

UFRRJ
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E FLORESTAIS

DISSERTAÇÃO

**Variabilidade genética em populações de *Mimosa acutistipula*
Mart. (Benth.) var. *ferrea* Barneby (Leguminosae) em vegetação
de Canga na Amazônia**

Maurício Vassali

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E
FLORESTAIS
CONSERVAÇÃO DA NATUREZA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Mimosa
acutistipula* Mart. (Benth.) var. *ferrea* BARNEBY (LEGUMINOSAE) EM
VEGETAÇÃO DE CANGA NA AMAZÔNIA**

MAURÍCIO VASSALI

Sob orientação do Professor
Sérgio Miana de Faria

e Co-orientação dos Professores
Maristerra R. Lemes
Haroldo C. de Lima

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de concentração em Conservação da Natureza.

Seropédica, RJ
Abril de 2014

333.9516

V336v

T

Vassali, Maurício, 1989-
Variabilidade genética em
populações de *Mimosa acutistipula*
Mart. (Benth.) var. *ferrea* Barneby
(Leguminosae) em vegetação de Canga na
Amazônia / Maurício Vassali - 2014.
59 f.: il.

Orientador: Sérgio Miana de Faria.
Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Ciências Ambientais e Florestais.
Bibliografia: f. 36-44.

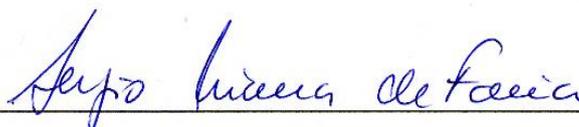
1. Biodiversidade - Conservação -
Teses. 2. Microssatélites (Genética) -
Teses. 3. Vegetação - Carajás, Serra
dos (PA) - Teses. 4. Leguminosa -
Teses. I. Faria, Sérgio Miana de,
1958-. II. Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Ciências Ambientais e
Florestais. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS

MAURÍCIO VASSALI

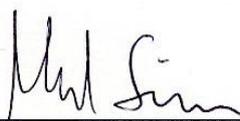
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Conservação da Natureza.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 28/04/2014



Sergio Miana de Faria. Dr. Embrapa Agrobiologia.

(Orientador)



Marcelo Fragomeni Simon. Dr. Embrapa Cenargen.



Evânia Galvão Mendonça. Dr^a. UFRRJ.

*Aos meus amados pais, Rosmari e Glademir, e àquela para quem eu esperava
apresentar o fruto do suor e da distância, Nona Angela, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao acaso, por terem coagido para que tudo desse certo.

Aos meus pais, Rosmari Inês e Glademir, pelo amor e carinho, por acreditarem em mim, por manterem meus pés no chão e por serem os maiores exemplos que eu tenho na minha vida. Sem vocês, este trabalho não existiria.

Ao meu irmão, Henrique, pela nossa ligação de eterno afeto e por dividir comigo os momentos inesquecíveis de uma família tão especial.

À minha segunda família, meus tios Lúcia e Alcir Fernando e meu primo Marco, por me receberem de braços abertos e terem me acolhido como filho e irmão, possibilitando que esta etapa se concretizasse.

Aos queridos primos Cláudia e Luiz Antonio, pelo apoio e por terem abdicado da própria intimidade para facilitar minhas idas ao Jardim Botânico. Jamais esquecerei o sofá-cama.

Aos demais familiares, em especial aos tios Tânia e Camargo, aos primos Renata e Rafael e minha madrinha Seli, por estarem sempre presentes e me dando forças para seguir na peleia.

Ao meu orientador, o Dr. Sergio Miana de Faria, pela orientação e por me apresentar um trabalho tão desafiador.

À minha co-orientadora, a Dra. Maristerra R. Lemes, pela exigência, conselhos e amizade. Por ter me provocado a ultrapassar limites e dificuldades, fazendo-me crescer. Seja lá qual for nosso futuro, espero jamais perder teu contato.

Ao Dr. Haroldo C. Lima, também pela co-orientação, pela ajuda nas coletas e por partilhar seu grande conhecimento.

Aos colegas de Laboratório, Evandson, Luan, Janaína e Daniele, pela ajuda, por dividirem os anseios e dificuldades do trabalho e tornarem a experiência laboratorial ainda mais rica com suas personalidades. Levarei para sempre a amizade de todos.

Aos colegas da Pós, principalmente o Rodrigo, a Mayara, a Kelly, o Silas e a Karla, com quem, mesmo depois de ter saído de Seropédica para trabalhar no Jardim Botânico, mantive uma amizade especial. Obrigado pelos risos e conselhos.

Aos amigos eternos da UFSM, do Literatortura e àqueles ainda mais antigos, de Campinas do Sul - RS e “región”, simplesmente por existirem e tornarem a vida mais alegre. Sim, só isso, até porque não colaboraram em nada com o trabalho em si.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do JBRJ, ao Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais e Florestais da UFFRJ, CAPES, Companhia Vale do Rio Doce, em especial a equipe da GABAN, Alexandre F. Castilho, Jenaldo Carvalho, Tarcísio Rodrigues e João Carlos Henriques, ICMBio, FAPERJ e CNPq pelo apoio logístico e/ou financiamento que tornaram possível a realização do trabalho. O estudo foi parcialmente financiado no âmbito dos projetos: E-26/111.351/2010/FAPERJ e 561905/2010-0/CNPq.

Minha mais sincera gratidão a todos.

RESUMO

VASSALI, Maurício. **Variabilidade genética em populações de *Mimosa acutistipula* Mart. (Benth.) var. *ferrea* Barneby (Leguminosae) em vegetação de Canga na Amazônia.** 2014. 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais). Instituto de Florestas. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

As áreas de cangas ferríferas presentes na Serra de Carajás, PA, possuem características bastante distintas, sendo consideradas ambientes raros. Na Amazônia oriental, as cangas ferríferas estão situadas em cimeiras de relevos residuais rochosos em meio a uma matriz florestal. O alto teor de ferro presente no substrato favorece o desenvolvimento de uma vegetação adaptada, chamada savana metalófila ou simplesmente vegetação de canga, onde frequentemente são encontrados endemismos. *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* é uma espécie arbustivo-arbórea de ocorrência natural e abundante na área de estudo, sendo representativa da vegetação rupestre que cobre as cangas ferríferas. No presente estudo foram investigados os padrões de distribuição da variabilidade genética em populações desta espécie por meio da análise de locos de DNA microssatélite do genoma do cloroplasto (cpSSR). No total, foram amostrados 119 indivíduos provenientes de nove populações distribuídas em áreas de canga situadas na Serra de Carajás, PA. Foram estimados parâmetros de diversidade e estrutura genética, bem como determinadas as relações entre os haplótipos encontrados em nove populações de *M. acutistipula* var. *ferrea* na região de estudo. No total foram encontrados nove alelos (2 a 5 alelos/loco) em três locos cpSSR investigados nas populações. O índice médio de diversidade genética nas populações foi de $H_E = 0,33$, variando de 0,215 a 0,485. Uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou que a maior parte da variabilidade genética está contida dentro das populações (78 a 95%), evidenciando uma baixa a moderada estruturação (diferenciação) genética das populações, com base nos modelos de mutação *stepwise* ($R_{ST} = 0,052$) ou alelos infinitos ($F_{ST} = 0,215$). A análise combinada dos diferentes alelos encontrados nos três locos cpSSR polimórficos possibilitou identificar 13 haplótipos, sendo a maioria deles compartilhada entre as populações amostradas de *Mimosa acutistipula*, corroborando a baixa estruturação genética encontrada na AMOVA. A ocorrência de vários haplótipos do cpDNA, comuns na maioria das populações de *M. acutistipula*, sugere a possível influência que eventos históricos, relacionados às alternâncias climáticas ocorridas no Pleistoceno, e o fluxo gênico histórico provavelmente tiveram no padrão atual de distribuição da variabilidade genética observado nas populações da espécie na região. No entanto, também foram observados haplótipos derivados mais recentes, exclusivos de algumas populações, cuja diferenciação provavelmente ocorreu após o isolamento de áreas de canga dentro da matriz florestal, após o último máximo glacial (UMG).

Palavras-chave: Diversidade genética. Marcadores Microssatélites. cpDNA.

ABSTRACT

VASSALI, Maurício. **Genetic variation in populations of *Mimosa acutistipula* Mart. (Benth.) var. *ferrea* Barneby (Leguminosae) in Amazon canga vegetation.** 2014. 46 p. Dissertation (Master Science in Environmental and Forest Sciences). Instituto de Florestas. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The iron-rich canga areas that are present in the Carajás National Forest, PA – Brazil, have very different characteristics and are considered rare environments. In Oriental Amazon, the iron-rich cangas are located in rocky summits of residual reliefs, surrounded by a forest matrix. The high content of iron present in the soil favors the development of an adapted vegetation, called metal-tolerant savannahs or simply canga vegetation, which often lodge harbours endemic species. *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* is a shrubby-arborescent species of natural and abundant occurrence in the study area, being representative of the rocky vegetation that covers the canga sites. This study investigated the distribution patterns of genetic variability in populations of this species through the analysis of microsatellite DNA loci from the chloroplast (cpSSR) genome. In total, 119 individuals from nine populations distributed in canga areas located in the Serra de Carajás, PA, were sampled. Parameters of genetic diversity and structure were estimated, and the relationship between haplotypes found in nine populations of *M. acutistipula* var. *ferrea* in the study area was determined. A total of nine alleles (2 to 5 alleles/locus) at three cpSSR loci investigated in nine populations were found. The average index of genetic diversity in populations was $H_E = 0,33$, ranging from 0,215 to 0,485. An analysis of molecular variance (AMOVA) showed that most of genetic variation is contained within populations (78 to 95%), indicating low to moderate genetic structuring (differentiation) of populations, based on the stepwise mutation model ($R_{ST} = 0,052$) and the infinite alleles model ($F_{ST} = 0,215$). The combination analysis of different alleles found in the three polymorphic cpSSR loci enabled the identification of 13 haplotypes, most of them shared between sampled populations of *M. acutistipula*, corroborating the low genetic structuring found in AMOVA. The occurrence of several common cpDNA haplotypes in most populations of the species suggests that historical events, related to climatic alternations during the Pleistocene, and gene flow possibly influenced the current pattern of distribution of genetic variability in populations of the species in the region. However, it was also detected recently derived haplotypes exclusive to some populations, which differentiation probably happened after the isolation of the canga areas within the forest matrix after the Late Glacial Maximum (LGM).

Key words: Genetic diversity. Microsatellite markers. cpDNA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Tipos fisionômicos recorrentes nas cangas da Floresta Nacional de Carajás: (A) Campos Rupestres Arbustivos; (B) Campos Rupestres Abertos. Fotos: H. C. Lima.....10
- Figura 2. Indivíduos adultos de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* em floração na Floresta Nacional de Carajás, PA (A e B); Detalhe da inflorescência e folíolos de *M. acutistipula* var. *ferrea* (C).....12
- Figura 3. Distribuição de *Mimosa acutistipula* em território brasileiro (BARNEBY, 1991).....13
- Figura 4. Localização das áreas de estudo das nove populações amostradas de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* na Serra de Carajás, PA. Em amarelo observa-se a delimitação da FLONA de Carajás, PA..... 15
- Figura 5. Quantificação do DNA genômico total extraído de amostras de *M. acutistipula* em comparação aos padrões de DNA do phago *Lambda*. Os números de 1 a 3 correspondem, respectivamente, às massas moleculares de DNA do phago *Lambda* de 50, 100 e 200 ng. As bandas no gel de 4 a 14 correspondem ao DNA extraído de 10 indivíduos de *M. acutistipula* de populações provenientes das Serras Sul (4 a 10) e Norte (11 a 13) situadas na FLONA de Carajás, PA..... 19
- Figura 6. Produtos amplificados para sete locos microssatélites do genoma do cloroplasto de *Mimosa acutistipula*, analisados em gel de agarose. O primeiro poço do gel mostra o marcador *Ladder* 1Kb e os seguintes (nos. 1 a 4), mostram os produtos da amplificação dos locos para quatro indivíduos da espécie. As imagens mostram os *primers* polimórficos (A) *ccmp4*, (B) *ccmp6* e (C) *ccmp7* e os monomórficos (D) *ccmp1*, (E) *ccmp2*, (F) *ccmp3* e (G) *ccmp10*.....20
- Figura 7. Eletroferogramas mostrando os diferentes alelos observados para três locos cpSSR polimórficos em diferentes indivíduos de *M. acutistipula* da Serra de Carajás, PA, após análise em sequenciador automático de DNA ABI 3500 XL. Cada pico na figura indica um alelo. Os tamanhos dos alelos estão indicados na barra superior, em pares de bases (pb). A) Alelos observados para o loco *ccmp4*, B) *ccmp7* e C) *ccmp6*..... 21
- Figura 8. Eletroferogramas mostrando os diferentes alelos observados para três locos cpSSR monomórficos em diferentes indivíduos de *M. acutistipula* da Serra de Carajás, PA, após análise em sequenciador automático de DNA ABI 3500 XL. Cada pico na figura indica um

alelo. Os tamanhos dos alelos estão indicados na barra superior, em pares de bases (pb). A) Alelos observados para o loco <i>ccm1</i> , B) <i>ccmp3</i> e C) <i>ccmp10</i>	22
Figura 9. Frequência dos haplótipos observados três locos cpSSR de <i>Mimosa acutistipula</i> na Serra de Carajás, PA. As cores representam as populações estudadas da Serra Norte (SN), Serra Sul (SS) e Serra da Bocaina (SB) conforme a legenda à direita do gráfico.....	24
Figura 10. Relações entre os haplótipos em <i>Mimosa acutistipula</i> na Serra de Carajás, PA com base em análise de rede (<i>Network</i>) utilizando o método <i>Median Joining</i> , a partir da variação encontrada em três locos cpSSR. Cada traço sobreposto às linhas que unem os haplótipos representa um evento mutacional. O tamanho dos círculos representa, em proporção, as frequências de haplótipos. Os números correspondem aos haplótipos e as cores indicam as populações, como descritas na legenda à direita da figura. Os dois círculos correspondem a dois grupos de haplótipos mais recentes, observados exclusivamente na Serra da Bocaina (SB) e em populações predominantemente situadas na Serra Norte (SN).....	26
Figura 11. Distribuição geográfica de haplótipos observados em nove populações de <i>M. acutistipula</i> para três locos cpSSR. Os tamanhos dos círculos são proporcionais ao tamanho amostral e as cores representam os haplótipos, conforme legenda à direita da figura.....	27
Figura 12. Análise de agrupamento (UPGMA) de nove populações de <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> da Serra de Carajás, PA inferida a partir de estimativas das distâncias genéticas de Nei (1972; 1978).....	28
Figura 13. Correlação entre distância genética de Nei e distância geográfica (Km) para nove populações de <i>M. acutistipula</i> , analisadas par a par a partir do Teste de Mantel, com base na variação observada em três locos cpSSR ($r=0.2163$; $p=0.039$).....	29
Figura 14. Reconstrução do possível padrão de distribuição da vegetação na Bacia Amazônica e arredores durante o Último Máximo Glacial, aproximadamente 20.000 AP (VAN DER HAMMEN & HOOGHIEMSTRA, 2000).....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coordenadas geográficas e amostragem das nove populações de <i>M. acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> investigadas.....	14
---	----

Tabela 2. Características dos locos microssatélites do genoma do cloroplasto (cpSSR) cujas condições de amplificação foram otimizadas para <i>Mimosa acutistipula</i> . (T_A) = Temperatura de anelamento, N_A = número de alelos. * (Weising & Gardner, 1999).....	17
Tabela 3. Haplótipos encontrados em nove populações de <i>M. acutistipula</i> na Serra de Carajás, PA, com base na análise combinada de três locos microssatélites do genoma do cloroplasto. N = n° de indivíduos, SN1 – Serra Norte 1, SN2 – Serra Norte 2, SN3 – Serra Norte 3, SS1 – Serra Sul 1, SS2 – Serra Sul 2, SS3 – Serra Sul 3, SB1 – Serra da Bocaina 1, SB2 – Serra da Bocaina 2, SB3 – Serra da Bocaina 3. Os números abaixo das colunas de cada loco cpSSR representam o tamanho dos alelos em pares de base (pb).....	23
Tabela 4. Estimativas da diversidade genética em nove populações de <i>M. acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> da Serra de Carajás, PA, com base na análise de três locos cpSSR. (N) = número de indivíduos, (A) = número de alelos, (NH) = número de haplótipos e (HE) = índice de diversidade genética de Nei (1989).....	24
Tabela 5. Distribuição da variabilidade genética em nove populações de <i>M. acutistipula</i> na Serra de Carajás, PA, inferida por meio de uma análise de variância molecular (AMOVA) em três locos cpSSR.....	25
Tabela 6. Matriz de correlação entre distâncias genéticas de Nei (na parte de baixo da diagonal) e distâncias geográficas (acima da diagonal, em quilômetros) entre as populações de <i>M. acutistipula</i> var. <i>ferrea</i> na Serra de Carajás, PA, analisadas par a par.....	29

LISTA DE ABREVIACOES E CONVENOES

AMOVA Análise de variância molecular (Analysis of Molecular Variance)

BSA Albumina de Soro Bovina (Bovine Serum Albumin)

CIA clorofrmio: lcool isoamílico

cpDNA Genoma de cloroplasto

CTAB Brometo de cetiltrimetilamnia

DNA cido desoxirribonucléico

dNTP Desoxirribonucleotídeo

EDTA cido etileno diamino tetracético

HCl cido Clorídrico

KCl Cloreto de potássio

MgCl₂ Cloreto de magnésio

ml Mililitro

µL Microlitros

NaCl Cloreto de sdio

pb Pares de bases

PCR Reao em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

Primers Oligonucleotídeos iniciadores

RNase Enzima utilizada na polimerizao do ácido ribonucleico (RNA)

TE Tris-HCl + EDTA

Taq Enzima termoestável derivada da bactéria *Thermus aquaticus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo Geral.....	2
1.2 Objetivos Específicos	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Conservação da Biodiversidade	3
2.2 Genética da Conservação	4
2.3 Marcadores Moleculares	6
2.4 A Serra de Carajás	7
2.5 A vegetação de Canga em Carajás.....	8
2.6 <i>Mimosa acutistipula</i> var. <i>ferrea</i>	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Área de estudo, amostragem populacional e coleta do material vegetal	14
3.2 Extração, Quantificação e Diluição do DNA.....	16
3.3 Amplificação e Análise dos Locos Microsatélites do Genoma do Cloroplasto (cpDNA)	16
3.4 Análise dos dados	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Extração e Quantificação do DNA	19
4.2 Amplificação dos Locos Microsatélites do Genoma do Cloroplasto (cpSSR)	19
4.3 Diversidade, Estrutura Genética de Populações e Relações entre Haplótipos	23
4.4 Discussão	30
5. CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	45

1. INTRODUÇÃO

A Serra de Carajás, situada no estado do Pará, é uma região caracterizada por alta heterogeneidade de ambiente tropical em uma escala espacial relativamente pequena, composta por várias fitofisionomias que variam desde áreas florestais de diferentes níveis de densidade até áreas não florestais com características de savana identificadas como vegetação de canga, além dos campos naturais. Na Serra de Carajás encontra-se a Floresta Nacional (FLONA) de Carajás, uma unidade de conservação cujo plano de manejo estabelece áreas para pesquisa científica, conservação e mineração, entres outros usos. Cerca de 95% da área da FLONA de Carajás é coberta por florestas, enquanto as vegetações rupestres, como as de canga, representam 2 a 3% do total. As cangas hematíticas (ferríferas) estão situadas em cimeiras de relevos residuais rochosos e são circundadas por uma matriz de floresta ombrófila ou estacional.

As áreas ferríferas presentes na FLONA de Carajás são cobertas por uma vegetação composta de espécies características deste local e de conservação indispensável. Nunes (2009) atenta para a raridade dos ambientes distintos de vegetação aberta na Floresta Nacional de Carajás sendo, portanto, urgentes os estudos nestes ambientes, dada a relevância do ecossistema de canga ferrífera.

