhos de reserva genética. O número 50 refere-se ao tamanho mínimo de uma população recomendada para conter os efeitos da endogamia, consideradas 100 gerações. Porém, como a estocasticidade genética pode resultar na perda da flexibilidade evolucionária em longo prazo, foram realizadas análises para o mesmo número de gerações as quais resultaram em um tamanho mínimo populacional de 500 indivíduos para conter a perda de variabilidade genética, permitindo sua adaptação às alterações ambientais (KAGEYAMA; LEPSCH-CUNHA, 2001).

Atualmente, a população mínima viável é abordada em termos de *tamanho efetivo populacional*, que incorpora variáveis relacionadas à estrutura genética da população. O tamanho efetivo populacional permite quantificar o efeito da deriva (tamanho efetivo de variância) e da endogamia (tamanho efetivo de endogamia), relacionados com a representatividade genética de amostras de indivíduos de uma população finita, sendo, então, um parâmetro importante na amostragem para coleta de sementes e na delimitação de uma área mínima viável para conservação *in situ* de uma espécie. O tamanho efetivo de variância é definido como o tamanho de uma população ideal com a mesma variância amostral de frequências alélicas que a população total, enquanto o tamanho efetivo de endogamia corresponde ao tamanho de uma população ideal com a mesma probabilidade de que alelos

amostrados aleatoriamente tenham a mesma identidade por descendência que a população total (WRIGHT, 1931; KIMURA; CROW, 1963; CABALLERO, 1994).

Diversos autores produziram expressões para o cálculo do tamanho efetivo populacional, mediante condições específicas. Um resumo de expressões usadas para estimar os tamanhos efetivos, tanto de endogamia como de variância para populações monoicas e dioicas, é apresentado no Anexo II, considerando-se casos de especial interesse.

Cockerham (1969) derivou uma expressão para o cálculo do tamanho efetivo de variância para espécies hermafroditas com sistema misto de reprodução:

$$N_e = \frac{0,5}{\theta \left(\frac{n-1}{n} \right) + \frac{1+F}{2n}}$$

sendo n o tamanho da amostra, F o coeficiente de endogamia e θ o coeficiente de médio de coancestria.

Se o número de descendentes por autofecundação e por cruzamentos possui distribuições de Poisson independentes, o tamanho efetivo de endogamia para uma amostra de tamanho n e sem parentesco pode ser determinado a partir do coeficiente de endogamia (F_{is}) com base na seguinte expressão (POLLAK; SABRAN, 1992):

$$N_e = \frac{n}{1 + F_{is}}$$

Embora esse estimador considere a endogamia na população, desconsidera a presença de parentesco entre os membros da população, que é outro fator gerador de endogamia na descendência. Por esse motivo, Sebbenn e Seoane (2005) derivaram a seguinte expressão para o tamanho efetivo de endogamia aplicado a indivíduos diploides de espécies monoicas e que considera tanto a endogamia quanto o parentesco nas populações:

$$N_e = \frac{0,5n^2}{(1+f)(0,5n + \sum_{x=1}^n \sum_{y \neq 1}^n \theta_{xy})}$$

em que n é o tamanho amostral; θ_{xy} é o coeficiente de coancestria (a probabilidade de que dois alelos homólogos, retirados aleatoriamente de dois indivíduos, x e y , sejam idênticos por descendência, isto é, sejam cópias de um mesmo alelo de um antecessor recente); f é o índice de fixação ou coeficiente de endogamia; θ_{xy} é a coancestria entre o par de indivíduos x e y . Em populações de cruzamentos aleatórios, a coancestria equivale à endogamia na descendência ($\theta_{xy}=f$).

A população mínima viável pode ser também, abordada em termos de Área Mínima Viável (AMV), parâmetro muito utilizado como a expressão do tamanho de área mínima de um fragmento florestal capaz de manter populações viáveis. É estimada com base na População Mínima Viável (PMV) e nas densidades populacionais dessas espécies, que podem ser estimadas em campo ou obtidas a partir de dados da literatura (SEBBENN et al., 2003; SILVA et al., 2014).

A área mínima viável é estimada com base na seguinte expressão:

$$AMV = \frac{nN_{e(ref.)}}{d\hat{N}_e}$$

em que AMV é a área mínima viável; n o tamanho da amostra; d a densidade populacional (número de indivíduos por hectare); N_e o tamanho efetivo populacional; e $N_{e(ref.)}$, o tamanho efetivo de referência.

Sebbenn et al. (2003) e Silva et al. (2014) usaram a expressão anterior para o cálculo da área mínima viável para a conservação *in situ* de populações, tendo usado o tamanho efetivo de referência de 1000 indivíduos, conforme recomendado por Lynch (1998). O tamanho efetivo de referência corresponde ao tamanho mínimo a partir do qual a variância genética média (decorrente da deriva genética) se torna independente do tamanho populacional, sendo, então, de especial importância para a conservação em longo prazo.

3.8 Simulação de dados genéticos

Devido à crescente perda da biodiversidade, é urgente o desenvolvimento de estratégias eficientes para prever cenários futuros, em face de ações antrópicas. O comportamento futuro de uma dada espécie ou população pode ser previsto através da sua história evolutiva do passado ao presente. Muitos fatores que contribuem podem ser acessados através da biologia reprodutiva e de marcadores moleculares, haja vista que a história evolutiva é difícil de acessar (PENG et al., 2013).

Estudos sobre o sistema reprodutivo podem ser conduzidos para determinar, entre outros parâmetros, taxas de cruzamento, de autofecundação, a proporção de cruzamentos endogâmicos ou biparentais, a distância de dispersão de pólen, a taxa de fluxo gênico entre populações. Tais estudos podem ser eficientemente realizados mediante o uso de marcadores moleculares, em especial àqueles de herança codominante e altamente polimórficos, como os microssatélites, desde que se adote uma amostragem delineada adequadamente para atingir os objetivos do estudo (SEBBENN, 2006).

O procedimento envolve a utilização de modelos genéticos para descrever padrões de reprodução, como o modelo de reprodução e o modelo de cruzamentos correlacionados. Devido ao custo e disponibilidade de amostras genéticas, falta de conhecimento das variantes causais que contribuem para os fenótipos observados e intratabilidade matemática de modelos evolutivos complexos, simulações de computador têm sido amplamente utilizadas para, entre várias aplicações, prever resultados sob cenários genéticos reais, comparar e verificar os métodos ou ferramentas e estimar parâmetros de modelos evolutivos (PENG et al., 2013).

Com o avanço cada vez mais crescente na área da informática, novos métodos e programas de simulação vêm sendo desenvolvidos na área da biologia evolutiva para inferir com maior acurácia eventos passados a partir de dados atuais. Pela natureza inerentemente desconhecida dos eventos passados, esses programas permitem desvendar as relações evolutivas entre caracteres moleculares simples, genes, genomas e espécies. Simulações da evolução *in silico* podem ser divididas em duas categorias principais (YUAN et al., 2012; DALQUEN et al., 2012):

Em *genética populacional*, a simulação leva em conta as alterações dentro e entre populações de indivíduos, que surgem através de modelos de sexo, recombinação, ou

conversão gênica (recombinação mitótica). A simulação pode ser realizada para trás (coalescência) ou para frente no tempo.

Em *filogenética* e *biologia evolutiva*, a simulação envolve representantes únicos de espécies relacionadas entre si por uma árvore. Os programas simulam diferentes modelos de evolução ao nível da sequência do gene ou proteína e do genoma, permitindo, assim, estudar os efeitos de vários modelos genéticos sobre a variabilidade genética.

Entre os diversos parâmetros que podem ser simulados pelos aplicativos computacionais, destacam-se:

Padrão de herança: Inferências sobre padrões de cruzamento e herança genética em populações, com base em combinações parental-descendência.

Frequências gênicas: Estimativas das frequências dos diferentes alelos no conjunto populacional.

Deriva genética: Uma simulação que ilustra como as frequências alélicas mudam ao longo do tempo como resultado da deriva genética em populações pequenas. Podem, então, ser simulados diferentes frequências alélicas iniciais, tamanhos populacionais e números de gerações.

Seleção natural: Alterações nas frequências alélicas ao longo do tempo em resposta à seleção natural; podem ser simuladas diferentes aptidões para cada genótipo, sob um número de gerações fixo.

Modelos e taxas de mutação: Permitem simular diferentes modelos em que determinado loco transita para um estado alélico diferente, bem como as taxas em que essas mutações ocorrem na população.

Modelos e taxas de migração: Simulam diferentes modelos em que os genes transitam de uma geração para outra e diferentes taxas em que isso ocorre.

Divergência de sequências de DNA: Simulação que ilustra a divergência de sequências de DNA.

Estocasticidade demográfica: Uma simulação que permite avaliar a probabilidade de persistência de populações estruturadas.

Baseados na assunção de que a origem de doenças causadas por mutações pode ser rastreada através de haplótipos (conjunto de Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos – SNPs do mesmo cromossomo e que são herdados juntos devido à proximidade entre os locos onde estão presentes, não existindo, portanto, recombinação nessa região do cromossomo) nos quais são encontradas, Calafell et al. (2001), desenvolveram um programa para simular a evolução de haplótipos e desequilíbrio de ligação gênica, sob um cenário evolucionário complexo. Nesse cenário foram incluídos o Tamanho Efetivo Populacional, história demográfica, taxa e modelos de mutação e taxa de recombinação, e, conforme esperado em SNPs, as frequências alélicas foram constantes com o passar das gerações, o que validou a simulação. Por seu turno, COSTA et al. (2015) realizaram simulações no programa EasyPop para estimar a fração mínima a ser amostrada em uma população para se obter estimativas confiáveis de riqueza alélica e coeficiente de endogamia.

Inúmeros programas já foram desenvolvidos para realizar simulação de dados genéticos, alguns dos quais se encontram listados no Anexo II. Neste trabalho, foram utilizados os programas EASYPOP para a simulação e FSTAT para a análise dos dados, que serão brevemente descritos a seguir.

3.8.1 O EASYPOP

O EASYPOP (BALLOUX, 2001) é um programa destinado a simular conjuntos de dados sob uma ampla gama de condições, permitindo explorar problemas muito complexos em genética de populações. Permite simular dados em haploides, diploides ou haplodiploides (presença de fêmeas diploides oriundas da combinação de gameta masculino e feminino, e de machos haploides oriundos de óvulos não fecundados, característico de vários himenópteros e alguns besouros) e seus diversos sistemas reprodutivos. Podem ser simulados, também, diversos modelos de migração e de mutação em diferentes taxas.

A fim de se ajustar às expectativas analíticas, em especial para variâncias, as funções implementadas no EASYPOP são probabilísticas e não deterministas, ou seja, as simulações se apóiam na geração de números aleatórios, permitindo gerar repetições independentes, que são diferentes realizações de uma mesma expectativa. As entradas do programa estão

limitadas aos parâmetros escolhidos pelo utilizador para qualquer simulação, incluindo parâmetros ecológicos e reprodutivos, ao passo que as saídas consistem de estatísticas de estruturação genética das populações tais como heterozigosidade observada e esperada e as estatísticas F. Isso permite, a partir de dados reais de estruturação genética obtidos mediante marcadores moleculares, realizar simulações visando encontrar o modelo ecológico e reprodutivo que melhor explica tais resultados. Esses arquivos podem ser analisados diretamente em diversos programas, incluindo FSTAT (GOUDET, 1996) ou ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 2005).

3.8.2 O FSTAT

Desenvolvido por Goudet (1995), o *software* estima diversidades gênicas e estatísticas de diferenciação a partir de marcadores genéticos codominantes ou de dados gerados em programas de simulação como o EASYPOP e faz os respectivos testes usando métodos de aleatorização. A partir de um conjunto de dados de marcadores genéticos codominantes ou haploides, FSTAT permite determinar os seguintes parâmetros:

- Frequência alélica total ou por amostra
- Número observado e esperado de cada genótipo por amostra e loco
- Variabilidade genética por amostra e loco
- Número de alelos e riqueza alélica por loco, amostra e total
- O índice de fixação (F_{IS}) por loco e amostra, bem como um teste para saber se é significativamente positivo ou negativo (significativo para déficit ou excesso de heterozigotos respectivamente)
- Estimadores de diversidade gênica e diferenciação de Nei
- Estimativas de F (F_{IT}), θ (F_{ST}) e f (F_{IS}) por alelo, loco e total
- Estatísticas R (SLATKIN, 1995), especificamente concebidas para microssatélites sob modelo de mutação passo a passo
- Testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco, amostra por loco e para todo o conjunto de dados
- Testes de diferenciação para cada par de amostras

O programa realiza a conversão do arquivo de saída para o formato GENEPOP. São fornecidos, também, intervalos de confiança baseados em esquemas de reamostragem para as estatísticas Weir e Cockerham: o *Jackknifing* e o *Bootstrapping*.

3.9 Descrição da espécie em estudo

O açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) pertence à família Malvaceae, e ocorre naturalmente em diversos estados do Brasil (Figura 3), nos biomas Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga e Pampa, e, também, no nordeste da Argentina, no leste do Paraguai e no norte do Uruguai. Sua ocorrência depende do tipo de bioma e formação florestal, sendo que, no Rio Grande do Sul, ocorre com frequências de até 46 indivíduos por hectare, na Floresta Ombrófila Mista do bioma Mata Atlântica, e de até 20 indivíduos por hectare, na mata de pau-ferro (*Myracrodruon balansae*) do bioma Pampa (CARVALHO, 2008). Levantamentos fitossociológicos mais recentes revelaram valores de 76,96 (HÜLLER et al., 2011) e 26,32 (FIGUEIREDO, 2014), nos municípios de Santo Ângelo (Bioma de Mata Atlântica), em 2008, e São Martinho da Serra (transição entre os biomas da Mata Atlântica e Pampa), em 2014, respectivamente.

