

Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas

**AVALIAÇÃO GENÉTICO-POPULACIONAL DE DUAS ESPÉCIES
PIONEIRAS EM ÁREAS DE RESTAURAÇÃO ECOLÓGICA NA FLORESTA
ATLÂNTICA**

Curitiba
2012

Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas

**AVALIAÇÃO GENÉTICO-POPULACIONAL DE DUAS ESPÉCIES
PIONEIRAS EM ÁREAS DE RESTAURAÇÃO ECOLÓGICA NA FLORESTA
ATLÂNTICA**

Ana Caroline Giordani
Orientadora: Prof^a. Dra. Valéria C. Muschner
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Márcia C. M. Marques

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ecologia e Conservação.

Curitiba

2012

1.1.1 Lar das Lembranças

Há algumas rosas na varanda do futuro
Onde moram as lembranças tuas dessa vida
Se não vê tão belas rosas em meio tantos e tamanhos espinhos
Olha para o quintal do passado
Tão sujo de folhas mal resolvidas
O que o passado tem de melhor carrega contigo
Na lapela a rosa do que tem aprendido
Ela tem pétalas de lindos sonhos
E um perfume doce de ter feito o prometido
E é tão pequena a borboleta visto o que se treme
E ali ela descansa sobre a rosa

Lembraí das borboletas quando a esperança se for
E lhe deixar nas frestas do portão o tormento
Lembraí que elas defrontam o furor do vento
Felizes para sentirem o perfume da flor

(Robson Vilalba)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Valéria C. Muschner, pela orientação, por ter permitido e acompanhado minha dupla jornada neste mestrado e no trabalho, e pela paciência em me inserir no mundo da genética molecular.

À minha co-orientadora, Prof.^a Márcia C. M. Marques, por me acolher no LEV e permitir que meu caminho para o mestrado se iniciasse mesmo antes de começar. Agradeço também a compreensão durante os longos meses de pesquisa no laboratório.

À toda a equipe da SPVS, que muito colaborou para que este trabalho se concretizasse. Aos guarda-parques, que sempre de bom humor acompanharam as coletas, em especial ao Carlinhos que ajudou no desenho amostral e Nerson pela engenhosidade ao coletar os guapuruvus mais inacessíveis.

Ao Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia e Prof. Walter Boeger, pela parceria nas análises laboratoriais. À Luciana Patella, pela prontidão e paciência ao me ajudar no laboratório.

Aos queridos amigos que conheci durante esta caminhada e que marcaram este período: Gabi, Carol Yumi, Fer Fernandes, Fer Cardoso, Felipe, Fabiano, Jana e demais colegas do mestrado.

À minha querida e dedicada “auxiliar” de laboratório, Suellen Giovanoni, que muito me ensinou na “arte melindrosa” do laboratório e tornou-se uma amiga!

À amiga inestimável de todas as horas: Jaque. Obrigada por toda amizade e compreensão durante os períodos de tensão! Pelos conselhos valiosos no laboratório, pelo tempo dedicado a esta dissertação, e todo companheirismo. Obrigada por todo o trabalho realizado na prorrogação da dissertação. OBRIGADA florzinha!!!

À minha família, mãe, pai e irmãs queridas por sempre me apoiarem e consolarem nos momentos de dificuldade. Obrigada pela minha formação e por me fazerem acreditar mais em mim mesma! Obrigada pelo amor e carinho. Amo vocês!

À minha querida irmã Rubia, por todo incentivo no decorrer desta longa jornada de aprendizado científico e pessoal e por me mostrar que era sim possível escolher dois caminhos desafiadores, por mais árduo que fosse o trabalho.

Ao meu eterno companheiro Robson, pela serenidade nos momentos difíceis, apoio e carinho e conselhos. Obrigada por me fazer refletir e crescer ao longo desta caminhada. Obrigada por toda paciência. Te amo!

As pessoas que possibilitaram que eu levasse este mestrado junto com o trabalho de bióloga na Prefeitura Municipal de Piraquara: Sandro Pires e Maraglai do Santos. Mara, obrigada pelo apoio e por defender a minha causa!

Ao CNPq pelo financiamento desta pesquisa.

RESUMO

Com a crescente demanda do campo da restauração ecológica, questões até então não discutidas vêm surgindo, tal como a importância da introdução da variabilidade genética em matrizes de sementes. Informações sobre a estrutura genética populacional e características ecológicas podem ajudar a definir as melhores matrizes para a coleta de sementes e assim garantir o sucesso de futuras áreas restauradas. Com a inserção de novos genótipos em áreas restauradas através das matrizes de sementes, evita-se a ausência de fluxo gênico e possíveis consequências genéticas como efeito gargalo de garrafa, deriva genética, perda de 'fitness', interrupção do sistema reprodutivo, entre outros. Assim, este estudo realizou uma avaliação genético-populacional de duas espécies arbóreas pioneiras (*Sapium glandulatum* e *Schizolobium parahyba*) para verificar a variabilidade genética destas espécies em áreas de regeneração natural, plantio e mata avançada. Utilizando o espaçador intergênico *trnS-trnG* do DNA de cloroplasto, avaliamos populações compostas por 27 indivíduos de *S. glandulatum* e 26 indivíduos de *S. parahyba*, distribuídos igualmente entre áreas de mata avançada, regeneração natural e plantio. Não houve variação na sequência de nucleotídeos nas duas espécies. Os resultados encontrados apontam para um possível efeito fundador nas áreas restauradas onde há dominância reprodutiva de poucos indivíduos. A formação histórica da Floresta Atlântica pode ser considerada como fator fundamental para entender a baixa diversidade genética encontrada em organismos da porção sul deste bioma. Estudos posteriores, com outros marcadores com taxas de mutação conhecidamente mais elevadas, além de um aumento do tamanho amostral, poderão detectar variabilidade nas populações estudadas.

Palavras-chave: variabilidade genética, restauração, regeneração natural, mata avançada.

ABSTRACT

With the growing demand in the field of ecological restoration, issues not previously discussed are emerging, such as the importance of introducing genetic variability in seed matrices. Information on the population genetic structure and ecological characteristics can help determine the best matrices for the collection of seeds and thus ensure the future success of restored areas. With the inclusion of new genotypes in restored areas through arrays of seeds avoids the lack of gene flow and genetic consequences as possible bottleneck effect, genetic drift, loss of 'fitness', disruption of the reproductive system, among others. Thus, this study conducted a population genetic evaluation of two pioneer tree species (*Sapium glandulatum* and *Schizolobium parahyba*) to determine the genetic variability of these species in areas of natural regeneration, planting and forest outpost. Using the intergenic spacer *trnS-trnG* chloroplast DNA, we evaluated populations composed of 27 individuals of *S. glandulatum* and 26 individuals of *S. parahyba* distributed equally among advanced forest areas, natural regeneration and planting. There was no variation in the nucleotide sequence in both species. The results point to a possible founder effect in the restored areas where there is dominance of a few reproductive individuals. The historical formation of the Atlantic Forest can be considered as fundamental to understanding the low genetic diversity of organisms found in the southern portion of this biome. Study later, with other markers with mutation rates higher knowingly, and an increased sample size, can detect variability in the populations studied.

Keywords: genetic variability, restoration, natural regeneration, forest advanced.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Localização da Reserva Natural do Rio Cachoeira e Reserva Natural Morro da Mina na Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba, litoral norte do Paraná. Fonte: Kauano, 2011. 21
- Figura 2: Aspectos das flores (A) e folhas (B) de *Sapium glandulatum*. Foto: A. C. Giordani. 23
- Figura 3: Aspectos de flores, frutos e sementes (A) e da floração (B) de *Schizolobium parahyba*. Foto: A. C. Giordani..... 24
- Figura 4: Mapa de localização dos indivíduos de *Schizolobium parahyba* em Mata Avançada (MA) na Reserva Natural do Rio Cachoeira, Antonina, Paraná. Apenas 15 pontos estão mostrados, pois nos pontos 1, 3, 5, 10 e 11 estão amostrados 2 indivíduos por ponto. 26
- Figura 5: Mapa de localização dos indivíduos de *Sapium glandulatum* (Leit) em áreas de Mata Avançada (MA), Regeneração Natural e Plantio e *Schizolobium parahyba* (Guap) em áreas de Regeneração Natural (RN) e Plantio (PL) na Reserva Natural Morro da Mina, Antonina, Paraná. Para *S. glandulatum* de MA foram amostrados cinco indivíduos por ponto. Para *S. glandulatum* de RN e PL foram amostrados seis indivíduos nos pontos 1 e 2 e oito indivíduos no ponto 3. Para *S. parahyba* de PL, foram amostrados dois indivíduos nos pontos 1, 2, 5, 7 e 9; e três indivíduos no ponto 6. Para *S. parahyba* de RN foram amostrados dois indivíduos nos pontos 3, 7, 8, 9 e 10; e três indivíduos nos pontos 1 e 2. 27
- Figura 6: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) segundo protocolo Roy et al. (1992) para indivíduos de *S. parahyba* amplificados com *primer trnS-trnG*. (25/08/2011). 30
- Figura 7: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) segundo protocolo Roy et al. (1992) para indivíduos de *S. glandulatum* e *S. parahyba* amplificados com *primer trnS-trnG*. (23/09/2011). 30
- Figura 8: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) segundo protocolo Doyle & Doyle (1990) para indivíduos de *S. glandulatum* amplificados com *primer trnS-trnG*. (04/01/2012). 31
- Figura 9: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) segundo protocolo Doyle & Doyle (1990) para indivíduos de *S. glandulatum* e *S. parahyba* amplificados com *primer trnS-trnG*. (14/06/2012). 31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR para <i>Sapium glandulatum</i> e <i>Schizolobium parahyba</i>	28
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Origem e evolução da Floresta Atlântica	12
1.2. Restauração.....	13
1.3. Genética de Paisagem.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Área de Estudo	20
3.2. Espécies estudadas.....	21
3.3. Coleta do material vegetal	24
3.4. Amplificação e sequenciamento do espaçador intergênico <i>trnS-trnG</i>	28
3.5. Análise das sequências de DNA	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

1.1. Origem e evolução da Floresta Atlântica

A Floresta Atlântica é um dos biomas mais diversos e ameaçados do mundo, que contempla quatro principais formações fitogeográficas - Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Decidual e Floresta Estacional Semidecidual - e ecossistemas associados, além de apresentar elevadas taxas de endemismo, o que a leva ao status de *hotspot* de diversidade (MYERS *et al.*, 2000). É uma das maiores florestas tropicais da América, sendo que sua fauna e flora incluem cerca de 1 a 8% das espécies mundiais (SILVA & CASTELETTI, 2003).