Estas áreas de canga em Carajás possuem características bastante particulares em relação à sua riqueza em ferro, o que atrai atenção das grandes mineradoras. A fragmentação de tal vegetação em função de ações antrópicas pode alterar as populações de espécies de plantas nesta formação, diminuindo o tamanho efetivo das mesmas.

Proteger comunidades biológicas é uma das formas mais eficientes de conservar a biodiversidade. Entretanto, com a complexa questão econômico-social no mundo atual, manter toda a biodiversidade protegida parece algo utópico. Assim, há a necessidade de priorizar a conservação de espécies que sejam endêmicas, que estejam ameaçadas de extinção, que possuam grande valor utilitário e/ou que façam parte de sistemas complexos com características particulares e de ocorrência pontual. Neste sentido, é essencial que se tenha uma atenção especial com as áreas de vegetação de canga, ambientes tão particulares e ricos em endemismo (POREMBSKI et al., 1994).

A variabilidade genética contida nas populações é primordial para que seja garantida a adaptação evolutiva das espécies frente a mudanças futuras, já que estas são contínuas no meio ambiente. Um pré-requisito essencial para que se desenvolvam estratégias de conservação de espécies é o conhecimento da extensão e distribuição da diversidade genética em suas populações, bem como dos fatores históricos e evolutivos que influenciam as trocas genéticas inter e intrapopulacionais.

Dentre os fatores que são responsáveis por manter a diversidade genética, podem-se citar as mutações e a troca de alelos entre populações distintas é um fator que mantém a diversidade genética, sendo indispensável para conservação de espécies em longo prazo. Por isso, é fundamental que populações geneticamente diversas sejam conservadas e, além disso, que a troca genética entre elas seja assegurada.

Neste estudo, são investigados os padrões de distribuição da variabilidade genética nas populações de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*, uma espécie que possui ocorrência natural nas áreas de canga amazônica, sendo característica deste habitat peculiar. Para isso, foram utilizados marcadores microssatélites do genoma do cloroplasto (cpSSR), uma importante ferramenta para a estimativa da diversidade e estrutura genética em populações vegetais. As análises aqui apresentadas são inéditas, já que ainda não foram realizados estudos genéticos com marcadores microssatélites para esta espécie.

A obtenção de informações sobre os níveis e os padrões de distribuição da variabilidade genética destas populações são de fundamental importância para a conservação desta espécie em particular, já que caracteriza os níveis de diversidade dentro e entre cada população estudada. Além disso, poderá nortear a implementação de estratégias efetivas para a conservação das áreas de Canga na Floresta Nacional de Carajás – PA.

1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar os padrões de distribuição da variabilidade genética em populações de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* em áreas de vegetação de Canga na Floresta Nacional de Carajás, situada no estado do Pará, visando fornecer subsídios que contribuam para a conservação efetiva desta formação vegetal na Amazônia brasileira.

1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os padrões de distribuição da variabilidade genética em populações de *M. acutistipula* características da Canga, com base na análise de polimorfismos de locos microssatélites do genoma do cloroplasto (cpDNA).
- Quantificar a diversidade genética e os níveis de diferenciação (estruturação) genética entre as populações de *M. acutistipula*, espécie de leguminosa característica da vegetação de canga que ocorre na Floresta Nacional de Carajás, PA., com base na variabilidade em locos microssatélites do genoma do cloroplasto (cpDNA).
- Determinar as relações entre haplótipos, bem como a distribuição geográfica destes nas populações de *M. acutistipula*.
- Gerar informações genéticas consistentes para subsidiar a implementação de ações que visem a conservação da espécie, bem como para a conservação da vegetação de canga na Amazônia brasileira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conservação da Biodiversidade

Para Soulé (1985), a Biologia da Conservação aborda a biologia das espécies, comunidades e ecossistemas que são direta ou indiretamente perturbados por atividades humanas ou de outros agentes e cujo objetivo é estabelecer princípios e ferramentas para a preservação da biodiversidade. O autor ainda destaca que a biologia da conservação é uma ciência de crise, onde muitas vezes é necessário agir antes mesmo da disponibilidade de um pleno conhecimento dos fatos, numa mistura de ciência e intuição.

Foi a partir Convenção da Diversidade Biológica que o termo “biodiversidade” começou a ser difundido (LÉVÊQUE, 1999), sendo que esta mesma convenção despertou a necessidade da conservação da diversidade biológica em maiores proporções (HOROWITZ, 2003).

A União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) define biodiversidade como a variabilidade entre organismos vivos - animais, plantas, seus habitats e genes – de todos os meios incluindo os terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos, e todos os complexos ecológicos a que fazem parte, englobando a diversidade dentro das espécies, entre as espécies e entre ecossistemas. Já Rao & Hodgkin (2002) a definem como a variação presente em todas as espécies de plantas e animais, seu material genético e o ecossistema onde ocorrem. A diversidade pode ocorrer em três níveis diferentes: a diversidade genética (de genes e genótipos), a diversidade de espécies (ou riqueza de espécies) e a diversidade de ecossistemas (comunidades e seus ambientes) (WRI, 1992; RAO & HODGKIN, 2002; LIU et al, 2011), sendo que o total da diversidade nestes três níveis constitui a biodiversidade propriamente (DAVIS & CORNWELL, 2012).

Neste sentido é natural e necessário que haja uma preocupação com a conservação de tal diversidade, e o Ministério do Meio Ambiente destaca três principais razões que a justificam: a biodiversidade é responsável pelo equilíbrio e estabilidade dos ecossistemas; tem grande potencial econômico; as consequências da sua deterioração devido ao impacto das atividades humanas. Tais impactos causadores da perda de biodiversidade incluem: a diminuição e fragmentação de habitats, a introdução de espécies exóticas, o uso de híbridos e monoculturas, a exploração excessiva dos recursos naturais, a contaminação dos meios abióticos e as mudanças climáticas (<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-global/impactos>).

As muitas causas da perda da biodiversidade estão relacionadas a fatores sociais, econômicos e culturais (BEUMER & MARTENS, 2013). Desta forma, a conservação da diversidade biológica é um dos maiores desafios da atualidade, dadas as grandes perturbações sofridas pelos ecossistemas naturais em decorrência de atividades antrópicas (VIANA & PINHEIRO, 1998). Têm sido discutidas as consequências destas atividades, que além da perda da biodiversidade, incluem a extinção de genes, espécies e ecossistemas (LIU et al, 2011). Fatores como o crescente isolamento de populações de plantas, devido à fragmentação de ecossistemas por atividades humanas, têm sido um dos maiores problemas para a conservação (CBD, 2012; CASTRO & VAN DEN BERG, 2013).

No âmbito do presente estudo e levando em conta os impactos supracitados, deve-se considerar o processo de exploração mineral para fins industriais como uma atividade que também causa danos ao ambiente. Dentre os principais impactos causados pela atividade mineradora estão a supressão da vegetação em área de lavra, conflitos relacionados ao uso do solo, depreciação de imóveis circunvizinhos e geração de áreas degradadas (BITAR, 1997).

Tendo em vista o potencial de degradação ambiental da atividade mineradora, são necessárias medidas mitigadoras que possibilitem a preservação da biodiversidade nas áreas exploradas e no seu entorno. Neste contexto, o artigo 6 da Convenção da Diversidade Biológica de 1992 destaca o desenvolvimento de estratégias e planos de utilização sustentável da biodiversidade e a integração desta com a conservação dos recursos naturais. O artigo 8 desta mesma convenção (CDB) aponta, dentre outros, a importância de se “promover a proteção de ecossistemas, habitats naturais e manutenção de populações viáveis de espécies em seu meio natural” como ponto importante da conservação *in situ*.

A falta de conhecimento sobre a biodiversidade limita a implantação de políticas eficientes de conservação e desenvolvimento para os próximos séculos (WILSON, 1997). Estudos mostram que a ineficiência das atividades humanas precisa ser resolvida, e que o crescimento econômico em si não é o responsável pela perda da biodiversidade (FUENTES, 2013). Por isso, outra estratégia importantíssima para a conservação da biodiversidade é o conhecimento e geração de informações acerca da diversidade de espécies. Estudos sobre a vegetação, tais como os fitossociológicos, são fundamentais para a conservação por possibilitarem o melhor manejo da cobertura vegetal por meio de novos modelos propostos (OLIVEIRA & AMARAL, 2004), conhecer o papel de cada espécie em determinada comunidade, avaliar a influência de fatores abióticos e antrópicos sobre o meio, além do conhecimento sobre a sucessão vegetal (GROMBRONE et al, 1990). Somam-se a isso os estudos sobre diversidade genética e a constituição de bancos genéticos (germoplasma), os quais representam ferramentas fundamentais para o controle e promoção da conservação da biodiversidade.

Metodologicamente, as espécies podem ser conservadas por duas vias principais: *in situ*, ou seja, dentro dos limites de suas comunidades naturais no presente e, com sorte, no futuro; e *ex situ*, ou seja, fora de seu local de ocorrência natural, como laboratórios e jardins botânicos, aos cuidados dos cientistas (FRANKEL et al, 1995). Na verdade, os programas *ex situ* complementam a conservação *in situ*, no sentido de promover a manutenção da diversidade genética das espécies a longo prazo, além de análises, testes e propagação de espécies ameaçadas, endêmicas ou raras. Vale ressaltar a importância destes programas para a conservação de espécies silvestres com populações muito reduzidas (McNELLY et al., 1990).

2.2 Genética da Conservação

A genética da conservação é parte importante da biologia da conservação. Esta área do conhecimento trata de estudos que são fundamentais para o entendimento de processos populacionais e evolutivos interligados à conservação de espécies, tendo íntima conexão com a ecologia molecular. Esta última utiliza de polimorfismos genéticos nas populações naturais como forma de compreender processos evolutivos, demográficos e ecológicos, fundamentais para a conservação (EIZIRIK, 1996). A genética da conservação é essencial para se compreender diferenças genéticas entre indivíduos e populações, as quais podem se manifestar nas sequências de DNA, em características bioquímicas, propriedades fisiológicas ou em conformações morfológicas. Conhecer a extensão e a distribuição da diversidade genética em populações de uma determinada espécie, e a forma como é estruturada, é um pré-requisito essencial na determinação de estratégias de conservação (RAO & HODGKIN, 2002).

Segundo Frankel et al. (1995), são dois os principais motivos de os genes contidos em populações naturais serem o foco da conservação, além de poderem ser considerados

‘recursos’. Primeiro, a variação genética é a fonte de sobrevivência da própria espécie e sua evolução em tempos futuros. Segundo, uma pequena fração dos genes é um recurso com potencial para melhorar a produtividade de populações de espécies. Neste segundo caso, de importância fundamental para estudos de plantas cultivadas.

De acordo com DeSalle & Amato (2004), a genética da conservação auxilia na criação de um quadro mais preciso sobre o padrão e o processo de extinção das espécies. Townsend et al. (2010) afirmam que a preservação da diversidade genética é imprescindível porque propicia um potencial evolutivo a longo prazo, sendo que formas raras de um gene ou combinações de alelos, mesmo que não ofereçam vantagens a curto prazo, podem auxiliar na adaptação dos organismos a novas condições ambientais no futuro.

A obtenção de dados acerca da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de árvores tropicais é de suma importância no desenvolvimento de estratégias de conservação cujo intuito seja preservar a diversidade genética de espécies de plantas nos diferentes biomas (HAMRICK & MURAWSKI, 1991; YOUNG *et al.*, 1996). Um conhecimento adequado sobre a diversidade genética atual das espécies, bem como sobre a biologia reprodutiva, são também de fundamental importância para um manejo sustentável dos recursos vegetais em florestas tropicais (MURAWSKI *et al.*, 1994).

Barret & Kohn (1991) afirmam que em populações pequenas e isoladas, a deriva genética tem uma grande influência na estrutura genética das populações. Em populações onde a deriva é predominante costuma haver perda de variabilidade deixando-as suscetíveis à extinção. Os autores ainda citam a ocorrência de endocruzamento como outra consequência da redução do tamanho das populações. Quanto menor o tamanho da população e quanto maior o tempo em que ela permanece neste estado, maior é a perda de variação genética (RAO & HODGKIN, 2002). Pequenas populações geralmente apresentam menor variabilidade genética tendo, assim, menor potencial evolutivo e tendências mais imediatas à depressão endogâmica (TOWNSEND *et al.*, 2010).

Embora se saiba que a fragmentação de habitats causada por ações antrópicas cause riscos às espécies de árvores tropicais, é difícil se estimar tais efeitos sobre a diversidade genética atual de suas populações, em função da escassez de informação (BAWA, 1993). Assim sendo, é imprescindível a obtenção de dados sobre o tipo e a extensão da variação genética que pode ser restaurada e como esta variação é mantida e espacialmente organizada (HAMRICK, 1993). A perda e fragmentação de habitat resultam em perda de diversidade biológica e isolamento de populações, além de mudanças nas taxas de migração e dispersão de espécies. Para Aguilar et al. (2008), a continuidade da condição de habitat fragmentado aumenta as chances de maior homoziguidade, o que pode resultar em acúmulo de alelos deletérios recessivos, perda de fecundidade, inviabilidade de sementes, menor crescimento e, conseqüentemente, extinção. À medida que as áreas naturais diminuem e ficam mais fragmentadas, é cada vez mais importante a compreensão da dinâmica ecológica, genética e evolutiva de populações pequenas, no sentido de mantê-las e preservá-las (LANGE, 1988).

A hipótese de que a maioria das espécies é levada à extinção antes que os fatores genéticos as afetem foi descartada por Spielman et al. (2004). Os autores verificaram que 77% das espécies ameaçadas estudadas possuíam menor heteroziguidade se comparadas às não-ameaçadas do estudo. Grande parte das espécies ameaçadas apresentou menor diversidade genética, de maneira geral, do que as não ameaçadas. Apesar da dificuldade em determinar se os fatores genéticos contribuem para a condição de ameaça, a reduzida diversidade genética é um forte indicador da aptidão reprodutiva da espécie estar comprometida e do risco de extinção ser elevado.

2.3 Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares são ferramentas essenciais em estudos sobre a diversidade e estrutura genética de populações e fluxo gênico, sendo, portanto, de grande importância para se estimar os efeitos de fragmentação de habitats bem como da sobre-exploração em populações naturais de espécies de plantas. A utilização de marcadores moleculares em análises genéticas de populações constituem assim, importantes subsídios para o planejamento e execução de táticas de conservação destas espécies (PARKER *et al.*, 1998; SELKOE & TOONEN, 2006).

Um marcador molecular é, potencialmente, qualquer sequência de DNA onde é possível encontrar polimorfismos e quanto maior o nível polimórfico de um marcador, mais informações ele possui, possibilitando a detecção de diferenças genéticas entre indivíduos (SOUZA, 2002).

Os marcadores de DNA microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeats) são constituídos de DNA repetitivo, no qual as sequências são dispostas lado a lado, onde 1 a 6 pares de bases são repetidas várias vezes ao acaso no genoma (LITT & LUTTY, 1989). Distribuídos ao longo de sequências codificantes e não codificantes do DNA (SCHLÖTTERER E TAUTZ, 1992), os microssatélites costumam apresentar locos altamente polimórficos com grande variabilidade genética, além de serem co-dominantes quando provenientes do genoma nuclear (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os locos microssatélites ocorrem aleatoriamente nos genomas (nuclear e citoplasmático) da maioria dos eucariotos e as alterações mutacionais que os geram, ocorrem em taxas mais elevadas do que as observadas em sequências de DNA não repetitivo (JARNE & LAGODA, 1996).

A descoberta de marcadores microssatélites no genoma do cloroplasto de plantas proporcionou novas abordagens de estudos em genética de populações e sistemática de plantas (POWELL *et al.*, 1995, PROVAN *et al.*, 1999), constituindo assim uma ferramenta alternativa importante para a estimativa de diversidade genética e descrição da estrutura genética e fluxo gênico histórico em populações de plantas (MORGANTE & OLIVIERI, 1993, PROVAN *et al.*, 1999).

Em função da herança uniparental, em geral materna na maioria das angiospermas, marcadores moleculares do genoma do cloroplasto são considerados os mais indicados em estudos que buscam detectar eventos demográficos antigos (ENNOS *et al.*, 1999), sendo importantes para se compreender padrões históricos de fluxo gênico, relações filogenéticas entre populações, reconstrução de rotas de dispersão e colonização de espécies de plantas (ENNOS *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2002; PROVAN, *et al.* 2001; CAVERS *et al.*, 2003).

Nesse sentido, marcadores microssatélites do cpDNA têm sido identificados e desenvolvidos para várias espécies de plantas (PROVAN *et al.* 1999; WEISING & GARDNER, 1999; ISHII *et al.*, 2001; SEBASTIANI *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2009), principalmente devido à sua grande aplicação em estudos populacionais (BUCCI *et al.*, 1998; PROVAN *et al.* 2001; COLLEVATTI *et al.*, 2003; EBERT & PEAKALL, 2009; LEMES *et al.*, 2010), alta conservação (PALMER, 1987) e taxas maiores de polimorfismos quando comparados a marcadores de sequências de regiões não codificadoras do cpDNA (HARRIS & INGRAM, 1991; SOLTIS *et al.*, 1992; PROVAN *et al.* 1999).

2.4 A Serra de Carajás

No centro-sul do estado do Pará, com mais de 350 km no sentido leste-oeste, localiza-se a Serra dos Carajás que passa pelos municípios de Marabá, Canaã dos Carajás, Curionópolis, Parauapebas e São Félix do Xingu. Geomorfologicamente, a Serra dos Carajás é composta de platôs e colinas alongadas, sendo que os afloramentos de ferro ocorrem nas áreas de platôs e são cobertos pela canga, composta por vegetação arbustiva e gramíneas (TEIXEIRA & BEISIEGEL, 2006).

De acordo com os autores supracitados, durante o éon Arqueano é que se constituiu, por uma série de depósitos sedimentares químicos, a formação ferrífera bandada, rocha que daria origem, mais tarde, ao minério de ferro de alto teor característico da Serra de Carajás. Foi na era Mesozóica que as superfícies de cangas começaram a se desenvolver sobre os afloramentos ferríferos, há cerca de 72 milhões de anos (Vasconcelos *et al.*, 1994 *apud* Teixeira & Beisiegel, 2006), promovendo impermeabilidade e resistência à ação da erosão e intemperismos, mantendo conservados até hoje os depósitos de ferro.

Entretanto, a Serra do Carajás só começou a ter relevância de informações pouco antes da década de 70, quando então foram descobertas grandes jazidas de minério de ferro, as quais a colocaram na posição de principal província mineral do mundo (SILVA *et al.*, 1996). A partir do desenvolvimento de estudos e do interesse de diversos órgãos e instituições na questão mineral da área, a consequente degradação do espaço biótico e abiótico pela exploração, a criação de programas sócio-ambientais, bem como o crescimento populacional na região, é que foi criada a Floresta Nacional (FLONA) de Carajás. Situada no estado do Pará, municípios de Canaã dos Carajás e Parauapebas, esta FLONA tem estreita relação com as atividades da Companhia Vale do Rio Doce na região, sendo, portanto, a descoberta da província mineral de Carajás o ponto histórico inicial da mesma (IBAMA-CRVD, 2003). Tal realidade é quase óbvia já que, de acordo com Lindenmayer (2001), encontram-se na Serra dos Carajás as maiores jazidas de ferro de alto teor do planeta, o que certamente desperta interesse de grandes companhias pelo potencial econômico da região. A FLONA de Carajás é uma área pertinente a estudos diversos devido, entre outros motivos, ao ambiente modificado em função da mineração (SALOMÃO *et al.*, 1988).

Por estar condicionada à categoria de Floresta Nacional, a área pode ser submetida ao “uso múltiplo sustentável dos recursos e também para pesquisa científica, voltada para a descoberta de métodos de exploração sustentável” (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2012).

Na classificação de Köopen, o clima da região da Floresta Nacional de Carajás é do tipo "AWi" - tropical chuvoso com seca de inverno, caracterizado por um período forte de estiagem no inverno do Hemisfério Sul, altos valores totais de precipitação anual (variando entre 1.900 e 2.400 mm) e temperatura mensal sempre maior que 18°C, com médias entre 23 e 26°C (IBAMA-CRVD, 2003).