É uma árvore decídua, heliófita, seletiva higrófito, típica de solos aluviais das bacias hidrográficas, constituindo-se na espécie emergente nas florestas ribeirinhas. Apresenta dispersão irregular e descontínua, sendo particularmente frequente ao longo de rios, terrenos rochosos e íngremes, onde a floresta é mais aberta, e nas formações secundárias. Possui uma das madeiras brasileiras mais valiosas e de amplo uso, incluindo a fabricação de móveis vergados. Do ponto de vista ambiental, é uma das árvores de uso mais relevante no reflorestamento em função da adaptação às encostas íngremes, margens de rios e áreas com solo permanentemente encharcado. Suas lindas flores de diversas tonalidades são muito visitadas, principalmente por insetos como as abelhas e beija-flores. Seu reconhecimento é facilitado por suas folhas discolores, verde-escuras na face superior e brancas na face inferior, bem como seus frutos em forma de cápsula lobada de valvas lenhosas, de coloração castanha, com densa pilosidade ferrugínea cobrindo inteiramente o tegumento e o pedicelo do fruto (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2008).

Trata-se de uma espécie hermafrodita (CARVALHO, 2008) e classificada, quanto ao sistema reprodutivo, como alógama (RUAS et al., 2009), isto é, com predomínio de fecundação cruzada em suas populações. Alia dispersão anemocórica (pelo vento) de seus frutos e sementes com atratividade de insetos polinizadores, principalmente abelhas, a suas vistosas pétalas róseas, roxas ou, raramente, brancas (CARVALHO, 2008). O fato de essa espécie florestal ter sofrido grande ação antrópica nas últimas décadas contribuiu bastante para a redução de suas populações naturais, e conseqüentemente, de sua variabilidade genética, sendo esses efeitos mais drásticos por se tratar de uma espécie alógama (FLÔRES et al., 2011), justificando deste modo a realização de estudos relacionados à sua conservação.

Há poucos trabalhos de caracterização genética de populações de *Luehea divaricata* disponíveis na literatura, sendo que fizeram uso de marcadores moleculares do tipo RAPD ou microssatélites (SSRs). De Carvalho et al. (2008), usaram, com sucesso, marcadores RAPD para avaliar a diferenciação genética entre populações expostas e não expostas à inundação. Ruas et al. (2009) identificaram sequências de DNA contendo SSRs, a partir do desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas em microssatélites pelo método de hibridização e captura; deste processo resultaram 10 locos polimórficos de microssatélites, os quais foram utilizados para caracterizar uma amostra de 42 indivíduos pertencentes a três populações distintas, sendo observados um total de 45 alelos, obtido um conteúdo de informação polimórfica (PIC) de 0,546, heterozigidade observada variando entre zero e 0,929 e heterozigidade esperada entre 0,194 e 0,821. Nove desses locos foram utilizados por Conson (2012) para estudar a estrutura genética de 268 indivíduos pertencentes a nove populações dessa espécie, amostrados ao longo da sua área de distribuição no bioma Mata Atlântica, tendo observando um total de 50 alelos e altos valores de heterozigidade observada e esperada (0,53 e 0,67 respectivamente). Por seu turno, Nagel et al. (2015) utilizaram cinco desses locos microssatélites para caracterizar a diversidade e estrutura genética de 128 indivíduos pertencentes a cinco fragmentos dessa espécie que ocorrem na região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, no bioma Pampa, o que resultou em uma heterozigidade observada e esperada de 0,52 e 0,64, respectivamente, sendo, a partir desses resultados, realizadas as simulações do presente trabalho. Os resultados dessas simulações se revestem de enorme importância, pois permitiram determinar parâmetros genéticos para a conservação dos fragmentos dessa espécie que teve, nas últimas décadas, suas populações naturais reduzidas e fragmentadas pelas atividades humanas, expondo-a a eventos genéticos que aumentam o risco de extinção.

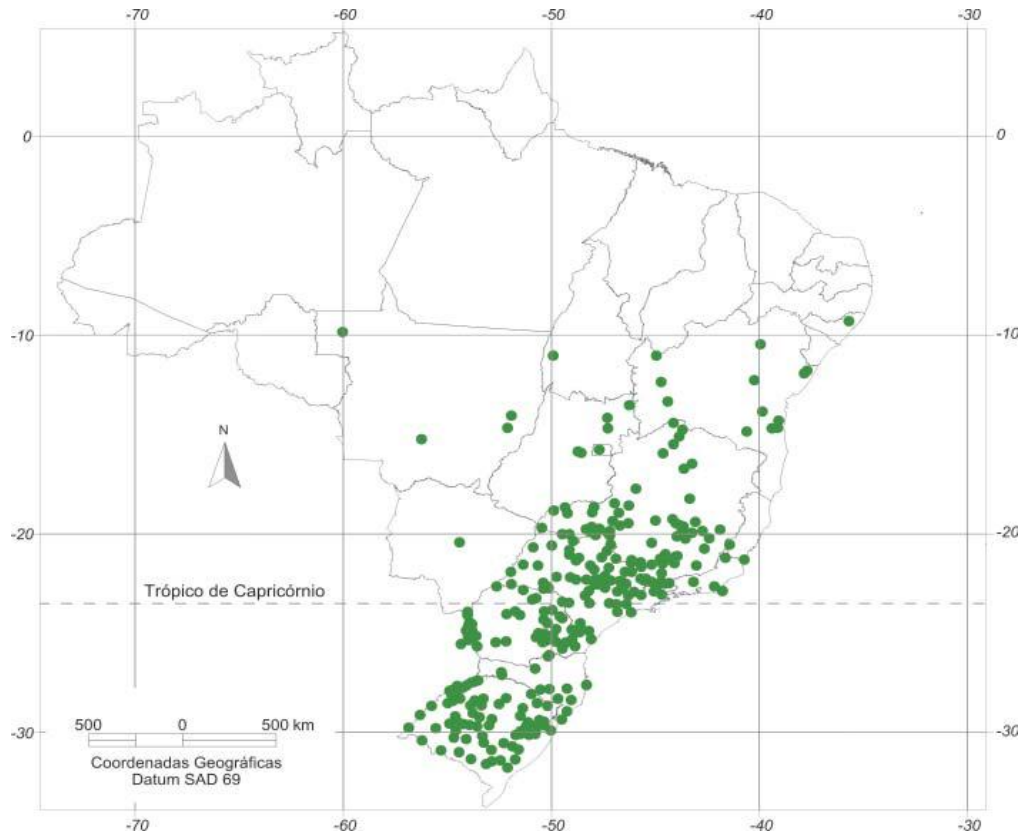


Figura 3 – Locais identificados de ocorrência natural de açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart. & Zucc.) no Brasil. Fonte: Carvalho (2008).

4 METODOLOGIA

As simulações e análises foram realizadas no Núcleo de Biotecnologia e Melhoramento do Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Rurais da UFSM, localizado em Santa Maria, RS. Os programas usados (EASYPOP e FSTAT) estão disponíveis para *download*, de forma gratuita, nas respectivas páginas *online*, indicadas no anexo II.

4.1 Simulações

Foi utilizado o programa EASYPOP (versão 2.0.1) para simular diferentes taxas de autofecundação (0,1, 0,3, ou 0,5) e de migração (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 ou 0,9), a fim de selecionar o modelo que melhor explica os resultados obtidos por marcadores microsatélites no trabalho desenvolvido por Nagel et al. (2015). Os fragmentos estudados foram: Camboazinho (100 indivíduos), Arroio Canas (100 indivíduos), Fazenda Inhatinhum, no município de São Gabriel (300 indivíduos), Rio Cacequi (100 indivíduos) e BR290 (50 indivíduos), todos localizados na Região da Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul (Figura 4). É oportuno esclarecer que o número de indivíduos de cada fragmento foi obtido em um levantamento fitossociológico efetuado em 2013 (dados não publicados).

Segundo Nagel (2013), as denominações dos fragmentos amostrais fazem referência ao local de coleta. O fragmento Camboazinho corresponde à mata ciliar do Rio Camboazinho; o fragmento Arroio Canas, também de mata ciliar, está localizado junto BR 290; o fragmento da Fazenda Inhatinhum corresponde à unidade produtiva do mesmo nome, em um remanescente florestal bem conservado; o fragmento do Rio Cacequi corresponde à mata ciliar deste recurso hídrico, que fica junto à BR 158; o fragmento denominado BR 290, é um povoamento quase que homogêneo de *Luehea divaricata* localizado junto à rodovia do mesmo nome.

O modelo foi simulado para uma espécie diploide, hermafrodita, com cruzamentos não aleatórios e com ausência de reprodução clonal. A distância média de dispersão considerada foi de 10.000 m, consoante os resultados obtidos por Nagel et al. (2015). Conforme a disposição geográfica dos fragmentos foi considerado o modelo de migração espacial, definido por duas dimensões, as quais foram obtidas por meio da alocação linhas verticais e horizontais tracejadas no mapa, com intervalos de uma unidade, baseado na posição geográfica real dos fragmentos (Figura 5).

Foram simulados cinco e dez locos que evoluem de acordo com o modelo de mutação misto SSM com uma proporção 0,1 de eventos KAM, sob 10, 45 ou 50 estados alélicos possíveis, os quais. A taxa de mutação foi de 0,0004. A variabilidade da população inicial foi considerada máxima, diminuindo com o passar de 400 gerações. Foram realizadas 100 repetições para cada combinação de taxa de autofecundação e de migração avaliada.

Foi selecionado o modelo que apresentou os valores mais próximos daqueles obtidos por marcadores microssatélites, tendo como critério de seleção a heterozigidade observada e esperada, cujos valores foram 0,52 e 0,64 respectivamente. Os arquivos no formato *.dat*, referentes ao modelo selecionado, foram analisados no programa FSTAT, sendo obtidas as demais estatísticas, importantes para caracterizar os fragmentos estudados, a saber: a riqueza alélica, a diversidade genética e os índices de diferenciação genética entre populações, segundo diferentes abordagens. O valor do índice de fixação intrapopulacional (F_{IS}) foi usado para estimar a taxa de cruzamentos aparente (t_a), dada pela expressão:

$$t_a = \frac{1 - Fis}{1 + Fis}$$

Foi determinada a estimativa de fluxo gênico em termos de número médio de migrantes por geração (Nm) a partir do valor de R_{ST} , em se tratando de dados de microssatélites, conforme a equação, também usada por outros autores, tais como Kasarasawa et al. (2007) e Nagel et al. (2015):

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{R_{ST}} - 1 \right)$$

Foram também estimados os valores de Nm para cada par de fragmentos, baseado nos valores respectivos de F_{ST} par a par, devido a limitação do programa FSTAT em fornecer valores de R_{ST} par a par.

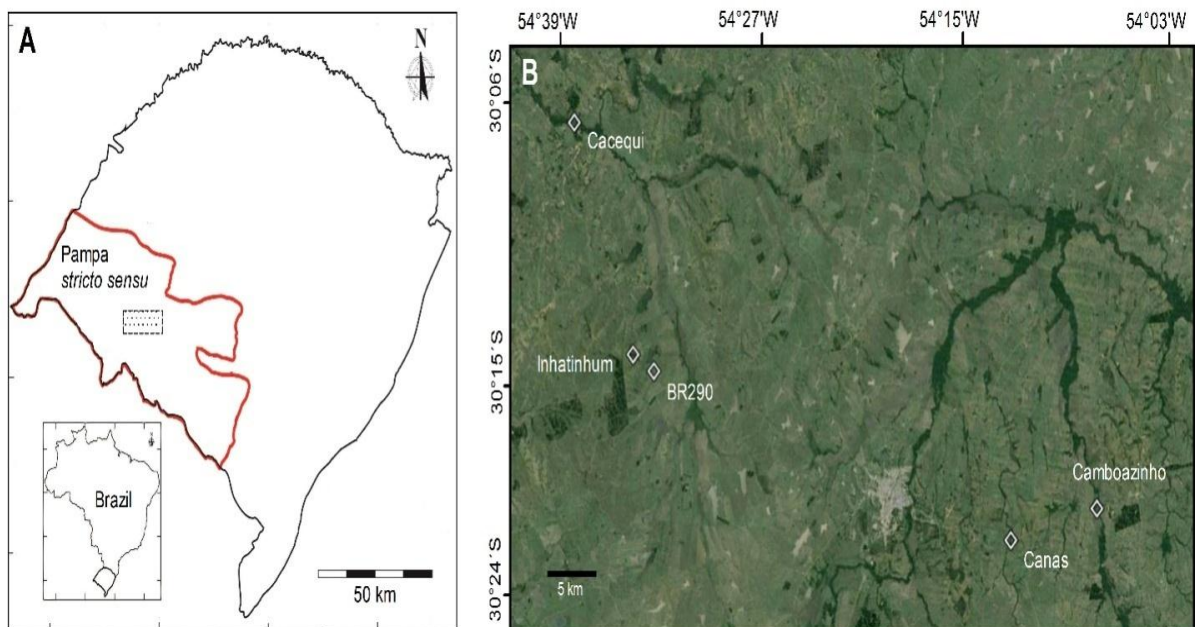


Figura 4 – Localização geográfica dos fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. estudadas. A: Delimitações do Pampa *stricto sensu* no sul do Brasil, com a área amostral destacada na Figura. B: Localização dos cinco fragmentos de *L. divaricata* plotados nas imagens de satélite do bioma Pampa, usadas na caracterização molecular e simulações do presente estudo. Fonte: Nagel et al. (2015).