A região da Floresta Atlântica foi formada por atividades tectônicas no Terciário e mudanças no nível do mar no Quaternário que resultaram em complexa topografia, clima diversificado e gradientes ambientais ao longo de curtas distâncias (MARTINS & COUTINHO, 1981). Tais processos históricos podem explicar a formação da diversidade genética e de espécies deste bioma (MARTINS, 2011).

Alguns autores têm recorrido à Teoria dos Refúgios (HAFFER, 1969) para explicar a elevada diversidade de espécies encontrada na Floresta Atlântica (CARNAVAL & MORITIZ, 2008; THOMÉ *et al.*, 2010; MARTINS, 2011;). Originalmente proposta para a Floresta Amazônica, essa teoria sugere que a ocorrência de vários períodos climáticos secos durante o Pleistoceno e pós-Pleistoceno ocasionou a fragmentação da floresta em pequenas porções isoladas por trechos abertos de vegetação não florestal (HAFFER, 1969). Dentro dos remanescentes florestais formaram-se refúgios de habitat que permitiram que populações isoladas geograficamente divergissem formando novas linhagens (HAFFER, 1969). Brown & Ab'Saber (1979) propuseram que as áreas abertas dominaram também a paisagem da Floresta Atlântica durante o último máximo glacial. Evidências de paleoecologia, modelagem e filogeografia sugerem a existência de refúgios em mais áreas subtropicais (HUGALL *et al.*, 2002).

Recentemente, o uso de modelos paleoclimáticos aliados a registros palinológicos indicou a presença histórica de refúgios florestais na Floresta Atlântica e variação espacial na persistência das florestas durante o Pleistoceno (CARNAVAL & MORITIZ, 2008). Estes autores apontaram a existência de dois principais refúgios de floresta contínua ao longo da Floresta Atlântica: o de Pernambuco e o da Bahia – este

representando a maior área. As análises mostraram altas taxas de endemismo e elevada diversidade genética nas zonas de refúgio ditas estáveis e, em contrapartida, menor diversidade e menor grau de endemismo, além de assinatura molecular de expansão recente nas áreas instáveis, ditas áreas de contração e expansão da floresta além das condições climáticas inconstantes (CARNAVAL & MORITZ, 2008).

Posteriormente, Carnaval *et al.* (2009) indicaram a presença de um terceiro refúgio ao sul do Rio Doce, na porção sul da Floresta Atlântica: o refúgio de São Paulo. Nesta porção florestal as condições climáticas não suportavam grandes manchas de floresta contínua, apresentando maior instabilidade e menor diversidade genética e, portanto, a Floresta Atlântica foi fragmentada em várias pequenas manchas na parte sul (CARNAVAL *et al.*, 2009). Assim, os efeitos das flutuações climáticas e o impacto das fases áridas do Pleistoceno foram maiores na porção sul do bioma, quando comparados com a porção norte (POR, 1992 *apud* CARNAVAL & MORITZ, 2008). No entanto, sugere-se que a Floresta Atlântica foi capaz de manter um grau razoável de continuidade durante esses acontecimentos climáticos, graças à complexa topografia da região e do potencial de migração vertical (POR, 1992 *apud* CARNAVAL & MORITZ, 2008).

Embora a Floresta Atlântica apresente historicamente evidências de fragmentação natural, a fragmentação antrópica mostrou-se determinante para o atual estado de devastação deste ecossistema. Devido a séculos de perturbação, este bioma foi reduzido a 300 mil quilômetros quadrados de área florestal altamente fragmentada (MMA, 2009), resultando em porcentagens entre 11 e 16% de mata remanescente no país, incluindo fragmentos menores que 100 hectares e florestas secundárias e intermediárias (RIBEIRO *et al.*, 2009). No Paraná os remanescentes de Floresta Atlântica chegam a 7% da floresta original (SPVS, 2006).

1.2 Restauração

Em um cenário atual de altas taxas de fragmentação e desmatamento, práticas que recuperam áreas perturbadas são essenciais para a manutenção das populações. Para reverter às tendências de degradação ambiental, os esforços para restaurar áreas

degradadas têm aumentado em nível global (ANDERSON, 1995; RODRIGUES *et al.*, 2009). Em sua essência, a restauração ecológica se define pelo conjunto de atividades que alteram permanentemente ecossistemas degradados com o objetivo de alcançar uma série de atributos desejáveis, como composição de espécies nativas ou funções ecossistêmicas, representando a primeira opção para aumentar os níveis de biodiversidade em áreas degradadas (BRUDVIG, 2011). Assim, a restauração desempenha papel chave para a conservação de biomas degradados à medida que retarda a degradação das florestas e auxilia na manutenção da biodiversidade nos remanescentes florestais (CHAZDON, 2008). Visto que várias paisagens tropicais têm ultrapassado o limite de percolação, e que a restauração ecológica não só minimiza os efeitos da degradação ambiental, mas também colabora para a conservação de biodiversidade, é urgente ampliar projetos de restauração em fragmentos florestais tropicais (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Desde o início do século XIX o intenso desmatamento da Floresta Atlântica já despertava cuidados (DEAN, 1995). O primeiro projeto de restauração no Brasil ocorreu no Rio de Janeiro durante a crise de abastecimento de água relacionado à conversão de áreas florestais em plantações de café (CORLETT, 1999). Para solucionar o problema, o Imperador mandou plantar milhares de mudas de plantas nativas e exóticas nas colinas da cidade (CORLETT, 1999). Desde esta iniciativa pioneira, a restauração ganhou perspectivas internacionais, com o avanço de técnicas novas, o surgimento de revistas especializadas e o aumento de publicações científicas (YOUNG *et al.*, 2005; HOBBS & CRAMER, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2009).

No Brasil muitos trabalhos têm avaliado diferentes métodos de restauração e rendido publicações neste campo (FERRETTI & BRITZ, 2006; LINDNER, 2009; BRUEL *et al.*, 2010; GANADE *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2011). Rodrigues *et al.* (2011) desenvolveram um programa de restauração ecológica em matas ciliares no Estado de São Paulo que aplicou diferentes técnicas de restauração a distintos padrões de uso da terra, em média e grande escala. Além da restauração de matas ciliares e corredores migratórios para a fauna, parte dos esforços para garantir o sucesso das florestas restauradas incluiu o projeto Árvore Mãe que buscou e marcou a localização de 15.000 árvores de 800 espécies diferentes para apoiar programas de coleta de sementes e garantir a diversidade genética adequada nas florestas replantadas (WUETHRICH, 2007). Rodrigues *et al.* (2011) concluíram que o sucesso de projetos de

restauração em grande escala depende diretamente de estratégias que integrem aspectos políticos, sócio-econômicos e metodológicos.

A restauração da Floresta Atlântica pode ser dividida em cinco fases definidas arbitrariamente e de forma simplificada que perpassam desde as técnicas mais rudimentares até os avanços científicos da restauração ecológica (RODRIGUES *et al.*, 2009). Na fase um, os primeiros projetos visavam apenas à proteção dos recursos naturais com os chamados plantios de proteção, desconsiderando as diversidades funcional e florestal e utilizando espécies exóticas e nativas. As três fases posteriores incluem o avanço do campo científico e os projetos de restauração começam a integrar conhecimentos ecológicos, tais como sucessão florestal, grupos ecológicos, uso de espécies nativas, diversidades funcional e de espécies (RODRIGUES *et al.*, 2009). A última fase, que compreende o período de 2003 até a atualidade, abrange projetos de restauração que focam em elementos para a manutenção e evolução dos ecossistemas florestais: diversidades florística e genética (LESICA & ALLENDORF, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2009;).

Práticas de restauração devem incorporar a recuperação das diversidades florística, genética e de processos ecológicos que garantam a resistência/resiliência do ecossistema florestal (LIMA & RODRIGUES, 2009). Áreas restauradas podem representar manchas que contribuem para processos de dispersão e polinização e, conseqüentemente, para o fluxo gênico, de modo que, populações de fragmentos isolados podem se conectar através de áreas de reflorestamento (plantio). Pequenos fragmentos de vegetação remanescente e de sucessão secundária – áreas em regeneração natural – também podem servir de corredores contribuindo para a conectividade (ARROYO-RODRIGUES & MANDUJANO, 2006). Estas ideias tornaram-se centrais para práticas de conservação, causando alteração do foco local para a escala de paisagem (MONTROYA *et al.*, 2008).

Muitas são as ferramentas que enriquecem a restauração de áreas perturbadas, entre as quais pode-se citar as técnicas de: plantio em ilhas de diversidade, manejo de espécies exóticas e transposição de solo (REIS *et al.*, 2003), que auxiliam na recuperação da diversidade e de processos funcionais do ecossistema. Neste contexto, a variabilidade genética das espécies inseridas, representada por matrizes distintas de obtenção de sementes, é decisiva para o sucesso de ações de restauração (LIMA & RODRIGUES, 2009). Diversos trabalhos têm ressaltado a importância da escolha dos

locais de coleta de sementes utilizadas no plantio para a restauração (O'BRIEN *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2008; LIMA & RODRIGUES, 2009; SINCLAIR & HOBBS, 2009).