De acordo com Silva *et al.* (1996), grande parte dos solos na região de Carajás é do tipo Podzólico Vermelho-Amarelo, em cimeiras florestais, Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, em morrotes, cristas dessecadas nas margens da serra, Litólicos distróficos e em níveis baixos das colinas, Podzólicos Amarelos e Vermelho-Amarelos.

Nas localizações onde se encontra o minério de ferro há uma camada de canga, recoberta por vegetação baixa, composta por gramíneas e outras herbáceas, que claramente tem características que diferem das florestas próximas. Na vegetação ocorre um tipo de mineralização e esta é selecionada por suportar altas concentrações de metais pesados e baixa fertilidade do solo, já que ocupa uma área de contato direto com as jazidas (SILVA *et al.*, 1996).

2.5 A vegetação de canga em Carajás

De acordo com Kubitski (1979), a flora dos campos amazônicos é composta por algumas espécies lenhosas, comumente encontradas na vegetação do cerrado brasileiro, além de espécies de maior distribuição através das savanas da América tropical. Muitas vezes os campos amazônicos são incluídos em mapeamentos da vegetação do cerrado, podendo ser estas ‘ilhas de savanas’ em meio a vegetação amazônica, vestígios de tempos mais antigos, quando o cerrado era espalhado sobre grande parte da América tropical.

Estudos sugerem que as savanas eram predominantes na Bacia Amazônica durante o Mioceno, sendo que as florestas pluviais passaram a se estabelecer na transição deste período para o Plioceno (MÖRNER et al., 2001). Além disso, estudos realizados na própria Serra de Carajás sugerem fases de savanização durante períodos de seca no Quaternário Tardio (ABSY et al, 1991; HOOGHIEMSTRA & VAN DER HAMMEN, 1998)

Além da região central, Pennington et al. (2006) destaca a ocorrência de vegetação com características de cerrado na região amazônica, especificamente ao norte do Rio Amazonas (nos estados do Amapá e Roraima), ao sul (nas proximidades dos cerrados da região central) e ao longo do Rio em Alter do Chão, no Pará. Assim sendo, vale frisar que, mesmo que a área central seja rica em espécies, a região periférica pode ser igualmente diversificada ou até mesmo superior neste aspecto (RATTER et al., 2003). Este bioma engloba diversos tipos de vegetação, sendo o cerrado *sensu lato* do tipo esclerófilo dominante (PENNINGTON et al., 2006). Mendonça et al. (1998) destaca 22 termos que se referem aos tipos fitofisionômicos do bioma, incluindo variadas formas de matas e campos.

Entre as savanas do mundo, o cerrado é a que possui a mais rica diversidade vegetal, havendo endemismo em 44% da flora (KLINK & MACHADO, 2005). Mendonça et al. (1998) aponta mais de 6.400 espécies componentes da flora vascular nativa deste bioma. É considerado um dos 25 *hotspots* mundiais em biodiversidade, em decorrência desta elevada riqueza e dos impactos atuais sobre os 20% remanescentes da área original (MYERS et al., 2000).

No caso específico da vegetação de Carajás, Secco & Mesquita (1983) a separam em áreas florestais de diferentes níveis de densidade, ocorrendo florestas mais abertas com alta incidência de luz e também florestas fechadas, com biomassa densa e alto sombreamento; áreas não florestais com características de savana identificadas como vegetação de canga densa e aberta; e os campos naturais.

Já Silva et al. (1996) destaca dois grupos mais abrangentes para a vegetação na Serra dos Carajás: a Floresta Equatorial Ombrófila e o campo rupestre (também chamado savana metalófila, vegetação rupestre e vegetação de canga), este último encontrado em quantidades bem menores se comparado às áreas florestais, e geralmente situado em cimeiras de relevos residuais rochosos ou sub-rochosos, em canga hematítica. “Campo Rupestre” é uma das 22 designações fitofisionômicas diferentes citadas por Mendonça et al. (1998), no que diz respeito ao cerrado.

Nunes (2009) define os campos rupestres de Carajás como “formações herbáceo-arbustivas associadas a afloramentos rochosos ou solos rasos, formados pela decomposição de rochas resistentes”. A mesma autora separa os campos rupestres de Carajás em campo rupestre aberto e campo rupestre arbustivo. O primeiro tem ocorrência em áreas de afloramento rochoso de minério de ferro, com horizonte A rico em matéria orgânica. Indivíduos subarbustivos dividem espaço com herbáceas como *Ipomoea carajaensis*, *Norantea goyasensis*, *Ipomoea marabaensis*, *Sobralia liliastrum*, criando um aspecto campestre na área. O segundo ocorre em solos mais profundos que nos campos abertos e com uma vegetação mais homogênea em sua composição florística, que compreende elementos

como *Callistene minor*, *Byrsonima coriacea*, *Bauhinia pulchella*, *Eugenia puniceifolia*, *Alibertia cf. longiflora* e *Mimosa acutistipula*. A Figura 1 apresenta imagens de ambos os tipos fisionômicos aqui descritos.

Em Carajás, a área florestal toma um espaço maior a 95% do total, sendo que cerca de 2 a 3% são formados por clareiras naturais de vegetação rupestre (IBAMA-CRVD, 2003). Para Nunes (2009), a vegetação de campo rupestre estende-se por mais ou menos 9.031,54 ha, 2,28% da área total da FLONA Carajás, que é de 395.826,70 ha.

Porto & Silva (1989) se atentam às fisionomias contrastantes na vegetação ocorrente na Serra dos Carajás e na Cadeia do Espinhaço (em Minas Gerais) acrescentadas da conhecida ocorrência de metais nos solos desta região, para supor que a vegetação é adaptada a tais condições. Além disso, destacam que nestes ambientes são encontradas com frequência novas espécies e endemismos. Para Silva (1992), os mais críticos fatores seletivos na área devem ser as concentrações altas de metais pesados, a pobreza de nutrientes e a pouca retenção de água, já que as plantas no local crescem diretamente sobre as jazidas de ferro. Tais fatores causam pressão ambiental, resultando numa forte seleção natural. Os indivíduos das espécies de plantas ali presentes, apesar das limitações que sofrem, acabam enfrentando uma menor competição.

Ainda assim, é necessário destacar as condições que favorecem o clímax da Floresta Ombrófila. A alta umidade do ar, o diminuto período de estresse hídrico e a baixa amplitude térmica, aliadas ao rompimento das condições edáficas que sustentam a savana metalófila, como as cavidades presentes nas cangas e no contato destas com a rocha, devido a processos erosivos antigos que evoluíram com novas incasões, acabam promovendo o gradativo avanço da floresta sobre os domínios da vegetação de canga (MARTINS, 2012).

A região ganha ainda mais importância se considerado o fato dos afloramentos de rochas nos topos de morro serem grandes centros de diversidade e endemismo (POREMBSKI et al., 1994). De acordo com Nunes (2009), as vegetações abertas na região da FLONA de Carajás ocorrem em ambientes distintos, podendo ser considerados raros. Estudos em ambientes como este são urgentes, dados a relevância do ecossistema de canga ferrífera e as atividades de exploração do minério de ferro que vem ocorrendo de maneira bastante rápida.

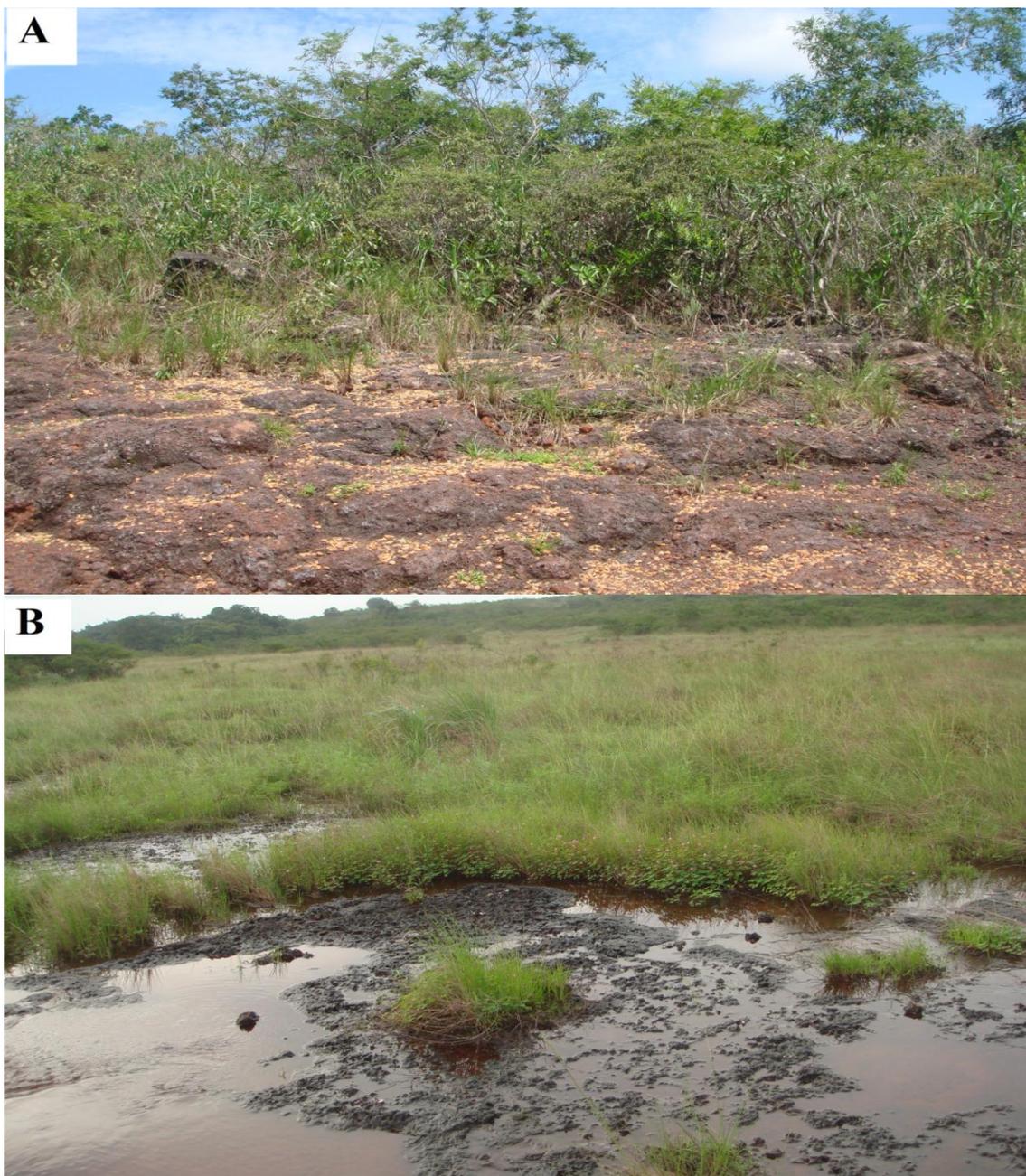


Figura 1. Tipos fisionômicos recorrentes nas cangas da Floresta Nacional de Carajás: (A) Campos Rupestres Arbustivos; (B) Campos Rupestres Abertos. Fotos: H. C. Lima.

2.6 *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*

Mimosa acutistipula (Martius) Benth., pertence à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae, e foi escolhida como espécie de interesse no presente estudo pela abundância e ocorrência natural de suas populações na Floresta Nacional de Carajás, PA. Barneby (1991) verificou que só no gênero *Mimosa*, ocorrem aproximadamente 600 espécies distintas, em maior número nas Américas do Sul e Central, com extensões para a África e a Ásia. Para o mesmo autor, o centro de dispersão está localizado no Centro-Oeste e Nordeste brasileiros, seguido de algumas regiões da América Central, já que essas espécies têm preferência por

áreas mais ou menos secas, abertas e em geral não florestais, onde assumem os hábitos subarbustivo, arbustivo e arbóreo baixo. Entretanto, as espécies do gênero crescem em um conjunto bastante diversificado de habitats, incluindo florestas tropicais úmidas, savanas, florestas secas, desertos, pastagens e banhados (SIMON et al., 2011). Só no Cerrado ocorrem aproximadamente 200 espécies de *Mimosa*, sendo que a maioria delas é endêmica do bioma ou de locais específicos dentro dele (SIMON & PROENÇA, 2000).

Mimosa acutistipula é caracterizada pelo porte de arbusto alto e arvoreta, alcançando até 5 metros de altura. O caule é contorcido, enrugado, espinhoso, com casca escura e fendas longitudinais. As folhas são bipinadas e as flores dispostas em longas inflorescências em espigas, com cálice campanulado esverdeado e estames exsertos alvos, ligeiramente rosados na base (Figura 2). O fruto é uma vagem indeiscente e articulada, com artículos de 7-9 mm de comprimento (BARNEBY, 1991). A polinização é realizada por *Apis mellifera* (ALMEIDA et al, 2003) enquanto que a dispersão de sementes é do tipo autocórica (FERREIRA, 2011).

Estudos recentes sobre o número de cromossomos em espécies do gênero têm sido realizados (DAHMER et al, 2011; MORALES et al, 2014), sendo que *Mimosa acutistipula* é considerada uma espécie tetraploide ($2n=52$) (DAHMER et al, 2011).

Mimosa acutistipula var. *ferrea* Barneby é uma variedade de ocorrência comum em vegetação campestre xeromórfica, principalmente em áreas ricas em ferro como a Serra de Carajás, no Pará. Barneby (1991) citou também as ocorrências em Mato Grosso e Maranhão, mas estas áreas carecem de estudos para futura confirmação da amplitude de distribuição desta variedade. Esta é, portanto, uma espécie representativa da vegetação rupestre que ocorre nas chamadas savanas metalófilas que cobrem as cangas ferríferas na região de Carajás, uma designação fitofisionômica relacionada ao bioma Cerrado. Sendo amplamente distribuída nas cangas ferríferas de Carajás, o estudo genético desta espécie em particular trará importantes informações acerca da sua conservação, bem como poderá ser base para outros estudos deste tipo com outras espécies presentes neste habitat tão rico e peculiar. A Figura 3 apresenta a distribuição da espécie em território brasileiro.

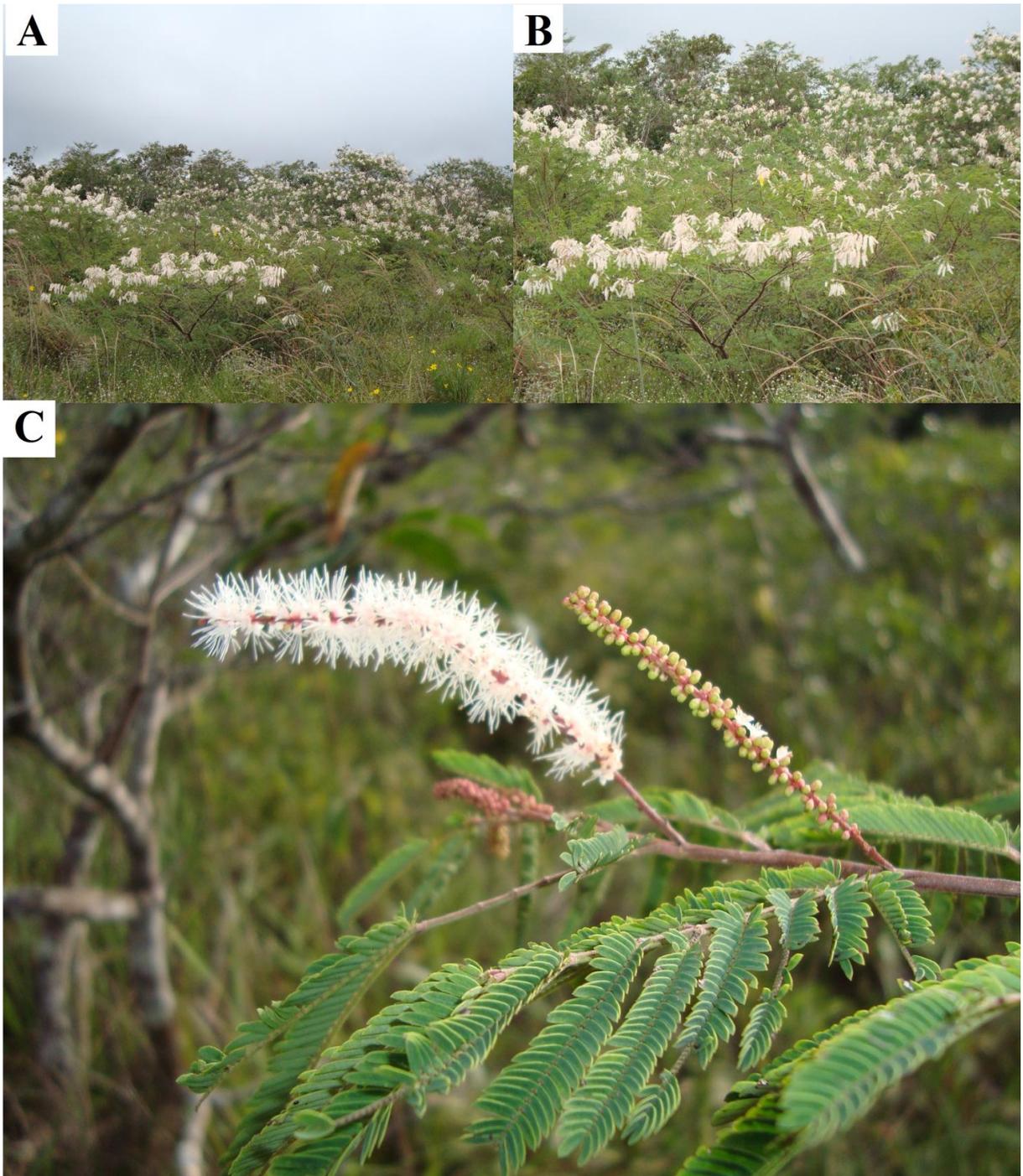


Figura 2. Indivíduos adultos de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* em floração na Floresta Nacional de Carajás, PA (A e B); Detalhe da inflorescência e folíolos de *M. acutistipula* var. *ferrea* (C).