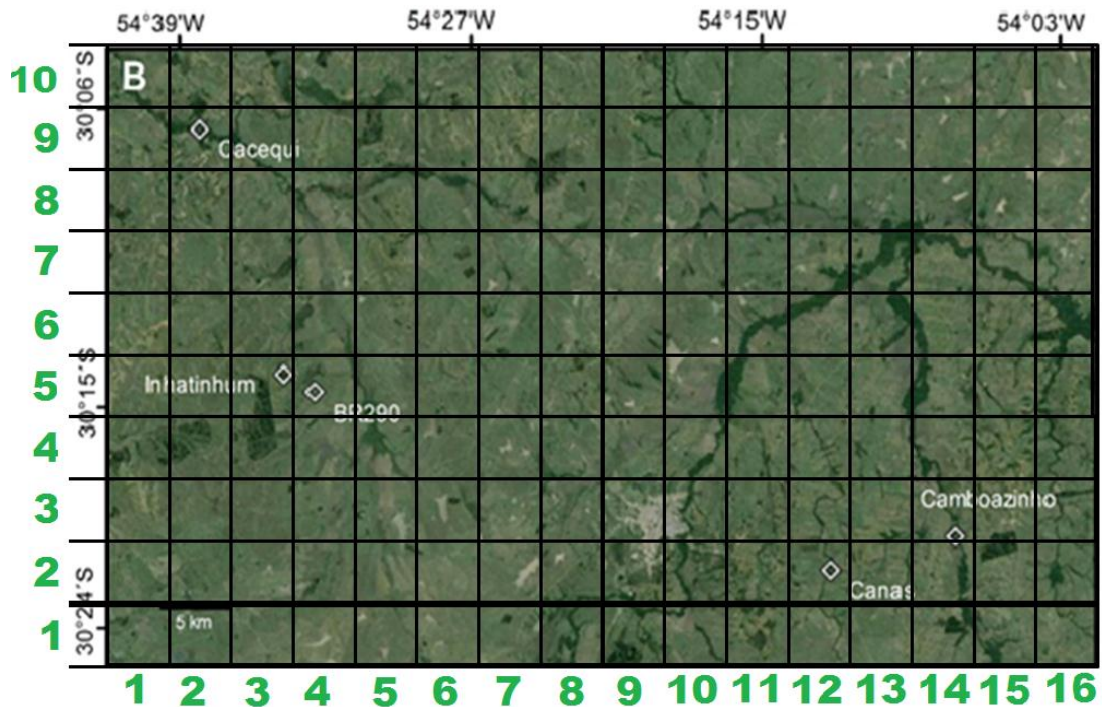


Figura 5 – Distribuição espacial das cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. com as duas coordenadas geográficas inseridas sobre o mapa. Fonte: adaptado de Nagel et al. (2015).

4.2 Parâmetros Genéticos para a Conservação de Populações Naturais de *L. divaricata*

Com base nas estatísticas obtidas, foram determinados os parâmetros importantes para a conservação, a saber, o Tamanho Efetivo Populacional (N_e), a População Mínima Viável (PMV) e a Área Mínima Viável (AMV) para cada fragmento. O N_e determinado foi o de endogamia, o qual correspondeu ao tamanho representativo do fragmento de tamanho n em termos de identidade por descendência de alelos amostrados aleatoriamente, dado o coeficiente de endogamia f , sendo usada a equação:

$$N_e = \frac{n}{1 + f}$$

A PMV foi estimada para cada fragmento através da divisão do tamanho efetivo de referência ($N_{e(ref.)}$) pela razão N_e/n , conforme Vieira e Carvalho (2008). A diferença (D) entre o tamanho amostral e o PMV foi calculada ($D = n - PMV$), a qual corresponde a:

$$D = d * A - \frac{N_{e(ref.)}}{N_e/n}$$

em que d é a densidade da espécie (indivíduos ha^{-1}), A é a área do fragmento (ha), n é o tamanho amostral de cada fragmento e $N_{e(ref.)}$ é o tamanho efetivo de referência adotado para 100 ou 1000, para conservação em curto ou longo prazo, respectivamente, de acordo com Nunney e Campbell (1993).

Fragmentos com valores positivos de D foram considerados viáveis para conservação ao passo que aqueles com valores negativos foram classificados como inviáveis. A AMV foi

estimada com base na equação $AMV = \frac{nN_{e(ref.)}}{d\hat{N}_e}$, para conservação em curto e longo prazos, considerando-se a densidade de 26,32 estimada por Figueiredo (2014) para esta espécie no município de São Martinho da Serra, RS, em decorrência de estar inserida no bioma Pampa, assim como os fragmentos do presente estudo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de Modelos

Ao final das simulações inicialmente propostas, em que foram considerados 10 locos microssatélites e 10 estados alélicos possíveis, o modelo que melhor explicou a análise genética com marcadores microssatélites, tendo-se como critério os valores de 0,52 e 0,64 para as heterozigosidades observada e esperada, respectivamente, correspondeu àquele em que a taxa de autofecundação é igual a 0,3 e taxa de migração, entre 0,3 e 0,5 (Tabela 2). A taxa de migração de 0,4, com valores de heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada de 0,526 e 0,638, respectivamente (na taxa de autofecundação de 0,3), parece a mais adequada, porém, pelo teste t a 5% de probabilidade de erro, não difere significativamente das taxas de 0,3 e 0,5, sendo diferente das taxas de 0,2 e 0,6.

Tabela 2 – Estimativas de heterozigosidade observada (Ho) e heterozigosidade esperada (Hs) geradas por simulações no programa EASYPOP (BALLOUX, 2001) sob diferentes taxas de autofecundação e de migração, de cinco fragmentos de *L. divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul.

Taxa de migração	Taxa de autofecundação					
	0,1		0,3		0,5	
	Ho	Hs	Ho	Hs	Ho	Hs
0,1	0,599	0,631	0,507	0,615	0,381	0,571
0,2	0,609	0,643	0,511	0,618	0,393	0,587
0,3	0,621	0,654	0,520	0,630	0,398	0,595
0,4	0,621	0,657	0,526	0,638	0,407	0,611
0,5	0,630	0,665	0,533	0,646	0,416	0,621
0,6	0,644	0,679	0,536	0,650	0,418	0,627
0,7	0,648	0,684	0,545	0,659	0,418	0,629
0,8	0,650	0,686	0,534	0,651	0,421	0,629
0,9	0,645	0,679	0,544	0,659	0,415	0,622

Fonte: o autor

Simulações adicionais, realizadas com a incorporação de novas variáveis obtidas por outros pesquisadores (RUAS et al., 2009; CONSON, 2012), que caracterizaram geneticamente essa espécie, sendo considerados 5 locos e 45 estados alélicos possíveis, 10 locos e 45 estados alélicos possíveis, 10 locos e 50 estados alélicos possíveis, resultaram em heterozigosidades (observada e esperada) semelhantes para todas as taxas de autofecundação e de migração testadas no presente trabalho (Tabelas 3 e 4). Entretanto, isso não resultou no modelo de 0,3 de taxa autofecundação e 0,4 de migração obtido pela simulação que empregou 10 locos e 10 estados alélicos.

Nenhum modelo, nas simulações adicionais, apresentou valores idênticos àqueles obtidos no trabalho de Nagel et al. (2015) com marcadores microssatélites, o que motivou a inclusão de outras mais taxas de autofecundação (0,2 e 0,4). Após, existiu outra necessidade de simular taxas mais baixas de migração para a taxa de autofecundação de 0,3, em função do comportamento dos valores de heterozigosidade observada e esperada. Foram plotados, no mesmo gráfico, os valores da heterozigosidade observada e esperada em função da taxa de migração para as taxas de autofecundação de 0,3 e 0,5, para efeito de comparação (Figura 6). O comportamento dos gráficos sugere que, em se realizando simulações adicionais na taxa de autofecundação de 0,3, poderia ser obtido o modelo procurado ($H_O = 0,52$ e $H_S = 0,64$), ao contrário da taxa de autofecundação de 0,5 (e também das restantes taxas de autofecundação). Por isso, foram selecionadas as taxas de migração de 0,01; 0,02; 0,03 e 0,05, para novas simulações na taxa de autofecundação de 0,3. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3 e sugerem que a taxa de migração de 0,02 (2%) se ajusta melhor aos dados obtidos por marcadores microssatélites, com diferença significativa em relação às outras taxas testadas (teste t ao nível de 5% de probabilidade de erro) em todas as novas simulações com números de alelos superiores. Por serem observados resultados semelhantes em todas as combinações foi selecionado o modelo com 10 locos e 45 estados alélicos possíveis para fazer a caracterização da população e as análises subsequentes no FSTAT

Tabela 3 – Estimativas de heterozigosidade observada (H_O) e heterozigosidade esperada (H_S) geradas por simulações no programa EASYPOP (BALLOUX, 2001), em função de diferentes taxas de autofecundação, taxas de migração, números de locos e números de estados alélicos possíveis, de cinco fragmentos de *L. divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul.

	Taxa de migração	Taxa de autofecundação									
		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5	
		H_O	H_S	H_O	H_S	H_O	H_S	H_O	H_S	H_O	H_S
5 locos e 45 estados alélicos possíveis	0,01					0,510	0,612				
	0,02					0,524	0,630				
	0,03					0,533	0,646				
	0,05					0,536	0,650				
	0,1	0,660	0,695	0,601	0,675	0,548	0,667	0,487	0,646	0,417	0,624
	0,2	0,666	0,702	0,611	0,685	0,556	0,672	0,502	0,665	0,434	0,649
	0,3	0,668	0,705	0,619	0,696	0,566	0,686	0,505	0,673	0,434	0,652
	0,4	0,677	0,713	0,626	0,704	0,573	0,692	0,510	0,680	0,448	0,671
	0,5	0,688	0,726	0,642	0,720	0,579	0,702	0,517	0,688	0,456	0,680
	0,6	0,697	0,734	0,641	0,721	0,583	0,705	0,515	0,690	0,460	0,687
	0,7	0,790	0,740	0,655	0,735	0,594	0,721	0,527	0,700	0,459	0,689
	0,8	0,695	0,733	0,654	0,734	0,595	0,722	0,526	0,701	0,460	0,690
	0,9	0,704	0,742	0,646	0,726	0,594	0,721	0,525	0,702	0,455	0,682
10 locos e 45 estados alélicos possíveis	0,01					0,510	0,615				
	0,02					0,525	0,636				
	0,03					0,535	0,647				
	0,05					0,542	0,658				
	0,1	0,655	0,690	0,601	0,675	0,543	0,659	0,487	0,646	0,417	0,625
	0,2	0,671	0,707	0,611	0,685	0,556	0,672	0,502	0,665	0,434	0,643
	0,3	0,668	0,706	0,619	0,696	0,568	0,689	0,505	0,673	0,437	0,653
	0,4	0,679	0,715	0,626	0,704	0,567	0,688	0,510	0,680	0,443	0,663
	0,5	0,692	0,730	0,642	0,720	0,576	0,698	0,517	0,688	0,452	0,678
	0,6	0,697	0,736	0,641	0,721	0,585	0,709	0,515	0,690	0,452	0,678
	0,7	0,699	0,736	0,655	0,735	0,589	0,714	0,527	0,700	0,462	0,692
	0,8	0,696	0,735	0,654	0,734	0,587	0,713	0,526	0,701	0,458	0,686
	0,9	0,701	0,739	0,646	0,726	0,587	0,713	0,525	0,702	0,457	0,687

Fonte: o autor

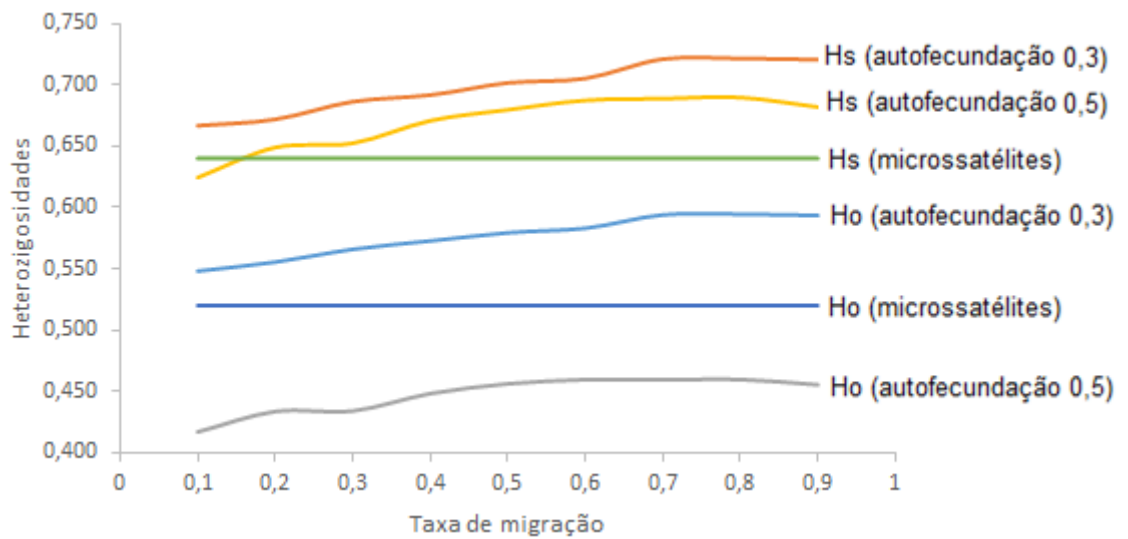


Figura 6 – Comportamento da heterozigidade observada (Ho) e heterozigidade esperada (Hs) em função da taxa de migração para as autofecundações de 0,3 e 0,5 de cinco fragmentos de *L. divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.

A análise de todas as simulações geradas indica um aumento na heterozigidade, tanto na observada, como na esperada, com o aumento na taxa de migração (Tabelas 2 e 3), devido à maior distribuição dos alelos entre as populações e sua recombinação. Por se esperar o mesmo comportamento para a simulação com 10 locos e 50 estados alélicos foram simuladas somente as taxas de migração 0,01; 0,02; 0,03; 0,05 e 0,1 e a taxa de autofecundação de 0,3, tendo-se obtido resultados semelhantes (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de heterozigosidade observada (H_O) e heterozigosidade esperada (H_S) em função de diferentes taxas de migração, obtidos em simulações no programa EASYPOP (BALLOUX, 2001), de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul, considerando a taxa de autofecundação de 0,3, número de locos igual a 10 e número de estados alélicos possíveis igual a 50.

Taxa de migração	H_O	H_S
0,01	0,509	0,617
0,02	0,530	0,637
0,03	0,537	0,648
0,05	0,538	0,654
0,10	0,545	0,662

Fonte: o autor

Em decorrência das análises, resultaram duas possibilidades em relação à taxa de migração: 0,4 ou 0,02, apesar da convergência em relação à taxa de autofecundação, que foi igual a 0,3. Para caracterizar, na sequência, os fragmentos, foi escolhido o segundo modelo (taxa de fecundação de 0,3 e taxa de migração de 0,02), que resultou de diferentes simulações que incluíram parâmetros obtidos na literatura referente à caracterização dessa espécie (número de locos e de alelos), além da análise no programa FSTAT apresentar maior congruência com àquela obtida por marcadores moleculares no estudo de Nagel et al. (2015).