O uso de sementes de fontes locais para a restauração garante a conservação de genótipos localmente adaptados às condições prevalecentes (O'BRIEN & KRAUSS, 2010), considerando que a maioria das espécies apresenta uma estruturação da diferenciação genética dentro de sua distribuição (O'BRIEN *et al.*, 2007). A adaptação local de genótipos tem sido demonstrada experimentalmente para muitas espécies sob o que se denomina 'home site advantage', onde as plantas crescidas no seu sítio de origem apresentam melhor desempenho do que aquelas translocadas para ou a partir de locais mais distantes (MCKAY *et al.*, 2001; HUFFORD & MAZER, 2003). Além disso, a coleta de sementes de origem local é frequentemente estimulada para a restauração de populações de plantas a fim de prevenir a depressão exogâmica e conservar genótipos locais (JONES *et al.*, 2001; SACKVILLE HAMILTON, 2001). Da perspectiva genética, a manutenção de genótipos localmente adaptados em populações restauradas deve ser equilibrada com a necessidade de assegurar que a população abrigue variabilidade genética suficiente para facilitar a evolução adaptativa e persistência em longo prazo (MONTALVO & ELLSTRAND, 2000). Portanto, estudos de genética de paisagem podem ser um diferencial para a recuperação e a conservação da biodiversidade.

1.3 Genética de Paisagem

A genética de paisagem pode ser definida como os estudos que quantificam explicitamente os efeitos da composição da paisagem, a configuração e qualidade da matriz no fluxo gênico e variação genética espacial (STORFER *et al.*, 2007). Ela combina marcadores moleculares de alta resolução com análise de dados espaciais que têm sido particularmente relevantes quando se avalia a influência das características de paisagem na variabilidade genética e na identificação de barreiras para o fluxo gênico (LAVANDERO *et al.*, 2009). Tais caracterizações podem auxiliar na previsão de alternativas de manejo genético e conectividade populacional e na identificação de potenciais corredores biológicos para auxiliar no design de uma reserva (STORFER *et al.*, 2007).

Entender os efeitos da paisagem na conectividade genética esclarece alguns processos biológicos tais como a dinâmica de metapopulações, a especiação e a distribuição das espécies. Um exemplo sobre esta aplicação prática de análises genéticas, processos ecológicos e paisagem é o trabalho de Sezen *et al.* (2005). Numa análise sobre grau de parentesco de uma espécie de palmeira (*Iriarteia deltoidea*) entre áreas de floresta em regeneração e áreas de floresta em estágio avançado na Costa Rica, os autores demonstraram que, apesar do fluxo gênico contínuo entre as manchas, foi possível detectar efeito fundador e baixa variabilidade genética na área regenerada. Outro exemplo de uso da genética de paisagem é a avaliação genética-espacial de *Dipteryx alata*, uma espécie de leguminosa do Cerrado brasileiro (SOARES *et al.*, 2008). Através do uso de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), análises de padrões genéticos e de estrutura espacial populacional indicaram quais populações deveriam ser escolhidas para manejo e conservação (SOARES *et al.*, 2008).

Todavia, a importância da estrutura genética é raramente considerada nas práticas de restauração, apesar de seu papel ser bem reconhecido na persistência dos ecossistemas. Assim, apesar do novo Código Florestal Brasileiro (Lei Federal nº 12.651, 25/05/2012) incluir ferramentas e meios que assegurem a restauração de áreas degradadas - como linhas de financiamento para iniciativas de preservação voluntária; destinação de recursos arrecadados com a cobrança pelo uso da água para a manutenção, recuperação ou recomposição das Áreas de Preservação Permanente – há carência de regulamentação específica sobre a restauração da diversidade genética. Mesmo o Estado de São Paulo, que apresenta uma legislação específica para restauração, não apresenta uma instrução que pondere especificamente a questão da diversidade genética para o sucesso da restauração (RODRIGUES *et al.*, 2009; DURIGAN *et al.*, 2010). Nesta resolução paulista (SMA nº 8/2008) é determinada a necessidade de se realizar plantios heterogêneos, mas desconsidera que as dificuldades de obtenção/produção de mudas podem inserir baixa diversidade genética nos plantios ou até mesmo contaminação genética por mudas oriundas de regiões ecológicas distintas (DURIGAN *et al.*, 2010).

A manutenção da diversidade genética das espécies utilizadas nos reflorestamentos pode garantir uma melhor recuperação do ecossistema, aumentando a resistência e resiliência do mesmo. Deste modo, para o sucesso da restauração, características genéticas apropriadas dependem do grau e escala de distúrbio (REUSCH

et al., 2005). Por exemplo, onde o grau de distúrbio é baixo, espécies tolerantes à sombra são mais adequadas para a restauração (LESICA & ALLENDORF, 1999). Por outro lado, em sítios de grau elevado de perturbação – onde as espécies clímax não estão bem adaptadas às mudanças ambientais – misturas de genótipos de espécies iniciais representam a melhor estratégia para a restauração (LIU *et al.*, 2008).

Um fator importante da genética de paisagem é o monitoramento/avaliação de movimentos de dispersão através de marcadores genéticos. Para inferir fluxo gênico e padrões de estrutura genética, é necessário primeiramente monitorar marcadores genéticos que permitam diferenciar movimentos de sementes e de pólen (ODDOU-MURATORIO *et al.*, 2001). Marcadores nucleares, que apresentam herança biparental, rastreiam tanto o fluxo da dispersão de sementes quanto o fluxo de pólen, enquanto marcadores organelares, geralmente com herança uniparental, acompanham o fluxo de pólen (quando apresentam herança paterna) ou o fluxo da dispersão de sementes - quando apresentam herança materna (BIRKY, 1989; PETIT *et al.*, 2005).

Genomas de cloroplasto apresentam geralmente herança materna em angiospermas e paterna em gimnospermas (NEALE & SEDEROFF, 1989). Como consequência destes modos distintos de heranças, é sabido que a extensão do fluxo gênico entre populações irá diferir entre marcadores de herança biparental, paterna e materna (ENNOS, 1994). Portanto, nas últimas décadas, pesquisas com DNA de cloroplasto puderam ser comparadas com resultados obtidos de marcadores nucleares para contrastar estimativas de fluxo gênico mediado por pólen ou sementes sobre vários modelos de estrutura de populações (ODDOU-MURATORIO *et al.*, 2001).

Os espaçadores intergênicos do DNA plastidial são bastante utilizados em estudos de genética de populações e caracterizam-se pela frequente herança uniparental, que é uma vantagem destes marcadores para a avaliação diferencial do fluxo de pólen e sementes (BIRKY, 1995; KORPELAINEN, 2004). Além disso, o sequenciamento de regiões plastidiais e nucleares são exemplos de marcadores bastante utilizados para análises de diversidade genética e variação adaptativa (FEHLBER & RANKER, 2009; TURCHETTO-ZOLET, 2009).

2. OBJETIVOS

Neste estudo foi realizado uma avaliação genético-populacional de duas espécies arbóreas pioneiras da Floresta Atlântica (*Sapium glandulatum* e *Schizolobium parahyba*) em duas áreas preservadas do litoral do Paraná, para 1) verificar se há variabilidade genética destas espécies em áreas de regeneração natural, plantio e mata avançada; 2) gerar subsídios para planos de manejo e restauração florestal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de Estudo

O estudo foi realizado na Reserva Natural do Rio Cachoeira (RNRC) – 25°19'15''S e 45°42'24''W - e Reserva Natural Morro da Mina (RNMM) – 25°21'16''S e 48°46'17''W - com áreas de 8.600 e 3.300 ha, respectivamente. Ambas as reservas estão localizadas no município de Antonina, litoral norte do Estado do Paraná (Figura 1), inseridas na Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaraqueçaba e pertencem à Sociedade de Pesquisa em Vida Selvagem e Educação Ambiental (SPVS). As reservas apresentam áreas degradadas (pastagens e agricultura) e ambientes naturais, com florestas primárias e secundárias pouco alteradas. Em sua análise sobre a estrutura de paisagem da APA de Guaraqueçaba, Kauano *et al.* (2012), concluíram que atualmente 68% da área estão cobertas por florestas em estágios avançados de desenvolvimento.

As reservas possuem em seus limites morros pertencentes à cadeia montanhosa da Serra do Mar com altitudes que chegam a mais de 600 metros e planícies formadas pelos sedimentos formados pela erosão milenar da Serra do Mar e pela deposição marinha. Os tipos de vegetação predominantes nessa área são as Florestas Ombrófilas Densas das Terras Baixas e Aluvial (planícies), Florestas Ombrófilas Densas Submontana e Montana (encostas de morros), Formações Pioneiras com Influência Flúvio-marinha (manguezais) e com Influência Fluvial (pântanos, várzeas e banhados de água doce) e Vegetações Secundárias (capoeirinhas, capoeiras, capoeirões e florestas regeneradas após a derrubada da floresta original). Há uma parcela de áreas fortemente alteradas por ação antrópica para exploração seletiva de madeira e desmatamento a fim de atender a agricultura, a criação de búfalos e áreas de pastagem a partir da década de 70 (FERRETTI & BRITTEZ, 2005; FERRETTI & BRITTEZ, 2006; BRUEL *et al.*, 2010).

A alteração da paisagem para a recuperação das áreas degradadas nas RNRC e RNMM teve início em 1999, com projetos de restauração ecológica por meio de técnicas de plantio e regeneração natural, afim de reestabelecer a biodiversidade do bioma local e realizar sequestro de carbono através da reabilitação das florestas (FERRETTI & BRITTEZ, 2006). Como resultado do projeto, mais de 2000 ha de áreas degradadas estão, atualmente, em estágio inicial de recuperação através da aplicação de

diferentes técnicas de restauração (regeneração natural, plantio de mudas e enriquecimento de capoeiras), com diferentes idades (de dois a dez anos) e diferentes características de relevo, solo e manejo (FERRETI & BRITZ, 2006; BRUEL *et al.*, 2010).