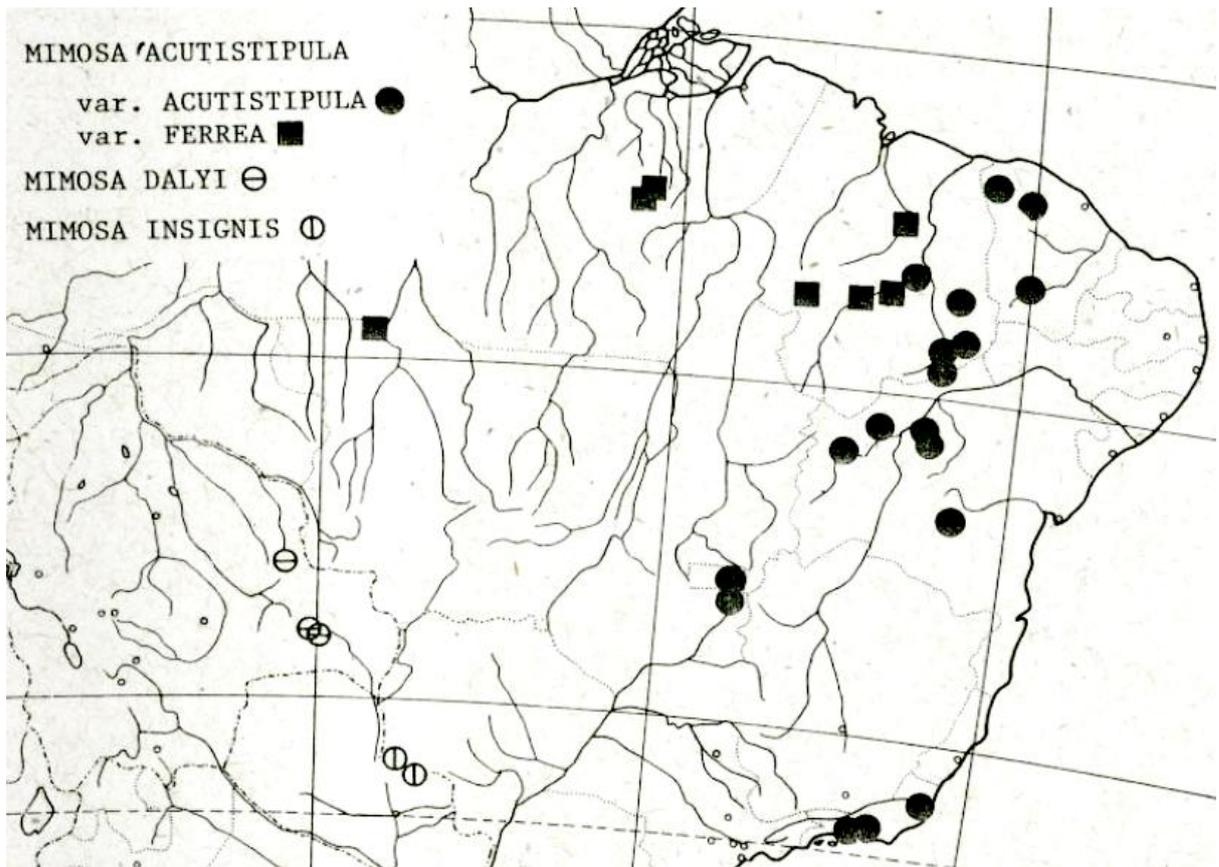


Figura 3. Distribuição de *Mimosa acutistipula* em território brasileiro (BARNEBY, 1991).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo, amostragem populacional e coleta do material vegetal

A área de estudo situa-se na Serra de Carajás, no estado do Pará. Para a realização das análises genéticas foram amostradas nove populações de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*, situadas em três áreas de vegetação de Canga na Floresta Nacional de Carajás, PA (Figura 4). Foram amostradas três populações em cada uma das três áreas de canga. Amostras de folhas foram coletadas de 15 a 20 indivíduos/população, somando 175 indivíduos amostrados.

O material vegetal coletado (folhas) foi acondicionado em sacos plásticos (tipo Ziploc) contendo sílica gel visando sua desidratação e preservação da molécula do DNA. Posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até a extração do DNA genômico total. Também foram coletadas amostras testemunhas de indivíduos férteis para a confecção de exsicatas as quais foram depositados no Herbário do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Duplicatas de material de herbário serão depositadas nos herbários do INPA e da Companhia Vale do Rio Doce na Serra de Carajás, PA. A localização precisa das nove populações de *M. acutistipula* amostradas foi determinada por meio de georreferenciamento utilizando aparelho GPS (Tabela 1).

Tabela 1. Coordenadas geográficas e amostragem das nove populações de *M. acutistipula* var. *ferrea* investigadas.

População	Posição	Nº de indivíduos
Serra Norte 1 (SN1)	6°02'11" S, 50°17'01" W	20
Serra Norte 2 (SN2)	6°02'41" S, 50°12'42" W	20
Serra Norte 3 (SN3)	6°06'11" S, 50°11'21" W	15
Serra Sul 1 (SS1)	6°24'13" S, 50°20'51" W	20
Serra Sul 2 (SS2)	6°22'43" S, 50°23'08" W	20
Serra Sul 3 (SS3)	6°23'39" S, 50°22'15" W	20
Serra da Bocaina 1 (SB1)	6°18'40" S, 49°52'10.83" W	20
Serra da Bocaina 2 (SB2)	6°18'37" S, 49°52'20.52" W	20
Serra da Bocaina 3 (SB3)	6°18'52" S, 49°53'24" W	20

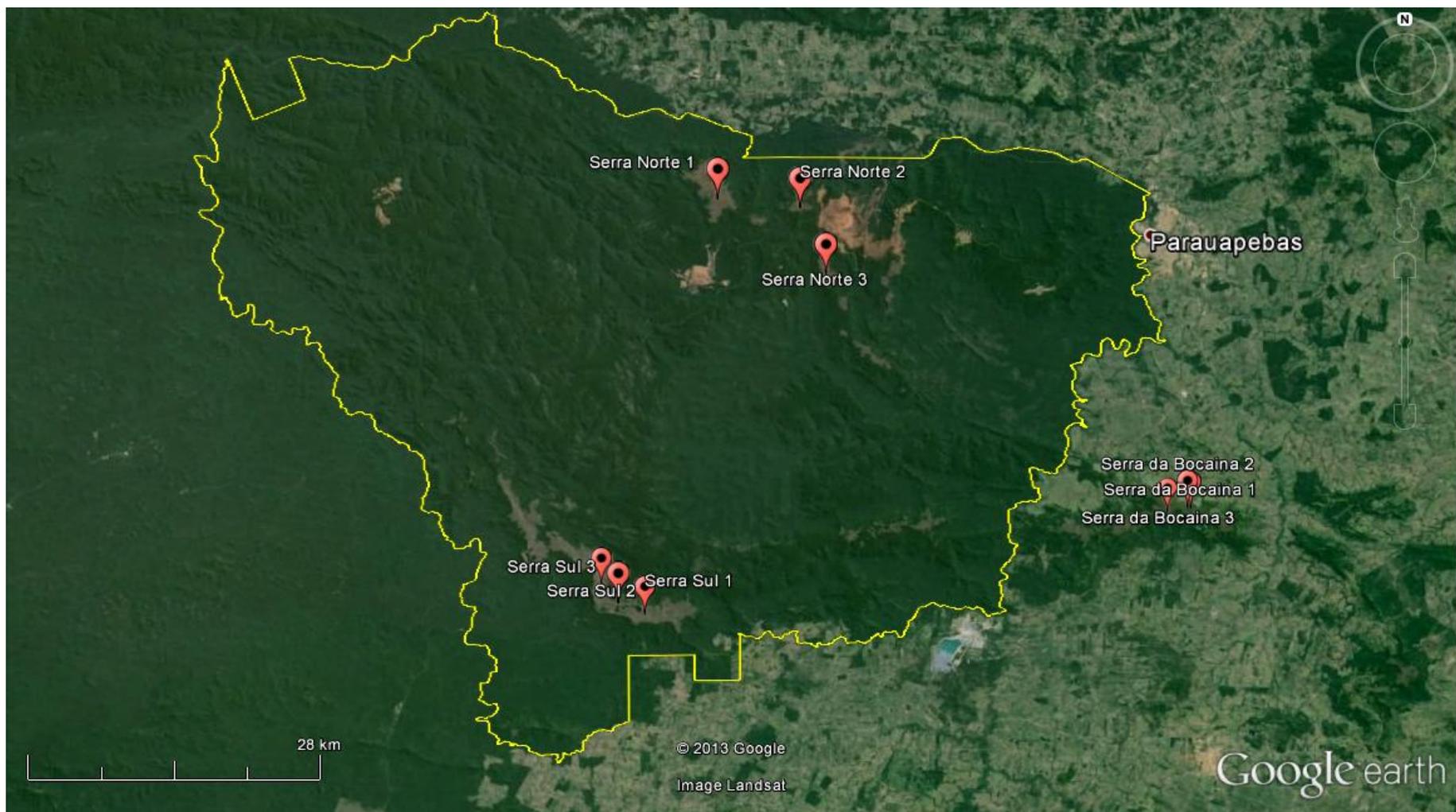


Figura 4. Localização das áreas de estudo das nove populações amostradas de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* na Serra de Carajás, PA. Em amarelo observa-se a delimitação da FLONA de Carajás, PA.

3.2 Extração, Quantificação e Diluição do DNA

A extração do DNA genômico total das amostras de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* foi realizada utilizando-se o protocolo de extração de tecidos vegetais CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio; DOYLE & DOYLE, 1987) modificado por Ferreira & Grattapaglia (1998) (protocolo detalhado no Anexo A). Visando a facilitação da liberação do DNA, por meio de lise mecânica da parede e membrana das células vegetais, as amostras foram inicialmente maceradas utilizando-se um disruptor celular Mixer Mill (Retsch).

A quantificação do DNA total extraído foi realizada por comparação com padrões de massa molecular conhecida, utilizando-se o DNA do bacteriófago *Lambda* após eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Biotium, Inc). Para isso, as bandas de DNA no gel foram comparadas visualmente com os padrões de massa molecular (50, 100 e 200 ng de DNA do fago Lambda). Para estimar a quantidade de DNA obtido foram utilizados 2 µL de DNA estoque de cada amostra. Os géis foram analisados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

Após a quantificação, as amostras de DNA extraído foram diluídas em água ultra-pura e padronizadas a uma concentração de 2,5 ng/µl para utilização na etapa de amplificação do DNA.

3.3 Amplificação e Análise dos Locos Microssatélites do Genoma do Cloroplasto (cpDNA)

Para a análise da variabilidade genética nas populações de *M. acutistipula* foram inicialmente testados 20 pares de iniciadores (*primers*) universais, 10 deles originalmente desenvolvidos para *Nicotiana tabacum* (WEISING & GARDNER, 1999), os quais amplificam locos microssatélites do genoma do cloroplasto (cpSSR) da maioria das angiospermas, e outros 10 pares de *primers* desenvolvidos para *Epidendrum* (Orchidaceae) (PINHEIRO et al., 2009).

A amplificação dos locos cpSSR foi realizada via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando-se um termociclador Veriti (Life Technologies, Inc) com gradiente de temperatura, nas seguintes condições iniciais: 1) Desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguida de 30 ciclos de: 2) Desnaturação a 94 °C durante 1 minuto; 3) Anelamento na temperatura específica de cada par de *primer* durante 1 minuto; 4) Extensão a 72 °C durante 1 minuto e 5) extensão final a 72 °C durante 60 minutos. As reações para a amplificação dos locos cpSSR continham os seguintes reagentes: tampão de PCR 1X (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 200 µM de cada DNTP, 3,25 µg de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 1 unidade de Taq polimerase (Biolase), 0,4 µM de cada *primer*, 5,0 ng de DNA e água ultrapurificada para um total de 10 µL de reação final. Os produtos da PCR foram posteriormente checados em gel de agarose 2% corado com GelRed (Biotium Inc.) e fotodocumentados sob luz ultravioleta utilizando-se um transiluminador em sistema de fotodocumentação (Major Science). Para a estimativa dos tamanhos dos produtos amplificados em gel de agarose foi utilizado o marcador padrão *Ladder* 1 Kb *plus*.

Na etapa de transferibilidade dos marcadores microssatélites do cpDNA desenvolvidos para *Nicotiana tabacum* e espécies de *Epidendrum* foram realizados testes visando à otimização das condições de amplificação destes locos para *M. acutistipula*. Neste processo foram testadas diferentes temperaturas de anelamento para cada par de *primers* (47 a

63°C), bem como diferentes concentrações dos reagentes na PCR. A Tabela 2 apresenta os locos microssatélites amplificados e suas características.

Tabela 2. Características dos locos microssatélites do genoma do cloroplasto (cpSSR) cujas condições de amplificação foram otimizadas para *Mimosa acutistipula*. (T_A) = Temperatura de anelamento, N_A = número de alelos. * (Weisigner & Gardner, 1999).

Locus cpSSR	Sequência dos primers* 5' – 3'	T_A (°C)	N_A	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>ccmp01</i>	F: CAGGTAAACTTCTCAACGGA R: CCGAAGTCAAAAGAGCGATT	57	1	125
<i>ccmp02</i>	F: GATCCCGGACGTAATCCTG R: ATCGTACCGAGGGTTCGAAT	57	1	210
<i>ccmp03</i>	F: CAGACCAAAAAGCTGACATAG R: GTTTCATTCCGGCTCCTTTAT	52	1	85
<i>ccmp04</i>	F: AATGCTGAATCGAYGACCTA R: CCAAATATTBGGAGGACTCT	57	2	109 – 110
<i>ccmp06</i>	F: CGATGCATATGTAGAAAGCC R: CATTACGTGCGACTATCTCC	58	5	94 – 98
<i>ccmp07</i>	F: CAACATATACCACTGTCAAG R: ACATCATTATTGTACTCTTTC	58	2	148 – 149
<i>ccmp10</i>	F: TTTTTTTTTTAGTGAACGTGTA R: ATTCGTCGDCGTAGTAAATAG	46	1	109

Após a amplificação, os produtos da PCR foram então diluídos e analisados posteriormente sob eletroforese capilar em um sequenciador automático de DNA ABI 3500 XL (Life Technologies, Inc.). Para a estimativa dos tamanhos dos alelos no sequenciador foi utilizado o marcador interno GeneScan 600LIZ (Life Technologies, Inc.) e para tal um dos *primers* de cada par utilizado foi marcado com um fluoróforo específico (6-FAM, VIC, NED e PET) para a detecção a laser dos produtos amplificados. Posteriormente os produtos amplificados foram analisados no programa *GeneMapper* versão 4.1 (Life Technologies, Inc.), por meio do qual o tamanho dos alelos foram estimados e feita a detecção de polimorfismos.

3.4 Análise dos dados

A diversidade genética foi estimada por meio dos seguintes parâmetros: número de alelos (A), número de haplótipos (H) e índice de diversidade genética de Nei (H_E) (NEI, 1987), por população, os quais foram inferidos por meio do programa *Arlequin 3.5* (EXCOFFIER et al, 1992).

Para a determinação dos padrões de distribuição da variabilidade genética e diferenciação genética entre as populações foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA), também utilizando-se o programa *Arlequin 3.5* (EXCOFFIER et al, 1992). Os dados dos haplótipos foram codificados como dados genotípicos genealogicamente não-ordenados, a fim de se calcular os parâmetros das estatísticas F-Wright e R_{ST} também

utilizando-se o *Arlequin 3.5* (EXCOFFIER et al, 1992). A significância dos índices de diferenciação (F_{ST} e R_{ST}) foi testada por meio de 1000 permutações utilizando-se teste não paramétrico, segundo Excoffier *et al.* (1992).

Foram também estimadas as relações genéticas entre os haplótipos observados nas populações de *Mimosa acutistipula*. Para tal foi realizada uma análise de rede (“*Network*”) utilizando um critério de máxima parcimônia pelo método “*Median-Joining*” (BANDELT *et al.*, 1999) implementada no programa *NETWORK* versão 4.6.1.2 (*Fluxus Technology Ltd.* At www.Fluxus-engineering.com; FORSTER *et al.*, 2000).

Foi realizada uma análise de agrupamento (UPGMA), a qual infere sobre o relacionamento entre pares de populações (SWOFFORD & OLSEN, 1990) com base em uma matriz de distâncias genéticas de Nei (1987), utilizando-se o programa *Tools for Population Genetic Analyses – TFPGA* (MILLER, 1997). A significância estatística dos nós no dendrograma foi estimada por meio de análise *bootstrapping* a partir de 1000 permutações, também implementada no programa TFPGA.

A hipótese de isolamento por distância foi avaliada por meio do teste de Mantel (Mantel, 1967) o qual relaciona distância genética (no caso, a distância genética de Nei) e a distância geográfica (em Km) entre os pares de populações de *M. acutistipula*, a partir dos locos polimórficos. O teste de Mantel foi executado a partir do programa *Tools for Population Genetic Analyses – TFPGA* (MILLER, 1997).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração e Quantificação de DNA

As extrações de DNA das amostras de *M. acutistipula* apresentaram DNA de boa qualidade e quantidade. A Figura 5 mostra gel de quantificação de DNA genômico total extraído de amostras de diferentes indivíduos de *M. acutistipula*. Pela análise do gel foi possível determinar a concentração de DNA nas amostras, as quais apresentaram em média 100 ng/ μ L, variando de 50 a 350 ng de DNA/ μ L.

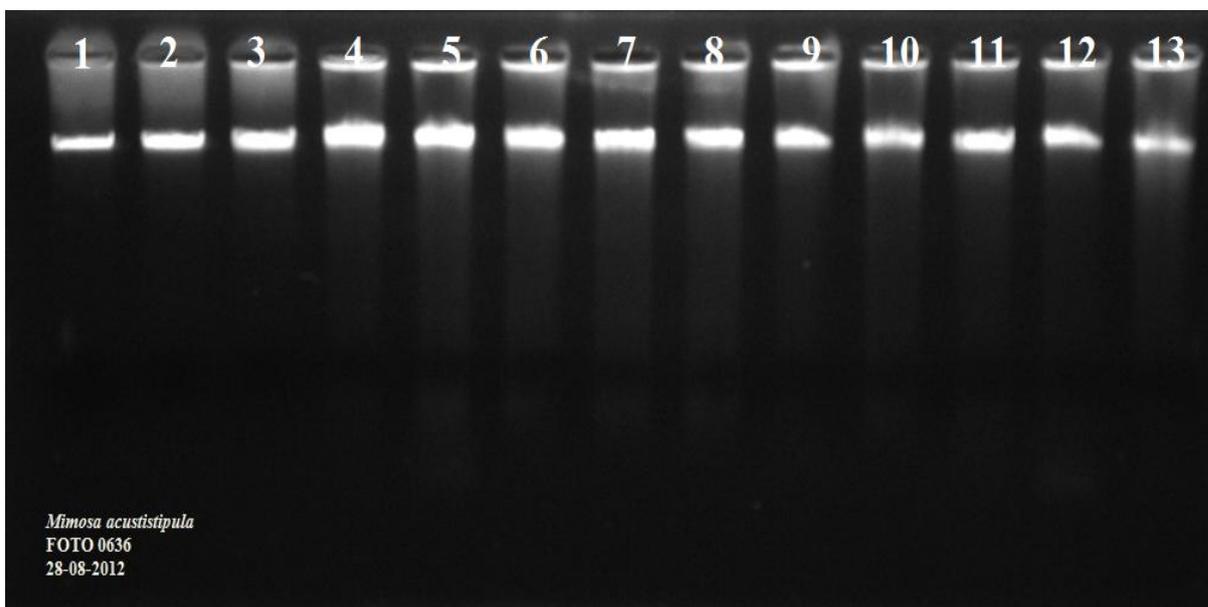


Figura 5. Quantificação do DNA genômico total extraído de amostras de *M. acutistipula* em comparação aos padrões de DNA do phago *Lambda*. Os números de 1 a 3 correspondem, respectivamente, às massas moleculares de DNA do phago *Lambda* de 50, 100 e 200 ng. As bandas no gel de 4 a 14 correspondem ao DNA extraído de 10 indivíduos de *M. acutistipula* de populações provenientes das Serras Sul (4 a 10) e Norte (11 a 13) situadas na FLONA de Carajás, PA.

4.2 Amplificação dos Locos Microssatélites do Genoma do Cloroplasto (cpSSR)

Dos vinte marcadores cpSSR testados, sete previamente desenvolvidos para *Nicotiniana tabacum* tiveram as condições ótimas de amplificação determinadas (Tabela 2), confirmando a transferabilidade destes marcadores para *Mimosa acutistipula*. Destes, três (*ccmp04*, *ccmp06* e *ccmp07*) apresentaram polimorfismos e foram utilizados nas análises genéticas populacionais. Na Figura 6 são apresentados os produtos obtidos a partir da amplificação dos sete locos cpSSR para amostras de DNA de *Mimosa acutistipula*, em géis de agarose 2%, documentados sob luz ultravioleta. Os tamanhos dos alelos estimados por comparação com padrão *Ladder* 100pb, variaram de 80 a 200 pb (Figura 6), os quais foram

posteriormente confirmados em sequenciador automático de DNA. Nas figuras 7 e 8 observam-se os alelos detectados respectivamente para os locos cpSSR polimórficos (que apresentaram variação de tamanhos de alelos) e monomórficos (locos que apresentaram um único alelo).