5.2 Caracterização dos fragmentos

Com base no modelo selecionado, a população pode ser caracterizada, quanto ao modo de reprodução, como mista, com predomínio de cruzamentos, conforme a classificação de Destro e Montalván (1999), com uma taxa de autofecundação de 0,3, sendo que a taxa de cruzamentos situa-se na ordem dos 0,7, sugerindo a presença de algum sistema de autoincompatibilidade nessa espécie, o qual reduz, mas não impede a autofecundação. Segundo Brewbaker (1959) e Bawa (1974), a autoincompatibilidade é um mecanismo muito frequente em angiospermas, com vista a prevenir os efeitos adversos da endogamia e da perda de variabilidade genética.

Adicionalmente, deve-se considerar, segundo Lobo et al. (2013), que taxas de autofecundação em espécies com sistema misto de reprodução dependem de fatores ecológicos como densidade populacional, abundância e efetividade de polinizadores. Em ambientes fragmentados ou perturbados, as espécies respondem à escassez de polinizadores com um aumento nas taxas de autofecundação de modo a garantir a reprodução. Desse modo, a subdivisão e o conseqüente isolamento reprodutivo de seus fragmentos (o fluxo gênico restrito aos fragmentos próximos) resultaram na redução da taxa de cruzamentos, abaixo inclusive da média registrada em populações naturais de espécies arbóreas folhosas, que é de 0,88 (SEBBENN, 2002; SOBIERAJSKI et al., 2006), sugerindo, também, uma perda de alelos de autoincompatibilidade pela deriva genética, que permitiu aos indivíduos de se autofecundar com sucesso. Lobo et al. (2013) estudaram o sistema reprodutivo em uma população perturbada de *Ceiba pentandra* (Malvaceae) em diferentes anos, obtendo como resultado uma taxa de cruzamentos igual a 0,759 (no ano de 2007) e 0,624 (em 2009), em função da redução no fluxo gênico, valores semelhantes aos obtidos no presente trabalho.

Por outro lado, a presença de sistemas de autoincompatibilidade em espécies que realizam autofecundação é importante para evitar a depressão endogâmica e permitir o potencial evolutivo. Quesada et al. (2013) observaram durante um período de 4 anos, em *Ceiba aesculifolia* (Malvaceae), taxas de cruzamento próximas a 1,0 em ambientes perturbados e não perturbados, devido à presença, na espécie, de um rigoroso mecanismo de autoincompatibilidade. Já Moraes e Monteiro (2002) estimaram as taxas de cruzamento aparente de *Cryptocarya moschata* em diferentes classes de idade (progênies, juvenis e adultos) e obtiveram os valores de 0,51, 1,0 e 0,96, respectivamente, cuja diferença foi atribuída (i) às diferenças encontradas em diferentes anos, sendo, então, uma mera coincidência a menor taxa de cruzamento em progênies ou (ii) à uma vantagem diferencial de indivíduos oriundos de sementes de exocruzamento em relação àquelas autofecundadas, comprovando a existência de seleção contra os indivíduos oriundos de sementes endogâmicas devido à depressão endogâmica.

O fluxo de genes entre fragmentos é realizado mediante o modelo espacial, somente entre fragmentos vizinhos, com uma taxa média de 2%, porém, esse valor somente considera os migrantes (sementes ou pólen) bem sucedidos. Nesse contexto, todo o pólen que migra de um fragmento para outro deverá ser viável, pousar sobre o estigma de alguma flor, o qual estará igualmente receptivo, vencer as barreiras de incompatibilidade e formar o tubo

polínico, para, na sequência, produzir uma semente viável que irá, posteriormente, em condições ambientais favoráveis, germinar, emergir, crescer e se desenvolver; na maturidade, contribuirá com seus genes para as gerações futuras. No caso de fluxo via semente, sua viabilidade seria, também, condição primordial, além da sua obrigatoriedade em pousar em um solo com condições adequadas para sua germinação, crescimento, desenvolvimento, maturação e reprodução. Assim, a taxa de migração superestima a quantidade real de movimento de pólen e semente, ao considerar que todos migrantes apresentam sucesso reprodutivo.

Aliado à perda de alelos de autoincompatibilidade pela deriva genética, o baixo fluxo terá resultado no aumento da taxa de endogamia, ratificando a classificação da espécie em estudo, quanto ao modo de reprodução como mista, com predomínio de cruzamentos com taxa de cruzamento situada entre 0,05 e 0,95. Além disso, o fluxo gênico é definido por um modelo espacial de isolamento por distância, ocorrendo localmente entre populações vizinhas, em uma distância média de dispersão de cerca de 10.000 m, justificando o aumento de cruzamentos endogâmicos e biparentais pela limitação do movimento de agentes polinizadores e dispersores de sementes. A distribuição geográfica dos fragmentos (Figura 4B) e as distâncias entre si sugerem que a troca de genes ocorre entre os fragmentos Canas e Camboazinho (que distam 8.513 metros) e entre Inhatinhum, Cacequi e BR290 (Inhatinhum e BR290 distam 2.200 m, Inhatinhum e Cacequi distam 16.084 m e, Cacequi e BR290 distam 18.063 m), limitando a maior parte dos cruzamentos ao interior de cada fragmento em função do isolamento pela distância. Os demais pares de fragmentos estão separados por distâncias entre 36.224 m (Canas e BR290) e 56.167 (Camboazinho e Cacequi) (Nagel et al., 2015). Essa análise está em concordância com o dendrograma obtido por Nagel et al. (2015) usando dados microssatélites, o qual separou os fragmentos em dois grupos, o primeiro formado pelos fragmentos Canas e Camboazinho e o segundo pelos fragmentos Inhatinhum, Cacequi e BR290 .

No que se refere ao fenômeno de mutação, por se tratar de dados microssatélites, o modelo de mutação de único passo SSM (perda ou ganho de uma única repetição por vez) limitado a 45 estados alélicos é adequado, com ocorrência de eventos KAM na proporção de 0,1. Em outras palavras, 90% das mutações resultam em um estado alélico cujo tamanho depende do anterior, sendo que, em 10% dos casos, resulta em um alelo de qualquer um dos estados alélicos possíveis com igual probabilidade. O modelo de variabilidade máxima inicial explica a redução da variabilidade genética ao longo das 400 gerações em função da

endogamia e da deriva genética ocasionados pela fragmentação. Apesar das mutações agirem no sentido de aumentar a variabilidade, sua taxa muito baixa não foi suficiente para se contrapor aos efeitos do isolamento e do consequente baixo fluxo de genes entre fragmentos.

5.3 Estrutura genética dos fragmentos

Com base nos parâmetros da estrutura genética (Tabela 5), os valores da riqueza alélica e da variabilidade genética aumentam de acordo com o tamanho do fragmento, porém, sem grande diferença entre si, o que é ratificado pelos respectivos valores da riqueza alélica. . O fragmento Inhatinhum (com o maior tamanho) teve maior número de alelos e maior heterozigosidade, ao passo que Cacequi (com o menor tamanho) teve a menor heterozigosidade. Stefenon e Costa (2012) realizaram simulações para analisar o efeito da fragmentação na riqueza alélica e no coeficiente de endogamia ao longo do tempo. Dessas simulações resultou que, com o passar de gerações, as populações de menor tamanho tiveram níveis maiores de redução na riqueza alélica e de aumento no coeficiente de endogamia, comparado às populações mais numerosas. Essa constatação reforça a importância do tamanho de uma população na preservação da variabilidade genética com vistas a minimizar o seu risco de extinção.

Na Figura 7 está representado o comportamento do número de alelos no decorrer das gerações, em que se observa uma acentuada taxa de perda de alelos nas primeiras gerações, com uma tendência à estabilidade a partir da geração de número 100 (quando o número de alelos cai para cerca de 18), terminando com cerca de oito alelos ao final de 400 gerações. Devido à acentuada perda de alelos nas primeiras 100 gerações, foram observados também níveis maiores de redução da heterozigosidade (observada e esperada), sendo que, a partir desse momento, sua redução foi praticamente constante até a 400ª geração, atingindo os níveis de 0,52 e 0,64, respectivamente (Tabela 8).

A reduzida diferenciação genética entre os fragmentos, avaliada pelos índices de diferenciação genética (G_{ST} , F_{ST} e θ), indica que há similaridade em suas frequências alélicas. Isso sugere que, apesar do isolamento reprodutivo, existe semelhança nos modelos evolutivos dos fragmentos, nomeadamente, intensidade e direção da deriva genética, da seleção natural, e

taxas e modelos de mutação.

Tabela 5 – Número de indivíduos no fragmento (N), número de alelos (Na), riqueza alélica (Ar), heterozigosidade esperada (H_S), coeficiente de endogamia dentro do fragmento (F_{IS}) e taxa de cruzamento aparente (\hat{t}_a) de fragmento de *Luehea divaricata* Mart & Zucc., obtidos a partir de dados de marcadores microssatélites e análises no programa FSTAT.

	Camboazinho	Canas	Inhatinhum	Cacequi	BR290	Total
N	100	100	300	100	50	650
Na	5	5	6	5	5	5
Ar	5,27	5,31	5,52	5,24	5,18	6,24
H_S	0,637	0,635	0,641	0,637	0,631	0,636
F_{IS}	0,183	0,168	0,180	0,175	0,173	0,176
\hat{t}_a	0,691	0,712	0,694	0,702	0,705	0,701

Fonte: o autor

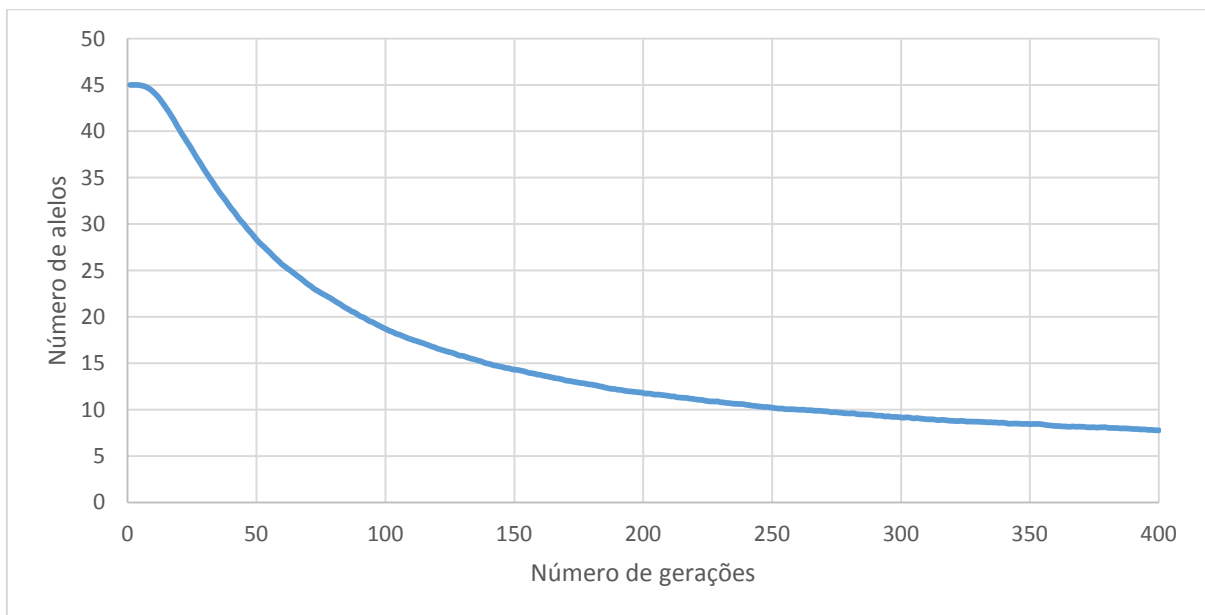


Figura 7 – Evolução do número de alelos com o passar das 400 gerações de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.

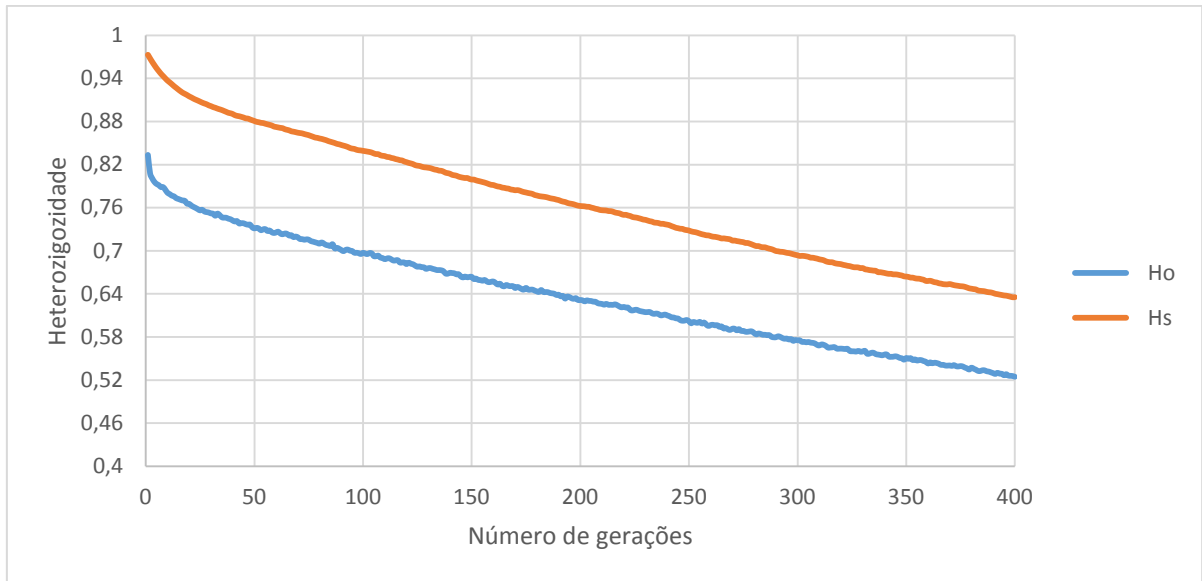


Figura 8 – Comportamento da heteroziguidade observada (Ho) e esperada (Hs) ao longo das gerações de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.

Com base nos índices de diversidade genética de Nei (Tabela 6), 94% da variabilidade genética está distribuída dentro dos fragmentos, sendo que apenas 6% se encontra distribuída entre eles. A grande variabilidade observada dentro dos fragmentos resulta da elevada taxa de cruzamento, o ratifica os anteriores em relação ao modo de reprodução misto com predomínio de cruzamentos. Resultado semelhante foi obtido por Conson (2012) na análise de nove populações dessa mesma espécie efetuada, na Mata Atlântica com locos microssatélites, que observou que 93,16% da variação está distribuída dentro de populações e, apenas 6,84%, entre populações.