O clima predominante na região, segundo a classificação de Köppen, é o subtropical úmido mesotérmico (Cfa) sem estação seca definida e isento de geadas nas regiões serranas e chuvoso tropical sempre úmido Af(t) na planície. Devido ao efeito orográfico e complexa topografia, há variações significativas no regime de chuvas desta região (FERRETI & BRITZ, 2006). A precipitação média anual na parte frontal da região serrana permanece em torno de 2000 e 2500 milímetros (mm) e valores mais baixos – em torno de 1800 mm – são observados nas regiões planas (SUDERSA, 1998).

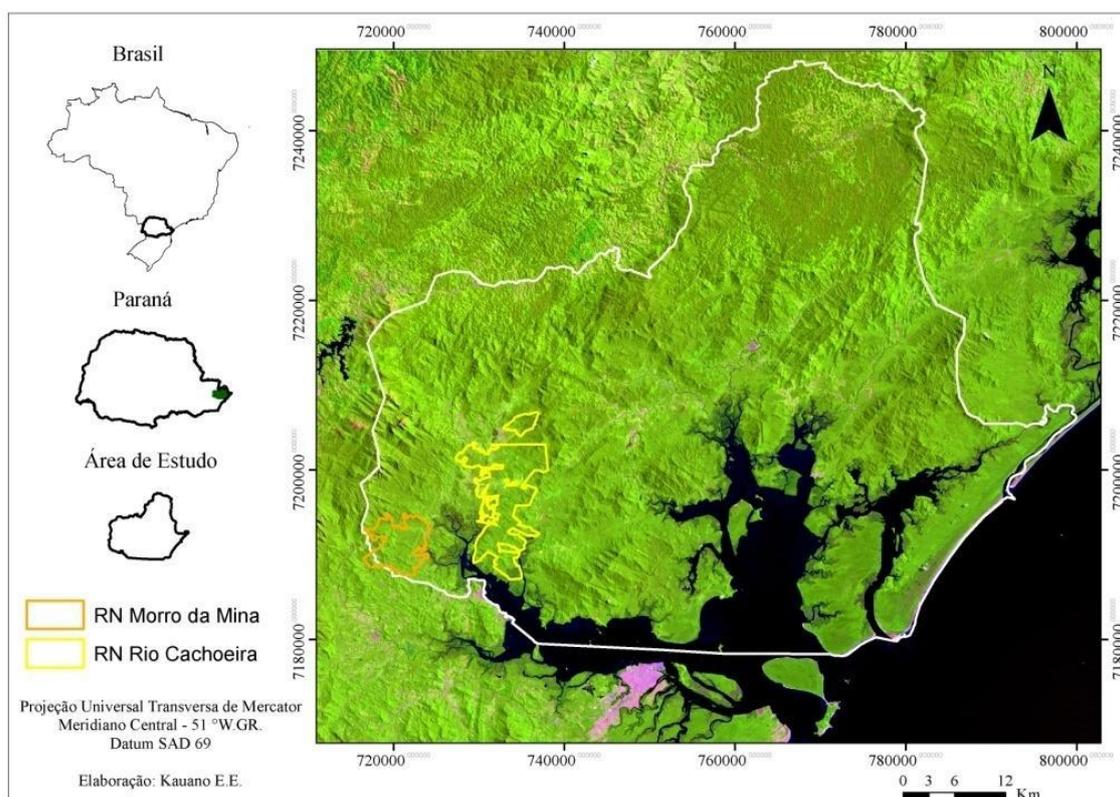


Figura 1: Localização da Reserva Natural do Rio Cachoeira e Reserva Natural Morro da Mina na Área de Proteção Ambiental de Guaraqueçaba, litoral norte do Paraná. Fonte: Kauano, 2011.

3.2. Espécies estudadas

Foram selecionadas duas espécies arbóreas de crescimento rápido que ocorrem tanto em áreas de plantio, quanto regeneração natural e mata avançada: *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax, pertencente à Família Euphorbiaceae, e *Schizolobium*

parahyba (Veel) S.F. Blake, Família Fabaceae. As espécies foram escolhidas de modo a contemplar duas síndromes de dispersão contrastantes, zoocoria (*S. glandulatum*) e anemocoria (*S. parahyba*). Ambas as famílias destas espécies apresentam herança do DNA de cloroplasto (cpDNA) do tipo maternal (CORRIVEAU & COLEMAN, 1988). As mudas introduzidas no plantio nas Reservas Naturais do Rio Cachoeira e Morro da Mina são produzidas a partir de sementes de indivíduos reprodutivos presentes nas próprias reservas.

Sapium glandulatum, popularmente conhecida como leiteiro ou pau-de-leite (Figuras 2A e 2B) ocorre no Brasil desde o Estado do Rio Grande do Sul até Minas Gerais, em biomas variados como os campos sulinos e florestas estacionais, sendo característica da Floresta Ombrófila Mista (SANCHOTENE, 1985). *S. glandulatum* também pode ser encontrado no Paraguai, nordeste da Argentina e Uruguai (SANCHOTENE, 1985; LORENZI, 1992). Esta espécie atinge até 18 m de altura e 35 cm de diâmetro e sua produção de látex é abundante (FERREIRA, 2008). É uma espécie nativa altamente indicada para a recuperação de áreas degradadas devido, principalmente, ao seu caráter pioneiro/colonizador que facilita a entrada de outras espécies em áreas perturbadas. É uma planta decídua e heliófila comum em beira de estradas, cursos d'água e encostas de barrancos, com intensa ornitocoria, rápido crescimento e resistência ao frio e à seca (SANCHOTENE, 1985; PALAZZO JUNIOR & BOTH, 1993; FERREIRA *et al.*, 2001).

A floração ocorre de outubro a janeiro e a frutificação de janeiro a março. Possui baixa produção de sementes devido à espécie apresentar um maior número de flores masculinas (FERREIRA, 2010). *S. glandulatum* não tem uma síndrome de polinização definida o que a classifica como não especializada (YAMAMOTO *et al.*, 2007). As folhas desta espécie são alternas e as flores estão reunidas em inflorescências de 10 cm não muito vistosas.

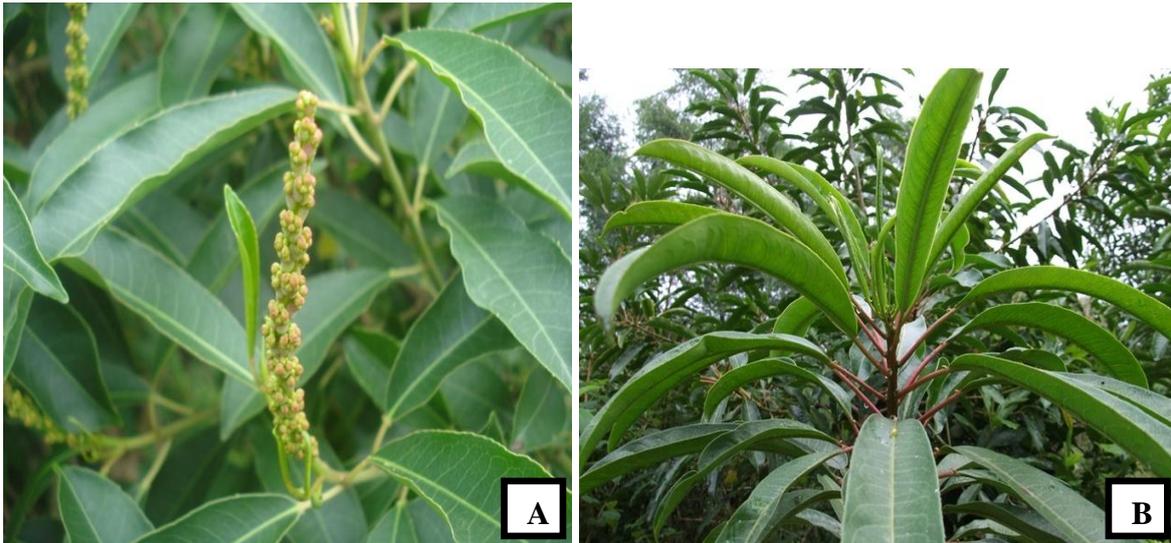


Figura 2: Aspectos das flores (A) e folhas (B) de *Sapium glandulatum*. Foto: A. C. Giordani.

Schizolobium parahyba é conhecida popularmente como guapuruvu (Figuras 3A e 3B). Sua distribuição natural é irregular e descontínua, abrangendo a região litorânea do Brasil, na Floresta Ombrófila Densa Atlântica dos Estados do Rio Grande do Sul até a Bahia, a América Central e parte da região Andina (AGUIAR SOBRINHO, 1996). Ocorre em áreas com precipitação pluvial média anual variando de 1.100 a 2.400 mm e temperatura média anual de 18,8 a 24,3° C, em tipos climáticos tropical, subtropical de altitude e subtropical úmido (CARVALHO, 2003). *S. parahyba* não tolera baixas temperaturas, mas pode ocorrer numa variação altitudinal de 10 a 900 m. É uma árvore de rápido crescimento, podendo atingir até dez metros de altura no período de dois anos (PIETROBOM & OLIVEIRA, 2004), razão pela qual é bastante utilizada em projetos de recuperação de áreas degradadas, especialmente em florestas de galeria, em locais não sujeitos à inundação (FREIRE, 2005). Sua distribuição dentro da mata é irregular podendo ocorrer em grupos de várias árvores ou individualmente nos estágios sucessionais (TURCHETTO-ZOLET, 2009).