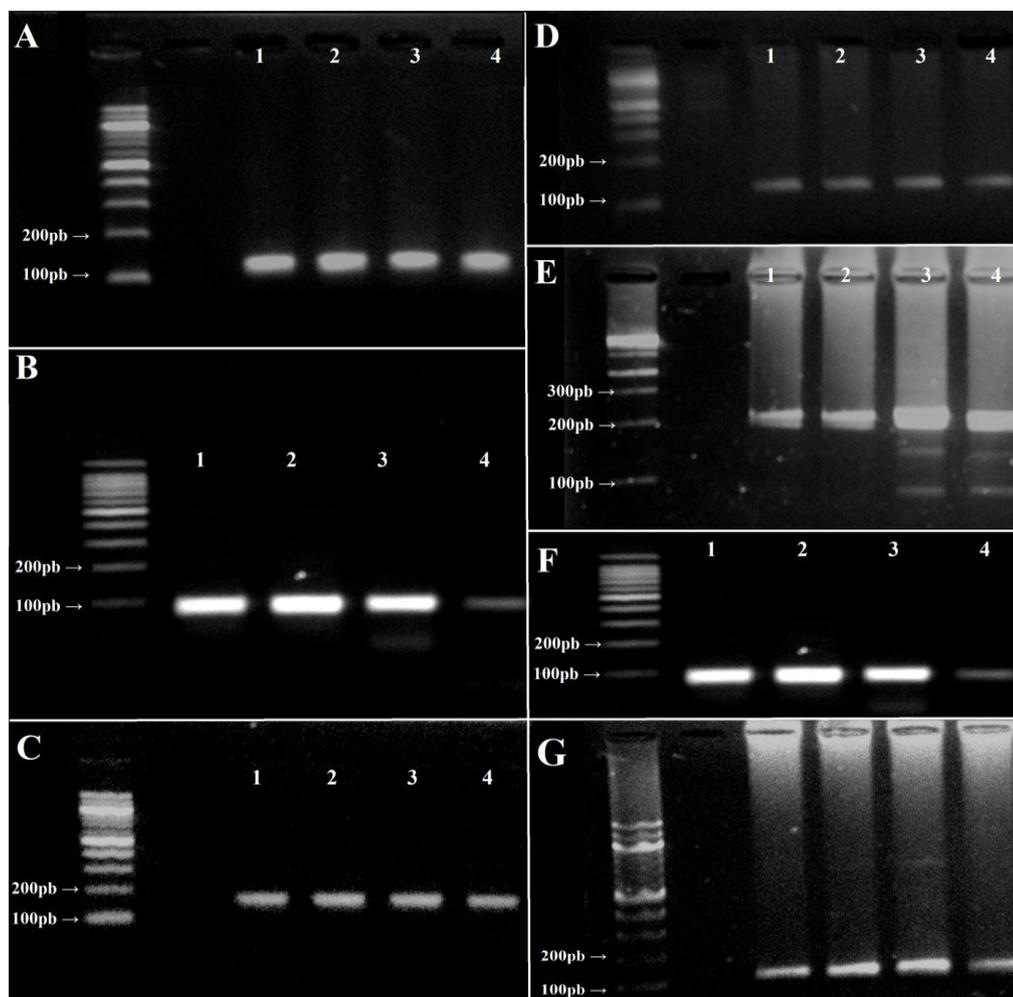


Figura 6. Produtos amplificados para sete locos microssatélites do genoma do cloroplasto de *Mimosa acutistipula*, analisados em gel de agarose. O primeiro poço do gel mostra o marcador *Ladder* 1Kb e os seguintes (nos. 1 a 4), mostram os produtos da amplificação dos locos para quatro indivíduos da espécie. As imagens mostram os *primers* polimórficos (A) *ccmp4*, (B) *ccmp6* e (C) *ccmp7* e os monomórficos (D) *ccmp1*, (E) *ccmp2*, (F) *ccmp3* e (G) *ccmp10*.

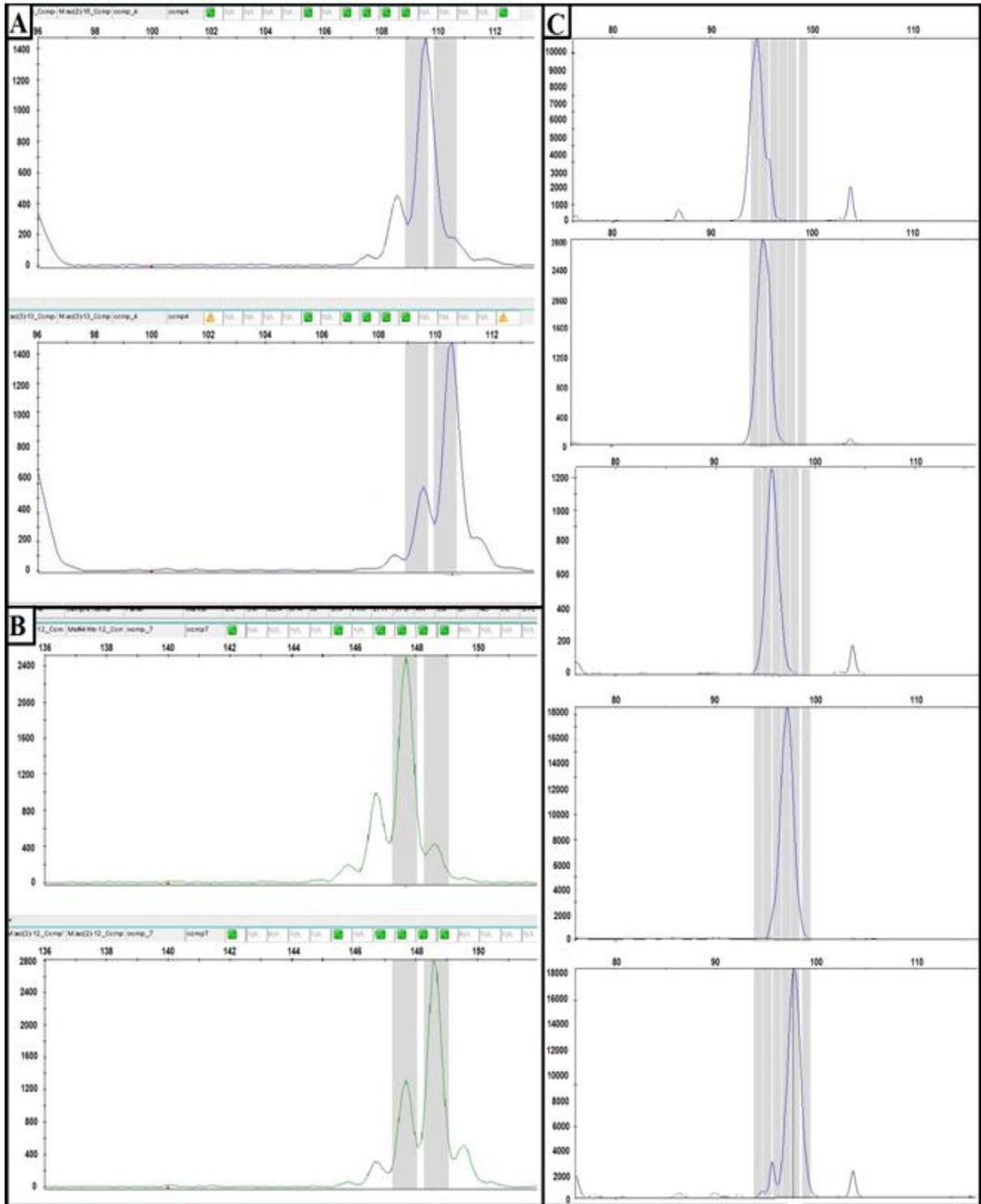


Figura 7. Eletroferogramas mostrando os diferentes alelos observados para três locos cpSSR polimórficos em diferentes indivíduos de *M. acutistipula* da Serra de Carajás, PA, após análise em sequenciador automático de DNA ABI 3500 XL. Cada pico na figura indica um alelo. Os tamanhos dos alelos estão indicados na barra superior, em pares de bases (pb). A) Alelos observados para o loco *ccmp4*, B) *ccmp7* e C) *ccmp6*.

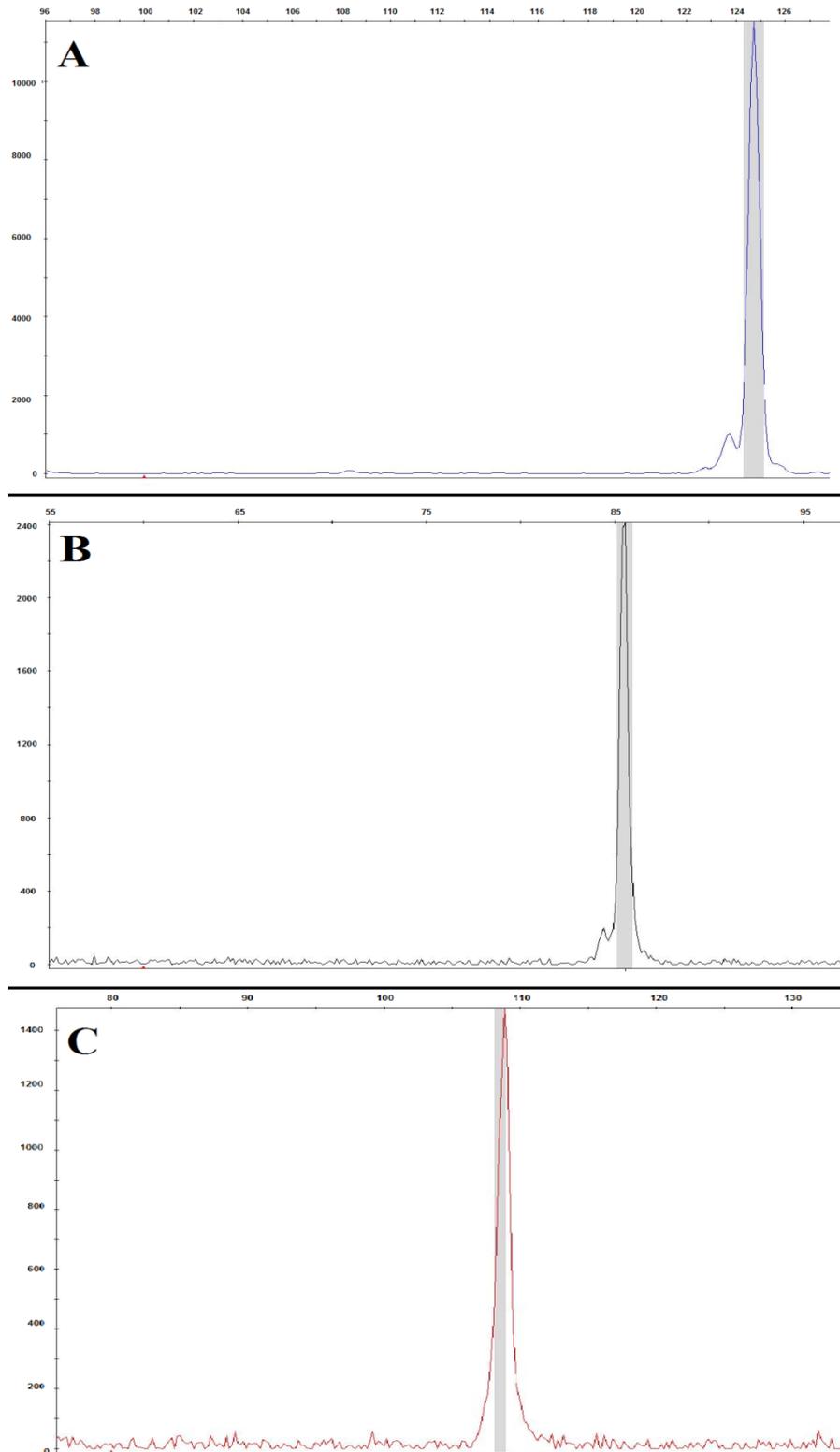


Figura 8. Eletroferogramas mostrando os diferentes alelos observados para três locos cpSSR monomórficos em diferentes indivíduos de *M. acutistipula* da Serra de Carajás, PA, após análise em sequenciador automático de DNA ABI 3500 XL. Cada pico na figura indica um alelo. Os tamanhos dos alelos estão indicados na barra superior, em pares de bases (pb). A) Alelos observados para o loco *ccm1*, B) *ccmp3* e C) *ccmp10*.

4.3 Diversidade, Estrutura Genética de Populações e Relações entre Haplótipos

No total foram identificados nove alelos para os três locos cpSSR (*ccmp 4*, *ccmp 6* e *ccmp 7*) que apresentaram variação, sendo que o número de alelos observados por loco variou de 2 a 5.

A análise combinada dos alelos possibilitou identificar 13 haplótipos diferentes para o total de 119 indivíduos das nove populações amostradas de *M. acutistipula* na Serra de Carajás, PA (Tabela 3). Dos 13 haplótipos observados, um mostrou-se mais frequente (8) em relação aos demais (31%), com ocorrência em todas as populações e dois foram representados por apenas um indivíduo (9 e 12). A frequência dos demais haplótipos variou de 16% a 0.8%. Dentre os 13 haplótipos detectados, três (1, 9 e 12) foram exclusivos de uma única população, respectivamente, SN3, SB2 e SB3 (Tabela 3 e Figura 9).

O índice médio de diversidade genética (H_E) observado para o conjunto das populações foi 0.3297, variando de 0.2184 a 0.4848 (Tabela 4). A população que apresentou a maior diversidade genética foi a população da SB2, considerando todos os parâmetros estimados (número de alelos, haplótipos e índice de diversidade de Nei), seguida pela população SB1. Considerando-se apenas os índices de diversidade genética de Nei, as populações que apresentaram a maior diversidade foram as três populações situadas na Serra da Bocaina (SB1, 2 e 3).

Tabela 3. Haplótipos encontrados em nove populações de *M. acutistipula* na Serra de Carajás, PA, com base na análise combinada de três locos microssatélites do genoma do cloroplasto. N = n° de indivíduos, SN1 – Serra Norte 1, SN2 – Serra Norte 2, SN3 – Serra Norte 3, SS1 – Serra Sul 1, SS2 – Serra Sul 2, SS3 – Serra Sul 3, SB1 – Serra da Bocaina 1, SB2 – Serra da Bocaina 2, SB3 – Serra da Bocaina 3. Os números abaixo das colunas de cada loco cpSSR representam o tamanho dos alelos em pares de bases (pb).

Haplótipos	Loco cpSSR			N	Freq. (%)	População
	<i>ccmp 04</i>	<i>ccmp 06</i>	<i>ccmp 07</i>			
1	109	95	148	4	3.4	SN3
2	109	97	148	4	3.4	SN1, SN2, SB1
3	109	98	148	7	5.9	SN2, SN3
4	109	94	149	2	1.7	SN1, SS1
5	109	95	149	12	10.0	SN1, SN2, SS1, SS2, SS3, SB1
6	109	96	149	14	11.8	SN1, SN2, SS2, SS3, SB2, SB3
7	109	97	149	19	16.0	SN1, SN2, SS1, SS2, SS3, SB1, SB2
8	109	98	149	37	31.1	SN1, SN2, SN3, SS1, SS2, SS3, SB1, SB2, SB3
9	110	94	149	1	0.8	SB2
10	110	95	149	4	3.4	SB1, SB2, SB3
11	110	96	149	11	9.2	SB1, SB2, SB3
12	110	97	149	1	0.8	SB3
13	110	98	149	3	2.5	SB2, SB3
Total	2	5	2	119		

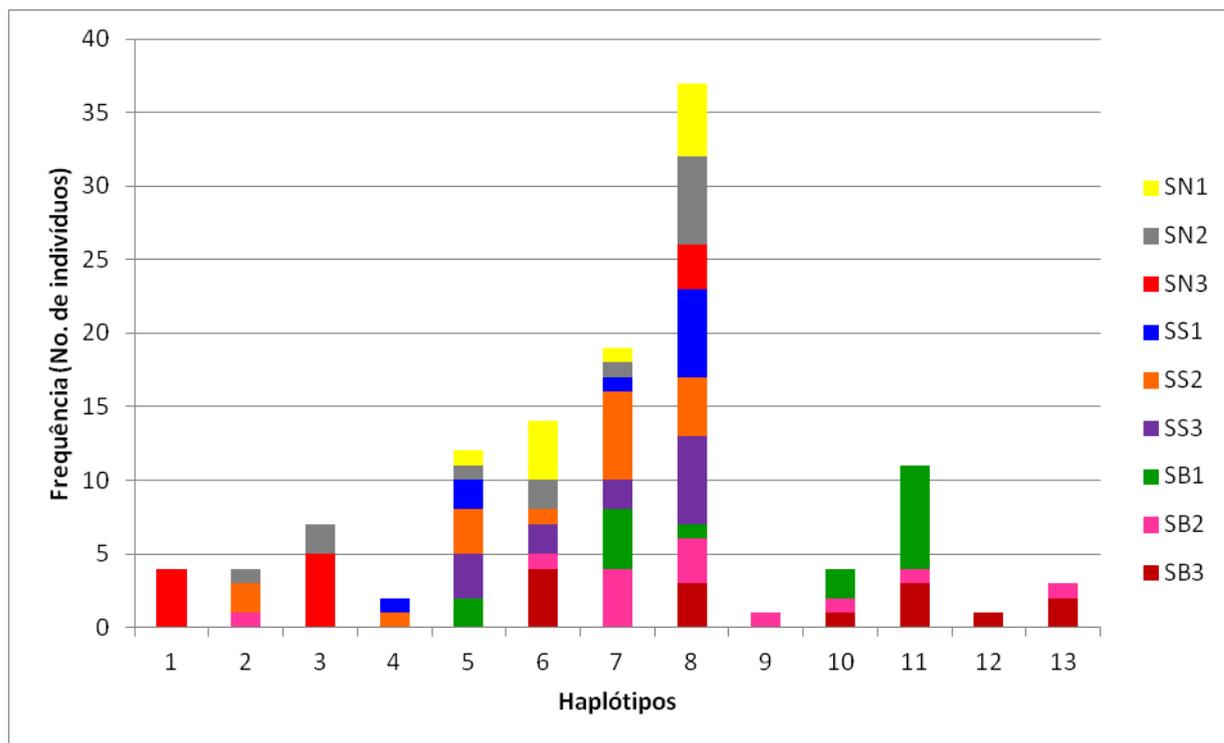


Figura 9. Frequência dos haplótipos observados em três locos cpSSR de *Mimosa acutistipula* na Serra de Carajás, PA. As cores representam as populações estudadas da Serra Norte (SN), Serra Sul (SS) e Serra da Bocaina (SB) conforme a legenda à direita do gráfico.

Tabela 4. Estimativas da diversidade genética em nove populações de *M. acutistipula* var. *ferrea* da Serra de Carajás, PA, com base na análise de três locos cpSSR. (N) = número de indivíduos, (A) = número de alelos, (N_h) = número de haplótipos e (H_E) = índice de diversidade genética de Nei (1989).

População	N	A	N_h	H_E
Serra Norte 1	18	8	6	0.30501
Serra Norte 2	13	7	6	0.35897
Serra Norte 3	12	5	3	0.29798
Serra Sul 1	10	6	4	0.21481
Serra Sul 2	11	6	4	0.23636
Serra Sul 3	13	6	4	0.24786
Serra da Bocaina 1	16	7	6	0.42222
Serra da Bocaina 2	12	9	7	0.48485
Serra da Bocaina 3	14	7	5	0.39927
Média	13.2	6.8	5	0.32970

A análise de distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações de *M. acutistipula*, inferidas por meio da análise de variância molecular (AMOVA), com base em

dois índices (F_{ST} e R_{ST}) distintos (Tabela 5) mostrou que a maior parte da variação genética encontrada (78 a 95%) é explicada pela variação contida dentro das populações, sendo que o restante da variabilidade detectada entre as populações, evidenciando uma baixa a moderada estruturação genética das populações ($R_{ST} = 0.052$; $F_{ST} = 0.215$).

Tabela 5. Distribuição da variabilidade genética em nove populações de *M. acutistipula* na Serra de Carajás, PA, inferida por meio de uma análise de variância molecular (AMOVA) em três locos cpSSR.

Fonte de Variação	Porcentagem de Variação ¹ (%)	Porcentagem de Variação ² (%)	Índice de diferenciação genética $F_{ST}=0.215^*$, $R_{ST}=0.052^*$
Entre pops	21.53	5.21	
Dentro das pops	78.47	94.79	

*Teste de significância (1000 permutações): P = 0.0001

As relações entre os haplótipos de locos cpSSR de *M. acutistipula*, inferidas por meio de uma análise de rede utilizando o método *Median-Joining*, são apresentadas na Figura 10. A rede mostra vetores que interligam os diferentes haplótipos, sendo que dezessete passos de mutação única foram identificados entre eles e dez dos treze haplótipos foram compartilhados entre populações.