Tabela 6 – Índices de diversidade genética de Nei entre e dentro de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul.

Fonte de Variação	Diversidade absoluta	Diversidade relativa
Entre populações (D_{ST})	0,042	0,06
Dentro de populações (H_S)	0,636	0,94
Total (H_T)	0,678	

Fonte: o autor.

As estatísticas de diferenciação entre fragmentos sob diferentes abordagens, a saber: G_{ST} , θ , F_{ST} e R_{ST} , foram similares (Tabela 7), tendo-se verificado a mesma situação dentro das populações (G_{IS} , f e F_{IS}). Isso sugere que os fragmentos estão evoluindo na mesma direção, uma vez que a diferença entre as estimativas F_{ST} e R_{ST} deve-se ao processo de evolução dessas populações, ou seja, o quanto elas estão divergindo no tempo, devido aos seus modelos evolutivos (VALLE et al., 2011). Considerando-se que os locos microssatélites evoluem de acordo com o modelo de mutação passo a passo, R_{ST} é a estimativa mais indicada para a estimação da diferenciação genética entre populações. Segundo Slatkin (1995), é esperado que a estimativa de R_{ST} seja mais similar ao valor de θ , por ambas serem baseadas em componentes de variância interpopulacional. De fato, na presente simulação foram obtidos valores de R_{ST} igual a 0,076 e de θ igual a 0,075. Esses valores revelam uma diferenciação moderada entre as subpopulações (HARTL; CLARK, 2010). Comparando-se com os valores obtidos por Nagel et al. (2015), apenas a endogamia dentro das subpopulações (F_{IS}) se equipara, pois essa estatística é dependente das heterozigosidades observada e esperada, parâmetros usados nas simulações.

Seja qual for a abordagem usada, observa-se a ocorrência de algum nível de endogamia, em função do sistema reprodutivo e da fragmentação da população. Usando marcadores microssatélites para a caracterização genética de três populações naturais de *Theobroma grandium* (Malvaceae) na floresta Amazônica, Alves (2002) obteve um índice de fixação (f) igual a 0,161, um coeficiente de endogamia total (F) de 0,418 e uma divergência genética (θ) de 0,303, indicando que a deriva genética decorrente da subdivisão foi a maior responsável pela endogamia observada nesse caso. Já na caracterização genética de 24 acessos da mesma espécie (*Theobroma grandium*) oriundos da Embrapa - CPAFRO (município de Porto Velho – RO), Embrapa - CPAA (município de Manaus – AM) e Embrapa - CPATU (município de Belém – PA), mediante marcadores microssatélites, por Alves et al. (2013), não foi observada endogamia na população ($f = 0,003$), o valor médio de coancestria foi baixo ($\theta = 0,0199$) e o número de alelos foi de 45. Segundo Slatkin (1995), valores de F_{IS} podem ser superestimados devido às altas taxas de mutação dos locos microssatélites, existindo, assim, maior probabilidade de os alelos serem idênticos por estado (mutações que resultam em um tamanho igual de unidades de repetição) do que por descendência. Além disso, o tamanho amostral desempenha papel importante na precisão da estimativa da endogamia devido a erros de amostragem, haja vista que, com amostras pequenas, é menos provável de capturar todos os genótipos possíveis de cada loco, resultando em superestimativa da endogamia.

Tabela 7 – Estatísticas de estrutura genética sob diversas abordagens, geradas pelo programa FSTAT para cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.

Estatísticas de Nei	H_O	0,524
	H_S	0,636
	H_T	0,678
	D_{ST}	0,042
	G_{ST}	0,061
	G_{IS}	0,176
Estatísticas de Cockerham	F	0,238
	θ	0,075
	f	0,176
Estatísticas F de Wright	F_{IT}	0,226
	F_{ST}	0,061
	F_{IS}	0,176
Estatística de diferenciação genética adaptada para microssatélites	R_{ST}	0,076
Fluxo gênico	Nm	3,04

H_O : heterozigosidade observada dentro de fragmentos; H_S : heterozigosidade esperada dentro de fragmentos; H_T : heterozigosidade total; D_{ST} : diversidade genética entre fragmentos; G_{ST} : coeficiente de divergência genética entre populações (diversidade relativa); G_{IS} : diversidade relativa dentro de fragmentos; F: coeficiente de coancestria total, θ : coeficiente de correlação de gametas entre fragmentos; f: coeficiente de coancestria dentro dos fragmentos; F_{IT} : coeficiente de endogamia total; F_{ST} : coeficiente de endogamia entre fragmentos; F_{IS} : coeficiente de endogamia dentro dos fragmentos. Fonte: o autor.

Em relação ao fluxo gênico estimado a partir do número médio de migrantes, esse parâmetro foi estimado em 3,8, e, portanto, restrito a subpopulações vizinhas. Com base na escala definida por Govindaraju (1989), que distingue três níveis de fluxo gênico, a saber: alto ($Nm > 1$), intermediário ($0,25 < Nm < 0,99$) e baixo ($Nm < 0,25$), o fluxo gênico observado no presente estudo é como alto e, teoricamente, seria suficiente para contrapor os efeitos da endogamia, resultando em menor diferenciação entre aos fragmentos. Porém, a expressão usada para estimar o número de migrantes por geração foi desenvolvida para um modelo de ilhas idealizado por Wright, diferente do modelo de isolamento por distância do caso em estudo. Por essa razão, esse valor é superestimado, pois a taxa de fluxo gênico obtida pelas

simulações é muito pequena (2%) e alguns fragmentos não trocam genes com os outros em função do isolamento por distância.

A diferenciação par a par indica uma maior diferenciação entre os fragmentos Cacequi e BR290 (resultado do menor fluxo de genes entre eles) (Tabela 8). Por outro lado, e em resultado do maior fluxo entre si, os fragmentos Canas e Inhatinhum possuem a menor diferenciação genética. Ainda que as diferenças não sejam significativas, esses dados contrastam com a primeira lei da geografia (TOBBER, 1970), segundo a qual se espera menor diferenciação entre os pares de fragmentos Canas e Camboazinho, e Inhatinhum e BR290, por serem geograficamente mais próximos entre si, e maior diferenciação entre aqueles mais distantes, como Cacequi e Camboazinho e entre Cacequi e Canas. Porém, aspectos como autoincompatibilidade, ausência de fluxo gênico ou o insucesso reprodutivo de migrantes contribuem negativamente para o cumprimento dessa lei, de tal maneira que proximidade geográfica entre fragmentos não significa, obrigatoriamente, proximidade genética entre eles. Outra possível razão para esse fato pode ser a ausência de diferença significativa entre as coordenadas inseridas nas simulações, em uma escala que não teria permitido gerar diferenças genéticas significativas entre as populações. Adicionalmente, foram, também, simuladas apenas duas dimensões, ignorando-se o efeito da altitude e resultando em distâncias subestimadas entre fragmentos. No trabalho de Conson (2012), citado anteriormente, também não foi observada correlação significativa entre os dados de F_{ST} par a par e as distâncias geográficas.

Tabela 8 – Estimativas de F_{ST} (diagonal superior) e fluxo gênico (diagonal inferior) par a par de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.

	Camboazinho	Canas	Inhatinhum	Cacequi	BR290
Camboazinho	–	0,078	0,065	0,077	0,081
Canas	2,974	–	0,061	0,076	0,078
Inhatinhum	3,610	3,853	–	0,064	0,058
Cacequi	2,976	3,041	3,666	–	0,082
BR290	2,826	2,950	4,055	2,793	–

Fonte: o autor

Os valores referentes ao número de migrantes por geração entre pares de fragmentos são superestimados, uma vez que existem pares que não trocam genes entre si, em função das distâncias entre eles. Além disso, conforme citado anteriormente, a estatística F_{ST} não é adequada para análise genética de locos microssatélites devido ao fato de evoluírem de acordo com o modelo de mutação passo a passo, sendo a estatística R_{ST} a mais indicada. Portanto, devido à limitação do programa usado para a análise dos dados (programa FSTAT), que não determina os valores de R_{ST} par a par, as taxas de fluxo entre os pares de fragmentos foram estimadas mediante valores F_{ST} par a par. Ademais, a estimativa indireta do fluxo gênico com base na estatística de diferenciação genética (F_{ST} ou R_{ST}) pressupõe estrutura genética sob o modelo de Wright (o qual assume uniformidade e constância, no tempo e no espaço, do tamanho populacional e da taxa de migração), não condizente com o modelo de migração observado nesse trabalho, com fragmentos isolados por distância. Apesar do modelo de ilhas ser o mais convencional, ele não reflete, segundo Sork et al. (1999), o movimento contemporâneo dos genes ou as alterações no processo de dispersão entre populações (sendo por isso o fluxo denominado histórico ou aparente), mas fornece informações valiosas sobre efeitos cumulativos de fluxo gênico na estrutura genética de populações.

Dada a importância do fluxo gênico na prevenção da perda de variabilidade genética, foram plotadas, para ilustração, as heterozigosidades em função do número de gerações, considerando-se taxa de migração baixa (1%) e alta (90%) (Figuras 9 e 10 respectivamente). Observa-se que, se a taxa de migração fosse igual a 1%, os valores da heterozigosidade atual teriam sido atingidos mais cedo, na geração 360, ao passo que sob uma taxa de migração de 90%, até a geração 400 essa heterozigosidade ainda não teria sido alcançada e a variabilidade genética teria sido maior. Esses dados ratificam, mais uma vez o papel do fluxo gênico no controle da perda de variabilidade genética em populações, contribuindo para sua viabilidade.

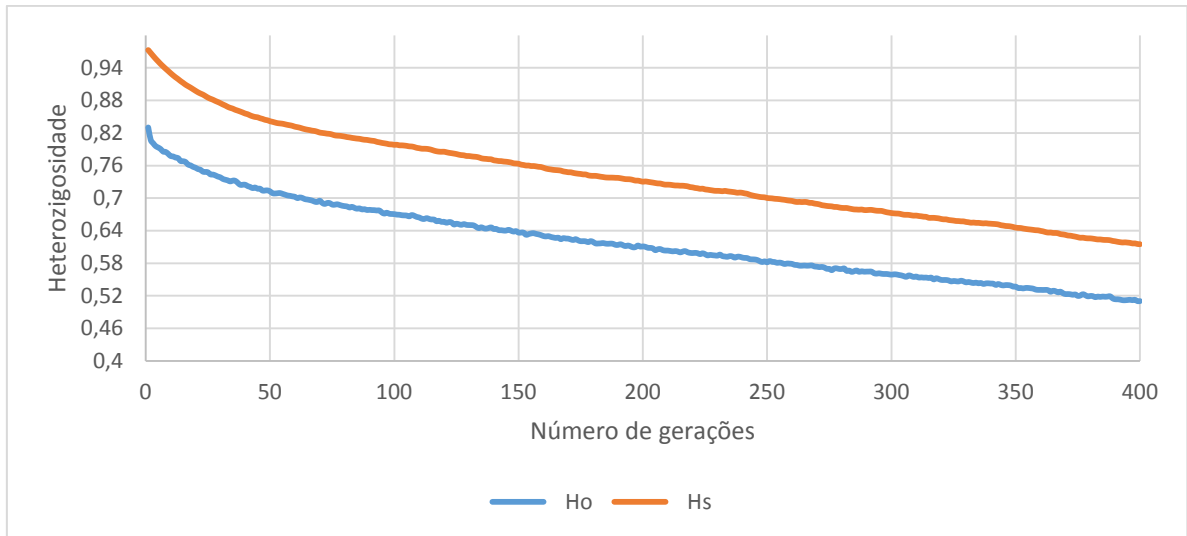


Figura 9 – Heterozigidade observada e esperada considerando a taxa de migração de 1% de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.

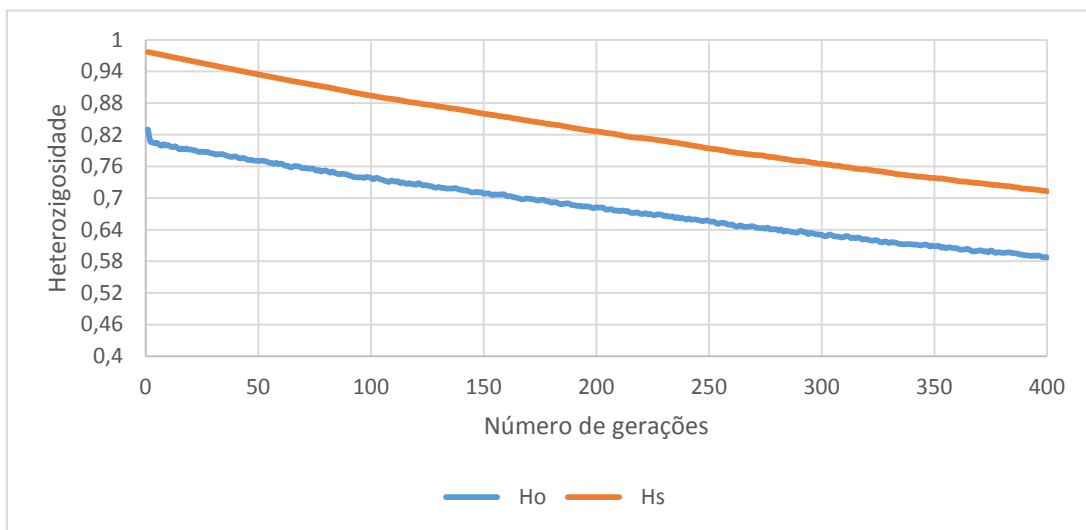


Figura 10 – Heterozigidade observada e esperada considerando a taxa de migração de 90% de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.