Schizolobium parahyba é uma árvore caducifólia, que possui grandes flores de coloração amarela, hermafroditas, com fruto tipo sâmara (LORENZI, 1992). Tem como principais polinizadores abelhas pequenas tais como *Apis mellifera*, *Friesella schrottkyi*, *Plebeia remota*, *Paratrigona subnuda*, *Tetragonisca angustula* e *Trigona spinipes* e grandes *Bombus morio* e *Bombus atratus* (MORELATTO, 1991; KUHLMANN & KUHN, 1947). A dispersão dos frutos alados se dá pelo vento (TURCHETTO-ZOLET, 2009). A floração ocorre de julho a dezembro e os frutos

amadurecem entre março e agosto. O início da floração e a frutificação acontecem quando as plantas atingem entre seis e oito anos de idade (TURCHETTO-ZOLET, 2009).



Figura 3: Aspectos de flores, frutos e sementes (A) e da floração (B) de *Schizolobium parahyba*. Foto: A. C. Giordani

3.3. Coleta do material vegetal

O material vegetal foi coletado em localidades distintas (Figuras 4 e 5): mata avançada, regeneração natural e plantio. Em cada área foram coletadas folhas de 20 indivíduos adultos, mapeados pelo sistema GPS, totalizando 60 indivíduos para cada espécie. Os indivíduos foram marcados, conforme suas ocorrências nas proximidades da trilha, sendo que suas distâncias variaram entre 20 e 500 m. A área de regeneração natural de *S. glandulatum* tem nove anos enquanto a área de plantio está com 8 anos. A área de regeneração natural de *S. parahyba* tem dez anos enquanto a área de plantio está com 8 anos.

As folhas foram primeiramente acondicionadas em sílica gel para desidratação e posteriormente foram maceradas com nitrogênio líquido em almofariz. Inicialmente a extração de DNA foi testada com o protocolo de Roy *et al.*(1992), todavia, os testes definitivos seguiram a técnica de Doyle & Doyle (1990, modificado). Cerca de 20 miligramas (mg) do extrato foram transferidos para um tubo de microcentrífuga, onde

foram adicionados 500 microlitros (μl) de tampão de extração [CTAB 2% (p/v); 2 μl de β -mercaptoetanol e 3 μl de Proteinase K (10mg/ml)]. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65° C por 30 minutos, sendo adicionado posteriormente 400 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e agitados em agitador Kline por 30 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 12.000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos à temperatura ambiente e cerca de 350 μL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos, sendo adicionado igual volume de isopropanol gelado. Após 24 h em freezer (-18°C), o material foi centrifugado por 20 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante descartado por inversão. O *pellet* que permaneceu na parede do tubo foi lavado com 400 μl de etanol 70% e submetido à secagem em temperatura ambiente por 20 minutos. Na etapa final, o *pellet* foi eluído em 200 μl de água ultra-pura estéril e 2 μl de RNase (10 mg/ml). O DNA foi então quantificado através de fluorectofotômetro (NanoDrop 3300).

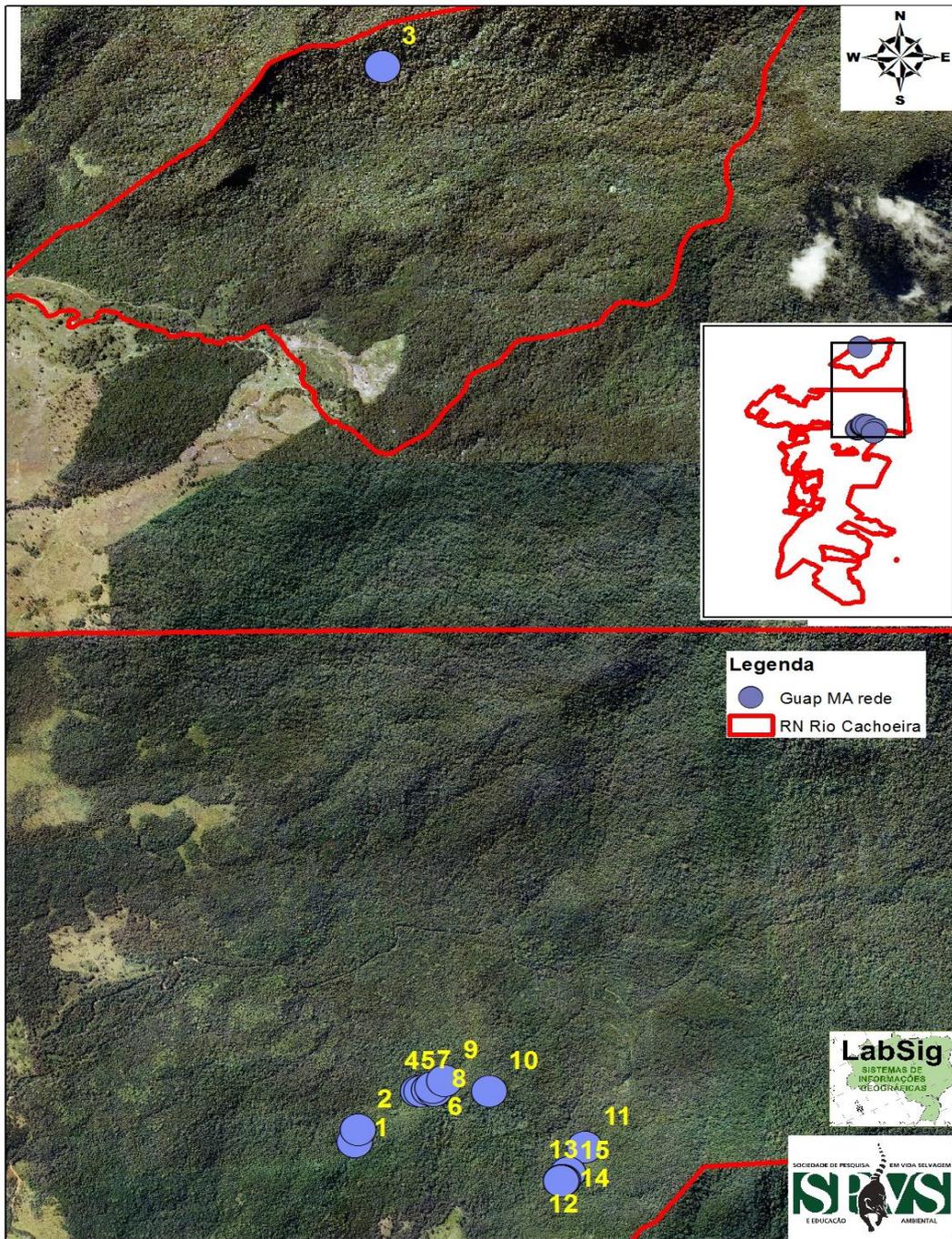


Figura 4: Mapa de localização dos indivíduos de *Schizolobium parahyba* em Mata Avançada (MA) na Reserva Natural do Rio Cachoeira, Antonina, Paraná. Apenas 15 pontos estão mostrados, pois nos pontos 1, 3, 5, 10 e 11 estão amostrados 2 indivíduos por ponto.