Na figura 10 também é possível observar a existência de quatro haplótipos mais frequentes (5, 6, 7, 8) localizados na parte mais central da *network*, a partir dos quais os demais haplótipos mais raros se derivam, indicando serem os haplótipos mais ancestrais. As relações dos haplótipos na *network* também corroboram a fraca estruturação genética observada nas populações de *M. acutistipula* na Serra de Carajás com base nas outras análises genéticas (AMOVA, índices F_{ST} e R_{ST} e teste de Mantel), bem como pelo padrão de distribuição geográfica dos haplótipos nas populações (Figura 11). Observa-se o compartilhamento da maioria dos haplótipos nas populações de *M. acutistipula*, indicando a provável existência de fluxo gênico histórico entre as mesmas na região. Também é evidenciada na *network* (Figura 10) a presença de dois grupos de haplótipos menos frequentes, os quais são derivados a partir do haplótipo mais frequente (8) encontrado em todas as populações, bem como de outros dois mais comuns (7 e 5). Desses dois grupos de haplótipos, o posicionado mais à esquerda na *network* é representado por haplótipos que ocorrem exclusivamente nas populações da Serra da Bocaina (SB), enquanto os haplótipos do grupo situado à direita pertencem em sua maioria às populações da Serra Norte (SN).

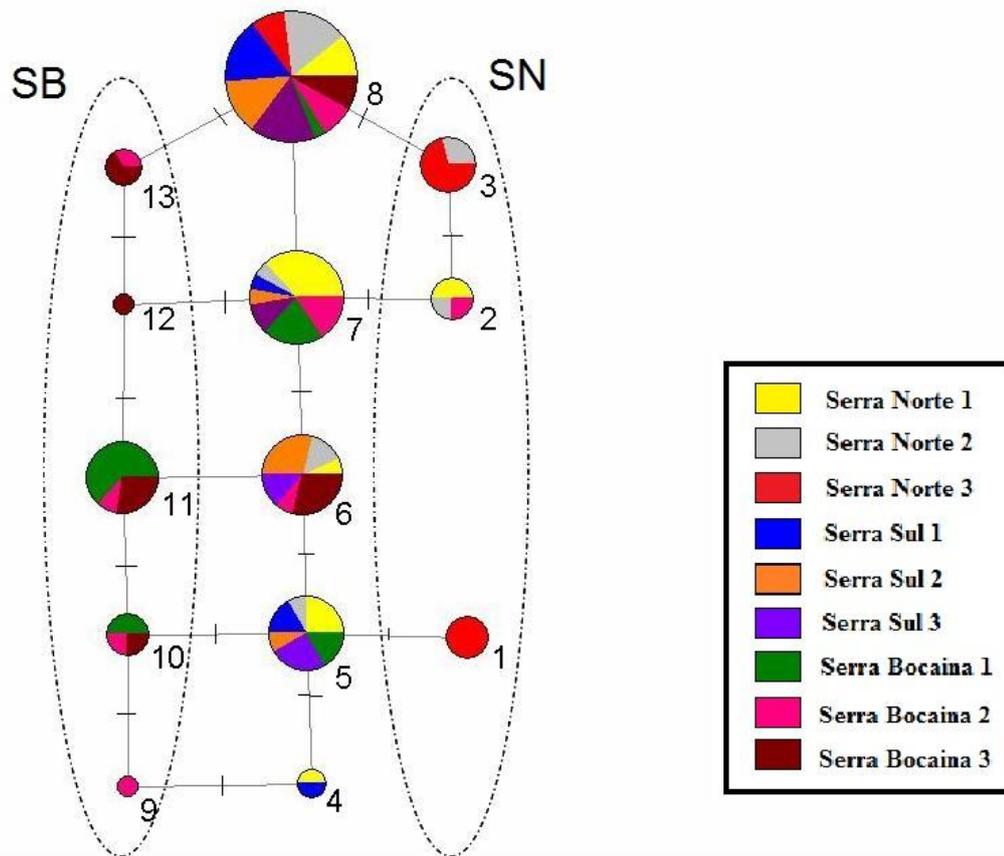


Figura 10. Relações entre os haplótipos em *Mimosa acutistipula* na Serra de Carajás, PA com base em análise de rede (*Network*) utilizando o método *Median Joining*, a partir da variação encontrada em três locos cpSSR. Cada traço sobreposto às linhas que unem os haplótipos representa um evento mutacional. O tamanho dos círculos representa, em proporção, as frequências de haplótipos. Os números correspondem aos haplótipos e as cores indicam as populações, como descritas na legenda à direita da figura. As duas elipses correspondem a dois grupos de haplótipos mais recentes, observados exclusivamente na Serra da Bocaina (SB) e em populações predominantemente situadas na Serra Norte (SN).

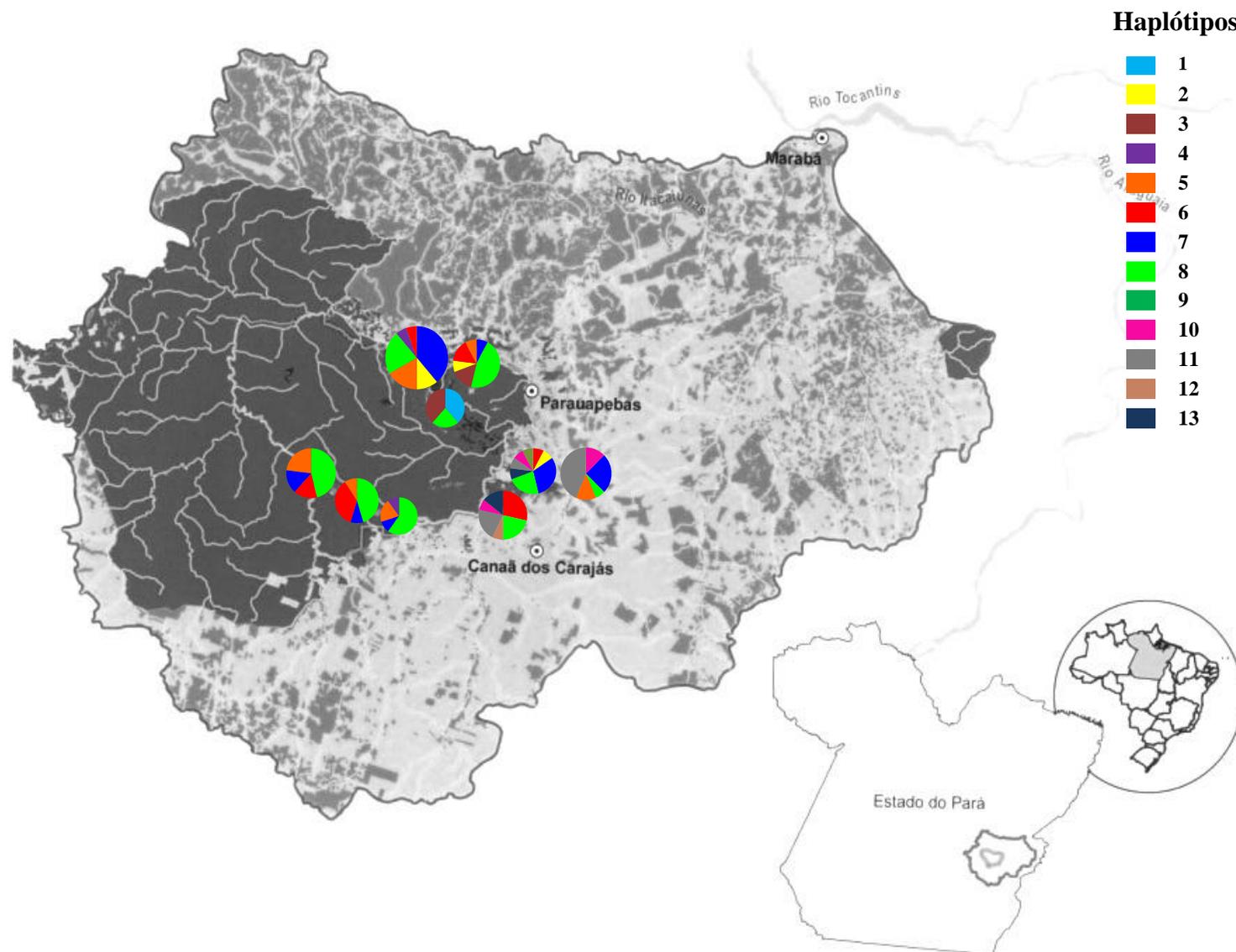


Figura 11. Distribuição geográfica de haplótipos observados em nove populações de *M. acutistipula* para três locos cpSSR. Os tamanhos dos círculos são proporcionais ao tamanho amostral e as cores representam os haplótipos, conforme legenda à direita da figura.

A análise de agrupamento (UPGMA) inferida a partir de estimativas das distâncias genéticas de Nei (1972; 1978) mostrou baixas distâncias genéticas entre as populações, evidenciando a fraca estruturação no conjunto das populações de *M. acutistipula* estudadas, com exceção da população SN3, a qual se mostrou bastante distanciada do grupo maior formado pelo conjunto das demais populações no dendrograma, com suporte de *bootstrapping* de 100% (Figura 12). No entanto observa-se também o agrupamento das populações da Serra Sul e duas das três populações da Serra da Bocaina, com *bootstrapping* de 48 e 73%, respectivamente.

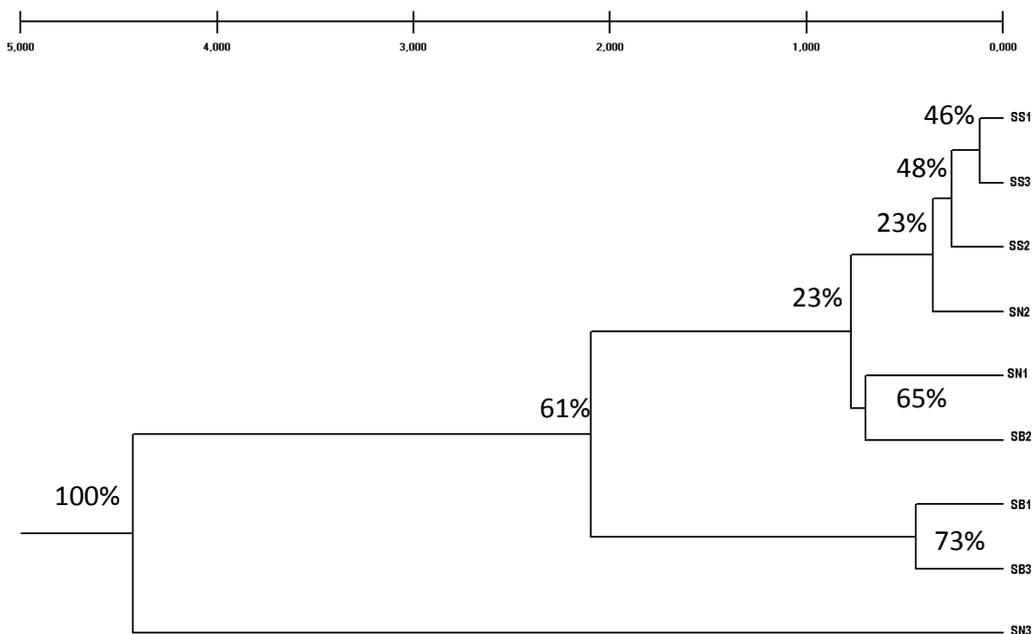


Figura 12. Análise de agrupamento (UPGMA) de nove populações de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* da Serra de Carajás, PA inferida a partir de estimativas das distâncias genéticas de Nei (1972; 1978).

Na Tabela 6 é apresentada a matriz que correlaciona as distâncias genéticas e geográficas entre as populações de *M. acutistipula* analisadas par a par. Com base nesta matriz foi feito o Teste de Mantel, que avalia a hipótese de isolamento por distância. Os resultados do teste de Mantel mostraram correlação muito fraca ($r = 0.2163$; $p = 0.039$), entre as variáveis testadas, indicando uma pequena influência da distância geográfica entre as populações para explicar a diferenciação genética observada entre elas (Figura 13).

Tabela 6. Matriz de correlação entre distâncias genéticas de Nei (na parte de baixo da diagonal) e distâncias geográficas (acima da diagonal, em quilômetros) entre as populações de *M. acutistipula* var. *ferrea* na Serra de Carajás, PA, analisadas par a par.

	SN1	SN2	SN3	SS1	SS2	SS3	SB1	SB2	SB3
SN1	-	7,85	12,75	41,4	39,5	40,9	54,5	54,9	53,35
SN2	0,0799	-	6,85	42,7	41,8	42,6	47,5	47,9	46,3
SN3	0,3576	0,1667	-	37,5	37,4	38	41,6	42	40,7
SS1	0,0741	0,033	0,2913	-	5	2,7	53,5	53,9	51,4
SS2	0,0799	0,0396	0,3586	0,0373	-	2,4	57,3	57,6	55,35
SS3	0,0496	0,0342	0,3178	0,0118	0,145	-	55,8	56,2	53,6
SB1	0,225	0,3521	0,8991	0,3053	0,2169	0,2326	-	0,4	2,3
SB2	0,0699	0,1024	0,456	0,0866	0,0776	0,0687	0,091	-	2
SB3	0,263	0,2242	0,6956	0,2082	0,127	0,1666	0,0445	0,0731	-

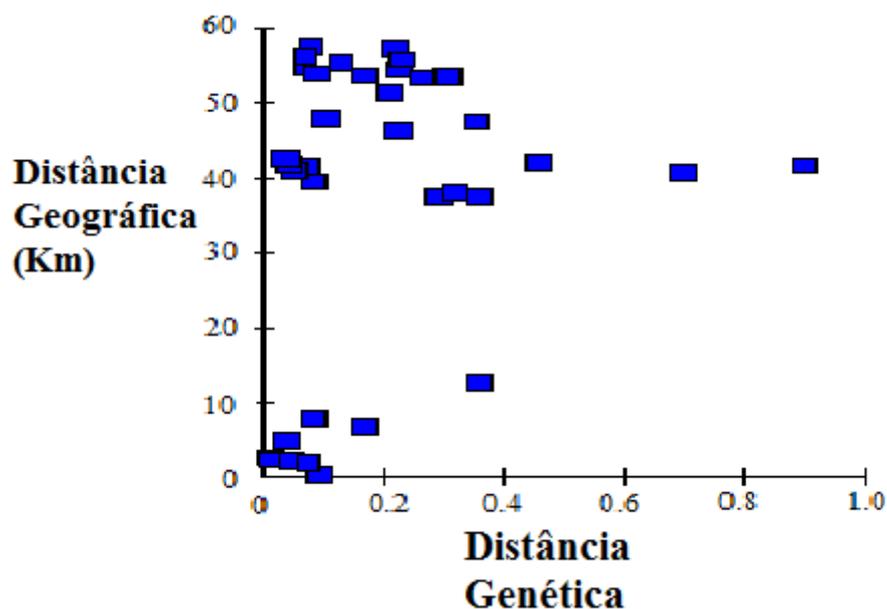


Figura 13. Correlação entre distância genética de Nei e distância geográfica (Km) para nove populações de *M. acutistipula*, analisadas par a par a partir do Teste de Mantel, com base na variação observada em três locos cpSSR ($r=0.2163$; $p=0.039$).

4.4 Discussão

Este estudo mostrou a utilidade de marcadores microssatélites do genoma do cloroplasto na detecção de variação genética suficiente para a realização de análises populacionais em *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*, possibilitando compreender os padrões de distribuição da variabilidade genética e o fluxo gênico histórico em populações desta espécie na região da Serra dos Carajás, PA. Espera-se que as informações aqui apresentadas possam nortear estratégias efetivas para a conservação da espécie, assim como servir de modelo para estudos similares com outras espécies de plantas características da vegetação de canga na região da Serra de Carajás.

As populações de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* analisadas apresentaram considerável diversidade genética (H_E médio = 0.329, variando de 0,21 a 0,48) com base na análise conjunta de três locos microssatélites do genoma do cloroplasto, sendo que a diversidade média ($H_E=0,33$) encontrada foi um pouco inferior à registrada em outros estudos que também utilizaram este marcador molecular em espécies tropicais (BUTAUD et al., 2005; ANDRIANOELINA et al., 2005; LEMES et al., 2010; PINHEIRO et al., 2011). Todas as populações estudadas apresentaram polimorfismos para pelo menos um dos locos cpSSR analisados. O número médio de alelos encontrado por loco cpSSR polimórfico (3,0), compara-se aos encontrados em populações de outras espécies, os quais variaram de 2,3 a 5 alelos por loco (COLLEVATTI et al., 2003; LIRA et al., 2003 BUTAUD et al., 2005; CUBAS et al., 2005; ANDRIANOELINA et al., 2006; PARDO et al., 2008; EBERT & PEAKALL, 2009; LEMES et al., 2010; HERNANDEZ et al, 2013), indicando o alto conteúdo informativo dos marcadores utilizados para se detectar variabilidade genética nas populações de *M. acutistipula*.

As populações que apresentaram maior diversidade genética foram as populações localizadas na Serra da Bocaina, situada fora da FLONA de Carajás. Os índices de diversidade genética (H_E) mostram que as populações da Serra da Bocaina são mais variáveis que as demais, com valores de H_E variando de 0.399 a 0.485. A população Serra da Bocaina 2 apresentou o maior número de alelos ($A=9$), de haplótipos ($N_h=7$) e índice de diversidade genética ($H_E=0.485$). Estão também presentes unicamente na Serra da Bocaina dois dos três haplótipos exclusivos encontrados neste estudo (9-SB2; 12-SB3), além de outros três (10, 11 e 13) que só são compartilhados entre as populações desta serra. Por outro lado, a população Serra Norte 3, que está localizada no corpo N4WS, apresentou o menor número de alelos ($A=5$) e de haplótipos ($N_h=3$) quando comparada às demais populações estudadas. Entretanto, um destes haplótipos se mostrou exclusivo desta população, estando presente em quatro dos doze indivíduos analisados. A alta frequência de um haplótipo exclusivo desta população é, provavelmente, o principal motivo que distancia geneticamente a Serra Norte 3 das demais populações, na análise de agrupamento (Figura 12). A baixa diversidade genética encontrada e a alta frequência do haplótipo exclusivo nesta população podem indicar evento de colonização mais recente. Já a maior diversidade genética encontrada nas populações situadas na Serra da Bocaina, reflete o maior acúmulo de informação genética nestas populações, as quais provavelmente não sofreram gargalos populacionais significativos, podendo tratar-se de populações mais ancestrais.

O padrão de distribuição da variabilidade genética nas populações de *M. acutistipula*, como evidenciado pelos resultados da AMOVA e pelos índices de diferenciação genética ($F_{ST} = 0.215$ e $R_{ST} = 0.05$), mostra que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das populações revelando a baixa estruturação genética das mesmas. Além disso, o fato de 10 dos 13 haplótipos encontrados serem compartilhados entre as populações sugere a ocorrência de intenso fluxo gênico histórico entre elas.

As diferenças observadas nos índices de diferenciação genética ($F_{ST} = 0.215$ e $R_{ST} = 0.052$) se devem provavelmente aos diferentes modelos de mutação que os regem. Enquanto o índice F_{ST} (WRIGHT, 1951) assume uma baixa amplitude de mutação e segue o modelo de alelos infinitos (onde cada mutação pode gerar uma série infinita de alelos), o índice R_{ST} (SLATKIN, 1995) considera a proporção da variância entre o tamanho dos alelos, seguindo estritamente o modelo *stepwise* de mutação (no qual é considerada a perda ou ganho de uma única repetição por vez). Em suma, o R_{ST} é um índice F_{ST} corrigido, que supostamente reflete de maneira mais adequada a informação contida nos locos microssatélites, já que estes marcadores seguem o modelo de mutação *stepwise* (GOLDSTEIN & POLLOCK, 1997). De qualquer forma, ainda há um grande debate sobre qual destas estatísticas melhor estima a diferenciação genética entre as populações.