O estreitamento da área entre as curvas da heterozigidade observada e esperada com o passar das gerações, observado na Figura 10, motivou a plotagem das diferenças entre esses parâmetros ($H_S - H_O$) e os coeficientes de endogamia para as taxas de migração de 2% e 90%,

com a finalidade de ilustrar o impacto do fluxo gênico sobre a endogamia (Figura 11). O resultado foi uma estabilização do índice de fixação para ambas as taxas de migração, apesar de uma ligeira tendência ascendente na taxa de migração de 2%, sobretudo nas gerações iniciais. Com o passar das gerações, as heterozigosidades observadas tendem a se aproximar das esperadas para o Equilíbrio, apesar de ser um processo demasiadamente demorado. No entanto, com a taxa de migração de 2% existe a tendência de se atingir primeiro o equilíbrio de Hardy-Weinberg (isto é, $H_S - H_O = 0$) em relação à taxa de 90%, sob os mesmos valores iniciais de heterozigosidade. Isso acontece porque na taxa de migração de 2%, a perda da heterozigosidade é mais rápida e a heterozigosidade esperada reduz com maior velocidade que a observada, atingindo mais cedo o equilíbrio apesar do baixo fluxo gênico.

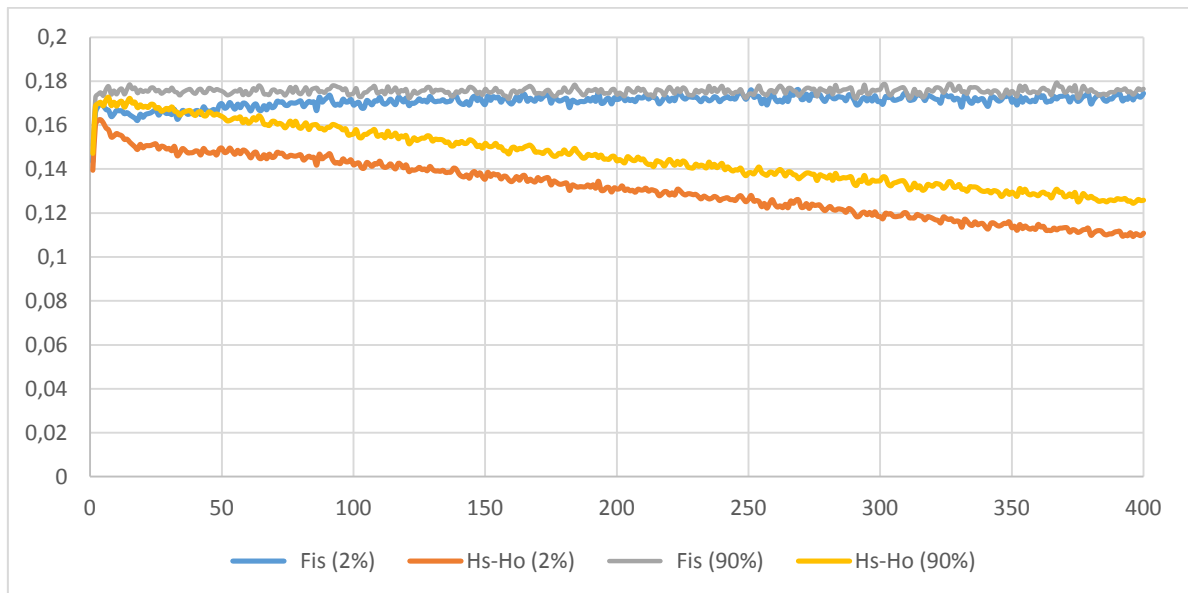


Figura 11 – Diferenças entre as heterozigosidades (Hs-Ho) e índices de fixação em função do número de gerações de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.

Ainda para efeitos de ilustração foram plotadas as estatísticas F considerando-se as mesmas taxas de migração (Figuras 12 e 13), de modo a ilustrar a contribuição dos efeitos do isolamento dos fragmentos e do sistema reprodutivo na endogamia total ou desvio de panmixia da população total (F_{IT}). Em função da ausência de diferenciação entre os fragmentos, as curvas de F_{IS} e F_{IT} se sobrepõem na taxa de migração de 0,9. Assim, a endogamia devido à subdivisão é insignificante, sendo o sistema reprodutivo praticamente o

único responsável por toda endogamia observada na população. Pelo contrário, a migração na taxa de 0,02 concede espaço para a ocorrência de endogamia em função do isolamento, para além do efeito do sistema reprodutivo.

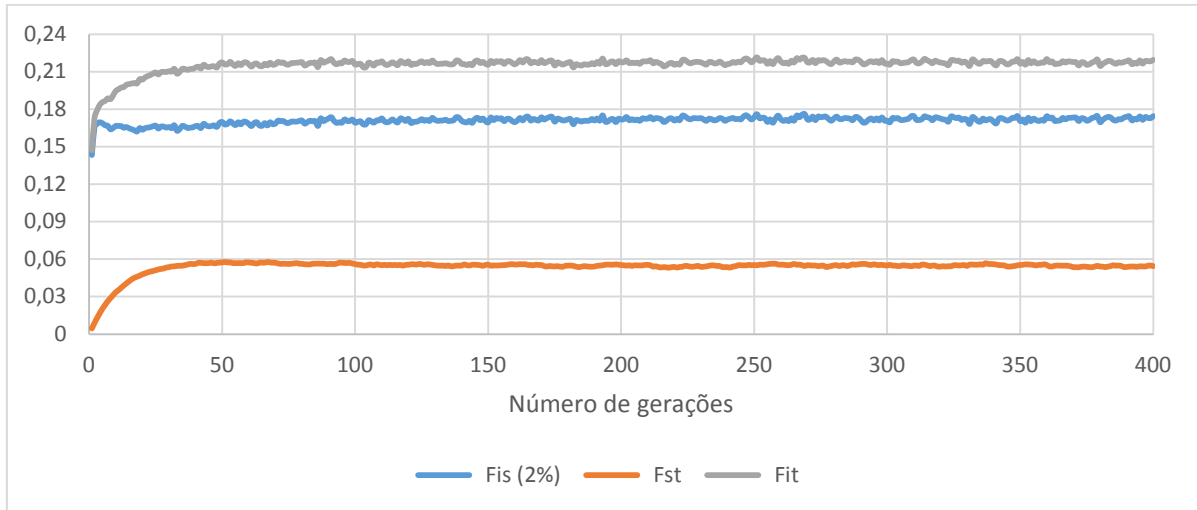


Figura 12 – Plotagem das estatísticas F de Wright para uma taxa de migração de 0,02 de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.

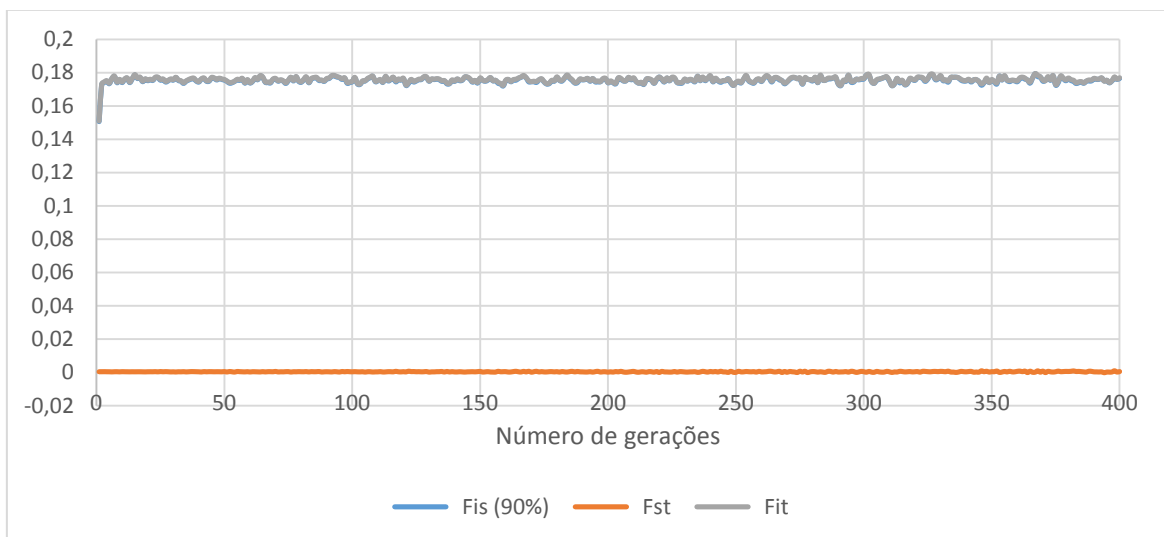


Figura 13 – Plotagem das estatísticas F de Wright para uma taxa de migração de 0,9 de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.

Com a finalidade de validar as estimativas geradas dos parâmetros, são apresentados, na Tabela 9, os resultados de mil reamostragens e erro padrão, para as estatísticas de correlação entre gametas que se unem, segundo Cockerham. O erro padrão foi obtido com base na técnica de *Jackknifing*, ao passo que os limites de confiança foram obtidos com base na técnica de *Bootstraping*. Devido ao baixo erro padrão, as estatísticas obtidas podem ser consideradas confiáveis.

Tabela 9 – Validação das estatísticas de Cockerham com base em reamostragens e erro padrão de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.

	F	θ	F
Valor da estatística	0,238	0,075	0,176
Erro padrão	0,015	0,010	0,014
Limite inferior (95%)	0,210	0,058	0,151
Limite superior (95%)	0,267	0,095	0,201
Limite inferior (99%)	0,201	0,053	0,143
Limite superior (99%)	0,275	0,101	0,209

F: coeficiente de coancestria total, θ : coeficiente de correlação de gametas entre fragmentos; f: coeficiente de coancestria dentro dos fragmentos

5.4 Parâmetros para a Conservação Genética

Com vistas à conservação dos recursos genéticos, o Tamanho Mínimo Efetivo e a Área Mínima Viável (Tabela 10) revestem-se de grande importância na medida em que minimizam os efeitos dos fatores que conduzem à extinção de alelos e, conseqüentemente, à extinção de espécies.

Tabela 10 – Parâmetros para conservação genética da população de cinco fragmentos de *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. em desenvolvimento no bioma Pampa, Rio Grande do Sul. Santa Maria, RS, 2015.

	Camboazinho	Arroio Canas	Fazenda Inhatinhum	Rio Cacequi	BR290
N	100	100	300	100	50
Fis	0,183	0,168	0,18	0,175	0,173
Ne	84,53	85,62	254,24	85,11	42,63
Ne/n	0,85	0,86	0,85	0,85	0,85
D	26,32	26,32	26,32	26,32	26,32
A	3,8	3,8	11,4	3,8	1,9
PMV ₍₁₀₀₎	118	117	118	117	117
D ₍₁₀₀₎	-18	-17	182	-17	-67
PMV ₍₁₀₀₀₎	1183	1168	1180	1175	1173
D ₍₁₀₀₀₎	-1083	-1068	-880	-1075	-1123
AMV ₍₁₀₀₎	4,5	4,4	4,5	4,5	4,5
AMV ₍₁₀₀₀₎	45	44,4	44,8	44,6	44,6

n: tamanho do fragmento; Ne: Tamanho Efetivo Populacional; Fis: coeficiente de endogamia dentro dos fragmentos; d: densidade populacional (indivíduos ha⁻¹); A: área do fragmento em hectares; PMV(100) e PMV(1000): População Mínima Viável para conservação em curto e longo prazo, respectivamente; AMV(100) e AMV(1000): Área Mínima Viável para conservação em curto e longo prazo, respectivamente; D(100) e D(1000): diferença entre o tamanho e a PMV do fragmento em curto e longo prazo, respectivamente.

O Tamanho Efetivo para todas as populações é inferior ao número de indivíduos amostrados, devido à ocorrência de endogamia dentro delas (valores de F_{IS} superiores a zero). O fragmento Inhatinhum, o qual possui maior tamanho e menor coeficiente de endogamia, possui o maior Tamanho Efetivo. Os valores da Tabela 10 sugerem que uma amostra de 85 indivíduos selecionados de maneira aleatória representará a variabilidade genética existente na população Camboazinho com 100 indivíduos. Já a população Canas, com o mesmo número de indivíduos, porém com uma taxa de fixação ligeiramente inferior, é representada geneticamente por 86 indivíduos. A diferença deve-se ao fato da endogamia reduzir a variabilidade genética da população, estando concentrada em um tamanho populacional inferior ao tamanho total. Em um extremo, se o índice de fixação ou coeficiente de endogamia for igual a zero, a variabilidade genética total estará distribuída em todos os indivíduos da população. No já citado trabalho de Alves (2002), ao estudar uma amostra média de 30,6 acessos coletados em sete populações, entre naturais, estabelecidas em Banco Ativo de Germoplasma e um plantio comercial, foi observado um tamanho efetivo de 27, devido ao

efeito da endogamia (existe menor representatividade quando há excesso de homozigotos). Por seu turno, amostrando 20 indivíduos de duas populações da espécie arbórea florestal *Calophyllum brasiliense*, Botrel et al. (2006) obtiveram, usando a mesma expressão empregada no presente trabalho, os tamanhos efetivos de endogamia de 18,24 e 19,59, respectivamente, para fins de conservação.

A razão N_e/n é um importante parâmetro nas atividades de preservação do germoplasma, coleção de sementes e conservação genética *in situ* (VIEIRA; CARVALHO, 2008). Uma vez que o índice de fixação teve valores semelhantes nos cinco fragmentos, a razão N_e/n resultou, igualmente, em valores semelhantes, fazendo com que nenhuma subpopulação tenha prioridade para conservação sobre as demais (fragmentos com menor razão N_e/n são prioritários para conservação) ou estratégia diferente de coleta de sementes (maior quantidade de amostragem é necessária em fragmentos com menor razão N_e/n para garantir a manutenção da variabilidade genética e mínima endogamia nas sementes). De qualquer maneira, devido aos elevados coeficientes de endogamia que resultaram em uma baixa razão N_e/n , são necessárias estratégias para a conservação e a coleta de sementes, as quais devem ser realizadas de maneira aleatória (não de sementes mas de árvores matrizes).