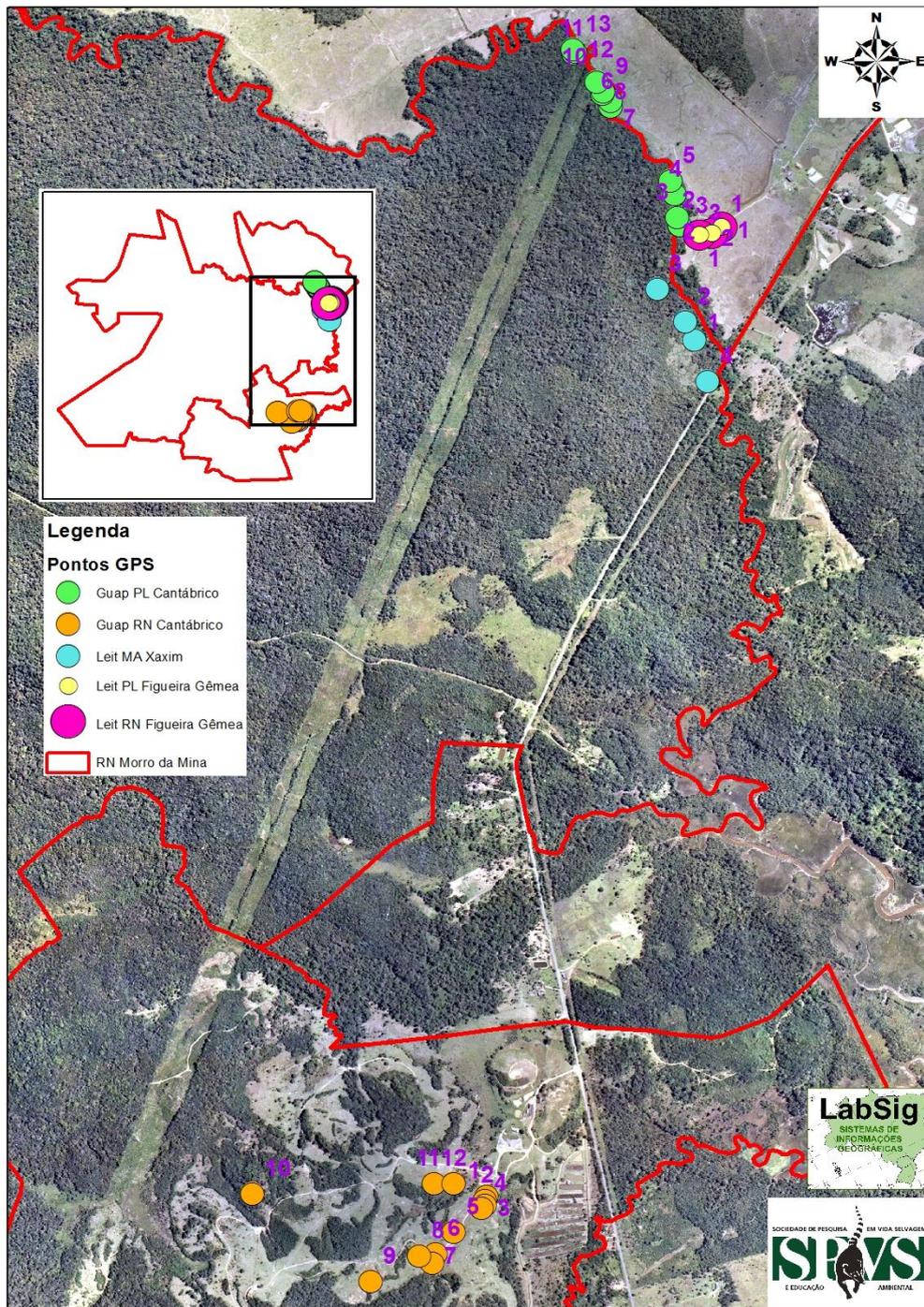


Figura 5: Mapa de localização dos indivíduos de *Sapium glandulatum* (Leit) em áreas de Mata Avançada (MA), Regeneração Natural e Plantio e *Schizolobium parahyba* (Guap) em áreas de Regeneração Natural (RN) e Plantio (PL) na Reserva Natural Morro da Mina, Antonina, Paraná. Para *S. glandulatum* de MA foram amostrados cinco indivíduos por ponto. Para *S. glandulatum* de RN e PL foram amostrados seis indivíduos nos pontos 1 e 2 e oito indivíduos no ponto 3. Para *S. parahyba* de PL, foram amostrados dois indivíduos nos pontos 1, 2, 5, 7 e 9; e três indivíduos no ponto 6. Para *S. parahyba* de RN foram amostrados dois indivíduos nos pontos 3, 7, 8, 9 e 10; e três indivíduos nos pontos 1 e 2.

3.4. Amplificação e sequenciamento do espaçador intergênico *trnS-trnG*

Para o presente estudo foi utilizado o espaçador intergênico *trnS-trnG* do DNA de cloroplasto (cpDNA) a partir de *primers* e protocolos específicos (SHAW *et al.*, 2005), através da reação da polimerase em cadeia (PCR – *polymerase chain reaction*). O espaçador intergênico *trnS-trnG* foi utilizado em diversos trabalhos com análises populacionais, mostrando-se variável (SMALL *et al.*, 2005; SHAW *et al.*, 2005; MILLER & SHAAL, 2005; WATANABE *et al.*, 2006), além de já ter sido utilizado em estudos com as famílias Fabaceae e Euphorbiaceae (ASIF *et al.*, 2010; OSKOU EIYAN *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2011).

O volume final da PCR foi de 25 µl com as concentrações dos reagentes discriminadas na Tabela 1. As reações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos com temperaturas de anelamento que variaram de 52°C a 56°C por 1min, extensão a 72°C por 1 min e 30 s e a extensão final a 72°C por 7 min.

TABELA 1 – Concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR para *Sapium glandulatum* e *Schizolobium parahyba*.

	dNTP (mM)	Buffer (mM)	trnS/trnG (pmoles/µl)	MgCl ₂ (mM)	BSA (mg/ml)	Taq platinum (U)	DNA (ng)	T de anelamento (°C)
<i>S. glandulatum</i>	0,25	0,25	2,5	2,0	0,25	1	25	56
<i>S. parahyba</i>	0,25	0,25	2,5	3,0	0,25	1	50	52

A amplificação dos produtos da PCR foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão 1X TRIS/Borato/EDTA (TBE) a 120 Volts, corado com brometo de etídeo e fotodocumentados em transiluminador de luz ultravioleta.

As amostras foram purificadas com polietilenoglicol (PEG 20%) segundo o protocolo de Dunn & Blattner (1986, modificado) para posterior sequenciamento dos

fragmentos amplificados utilizando os mesmos *primers* da PCR. O sequenciamento foi realizado em Sequenciador automático *ABI 3130 – Genetic analyzer*, seguindo os protocolos que acompanham o equipamento.

3.5. Análise das sequências de DNA

As sequências obtidas para o espaçador intergênico do cp DNA *trnS-trnG* foram corrigidas e alinhadas no programa Geneious 5.6 (<http://www.geneious.com>).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes para extração de DNA ocorreram com dois protocolos distintos: primeiramente com Roy *et al.* (1992) e em um segundo momento com Doyle & Doyle (1990, modificado). O método de Roy *et al.* (1992) não demonstrou eficiência no processo de extração das espécies. A eletroforese em gel após a PCR indicou baixa qualidade do DNA através desse método conforme figuras 6 e 7 abaixo.

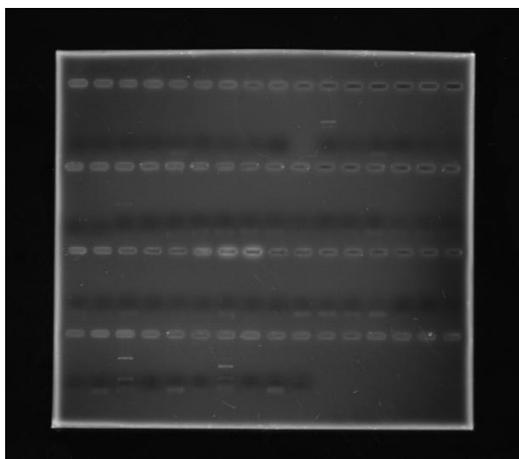


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) segundo protocolo Roy et al. (1992) para indivíduos de *S. parahyba* amplificados com primer *trnS-trnG*. (25/08/2011).

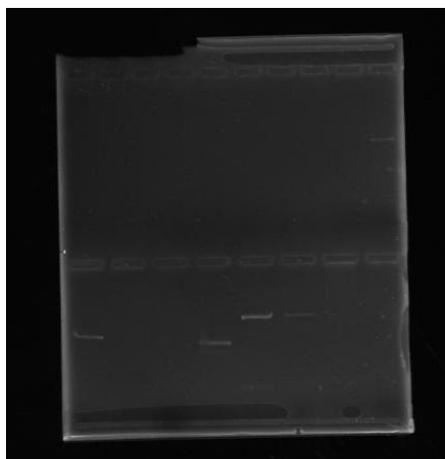


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) segundo protocolo Roy et al. (1992) para indivíduos de *S. glandulatum* e *S. parahyba* amplificados com primer *trnS-trnG*. (23/09/2011).

Por outro lado, a extração pelo método de Doyle & Doyle (1990, modificado) mostrou uma melhor qualidade do DNA conforme géis nas figuras 8 e 9. O uso de álcool isoamílico pode ter retirado mais compostos fenólicos das amostras que o uso de fenol sugerido no protocolo de Roy *et al.* (1992).

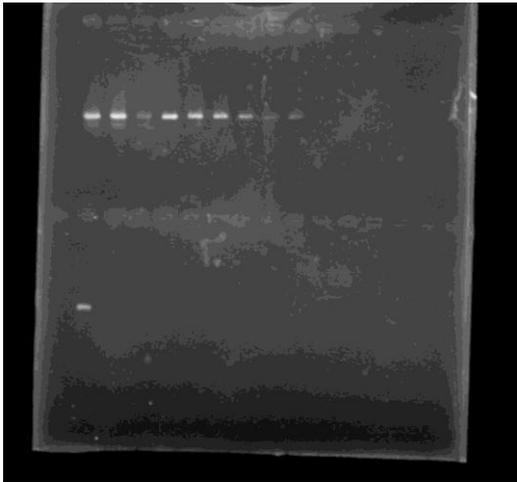


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) segundo protocolo Doyle & Doyle (1990) para indivíduos de *S. glandulatum* amplificados com primer *trnS-trnG*. (04/01/2012).

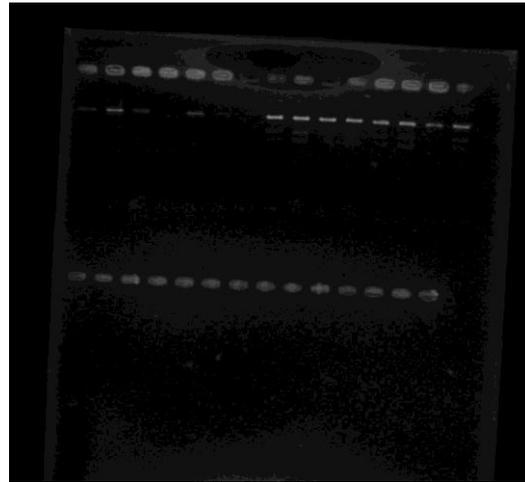


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) segundo protocolo Doyle & Doyle (1990) para indivíduos de *S. glandulatum* e *S. parahyba* amplificados com primer *trnS-trnG*. (14/06/2012).

Devido a problemas técnicos de amplificação das amostras por PCR, apenas 27 indivíduos de *S. glandulatum* - distribuídos entre Mata Avançada, Plantio e Regeneração Natural – e 26 indivíduos de *S. parahyba* (amostrados da mesma forma que *S. glandulatum*) foram sequenciados para o espaçador intergênico plastidial *trnS-trnG* (871 nucleotídeos para a primeira e 948 para a segunda espécie).

As análises moleculares das sequências do espaçador intergênico *trnS-trnG* do cpDNA não apresentaram variabilidade nucleotídica nos indivíduos analisados, independente da espécie e dos locais de coleta. Assim como *Dalbergia nigra* (RIBEIRO *et al.*, 2011) e *Dicksonia sellowiana* (SANTOS, 2011), espécies que ocorrem na Floresta Atlântica e que apresentaram baixa diversidade genética decorrente dos eventos de expansão e retração deste bioma, *Sapium glandulatum* e *Schizolobium parahyba* podem ter apresentado baixa diversidade pela mesma razão, considerando que possivelmente este resultado seja efeito do marcador utilizado e do tamanho amostral.