As relações entre os 13 haplótipos multilocos de cpSSR, inferidas pelo método *Median Joining*, mostram a ocorrência de quatro haplótipos mais frequentes os quais encontram-se presentes na maioria das populações, sendo que o haplótipo (8) mais frequente é encontrado em todas as populações estudadas. Os haplótipos mais frequentes ficaram dispostos na parte central da rede (Figura 10), sendo provavelmente os mais antigos já que, segundo Avise (2009), os haplótipos mais comuns costumam ser os mais ancestrais. A partir desses quatro haplótipos mais frequentes são derivados os demais haplótipos de menor frequência, dentro os quais destacam-se dois grupos de haplótipos com ocorrência nas Serras da Bocaina e Norte, os quais provavelmente derivaram-se mais recentemente. Todos os haplótipos diferiram entre si por apenas um passo mutacional.

O alto grau de compartilhamento dos haplótipos mais frequentes na maioria das populações amostradas sugere a ocorrência de intenso fluxo gênico histórico entre as populações, o qual moldou a fraca estrutura genética observada no cpDNA de *M. acutistipula* na Serra de Carajás. Já a presença de dois grupos diferenciados de haplótipos menos frequentes provavelmente tem origem mais recente (após o Último Máximo Glacial), quando a floresta expandiu-se mantendo isoladas as vegetações de cangas, levando à diferenciação genética destas populações em diferentes serras (Serras Norte e Bocaina). Apesar de fraca, esta estruturação genética foi corroborada pelos índices significativos de F_{ST} e R_{ST} , sendo que o F_{ST} foi mais sensível em detectar esta diferenciação genética entre as populações.

Mudanças climáticas ocorridas na Terra, desencadeadas pelos ciclos de Milankovitch durante os últimos dois milhões de anos, geraram alternâncias entre períodos mais secos e úmidos nos continentes, causando alterações no ambiente, bem como afetando diretamente a extensão e configuração dos habitats existentes no planeta. Tais mudanças influenciaram significativamente os padrões de distribuição, rotas de dispersão e colonização das espécies (DYNESIUS & JANSSON, 2000). Tais alterações também afetaram a dinâmica das formações florestais e de savanas na Amazônia (HAFFER & PRANCE, 2002).

Antes disso, durante o Mioceno, a vegetação predominante na Bacia Amazônica era aberta, do tipo savana, sendo que as florestas pluviais só passaram a se estabelecer na transição deste período para o Plioceno (MÖRNER et al., 2001). Sabe-se que as formações vegetais mais abertas têm origem arcaica (AB´SABER, 1986), antecedendo o período de expansão da floresta amazônica (NUNES, 2009). A presença de savanas na região amazônica antecede provavelmente a seis milhões de anos AP. Já durante o Quaternário Tardio ocorreram reduções das áreas de florestas pluviais úmidas em algumas partes da Amazônia (HAFFER & PRANCE, 2002).

Em eventos climáticos mais recentes (Último Máximo Glacial), foram desencadeadas contínuas expansões e retrações das savanas neotropicais (Figura 14), sendo que várias áreas de savanas amazônicas, hoje separadas, provavelmente já estiveram em algum momento conectadas no passado (BEHLING, 1998; HAMMEN & HOOGHMESTRA, 2000). Na figura 14 é apresentada a reconstrução do padrão de distribuição da vegetação na Bacia

Amazônica e arredores, durante o Último Máximo Glacial, aproximadamente 20.000 AP (VAN DER HAMMEN & HOOGHMISTRA, 2000). Análises palinológicas sugerem que as florestas amazônicas foram substituídas pelas savanas neste período (ABSY et al, 1991, HERMANOWSKI et al, 2012). Entretanto, a ideia de que as oscilações ocorridas durante o Pleistoceno são responsáveis por tal diversificação é controversa (COLINVAUX et al, 2000; RULL, 2011), e os estudos biogeográficos históricos e filogeográficos na América do Sul são urgentes para entender como eventos passados afetam a disposição atual das populações (TURCHETTO-ZOLET et al, 2013)

Estudos palinológicos realizados especificamente na Serra de Carajás indicam que houve, pelo menos, três fases de aridez no local, entre o período de 65 a 10 mil anos atrás, às quais seguiu a expansão das savanas (ABSY et al, 1991; HOOGHMISTRA & VAN DER HAMMEN, 1998; VAN DER HAMMEN & HOOGHMISTRA, 2000). Registros de pólen fóssil apontam que as savanas foram dominantes em Carajás nos períodos de 65.000 AP, 40.000 AP, e entre 25.000 e 10.000 AP (HOOGHMISTRA & VAN DER HAMMEN, 1998). Depois disso, a partir de 9.000 AP, fósseis de pólen apontam para o desenvolvimento completo da floresta tropical na região de Carajás. No entanto, registros de uma nova fase de clima seco fez a floresta retrair novamente por volta dos 5.000 AP. Depois disso, a floresta pluvial se estabeleceu sem registros de mudanças significativas na região (SERVANT et al., 1993).

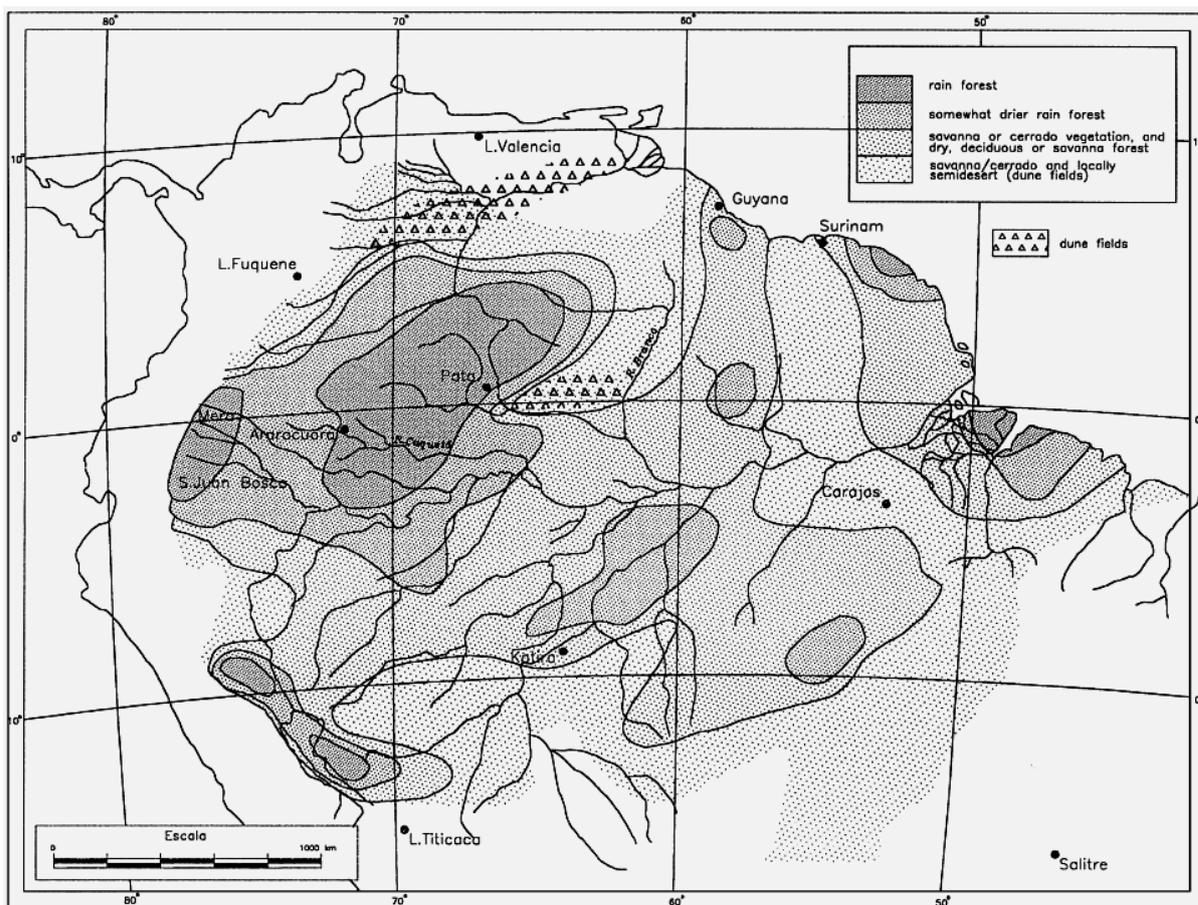


Figura 14. Reconstrução do possível padrão de distribuição da vegetação na Bacia Amazônica e arredores durante o Último Máximo Glacial, aproximadamente 20.000 AP (VAN DER HAMMEN & HOOGHMISTRA, 2000)

Nessas circunstâncias, as condições climáticas favoráveis que ocorreram durante o Pleistoceno Tardio promoveram a expansão das savanas para além dos seus limites como atualmente observados na região amazônica. A atual disposição das savanas metalófilas (cangas) em Carajás, isoladas entre si pela matriz florestal, provavelmente difere da conformação que tinham no passado, quando as populações amostradas possivelmente estiveram interligadas, promovendo o fluxo gênico entre elas. O grande compartilhamento de haplótipos mais frequentes, provavelmente mais ancestrais, observado na maioria das populações de *M. acutistipula* var. *ferrea* reflete o padrão de distribuição da variabilidade genética encontrado no cpDNA da espécie.

Uma explicação alternativa para tal padrão de distribuição pode ser a presença de pequenas áreas com vegetação de canga entre as populações analisadas, também isoladas pela matriz florestal, as quais não foram amostradas no presente estudo. Estas áreas podem estar desempenhando a função de *stepping stones* (ou trampolins ecológicos), as quais estariam facilitando o fluxo gênico mais contemporâneo entre as áreas maiores de vegetação de canga (METZGER, 2001; GRAHAM, 2001; UEZU et al, 2008), promovendo assim a conectividade entre as áreas.

A fraca correlação entre distância genética e distância geográfica evidenciada pelo teste de Mantel indica que a diversidade genética observada nas populações de *Mimosa acutistipula* é pouco influenciada pelo isolamento geográfico.

A maior diversidade genética observada nas populações da Serra da Bocaina, reflete um maior acúmulo de mutações nos locos cpSSR. É possível que os gargalos sofridos pelas populações da Serra da Bocaina tenham sido menos significativos em comparação aos sofridos pelas outras populações indicando provavelmente que estas populações são as mais antigas dentre as analisadas na região.

Os dois grupos distintos de haplótipos presentes nas populações da Serra da Bocaina e Serra Norte, os quais provavelmente derivaram de haplótipos mais ancestrais, indicam que estes se diversificaram nestas serras no período interglacial atual, após o último registro de período mais seco na região quando houve a contração das áreas florestais (5000 AP). Logo após, a floresta pluvial se estabeleceu isolando as áreas de cangas, mantendo-se como atualmente observado. Dessa forma, como esperado para uma espécie predominantemente autocórica como *M. acutistipula* (FERREIRA, 2011), o fluxo gênico via sementes é restrito, levando à diferenciação genética entre as populações de *M. acutistipula* situadas nas diferentes serras de Carajás, conforme evidenciado pelas relações entre os haplótipos nesses dois grupos circundados na rede (Figura 10).

A hipótese de fluxo gênico restrito mais recente, levando à diferenciação genética das populações de *M. acutistipula* nas diferentes serras, deve ser melhor corroborada por meio da análise de locos microssatélites do genoma nuclear, os quais possibilitam investigar o fluxo gênico mais contemporâneo via pólen. Sabe-se que locos microssatélites do genoma nuclear possuem taxas de mutação bem mais altas que outras regiões deste genoma (JARNE & LAGORDA, 1996; LI, 2002), no entanto, as taxas de mutação e evolução de microssatélites do genoma do cloroplasto são pouco conhecidas (ver no entanto trabalho com *Pinus torreyana*; PROVAN et al., 1999). Outra questão a ser considerada diz respeito à potencial ocorrência de homoplasia nos locos microssatélites, a qual está diretamente relacionada à taxa de mutação nos locos SSR individualmente (SCHLÖTERER, 1998). O baixo número de alelos encontrados nos locos cpSSR comparados ao locos SSR do genoma nuclear sugerem uma taxa de mutação mais lenta para os locos cpSSR e, dessa forma, o efeito da homoplasia nestes locos pode não ser tão pronunciado em comparação ao genoma nuclear (PROVAN et al. 1999; PROVAN, 2001). Estudo realizado com *Pinus* mostrou que o efeito de homoplasias não afetaram os índices de diversidade genética de Nei (H_E) em locos cpSSR e que o uso de um grande número de locos contribui para diminuir a influência das homoplasias nas

estimativas de diversidade genética (NAVASCUÉS & EMERSON, 2005). No entanto, o efeito de homoplasias na interpretação de dados cpSSR não deve ser negligenciado, principalmente quando se trata de análises filogenéticas.

5. CONCLUSÕES

- O estudo mostrou a utilidade de marcadores microssatélites do genoma do cloroplasto (cpDNA) na detecção de variação genética suficiente para a realização de análises populacionais e fluxo gênico histórico em *Mimosa acutistipula* var. *ferrea*.
- As populações de *Mimosa acutistipula* var. *ferrea* apresentaram considerável diversidade genética, sendo que as três populações localizadas na Serra da Bocaina foram as mais diversas, sugerindo a necessidade de ações específicas para a conservação destas populações.
- O padrão de distribuição da variabilidade genética nas populações de *M. acutistipula* mostrou que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das populações, revelando a baixa estruturação (diferenciação) genética entre elas.
- A diversidade genética observada nas populações de *Mimosa acutistipula* é pouco influenciada pelo isolamento geográfico.
- Foram identificados 13 haplótipos, sendo a maioria deles compartilhada entre as populações amostradas de *Mimosa acutistipula*, corroborando assim a baixa estruturação genética encontrada nas populações em geral o que sugere a ocorrência de intenso fluxo gênico histórico entre elas.
- A ocorrência de vários haplótipos do cpDNA, comuns na maioria das populações de *M. acutistipula*, bem como de grupos de haplótipos mais recentes exclusivos de determinadas serras (Serras Norte e Bocaina), sugerem a possível influência que eventos históricos, relacionados às alternâncias climáticas ocorridas no passado, e o fluxo gênico histórico, provavelmente tiveram no padrão atual de distribuição da variabilidade genética observado nas populações da espécie na região.
- A hipótese de fluxo gênico mais recente (após o Último Máximo Glacial) deve ser melhor corroborada por meio da análise de locos microssatélites do genoma nuclear, os quais possibilitarão investigar o fluxo gênico mais contemporâneo via pólen.
- As informações aqui apresentadas constituem subsídios importantes para nortear estratégias para a conservação efetiva de populações de *Mimosa acutistipula* na região da Serra de Carajás, assim como poderão servir de modelo para estudos similares com outras espécies de plantas características da vegetação de canga, contribuindo dessa forma para o melhor conhecimento e conservação desta vegetação que abriga uma grande variedade de espécies endêmicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSY, M. L. et al. Mise en evidence de quatre phases d'ouverture de la forêt dense dans le sud-est de l'Amazonie au cours des 60.000 dernières années. Première comparaison avec d'autres régions tropicales. **Comptes Rendus Academie des Sciences**, Paris, Série II, v.312, p. 673-678. 1991.

AB'SABER, A. N. Geomorfologia da Região. In: ALMEIDA JR. (Org). **Carajás: desafio político, ecologia e desenvolvimento**. São Paulo: Brasiliense; Brasília: CNPq, p.88-124. 1986.

AGUILAR, R. et al. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, Malden, v.17, p.5177-5188. 2008.

ALMEIDA, D. et al. **Plantas visitadas por abelhas e polinização**. Piracicaba: ESALQ – Divisão de Biblioteca e Documentação, 40 p. 2003.

ANDRIANOELINA, O. et al. Genetic diversity of *Dalbergia monticola* (Fabaceae) and endangered tree species in the fragmented oriental forest of Madagascar. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v.15, p.1109-1128. 2006.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, Malden, v.36, p. 3-15. 2009.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.16, p.37-48. 1999.

BARNEBY, R. **Sensitivae Censitae**. A Description of the Genus *Mimosa* Linnaeus (Mimosaceae) in the New World Mem. New York Bot. Gard. 65, 835 p. 1991.

BARRET, S. C. H.; KOHN, J. R. Genetic and Evolutionary Consequences of Small Population Size in Plants: Implications for conservation. In.: FALK, D. A., HOLSINGER, K. E. (org.). **Genetics and Conservation of Rare Plants**. Oxford University Press. p.3-30. 1991.

BAWA, K.S. Effects of deforestation and forest fragmentation on genetic diversity in tropical tree populations. In: Drysdale, R.M.; John, S.E.T.; Yapa, A.C. 1994. **Proceedings: International Symposium on Genetic Conservation and Production of Tropical Forest Tree Seed**. ASEAN-Canada Forest Tree Seed Centre Project, Muak-Lek, Saraburi, Thailand. P. 10-16. 1993.

BEHLING, H. Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. **Review of Palaeobotany and Palynology**, Amsterdam, v. 99, p. 143-156. 1998.

BEUMER, C.; MARTENS, P. IUCN and perspectives on biodiversity conservation in a changing world. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 22, p. 3105-3120. 2013.

BITAR, O. Y. **Avaliação da recuperação de áreas degradadas por mineração na Região Metropolitana de São Paulo**. São Paulo. 185 p. 1997.

BUCCI, G. et al. Detection of haplotypic variation and natural hybridization in halepensis-complex pine species using chloroplast SSR markers. **Molecular Ecology**, Malden, v.7, p.1633-1643. 1998.

BUTAUD, J. F. et al. Phylogeography of Eastern Polynesian sandalwood (*Santalum insulare*), an endangered tree species from the Pacific: a study based on chloroplast microsatellites. **Journal of Biogeography**, Malden, v.32, p.1763-1774. 2005.

CAVERS, S.; NAVARRO, C.; LOWE, A.J. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. **Molecular Ecology**, Malden, v.12, p.1451-1460. 2003.

CBD. **Cities and Biodiversity Outlook**. CBD, Montreal, 64 p. 2012.

COLINVAUX, P. A.; De OLIVEIRA, P. E.; BUSH, M. B. Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: the failure of the aridity and refuge hypotheses. **Quaternary Science Reviews**, Amsterdam, v.19, p. 141-169. 2000.

COLLEVATTI, R. G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J. D. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. **Molecular Ecology**, Malden, v.12, p.105-115. 2003.

CUBAS, P.; PARDO, C.; TAHIRI, H. Genetic variation and relationships among *Ulex* (Fabaceae) species in southern Spain and northern Morocco assessed by chloroplast microsatellite (cpSSR) markers. **American Journal of Botany**, St. Louis, v.92, p.2031-2043. 2005.

DAHMER, N. et al. Chromosome number in the genus *Mimosa* L.: cytotoxic and evolutionary implications. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 291, p. 211-220. 2011.

DAVIS, M.; CORNWELL, D. **Introduction to environmental engineering**. McGraw-Hill Companies. 1040 p. 2012.

DeSALLE, R.; AMATO, G. The expansion of Conservation Genetics. **Nature**, Londres, v.5, p.702-712. 2004.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15. Dupanloup, S.I.; Schneider, S.; Excoffier, L. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. **Molecular Ecology**, Malden, v.11, p.2571-2581. 2002.

DYNESIUS, M.; JANSSON, R. Evolutionary consequences of changes in species' geographical distributions driven by Milankovitch climate oscillations. **PNAS**, Washington, v. 97, p. 9115-9120. 2000.

EBERT, D.; PEAKALL, R. Chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs): technical resources and recommendations for expanding cpSSR discovery and applications to a wide array of plant species. **Molecular Ecology Resources**, Malden, v.9, p.673-690. 2009.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.4, Supp. P.23-29. 1996.

ENNOS, R. A. et al. Using organelle markers do elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: Hollingsworth, P. M., Bateman, R. M., Gornall, R. J. (eds) **Molecular Systematics and Plant Evolution**. Taylor & Francis, London, p.1-19. 1999.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. **Genetics**, Bethesda, v.131, p.479-491. 1992. EXCOFFIER, L. and LISCHER, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567.