A População Mínima Viável, calculada para prevenir a depressão endogâmica (curto prazo) e para manter o potencial evolutivo (longo prazo), foi determinada para os tamanhos efetivos de referência de 100 e 1000, respectivamente, conforme recomendado por Nunney e Campbell (1993). De acordo com Lynch (1998), a variância genética média (decorrente da deriva genética) torna-se independente do tamanho populacional quando o tamanho efetivo excede 1000 indivíduos, sendo esse o limite adequado para a conservação em longo prazo. No presente trabalho, foi assumida a mesma densidade (d) em todas subpopulações, com base no valor obtido no levantamento realizado por Figueiredo (2014), no município de São Martinho da Serra, e os resultados mostraram que somente o fragmento da Fazenda Inhatinhum apresentou possibilidades de manutenção da diversidade de equilíbrio genético em curto prazo pois obteve um valor positivo do parâmetro D , a diferença entre o tamanho da população estimada e a PMV. Porém, em longo prazo nenhum dos fragmentos se mostrou viável para preservar seu potencial evolutivo (todos os valores de D são negativos), aumentando, assim, a probabilidade de oscilações genéticas aleatórias que poderão levar ao seu declínio, constituindo-se em mais um motivo da necessidade de intervenção. Estratégias que reduzam a endogamia e a perda de alelos por deriva são necessárias, sendo uma das alternativas a criação de corredores ecológicos para manter um fluxo gênico entre as subpopulações. Em um estudo

sobre a estrutura genética de cinco fragmentos de *Protium spruceanum* em Lavras-MG, Vieira e Carvalho (2008) observaram valores de D entre -15 e 1252 para a conservação em curto prazo (tamanho efetivo de referência de 150) e entre -1027 e 237 para conservação em longo prazo (tamanho efetivo de referência de 1500).

A conversão da População Mínima Viável em termos territoriais (Área Mínima Viável) em termos de área indica a necessidade, para cada fragmento, de um mínimo de 4,5 e 45 ha para a conservação em curto e longo prazo respectivamente. Condizente com o parágrafo anterior, somente a Fazenda Inhatinhum possui uma área (11 ha) capaz de prevenir a depressão endogâmica (curto prazo). Isso significa que, caso se mantenha assim e sem fluxo, chegaria ao declínio. Conectando-se os fragmentos Canas e Camboazinho, que juntas somam 7,6 ha, ter-se-ia um tamanho suficiente para sua viabilidade em curto prazo. Para as restantes três subpopulações, dada a sua localização geográfica, seria necessário conectá-las todas elas, permitindo um fluxo gênico intenso, de modo a que se comportem como única população panmítica. Já para a manutenção do seu potencial evolutivo (em longo prazo), nem a conexão das três subpopulações (somando 24,7 ha) atingiria a Área Mínima Viável (45 ha). Porém, uma vez que a endogamia foi o efeito determinante na redução do tamanho efetivo, com o conseqüente aumento da População Mínima Viável, a conexão dos cinco fragmentos através de fluxo gênico, diminuiria a perda de alelos pela deriva e reduziria a endogamia, resultando em uma população (e área) mínima viável ainda menor, tornando-a mais próxima ou até inferior à área atual de 24,7 ha. À título de ilustração, se o coeficiente de endogamia no primeiro fragmento (Camboazinho) fosse igual a zero, seu tamanho efetivo teria sido igual ao tamanho populacional e a área mínima viável seria igual a 3,8 e 38 ha, para conservação em curto e longo prazo, respectivamente.

Um exemplo da importância do fluxo na minimização dos efeitos da endogamia e deriva foi observado por Vinson et al. (2015), quando estabeleceram duas parcelas de amostragem intensiva para as espécies arbóreas *Dipteryx odorata* e *Jacaranda copaia* na Floresta Nacional de Tapajós - Pará, tendo removido uma proporção de árvores dentro delas, simulando um corte seletivo. Os autores observaram uma perda de alelos nas árvores adultas, porém, um ganho de alelos em suas progênes devido à entrada de alelos vindos da circunvizinhança mediante o fluxo gênico. Por seu turno, estudando três fragmentos de *Hymenaea courbaril* L. na Amazônia Sul-Occidental, Silva et al. (2014) obtiveram uma Área Mínima Viável para conservação em longo prazo entre 3.565 e 25.963 ha (tamanho efetivo de referência de 1000), sendo a diferença de valores atribuída ao coeficiente de endogamia nos

fragmentos. Os autores estimaram também a Área Mínima Viável usando o tamanho efetivo de referência de 500, valor indicado por alguns autores para conservação em longo prazo, resultando em valores entre 1.782 e 12.976 ha.

Traill et al. (2007) realizaram uma meta-análise, resumizando os resultados da População Mínima Viável registrados ao longo de 30 anos na literatura e observaram em plantas (incluindo briófitas, pteridófitas, gimnospermas, monocotiledôneas e dicotiledôneas) um valor médio de 4.824 indivíduos, com um intervalo de confiança 2.512 – 15.992. Trata-se de uma base de dados de PMVs, levando em conta as diferenças na história de vida das espécies, porém, serve como guia preliminar em programas de conservação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho foram utilizados aplicativos computacionais, comprovadamente importantes na simulação de parâmetros genéticos populacionais, sendo uma ferramenta útil para antecipar fenômenos futuros, e assim, permitir intervenções conducentes a conservação da biodiversidade.

As simulações se basearam em dois parâmetros apenas, a saber, a heterozigosidade observada e heterozigosidade esperada, independentemente da heterozigosidade total, número de alelos, endogamia total (F_{IT}) e o endogamia entre fragmentos de fixação (F_{ST}), tendo-se registrado diferenças entre as estatísticas geradas no FSTAT e aquelas obtidas com o uso marcadores microssatélites. Outro aspecto a realçar se relaciona com as distâncias e escalas utilizadas na simulação, tendo-se limitado a apenas duas dimensões escaladas em uma unidade, quer dizer, não foi incluída a terceira dimensão (altitude), que, apesar de se tratar de um bioma plano, pode fornecer alguma influência nos resultados. Em função disso, serão realizadas, na sequência, novas de simulações com vista a se encontrar um modelo que satisfaça, simultaneamente, todos os parâmetros, de forma a obter estatísticas mais acuradas para caracterizar os fragmentos.

Nas condições dessa simulação, foram observados elevados índices de endogamia como resultado do isolamento reprodutivo dos fragmentos. O tamanho dos isolados não é suficiente para preservar seu potencial evolutivo em longo prazo, a menos que sejam conectados via fluxo gênico. Em curto prazo, somente o fragmento Inhatinhum possui um tamanho suficiente para superar os efeitos da depressão endogâmica. Desse modo, propõe-se, a construção de um corredor ecológico ligando os fragmentos Canas e BR290 e outro ligando Inhatinhum e Cacequi, de forma que o fluxo dos genes passe sendo regido sob o modelo *stepping stone*, cada um trocando genes com fragmentos adjacentes. Essa ação irá permitir o fluxo gênico entre os fragmentos, minimizando os efeitos da deriva genética e da endogamia. Além disso, o fluxo gênico permitirá a distribuição dos alelos, incluindo aqueles gerados por mutações, e permitir recombinações com características presentes em fragmentos distantes, aumentando assim a variabilidade genética e a capacidade adaptativa da população inteira em função das alterações ambientais.

Outro aspecto a considerar está ligado ao valor da taxa de migração obtida de 0,02, a qual representa o valor médio, que inclui valores iguais a zero entre fragmentos que não trocam genes entre si. Isso significa que as taxas de migração entre os fragmentos que trocam genes são variadas, incluindo valores superiores a 0,02, ratificando a importância de simulações a serem realizadas na sequência com a inclusão de todos os pares de fragmentos para estimar as respectivas taxas de fluxo gênico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381p.
- ALTER, S.E. et al. DNA Evidence for historic population size and past ecosystem impacts of gray whales. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n.38, p.15162-15167, 2007.
- ALVES, R.M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos**. 2002. 159f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, ESALQ, Universidade de São Paulo.
- ALVES, R.M. et al. Genetic diversity in Brazilian Amazon collections of cupuassu tree germplasm [*Theobromagrandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum.]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, n.3, p.818-828, 2013.
- ARAÚJO, A.M. **Paternidade e diversidade genética em caprinos no Brasil por meio de microssatélites de DNA**. 2004. 90f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa.
- BALLOUX, F. EASYPOP (version 1.7). A computer program for the simulation of population genetics. **Journal of Heredity**, v.92, n.3, p.301-302, 2001.
- BAWA, K.S. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. **Evolution**, v.28, n.1, p.95-92, 1974.
- BAWA, K.S. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. **American Journal of Botany**, v.72, n.32, p.331-345, 1985.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (ed). **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374p.
- BOTREL, M.C.G. et al. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, v.30, n.5, p.821-827, 2006.
- BREIER, A. C. B. **A Conservação genética de espécies arbóreas nativas em remanescentes de Mata Atlântica, no município do Rio de Janeiro**. 2008. 31f. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Curso de graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- BREWBAKER, J. L. Biology of the angiosperm pollen grains. **Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, v.19, n.2, p.121-33, 1959.
- CABALLERO, A. Developments in the prediction of effective population size. **Heredity**, v.73, n.6, p.657-679, 1994.
- CALAFELL, F. et al. Haplotype evolution and linkage disequilibrium: a simulation study. **Human Heredity**, v.51, n.1-2, p.85-96, 2001.

- CARVALHO, P.E.R. **Espécies arbóreas brasileiras**. v.3, 1 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 593p.
- COCKERHAM, C. C. Variance of gene frequency. **Evolution**, Lancaster, v. 23, n.1, p.72-84, 1969.
- CONSON, A.R.O. **Estrutura Genética em Populações de *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae)**. 2012. 58f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina.
- COSTA et al. Conservation of forest biodiversity: how sample size affects the estimation of genetic parameters. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.87, n.2: p.1095-1100, 2015.
- DALQUEN, D.A. et al. ALF—a simulation framework for genome evolution. **Molecular Biology Evolution**, v.29, n.4, p.1115–1123, 2012.
- DE CARVALHO M.C.C.G. et al. Flooding tolerance and genetic diversity in populations of *Luehea divaricata*. **Biologia Plantarum**, v.52, n.4, p.771–774, 2008.
- DE CONTI, D. et al. Identificação por PCR dos alelos-S associados à compatibilidade gametofítica em ameixeira japonesa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.10, p.1360-1367, 2013.
- DE NETTANCOURT, D. Incompatibility in angiosperms. **Sexual Plant Reproduction**, v.10, n.5, p.185-199, 1997.
- DESTRO D.; MONTALVÁN, R. **Melhoramento Genético de Plantas**. Londrina: Ed. UEL, 1999. 820p.
- DINIZ-FILHO, J.A.F.; TELLES, M.P.C. Spatial pattern and genetic diversity estimates are linked in stochastic models of population differentiation. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.3, p.541-544, 2000.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews – Genetics**, v.5, n.6, p.435-445, 2004.
- ELLIOTT, F. C. **Plant Breeding and Cytogenetics**. New York: McGraw-Hill Book Co., 1958. 395p.
- ENNOS, R.A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, v.72, p.250-259, 1994.
- ETHIER, S.N e GRIFFITHS, R.C. The infinitely-many-sites model as a measure valued diffusion. **The Annals of Probability**. v.15, n.2, p.414-545, 1987.
- EXCOFFIER, L. G. et al.. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

FERREIRA, M.E. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: GARRAY, I; DIAS, B.F.S. (Ed.). **Conservação da Biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Petrópolis: Vozes, 2001. v.1, p.223-267.

FIGUEIREDO, M.C.S. **Florística de mata ciliar em São Martinho da Serra, RS, Brasil**. 2014. 65f. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) - Curso de Pós-graduação em Agrobiologia, Universidade Federal de Santa Maria.

FISHER, R.A. The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. **Transactions of the Royal Society of Edinburgh**, v.52, n. 02, p.399-433, 1918.

FLATHER, C.H. et al. Minimum viable populations: Is there a 'magic number' for conservation practitioners? **Trends in Ecology and Evolution**, v.26, n.6, p.307–316, 2011.

FRANKEL, R.; GALUN, E. **Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding**. New York: Springer, 1977. 281p.

FU, Y.-X.; LI, W.-H. Coalescing into the 21st century: an overview and prospects of coalescent theory. **Theoretical Population Biology**, v.56, n.1, p.1–10, 1999.

GIBBS, P. E. Self-incompatibility in flowering plants: a neotropical perspective. **Revista Brasileira de Botânica**, v.13, p.125-136, 1990.

GIBBS, P.E.; BIANCHI, M.B. Does Late-acting self-incompatibility (LSI) Show family Clustering? Two more species of Bignoniaceae with LSI: *Dolichandra cynanchoides* and *Tabebuia nodosa*. **Annals of Botany**, v.84, n.4, p.449-457, 1999.

GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. **The Journal of Heredity**. v.86, n.6, p.485-486, 1995.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.M. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, v.122, n.1 p.81-89, 2001.

GOVINDARAJU, D.R. Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. **Journal of Evolutionary Biology**, v.2, n.3, p.173-181, 1989.

HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Columbus, v.69, n.10, p.1685-1693, 1982.

HARTL, D.L. & CLARK, A.C. **Princípios de genética de populações**, 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660p.

HELLBERG, M.E. et al. Genetic assessment of connectivity among marine populations. **Bulletin of Marine Science**, v.70 n.1, p.273-290, 2002.

HÜLLER, A. et al. Estrutura fitossociológica da vegetação arbórea do parque natural municipal de Santo Ângelo, Santo Ângelo, RS. **Ciência Florestal**, v.21, n.4, p.629-639, 2011.

HUNTER, R.L.; MARKET, C.L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, v. 125, n.3261, p.1294-1295, 1957.

HURLBERT, S.H. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Ecology**, v.52, n.4, p.577-586, 1971.

JOMBART, T. et al. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genetics**, v.11, n.94, p.1-15, 2010.

KAGEYAMA, P.; LEPSCH-CUNHA, N.M. Singularidade da biodiversidade nos trópicos. In: GARAY, I.; DIAS, B. (eds.) **Conservação da Biodiversidade em ecossistemas tropicais: Avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. São Paulo: Vozes, 2001, 432p.

Kasarasawa et al. Genetic structure of Brazilian wild rice (*Oryza glumaepatula* Steud., Poaceae) populations analyzed using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.2, p.400-410, 2007.

KEARNS, C.A. et al. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, v.29, n.4, p.83-112, 1998.

KIMURA, M. The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to the steady flux of mutations. **Genetics**, v.61, n.4, p.893-903, 1969.

KIMURA, M. Theoretical foundations of population genetics at the molecular level. **Theoretical Population Biology**, v.2, n.2, p.174-208, 1971.