Os resultados encontrados neste trabalho são compatíveis com a baixa variabilidade genética encontrada em diferentes espécies na porção sul da Floresta Atlântica (CARNAVAL & MORITZ, 2008; CARNAVAL *et al.*, 2009, MARTINS, 2011; TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2012). Especificamente, o estudo de Turchetto-Zolet *et al.* (2012) com *Schizolobium parahyba* mostrou, através da análise de

espaçadores intergênicos de cpDNA (*psbA-trnH*; *trnL-trnF*; *matK*), que as populações amostradas na porção Sul da Floresta Atlântica apresentaram uma menor diversidade genética como resultado de um possível efeito fundador. No presente estudo, poucos indivíduos podem ter colonizado as áreas de regeneração natural, bem como os indivíduos das áreas de plantio, fato que pode ocasionar fortes consequências genéticas para a floresta restaurada como, por exemplo, uma baixa diversidade genética (SEZEN *et al.*, 2005). A reduzida diversidade dos fundadores persiste nas gerações posteriores porque cada vez mais contribuem com uma fração maior de jovens (sementes).

Sezen *et al.* (2005) mostraram, através de análises de parentesco da palmeira *Iriartea deltoidea*, espécie tardia encontrada em área em regeneração, a dominância da geração de fundadores mesmo em uma paisagem com fontes diversas de sementes da floresta madura e comunidades intactas de dispersores. Este autor afirma ainda que os padrões de dominância podem ser ainda mais distorcidos em casos onde a população fonte é mais restrita em tamanho populacional e diversidade, que pode ser o caso das populações de *S. parahybae* e *S. glandulatum* nas Reservas estudadas. Porém, para corroborar tal afirmação, é necessário um maior esforço amostral além da análise de um maior número de marcadores.

A questão do efeito fundador pode ser melhor compreendida quando fatores históricos são agregados, considerando assim a escala temporal. As flutuações climáticas ocorridas no Pleistoceno alteraram os contínuos de floresta, e com o avanço das formações secas sobre os fragmentos florestais grandes remanescentes serviram de refúgio à flora e fauna então isoladas (MARTINS, 2011). Nesta nova configuração da Floresta Atlântica, os maiores fragmentos, então chamados de Refúgios (Pernambuco, Bahia, São Paulo) conseguiram se manter estáveis, apesar de ao sul do Rio Doce as condições climáticas não suportarem grandes formações florestais, o que acabou originando pequenas manchas de floresta instáveis (CARNAVAL & MORITZ, 2008; CARNAVAL *et al.*, 2009). Apesar do recuo dos habitats florestais, a Floresta Atlântica foi capaz de manter níveis razoáveis de continuidade entre a porção central e sul da floresta durante os eventos climáticos do Pleistoceno devido à complexa topografia, potencial para migração vertical e existência de rios que serviram como corredores de ligação entre os fragmentos isolados (CARNAVAL & MORITZ, 2008; POR, 1992). Porém, no caso de *S. glandulatum* e *S. parahyba*, mais populações devem ser

consideradas, visto que as análises deste trabalho se reportam apenas às populações das Reservas na cidade de Antonina (PR).

Em seu estudo filogeográfico de *S. parahyba*, Turchetto-Zolet *et al.* (2012) mostraram que quando as populações do Sul (PR e SC) e Sudeste (SP, RJ, ES) foram analisadas separadamente foi possível observar um padrão de expansão dos fragmentos da porção sudeste: há uma recolonização da parte sul da floresta por migrantes do Refúgio de São Paulo. Este padrão também foi observado em *Passiflora actinia* e *P. elegans*, em que também houve expansão para o sul da Floresta Atlântica (LORENZ-LEMKE *et al.*, 2005). Análises de registros fósseis de pólen demonstraram a substituição de florestas por áreas de campo durante o último máximo glacial no sul da Floresta Atlântica, demonstrando o recuo das formações florestais (CARNAVAL & MORITZ, 2008). Deste modo, a menor variabilidade encontrada em *S. glandulatum* e *S. parahyba* é compatível com a menor variabilidade genética encontrada em organismos já avaliados ao sul do Refúgio de São Paulo (CARNAVAL & MORITZ, 2008; CARNAVAL *et al.*, 2009, MARTINS, 2011; TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2012).

Embora a formação histórica da Floresta Atlântica possa explicar a baixa diversidade genética (CARNAVAL & MORITZ, 2008; CARNAVAL *et al.*, 2009, MARTINS, 2011; TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2012) e aponte para possíveis efeitos gargalo de garrafa ou fundador sobre populações da Floresta Atlântica, o *pool* gênico de *S. glandulatum* e *S. parahyba* representam uma importante fonte de genótipos locais. Além de já estarem localizados em áreas de proteção ambiental, estes indivíduos estão inseridos numa matriz que apresenta quantidade, qualidade e proximidade de habitats naturais (KAUANO *et al.*, 2012), tornando-se assim uma fonte única para a conservação e referência para matrizes de restauração.

Diversos autores ressaltam a importância da coleta de sementes em matrizes florestais distintas e semelhantes à área a ser restaurada para o sucesso da restauração (KAGEYAMA, 2003; ROGALSKI, 2003; LIMA & RODRIGUES, 2009). O aumento do estabelecimento de sementes locais em sítios perturbados sugere uma adaptação local, o que implica numa maior qualidade de espécies locais, as quais devem ser utilizadas para a restauração (O'BRIEN *et al.*, 2007; O'BRIEN & KRAUSS, 2010). Portanto, o entendimento da distribuição geográfica da variabilidade genética, ecológica

e de fatores ambientais que direcionam a divergência adaptativa dentro das espécies, ajuda a garantir fontes apropriadas de material para a restauração ecológica. Para as espécies alvo deste estudo, a escolha da matriz de sementes, numa escala regional, aparentemente independe do local de coleta, por causa da baixa variabilidade encontrada. Estudos com uma amostragem mais ampla geograficamente, que possam incluir diferentes linhagens, e com mais marcadores são necessários para apontar de forma mais robusta se estas espécies apresentam adaptação local.

Apesar dos avanços em termos científicos e de legislação na área da restauração (RODRIGUES *et al.*,2009; DURIGAN *et al.*, 2010; ARONSON *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*,2011) pouco se aplica na prática sobre a introdução de diversidade genética nos projetos de restauração ecológica. Neste sentido, o presente estudo reúne dados genéticos à restauração de áreas degradadas e pode auxiliar no manejo e conservação das espécies nativas aqui estudadas, já bastante indicadas para projetos de restauração ecológica (SANCHOTENE, 1985; LORENZI, 1992; FREIRE, 2005). Assim, o estudo de remanescentes florestais ditos fontes (de sementes, de diversidade biológica e genética) para outras áreas em restauração é de suma importância tanto para a obtenção de mudas, fator de insucesso dos projetos de restauração, quanto para a avaliação de potenciais matrizes. Tais fatores são imprescindíveis para o sucesso da restauração.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, J. Ecological restoration and creation: a review. **Biological Journal of the Linnean Society**, 56(Suppl): 187-211. 1995.

AGUIAR SOBRINHO, J. Guapuruvu (*Schizolobium parahyba* (Vee.) Blake) uma espécie de rápido crescimento. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, n. 3, p. 184-185, 1996.

ARONSON, J.; BRANCALION, P. H.S.; DURIGAN, G.; RODRIGUES, R.R.; ENGEL, V.L.; TABARELLI, M.; TOREZAN, J. M.; GANDOLFI, S. MELO, A. C. G.; KAGEYAMA, P.Y.; MARQUES, M.C.; NAVE, A.G.; MARTINS, S.V.; GANDARA, F.B.; REIS, A.; BARBOSA, L.M.; SCARANO, F.R. What role should government regulation play in ecological restoration? Ongoing debate in São Paulo State, Brazil. **Ecological restoration**, 19(6): 690-695. 2011.

ARROYO-RODRÍGUEZ, V.; MANDUJANO, S. The importance of tropical rain forest fragments to the conservation of plant species diversity in Los Tuxtlas, Mexico. **Biodiversity and Conservation**. 15:4159–4179. 2006.

ASIF, M.H.; MANTRINI, S.S.; SHARMA, A.; SRIVASTAVA, A.; TRIVEDI, I.; GUPTA, P.; MOHANTY, C.S.; SAWANT, S. V.; TULI, R. Complete sequence and organisation of the *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) chloroplast genome. **Tree Genetics & Genomes**, 6:941–952. 2010.

BIRKY, C.W. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes - mechanisms and evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 92:11331-11338. 1995.

BIRKY, C.W.; FUERST, P.; MARUYAMA, T. Organelle gene diversity under migration, mutation and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. **Genetics**, 121, 613–627. 1989.

BROWN, K. S.; AB'SABER, A. N. Ice-age forest refuges and evolution in Neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with biological endemism. **Paleoclimas**, 5: 1-30. (1979).

BRUEL, B.O.; MARQUES, M.C.M.; BRITZ, R.M. Survival and growth of tree species under two direct seedling planting systems. **Restoration ecology**, 18(4): 414-417. 2010.

BRUDVIG, L.A. The restoration of the biodiversity: where has research been and where does it need to go? **American Journal of Botany**, 98(3): 549–558. 2011.

CARNAVAL, A.C.; HICKERSON, M.J.; HADDAD, C.F.B.; RODRIGUES, M.T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. **Science**, 323: 785–789. 2009.