FERREIRA, E. V. R. 2011. **Composição florística, estrutura da comunidade e síndrome de dispersão de sementes de um remanescente de caatinga em Poço Verde – Sergipe**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Núcleo de Pós Graduação em Ecologia e Conservação. Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão. 81 p. 2011.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª edição. Brasília (EMBRAPA-CENARGEN). 222p. 1998.

FORSTER, P.; BANDELT; H. J., ROHL, A. **NETWORK** 3.1.1.0. Software free available at: www.fluxus-engineering.com. Fluxus Technology Ltd., Cambridge. 2000.

FRANKEL, O. H.; BROWN, A. H. D.; BURDON, J. J. **The conservation of plant biodiversity**. Cambridge University Press. 299 p. 1995.

FUENTES, M. Economic growth and biodiversity. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 20, p. 3453-3458. 2011.

GOLDSTEIN, D. B.; POLLOCK, D. D. Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference. **Journal of Heredity**, v.88, p.335-342. 1997.

GRAHAM, C. H. Factors influencing movement patterns of keel-billed toucans in a fragmented tropical landscape in southern Mexico. **Conservation Biology**, Malden, v. 15, p. 1789-1798. 2001.

GROMBONE, M. T. et al. Estrutura fitossociológica da floresta semidecídua de altitude do Parque Municipal da Grota Funda (Atibaia – Estado de São Paulo). **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, p. 47-64. 1990.

HAFFER, J.; PRANCE, G. T. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos Refúgios da diferenciação biótica. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 16, n. 46. 2002.

HAMMEN, V. D.; HOOGHIEMSTRA, H. Neogene and quaternary history of vegetation, climate and plant diversity in Amazonia. **Quaternary Science Reviews**, Amsterdam, v.19, p. 725-742. 2000.

HAMRICK, J.L.; MURAWSKI, D.A. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon tropical tree species. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v.7, p.395-399. 1991.

HAMRICK, J.L. 1993. Genetic diversity and conservation in tropical forests. *In*: Drysdale, R.M.; John, S.E.T.; Yapa, A.C. 1994. **Proceedings: International Symposium on Genetic Conservation and Production of Tropical Forest Tree Seed**. ASEAN-Canada Forest Tree Seed Centre Project, Muak-Lek, Saraburi, Thailand. P. 1-9.

HARRIS, S. A.; INGRAM, R. Chloroplast DNA and biosystematics: the effects of intraspecific diversity and plastid transmission. **Taxon**, Bratislava, v.40, p.393-412. 1991.

HERMANOWSKI, B.; da COSTA, M. L.; BEHLING, H. Environmental changes in southeastern Amazonia during the last 25.000 yr revealed from a paleoecological Record. **Quaternary Research**, Amsterdam, v.77, p. 138-148. 2012.

HERNÁNDEZ, M. B.; HERNÁNDEZ, D. G.; CAMPOS, G. C. Genetic diversity and population genetic structure of wild banana *Musa ornata* (Musaceae) in Mexico. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 299, p. 1899-1910. 2013.

HOOGHIEMSTRA, H.; Van Der HAMMEN, T. Neogene and Quaternary development of the neotropical rain forest: the forest refugia hypothesis, and a literature overview. **Earth-Science Reviews**, Amsterdam, v.44, p.147-183. 1998.

HOROWITZ, C. A sustentabilidade da biodiversidade em Unidades de Conservação de Proteção integral: Parque Nacional de Brasília. 2003, 329 p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Sustentável). Universidade de Brasília, Centro de Desenvolvimento Sustentável. 2003.

IBAMA – CVRD. **Plano de Manejo para Uso Múltiplo da Floresta Nacional de Carajás (Flona de Carajás)**. Brasília: IBAMA. 2003.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. Unidades de Conservação. Disponível em: < <http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/unidades-de-conservacao/categorias.html>>. Acessado em 15/abr/2012.

ISHII, T.; MORI, N.; OGIHARA, Y. Evaluation of allelic diversity at chloroplast microsatellite loci among common wheat and its ancestral species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.103, p.896-904. 2001.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v.11, p.424-430. 1996.

LANGE, R. Genetics and Demography in Biological Conservation. **Science**, Washington, New Series, v.241, n.4872, p.1455-1460. 1988.

LEMES, M. R. et al. Chloroplast DNA microsatellites reveal contrasting phylogeography structure in Mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) from Amazonia and Central America. **Tropical Plant Biology**, New York, v.3, p.40-49. 2010.

LÉVÊQUE, C. **A biodiversidade**. Bauru/SP: EDUSP. 1999.

LI, Y.C, et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Malden, v.11, p.2453-2465. 2002.

LINDENMAYER, Z. G.; LAUX, J. H.; TEIXEIRA, J. B. G. Considerações sobre a origem das formações ferríferas da Formação Carajás, Serra dos Carajás. **Revista Brasileira de Geociências**, Curitiba, v.31, n.1. 21-28. 2001.

LIRA, C. F. et al. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. **Molecular Ecology**, Hoboken, v.12, p.3219-3225. 2003.

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

LIU, X.; ZHANG, L.; HONG, S. Global biodiversity research during 1900-2009: a bibliometric analysis. **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 20, p. 807-826. 2011.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Distribución de la Variación en Especies de Arboles Tropicales. **Revista Biologia Tropical**, San José, v.35, n.1, 165-175. 1987.

KLINK C.A.; MACHADO, R. B. A Conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v.1, p.147-155. 2005.

KUBITSKI, K. Ocorrência de Kielmeyera nos campos de ‘Humaitá’ e a natureza dos ‘campos’ – Flora da Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v.9, p.401 – 404. 1979.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**., Philadelphia, v.27, p.209-220. 1967.

MARTINS, F. D et al (org.). **Fauna da Floresta Nacional de Carajás**: estudos sobre vertebrados terrestres. São Paulo: Nitro Imagens. 234 p. 2012.

McNELLY, J. A. et al. **Conserving the World’s Biological Diversity**. IUCN, Gland, Switzerland; WRI, CI, WWF-US, and the World Bank, Washington D.C. 1990.

MENDONÇA, R. et al. Flora vascular do Cerrado. In: S. Sano & S. Almeida (eds.). **Cerrado. Ambiente e flora**. 288-556. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa - Cerrados, Planaltina, Brasil. 1998.

METZGER, J. P. O que é ecologia de paisagens? **Biota Neotropica**, v. 1, n. 1 e 2. 2001.

MILLER, M. P. **Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA)**, ver. 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular populations genetic data. 1997. Software

distribuído pelo autor. Acessado em 05 de Fevereiro, 2013. <
http://www.marksgeneticsoftware.net/_vti_bin/shtml.exe/tfpga.htm>

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade Global**. Disponível em: <
<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-global/impactos>>. Acessado em: 22
junho/2012.

MORALES, M. et al. Chromosome studies in southern species of *Mimosa* (Fabaceae, Mimosoideae) and their taxonomic and evolutionary inferences. **Plant Systematic and Evolution**, Vienna, v. 300, p. 803-817. 2014.

MORGANTE, M.; OLIVIERE, A.M. PCR-Amplified microsatellites as markers in plant genetics. **Plant Journal**, Malden, v.3, p.175-182. 1993.

MÖRNER, N-A; ROSSETI, D.; TOLEDO, P.M. **The amazonian rainforest only some 6-5 million years old**. In: VIEIRA, I. C. G. et al (Orgs). Diversidade Biológica e Cultural da Amazônia. Belém: Museu Paraense Emilio Goeldi. p 3-18, 2001.

MURAWSKI, D.A.; GUNATILLEKE, I.A.U.N.; BAWA, K.S. The effects of selective logging on inbreeding in *Shorea megistophylla* (Dipterocarpaceae) from Sri Lanka. **Conservation Biology**, Malden, v.8, p.997-1002. 1994.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p.853-858. 2000.

NAVASCUÉS, M.; EMERSON, B.C. Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy. **Molecular Ecology**, Hoboken, v.14, p.1333-1341, 2005.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, Chicago, v.106 (949), p.283-292. 1972.

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

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia University Press, New York, New York, USA. 512p. 1987.

NUNES, J. A. **Florística, estrutura e relações solo-vegetação em gradiente fitofisionômico sobre canga, na Serra Sul, FLONA de Carajás – Pará**. 2009. Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. 101 p. 2009.

OLIVEIRA, A. N.; AMARAL, I. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 34, p. 21-34. 2004.

PALMER, J. D. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. **The American Naturalist**, Chicago, v.130 (Supplement), p.6-29. 1987.

PARDO, C.; CUBAS, P.; TAHIRI, H. Genetic variation and phylogeography of *Stauracanthus* (Fabaceae, Genisteae) from the Iberian Peninsula and Northern Morocco

assessed by chloroplast microsatellite (cpSSR) markers. **American Journal of Botany**, St. Louis, v.95, p.98-109. 2008.

PARKER, P.G et al. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, Washington, v.79(2), p.361–382. 1998.

PENNINGTON, R.T.; LEWIS, G.P.; RATTER, J.A. **An overview of the plant diversity, biogeography and conservation of Neotropical Savannas and Seasonally Dry Forests**. In: Pennington, R.T., Lewis, G. P. & Ratter, J. A. (eds). Boca Raton: CRC Press, p. 1-30. 2006.

PINHEIRO, F. et al. Chloroplast microsatellite markers for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*, na cross-amplification in other Laeliinae species (Orchidaceae). **Conservation Genetic Resources**, Dordrecht, v.1, p.505-511. 2009.

PINHEIRO, F. et al. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. **Journal of Biogeography**, Malden, v. 38, p. 1923-1935. 2011.

POREMBSKI, S. et al. Vegetation of rock outcrops in Guinea: granite inselbergs, sandstone table mountains, and ferricretes – remarks on species numbers and endemism. **Flora**, Amsterdam, v.189, p.315-326. 1994.

PORTO, M. L.; SILVA, M. F. F. Tipos de vegetação metalófila em áreas da Serra de Carajás e Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v.3 (2), p.13-21. 1989.

POWELL, W. et al. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. **Current Biology**, Amsterdam, v.5, p.1023-1029. 1995.

PROVAN, J. et al. The use of uniparentally inherited simple sequence repeat markers in plant population studies and systematics. In: Hollingsworth, P. M., Bateman, R. M., Gornall, R. J. (eds.). **Molecular systematics and plant evolution**, London, Taylor & Francis, p.35-50. 1999.

PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P. M. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v.16, n.3, p.142-147. 2001.

RAO, V. R.; HODGKIN, T. Genetic diversity and utilization of plant genetic resources. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.68, p.1-19. 2002.

RATTER, J.A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J.F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of the 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, Edimburgo, v.60 (1), p.57-109. 2003.

RULL, V. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 26, p.508-513. 2011.

SALOMÃO, R.P.; SILVA, M.F.F.; ROSA, N.A. Inventário ecológico em floresta pluvial tropical de terra firme, Serra Norte, Carajás, Pará. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, série Botânica, v.4, p.1-46. 1988.

- SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, p.211-215. 1992.
- SCHLÖTTERER, C. Are microsatellites really simple sequences? **Current Biology**, Amsterdam, v.8, p.132-134. 1998.
- SEBASTIANI, F.; CARNEVALE, S.; VENDRAMIN, G. G. A new set of mono- and dinucleotide chloroplast microsatellites in Fagaceae. **Molecular Ecology Notes**, Hoboken, v.4, p.259-261. 2004
- SECCO, R.; MESQUITA, A. L. Notas sobre a vegetação de canga na Serra Norte. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**. Nova Série Botânica. Belém, v.59, p.1-13. 1983.
- SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, Malden, v.9, p.615–629. 2006.
- SERVANT, M. et al. Tropical Forest changes during the Late Quaternary in African and South American lowlands. **Global and Planetary Change**, Amsterdam, v.7, p.25-40. 1993.
- SILVA, M. F. F. Distribuição de metais pesados na vegetação metalófila de Carajás. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v.6 (1), p.107-122. 1992.
- SILVA, M. F. F.; SECCO, R. S.; LOBO, M. G. A. Aspectos ecológicos da vegetação rupestre da Serra dos Carajás, estado do Pará, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v.26, p.17-44. 1996.
- SIMON, M. F.; PROENÇA, C. Phylogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the Cerrado biome of Brazil: an indicator genus of high altitude centers of endemism? **Biological Conservation**, Amsterdam, v.96, p.279-296. 2000.
- SIMON, M. F. et al. The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): Toward a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, St. Louis, v.98(7), p.1201 – 1221. 2011.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele. **Genetics**, Bethesda, v.139, p.233-240. 1995.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; MILLIGAN, B. G. Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. In: **Molecular Systematics of Plants**, Soltis, P. S., Soltis, D. E., DOYLE, J. J. (Eds.), p. 117-150. 1992.
- SOULÉ, M.E. What is conservation biology? **BioScience**, Reston, v.35, p.727–734. 1985.
- SOUZA, S. A. C. D. **Avaliação de variabilidade genética em *Musa spp.* utilizando marcadores microssatélites**. 2002. Tese (Doutorado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 86 p. 2002.
- SPIELMAN, D.; BROOK, W. B.; FRANKHAM, R. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. **PNAS**, Washington, v.101, n.42, p.15261-15264. 2004.
- SWOFFORD, D.L.; OLSEN, G. J. **Phylogeny Reconstruction**. In: Hillis, D.M. and C.

- Moritz (eds). *Molecular Systematics*. Sinaur Associates Inc., Sunderland, p.411-501, 1990.
- TEIXEIRA, J. B. G.; BEISIEGEL, V. R. **Carajás: Geologia e Ocupação Humana**. Belém: Museu Paraense Emilio Goeldi. 470 p. 2006.
- TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. **Fundamentos em ecologia**. 3. Ed – Porto Alegre: Artmed. 576 p. 2010.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 22, p. 1193-1213. 2013.
- UEZU, A.; BEYER, D. D.; METZGER, J. P. Can agroforest woodlots work as stepping Stones for birds in the Atlantic Forest region? **Biodiversity and Conservation**, Dordrecht, v. 17, p. 1907-1922. 2008.
- UNIÃO INTERNACIONAL PARA A CONSERVAÇÃO DA NATUREZA (IUCN). **Biodiversity**. Disponível em: < <http://www.iucn.org/what/tpas/biodiversity/>>. Acessado em: 22 junho/2012.
- Van Der HAMMEN, T.; HOOGHIEMSTRA, H. Neogene and Quaternary history of vegetation, climate, and plant diversity in Amazonia. **Quaternary Science Reviews**, Amsterdam, v.19, p.725-742. 2000.
- VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. **Série Técnica IPEF**, v. 12, p. 25-42. 1998.
- WEISING, K.; GARDNER, R.C. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, Ottawa, v.42, p.9 – 19. 1999.
- WILSON, E. O. *Biodiversidade*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. 657 p. 1997.
- World Resources Institute (WRI). **A estratégia global da biodiversidade: diretrizes de ação para estudar, salvar e usar de maneira sustentável e justa a riqueza biótica da Terra**. WRI: IUCN. 232 p. 1992.
- WRIGHT, S. The genetic structure of populations. **Annals of Eugenics**, Malden, v.13, p.323-354. 1951.
- WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations**, Vol. IV. Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago. 1978.
- YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, 11, 413-418. 1996.

ANEXOS

ANEXO A. Extração de DNA dos tecidos foliares – Protocolo CTAB 2% (DOYLE & DOYLE, 1987) modificado por Ferreira & Grattapaglia (1998)

Materiais

- Um microtubo em U para cada amostra;
- 3 microtubos eppendorfs para cada amostra;
- Marcador permanente ponta fina;
- Tesoura;
- Pinça;
- *Beads* (1 pequena e 1 média por amostra);
- Imã;
- Macerador;
- Tubo Falcon;
- Banho-maria;
- Suporte para tubos no banho-maria;
- Raque para tubos;
- Centrífuga;
- Vortex;
- Pipeta;
- Ponteira.

Reagentes

- Tampão de extração CTAB 2X
- 2-β-mercaptoetanol (2μl/ml de CTAB 2%)
- Proteinase K (0,5mg/ml)
- CIA 24:1
- Isopropanol absoluto (100%)
- NaCl 2 M
- Etanol 70%
- Etanol absoluto (100%)
- Tampão TE (Tris-HCl 1 M pH 8,0; EDTA 0,5 M pH 8,0) + RNase (10μg/ml)

Método

- 01) Identificar tubos com fundo em U;
- 02) Pesar em torno de 40 mg de folha e cortá-las usando pinça e tesoura, previamente esterilizadas em pedaços bem pequenos, colocando cada amostra em um tubo U.
- 03) Colocar as *beads* (uma pequena e outra média) com auxílio de pinça nos tubos U e macerar o material por 2 minutos na frequência 30 (Retsch MM400).
- 04) Bater levemente os tubos U em uma superfície para que o material macerado acumulado nas tampas dos tubos se concentre no fundo do tubo e as *beads* possam ser mais facilmente retiradas;
- 05) Retirar as *beads* usando o imã;
- 06) Acrescentar a cada tubo U 700 μL de tampão de extração CTAB, previamente misturado com o 2-β-mercaptoetanol (2μl/ml de tampão CTAB) e com a proteinase K (0.5 mg/ml), pré-aquecidos por 10 min em tubo Falcon;

- 07) Incubar as amostras em banho-maria usando o suporte a 60 °C por 30 minutos e de 10 em 10 minutos inverter os tubos U para que a suspensão fique homogênea; retirar os tubos U do banho-maria e deixá-los esfriar na raque.
- 08) Fazer a primeira extração com CIA (24:1). Colocar 600 µl em cada tubo U e agitá-los por 5 minutos, invertendo-os;
- 09) Centrifugar as amostras a uma velocidade de 13000 rpm por 10 minutos;
- 10) Pipetar a fase superior (aquosa) para tubos eppendorf previamente identificados;
- 11) Repetir os passos 8, 9 e 10;
- 12) Adicionar 400 µL de isopropanol frio (-20 °C) aos tubos contendo a fase aquosa. Misturar devagar;
- 13) Incubar o material a uma temperatura de -20 °C durante 2 horas;
- 14) Centrifugar por 10 minutos a 7500 rpm;
- 15) Verificar aonde se encontra o *pellet* e retirar o excesso de isopropanol invertendo cuidadosamente os tubos em descarte na capela;
- 16) Acrescentar 1 mL de etanol 70%, deixando o *pellet* imerso por 10 minutos;
- 17) Retirar o etanol invertendo cuidadosamente o tubo;
- 18) Ressuspender o *pellet* em 500 µL de NaCl 2 M, no vortex.
- 19) Deixar o pellet ressuspensando até o dia seguinte a temperatura ambiente.
- 20) Vortexar.
- 21) Deixar pelo menos 30 minutos em geladeira a 4 °C;
- 22) Centrifugar por 10 minutos a 12000 rpm;
- 23) Recuperar o sobrenadante com cuidado, evitando puxar junto os polissacarídeos;
- 24) Reprecipitar com 400 µl por amostra de isopropanol frio (-20 °C) e misturar devagar.
- 25) Incubar em freezer a -20 °C por 30 minutos;
- 26) Centrifugar por 10 minutos a 7500 rpm;
- 27) Verificar aonde se encontra o *pellet* e retirar o excesso de isopropanol invertendo os tubos com cuidado;
- 28) Acrescentar 1 ml de etanol 70%, deixando o *pellet* imerso por 10 minutos;
- 29) Retirar o etanol invertendo com muito cuidado os tubos;
- 30) Repetir os passos 28 e 29;
- 31) Colocar 1 ml de etanol absoluto (100%) e deixar por 3 minutos;
- 32) Retirar o máximo de etanol possível e deixar secar na capela até o dia seguinte;
- 33) Ressuspender o pellet com 100 µl de tampão TE acrescido de RNase;
- 34) Incubar a 37 °C por 2 horas para digestão com a RNase. Vortexar de 30 em 30 minutos;
- 35) Armazenar o material extraído em *freezer* ou em geladeira, dependendo de quando será usado.