KIMURA, M.; CROW, J.F. The effective population number. **Evolution**, v.17, n.3, p.279-288, 1963.

KIMURA, M.; WEISS, G.H. The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. **Genetics**, v.49, n.4, p.561-576, 1964.

LEVIN, D.A.; KESTER, H.W. Gene flow in seed plants. **Evolutionary Biology**, v.7, p.139-220, 1974.

LOBO, J. et al. Individual and temporal variation in outcrossing rates and pollen flow patterns in *Ceiba pentandra* (Malvaceae: Bombacoidea). **Biotropica**, v.45, n.2, p.185-194, 2013.

LORENZI, H.; **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v.2, 368p.

LOWE, A. J. et al. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, v.95, n.4, p.255-273, 2005.

LOXDALE, H.D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bulletin of Entomological Research**, v.88, n.6, p.577-600, 1998.

- LYNCH, M.; LANDE, R. The critical effective size for a genetically secure population. **Animal Conservation**, v.1, n.1, p.70-72, 1998.
- MANTEL, N. A technique of nonparametric multivariate analysis. **Biometrics**, v.26, n.3, p.547-558, 1970.
- MATSUNAGA, S. et al. Duplicative transfer of a MADS box gene to a plant Y chromosome. **Molecular Biology and Evolution**, v.20, n.7, p.1062-1069, 2003.
- MAYR, E. **Animal species and evolution**. Cambridge: Harvard University Press, 1963. 811p.
- MORAES, P.L.R.; MONTEIRO, R. Taxas de cruzamento em uma população natural de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae). **Biota Neotropica**, v.2, n.2, p.1-10 2002.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellite as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, n.1, p.175-182, 1993.
- NAGEL, J.C. **Diversidade e estrutura genética populacional em *Luehea divaricata* Mart. & Zucc. na região da fronteira oeste do Rio Grande do Sul, baseada em marcadores microssatélites**. 2013. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Curso de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa.
- NAGEL, J.C. et al. Historical gene flow within and among populations of *Luehea divaricata* in the Brazilian Pampa. **Genetica**, v.143, n.3, p.317-29, 2015.
- NASS, L.L. et al., **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 1183p.
- NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, v.41, n.2, p.225-233, 1977.
- NEI, M. et al. Infinite allele model with varying mutation rate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.73, n.11, p.4164-4168, 1976.
- NEIGEL, J. E. A comparison of alternative strategies for estimating gene flow from genetic markers, **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.28, n.1, p.105-128, 1997.
- NUNNEY, L.; CAMPBELL, K.A. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, v.8, n.7, p.234-239, 1993.
- OHTA, T e KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. **Genetic Resources**, v.22, n.2, p.201-204, 1973.
- PENG, B. et al. Genetic Simulation Resources: a website for the registration and discovery of genetic data simulators. **Bioinformatics**, v.29, n.8, p.1101-1102, 2013.
- PETIT, R. J. et al. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**. v.12, n.4, p.844-855, 1998.

PINTO, R.J.B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: EDUEM, 1995. 275pp.

POLLAK, E.; M. SABRAN. On the theory of partially inbreeding finite population. III. Fixation probabilities under partial selfing when heterozygotes are intermediate in viability. **Genetics**, v.131, n.4, p.979-985, 1992.

PROVINE, W. B. Discussion: Population genetics. **Bulletin of Mathematical Biology**. v.52, n.1/2, p.201-207, 1990.

QUESADA, M. et al. Long-term effects of habitat fragmentation on mating patterns and gene flow of a tropical dry forest tree, *Ceiba aesculifolia* (Malvaceae: *Bombacoideae*). **American Journal of Botany**, v.100, n.6, p.1095-1101, 2013.

REIS, R. L. et al. Comparação bayesiana de modelos com uma aplicação para o equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o coeficiente de desequilíbrio. **Ciência Rural**, v.41, n.5, p.834-840, 2011.

RIDLEY, M. **Evolução**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 752p.

RITLAND, K.; JAIN, S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using *n* independent *loci*. **Heredity**, v.47, p.35-52, 1981.

RODRIGUES, F.S. et al.; Estimativa da taxa de mutação de 15 locos autossômicos de microssatélites na população de Goiânia, GO. **Revista Brasileira de Biociências**, v.8, n.2, p.159-163, 2010.

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

RUVINSKY, R.; GRAVES, J.M. **Mammalian genomics**. Wallingford, Oxfordshire: CABI Publishing, 2005. 600p.

SÁNCHEZ, C.F.B. **Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva genética**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa.

SANCHEZ-MAZAS, A. et al. Distinct evolutionary strategies of human leucocyte antigen *loci* in pathogen-rich environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.367, n.1590, p.830-839, 2012.

SCHABERG P.G. et al. Anthropogenic alterations of genetic diversity within tree populations: implications for forest ecosystem resilience. **Forest Ecology and Management**, v.256, n.6, p.855-862, 2008.

SCHIFINO-WITTMANN, M.T. e DALL'AGNOL, M. Auto-incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.1083-1090, 2002.

- SEBBENN, A.M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, v.14, n.2, p.115-132, 2002.
- SEBBEN, A.M. et al. Conservação genética in situ e número de matrizes para a coleta de sementes em população de *Genipa americana* L. **Scientia Forestalis**, n.63, p.13-22, 2003.
- SEBBENN, A.M.; SEOANE, C.E.S. Estimativa do tamanho efetivo de endogamia por marcadores moleculares genéticos. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.1, p.1-7, 2005.
- SEBBENN, A.M. Sistemas de reprodução em espécies tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. In: HIGA, A.R.; SILVA, L.D (coord.). **Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba: FUPEF do Paraná, 2006. Cap.5, p.93-138.
- SHAFFER, M.L. Minimum population sizes for species conservation. **Bioscience**, v.31, n.2, p.131-134, 1981.
- SHRIVER, M.D. et al. VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation model: a computer simulations approach. **Genetics**, v.134, n.3, p.983-993, 1993.
- SIH, A.; M. BALTUS, M. Patch size, pollinator behavior and pollinator limitation in catnip. **Ecology**, v.68, n.6, p.1679-1690, 1987.
- SILVA, S.M.M. et al. Prâmetros genéticos para a conservação de *Hymenaea courbaril* L. na Amazônia Sul-Occidental. **Ciência Florestal**, v.24, n.1, p.87-95, 2014.
- SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, v.39, n.1, p.53-65, 1985.
- SLATKIN, M. Gene flow and geographic structure of natural population. **Science**. v.236, n.4803, p.787-792, 1987.
- SLATKIN, M.A. Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v.139, n.1, p.457-462, 1995.
- SOBIERAJSKI, G.R. et al. Sistema de reprodução em nove populações de *Mimosa scabrella* Bentham (Leguminosaceae). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.71, p.37-49, 2006.
- SOUZA, L.M.F.I. et al. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). **Scientia Forestalis**, n.65, p.70-79, 2004.
- STEFENON, V.M. Methodological Aspects of Gene Flow Estimation in Natural Populations. In: URBANO, K.V. **Advances in Genetics Research**. 2010. Cap.10
- STEFENON, V.M.; COSTA, L.S. A simulation study on the behavior of allelic richness and inbreeding coefficient over generations in fragmented populations of tree species. **Annals of Forest Research**, v.55, n.1, p.3-10, 2012.
- STORFER, A. Gene flow and endangered species translocation: a topic revisited. **Biological Conservation**, v.87, n.2, p.173-180, 1999.

THORPE, J. P.; SOLÉ-CAVA, A. M. The use of electrophoresis in invertebrate systematics. **Zoologica Scripta**, v.23, n.1, p.3-18, 1994.

TOBLER, W.R. A computer movie simulating urban growth in the Detroit region. **Economic Geography**, v.46, n.2, p.234-240, 1970.

TRAILL, L.W. et al. Minimum viable population size: A meta-analysis of 30 years of published estimates. **Biological Conservation**, v.139, n.1-2, p.159-166, 2007.

VALDES, A.M. et al. Allele frequencies at microsatellite *loci*: the stepwise mutation model revisited. **Genetics**, v.133, n.3, p.737-749, 1993.

VALLE, G. et al. Estrutura genética populacional de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) utilizando marcadores microssatélites. **Neotropical Entomology**, v.40, n.2, p.204-211, 2011.

VIEIRA, F.A.; CARVALHO, D. Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, v.17, n.10, p.2305-2321, 2008.

VINSON, C.C. et al. Impacts of selective logging on inbreeding and gene flow in two Amazonian timber species with contrasting ecological and reproductive characteristics. **Molecular Ecology**, v.24, n.1, p.38-53, 2015.

WALSH, B. **Details on the various assumptions used in computing TMRCA**. Tucson: Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade de Arizona, 2002. Capturado em 11 dez 2014. Online. Disponível em: <http://nitro.biosci.arizona.edu/ftdna/models.html>.

WEIR, B.S. e COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, n.6, p.1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian Populations. **Genetics**, v.16, n.2, p.97-159, 1931.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v.15, n.1, p. 323-354, 1951.

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

YUAN, X. et al. An overview of population genetic data simulation. **Journal of Computational Biology**, v.19, n.1, p.42-54, 2012.

ZAHA, A. et al. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Artmed, 2014. 403p.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. 2002**. 130p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Curso de Pós-graduação em Agronomia, ESALQ, Universidade de São Paulo.

APÊNDICES

Apêndice 1– Entrada de dados no software EASYPOP para as simulações

EASYPOP (v. 2.0.1)

Author: F. Balloux

Available at: <http://www.unil.ch/izea/software/easypop.html>

Ploidy level ? (0=haplo-diploid; 1=haploid; 2=diploid)

2

Two sexes?:y/n

n

Random mating?:y/n

n

Proportion of clonal reproduction (between 0 and 1)

0

Proportion of selfing (between 0 and 1)
of the individuals not born as clones

0.1

Number of populations ?

5

Same number of individuals in each populations?:y/n

n

enter number of individuals of population 1

100

enter number of individuals of population 2

100

enter number of individuals of population 3

300

enter number of individuals of population 4

100

enter number of individuals of population 5

50

Same migration scheme over all simulation? (y/n)

y

migration model?

1 = 1-dimension stepping stone;

2 = 2-dimension stepping stone (only with a square
number of populations, e.g. 9, 16,..144..);

3 = island model;

4 = hierarchical stepping stone ('contact zone');

5 = hierarchical island ;

6 = spatial models;

6

proportion of migration?(between 0 and 1)

0.1

How many dimensions define the space (at least one)

2

enter mean dispersal distance

10000

Number of loci ?

10

Free recombination between loci?:y/n

y

Do all loci have the same mutation scheme?:y/n

y

Mutation rate ?(between 0 and 1, e.g. 0.0001)

0.0004

Mutation model

1= Kam,(same probability to mutate to any allelic state)

2= Ssm, (single step mutation model)

3= Mixed model of Ssm with a proportion of Kam mutation events)

4= Mixed model of Ssm with a proportion of double step mutation events)

3

Proportion of Kam mutation events

0.1

Number of possible allelic states ?(below 1000)

10

Variability of the initial population

1= Maximal, (randomly assigned alleles)

2= Minimal, (all individuals start with the same allele)

1

Number of generations ?

400

How many populations in the result files (less than simulated populations)

5

How many individuals in each population (less than simulated individuals)

50

Number of replicates? (between 1 and 999)

100

Apêndice 2 – Lista de aplicativos computacionais comumente usados em genética de populações.

Programa	Autor(es)	Aplicação	Link para baixar
Aladyn	Katja Schiffers	Permite estudar como padrões demográficos, populações genéticas e condições abióticas afetam a taxa de adaptação	www.katja-schiffers.eu/research.html
Ms	HUDSON, R. R. (2002)	Um programa para simular diversos cenários demográficos evolutivos neutros.	http://home.uchicago.edu/~rhudson1/source/mksamples.html
Artificial Life Framework (ALF)	DALQUEN et al. (2001)	Visa simular toda a gama de forças evolutivas que atuam sobre genomas: nucleotídeos, códon, ou substituição de aminoácidos (sob modelos simples ou mistos), <i>indels</i> , duplicação de genes, perda de gene, fusão de genes, fissão gene, genoma rearranjo, a transferência lateral de genes, ou especiação.	www.cbrg.ethz.ch/alf
PopG	Joe Felsenstein	Um programa de simulação genética para um loco de dois alelos. Simula várias populações e permite observar o efeito da seleção natural, mutação, migração e deriva genética.	http://evolution.gs.washington.edu/popgen/
PopGen	Jouni Aspi	Programa de simulação projetado para esclarecer vários eventos genéticos populacionais.	http://cc.oulu.fi/~jasp/popgen/popgen.htm
PopGene (Population Genetic)	Francis Yeh, Rong-Cai Yang e Timothy Boyle	Executa as simulações comumente usados em genética de populações.	http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene_info.html
EasyPop	Francois Balloux (2001)	Permite simular conjuntos de dados genéticos sob uma gama muito ampla de condições, incluindo sistemas reprodutivos, modelos de migração e mutação	http://www.unil.ch/dee/en/home/menuinst/software-dataset/software/easypop.html
Fstat	Jérôme Goudet (1995)	Um programa para calcular estatísticas F, Nei e Weir & Cockerham.	http://www2.unil.ch/popgen/software/fstat.htm
Arlequin	EXCOFFIER et al. (2005)	um pacote de software integrado para análise de dados de genética de populações	http://popgen.unibe.ch/software/arlequin35/Arl35Downloads.html
BOTTLENECK	Sylvain Piry, Jean-Marie Cornuet and Gordon Luikart	Um programa para detecção da redução recente no tamanho efetivo populacional a partir de dados de frequências alélicas	http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/software/Bottleneck/

IBDsim	LEBLOIS et al. (2008)	Simulação de dados genotípicos sob modelos gerais de isolamento por distância.	http://raphael.leblois.free.fr/
SFS_CODE	HERNANDEZ (2008)	Simulações em genética populacional sob um modelo geral de Wright-Fisher com efeitos arbitrários de migração, demografia, seleção e mutação.	http://sfscode.sourceforge.net/sfs_code/index/index.html
Vortex	LACY e POLLAK (2014)	Modelo de simulação para análise de viabilidade populacional (PVA).	http://www.vortex9.org/vortex.html