- CARNAVAL, A.C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Biogeography**, 35: 1187–1201. 2008.
- CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA, CNPF, 1994. 640p. 2003.
- CORLETT, R.T. Environmental forestry in Hong Kong: 1871–1997. **Forest Ecology and Management**, 116: 93–105. 1999.
- CHAZDON, R. L. Beyond deforestation: restoring forest and ecosystem services on degraded lands. **Science**, 320: 1458-1460. 2008.
- CORRIVEAU, J.L.; COLEMAN, A.W. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. **American Journal of Botany**, 75:1443-1458. 1988.
- DEAN, W., 1995. **With Broadax and Firebrand: The Destruction of the Brazilian Atlantic Forest**. University of California Press, Berkeley.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15.1990.
- DUNN, I.S. & BLATTNER, F.R. Sharoins 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. **Nucleic Acids Research**, 15: 2677-2698. 1986.
- DURIGAN, G.; ENGEL, V.L.; TOREZAN, J.M.; MELO, A.C.G.; MARQUES, M.C.C.; MARTINS, S.V.; REIS, A.; SCARANO, F.R. Normas jurídicas para a restauração ecológica: uma barreira a mais para dificultar o êxito das iniciativas? **Revista Árvore**, 34 (3): 471-485. 2010.
- ENNOS, R. A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, 72: 250—259. 1994.
- FEHLBERG, S.D.; RANKER, T.A. Evolutionary history and phylogeography of *Encelia farinosa* (Asteraceae) from the Sonoran, Mojave, and Peninsular Deserts. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 50: 326-335. 2009.
- FERREIRA, B. G. A. 2008. Propagação de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax estaquia, miniestaquia e sementes. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- FERREIRA, B. G. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; CARPANEZZI, A. A.; TAVARES, F. R.; KOEHLER, H. S. Efeitos dos ácidos indol butírico e bórico no enraizamento de estacas de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax. **SBPN - Scientific Journal**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 122-123, 2001. Edição dos Anais da 9. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisadores Nikkeis, Bauru, 2001.

FERREIRA, B. G. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; WENDLING, I.; KOEHLER, H.S.; NOGUEIRA, A.C. Miniestaquia de *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax com o uso de ácido indol butírico e ácido naftaleno acético. **Ciência Florestal**, 20 (1):19-31. 2010.

FERRETTI, A. R.; BRITTEZ, R. M. A restauração da Floresta Atlântica no litoral do estado do Paraná: os trabalhos da SPVS. Pp. 87-102 in Galvão, A. P. M. & Porfírio-da-Silva (ed.). **Restauração Florestal: fundamentos e estudos de caso**. Embrapa. 2005.

FERRETTI, A.R.; BRITTEZ, R.M. Ecological restoration, carbon sequestration and biodiversity conservation: the experience of the Society for Wildlife Research and Environmental Education (SPVS) in the Atlantic Rain Forest of the Southern Brazil. **Journal of Conservation**, 14:249-259. 2006.

FREIRE, J. 2005. Variabilidade genética, morfométrica e germinativa em populações de guapuruvu (*Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake). Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

GANADE, G.; MIRITI, M.N; MAZZOCHINIA, G.G.; PAZ, C.P. Pioneer effects on exotic and native tree colonizers: Insights for *Araucaria* forest restoration. **Basic and Applied Ecology**, 12: 733–742. 2011.

GENEIOUS. <http://www.geneious.com>. Acessado em :15 de julho de 2012.

HAFER, J. Speciation in Amazonian Forest Birds. **Science**, 165(3889): 131-137. 1969.

HOBBS, R. J.; CRAMER, V. A. Restoration ecology: Interventionists approaches for restoring and maintaining ecosystem function in the face of rapid environmental change. **Annual Review of Environment and Resources**, 33: 39 - 61. 2008.

HUFFORD, K. M.; MAZER, S. J. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. **Trends in Ecology and Evolution**, 18:147–155. 2003.

HUGAAL, A.; MORITZ, C.; MOUSSALI, A.; STANISIC, J. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnararosophia bellendenkerensis* (Brasier 1875). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99:6112-6117. 2002.

JONES, A.T.; HAYES, M.J. & SACKVILLE HAMILTON, N.R. The effect of provenance on the performance of *Crataegus monogyna* in hedges. **Journal of Applied Ecology**, 38: 952– 962. 2001.

KAGEYAMA, P. Y. Reflexos e potenciais da resolução SMA 21, de 21/11/2001, na conservação da biodiversidade específica e genética. **Anais do seminário temático sobre recuperação de áreas degradadas**. Instituto de Botânica, São Paulo, pp. 07-12. 2003.

KAUANO, E. E. 2011. Caracterização da paisagem e sua influência sobre comunidades vegetais em restauração na região da floresta atlântica no litoral paranaense. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.

KAUANO, E. E. ; TOREZAN, J. M. ; CARDOSO, F. C. G. ; MARQUES, M. C. M. . Landscape structure in the northern coast of Parana State, a hotspot for the Brazilian Atlantic Forest conservation. **Revista Árvore**, 2012.(no prelo).

KORPELAINEN, H. The evolutionary processes of mitochondrial and chloroplast genomes differ from those of nuclear genomes. **Naturwissenschaften**, 91:505-518. 2004.

KUHLMANN, M. & KUHN, E. **A flora do distrito de Ibiti**. São Paulo: Instituto de botânica, 1947. 221p.

LAVANDERO, B., MIRANDA, M., RAMÍREZ, C.C., FUENTES-CONTRERAS, E. Landscape composition modulates population genetic structure of *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) on *Malus domestica* Borkh in central Chile. **Bulletin of Entomological Research**, 99: 97-105. 2009.

LESICA, P., ALLENDORF, F.W. Ecological genetics and the restoration of plant communities: mix or match? **Restoration Ecology**. 7: 42–50. 1999.

LINDNER, A. A rapid assessment approach on soil seed banks of Atlantic forest sites with different disturbance history in Rio de Janeiro, Brazil. **Ecological Engineering**, 35: 829–835. 2009.

LIMA, L.R; RODRIGUES, R. *A florística como base para restauração florestal com elevada diversidade*. In Anais III CLAE e IXCEB, São Lourenço, MG. p.1-3. 2009.

LIU, M.H., CHEN, X.Y., ZHANG, X., SHEN, D.W. A population genetic evaluation of ecological restoration with the case study on *Cyclobalanopsis myrsinaefolia* (Fagaceae). **Plant ecology**, 197: 31-41. 2008.

LORENZ-LEMKE, A.P.; MUSCHNER, V.C.; BONATTO, S.L.; CERVI, A.C.; SALZANO, F.M.; FREITAS, L.B.. Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. **Annals of Botany**, 95: 799–806. 2005.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*; 1992. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum.

MARTINS, F.M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society**, 104: 499–509. 2011.

MARTINS, L.R; COUTINHO, P.N. The Brazilian continental margin. **Earth-Science Reviews** 17: 87–107.1981.

MCKAY, J.K.; BISHOP, J.G.; LIN, J.Z.; RICHARDS, J.H.; SALA, A.; MITCHELL-OLDS, T. Local adaptation across a climatic gradient despite small effective population size in the rare sapphire rockcress. **Proceedings of the Royal Society of London B**, 268:1715–1721. 2001.

MILLER, A.; SCHAAL, B. Domestication of a Mesoamerican cultivated fruit tree, *Spondias purpurea*. **PNAS**, 102 (36): 12801–12806. 2005.

- MMA - Ministério do Meio Ambiente. Florestas do Brasil: em resumo. Serviço Florestal Brasileiro. Brasília, p, 120. 2009.
- MONTALVO, A. M.; ELLSTRAND, N. C. Transplantation of the sub- shrub *Lotus scoparius*: testing the home-site advantage hypothesis. **Conservation Biology**, 14:1034–1035. 2000.
- MONTOYA, D.; ZAVALA, M.A.; RODRÍGUEZ, M.A.; PURVES, D.W. Animal versus wind dispersal and the robustness of tree species to deforestation. **Science**, 320: 1502-1504. 2008.
- MORELATTO, L. P. C. **Estudo da fenologia de árvores, arbustos e lianas de uma floresta semi-decídua no sudeste do Brasil**. 1991. 176 f. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas - Campinas, SP.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. & KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, 403: 853-858. 2000.
- NEALE, D. B. AND SEDEROFF, R. R. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. **Theoretical and Applied Genetics**, 77: 212-216. 1989.
- O'BRIEN, E.K.; KRAUSS, S.L. Testing the home-site advantage in forest trees on disturbed and undisturbed sites. **Restoration ecology**, 18 (3): 359-372. 2010.
- O'BRIEN, E.K.; MAZANEC, R.A.; KRAUSS, S.L. Provenance variation of ecologically important traits of forest trees: implications for restoration. **Journal of Applied Ecology**, 44 , 583–593. 2007.
- ODDOU-MURATORIO, S.; PETIT, R.J.; LE GUERROUE, B.; GUESNET, D. DEMESURE, B. Pollen versus Seed mediated gene flow in a scattered forest tree species. **Evolution**, 55(6): 1123-1135. 2001.
- OSKOU EIYAN, R.; OSALOO, S. K.; MAASSOUMI, A.A.; NEJADSATTARI, T.; MOZAFFARIAN, V. Phylogenetic status of *Vavilovia formosa* (Fabaceae-Fabeae) based on nrDNA ITS and cpDNA sequences. **Biochemical Systematics and Ecology**, 38: 313–319. 2010.
- PALAZZO JUNIOR, J. T.; BOTH, M. C. **Flora ornamental brasileira: um guia para o paisagismo ecológico**. Porto Alegre: Sagra, 1993. 183 p.
- PETIT, R. J.; DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; SALVINI, D.; VENDRAMIN, G. G. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. **Molecular Ecology**, 14:689–701. 2005.
- PIETROBOM, R.C.V; OLIVEIRA, D.M.T. Morfoanatomia e ontogênese do pericarpo de *Schizolobium parahyba* (Vell) Blake (Fabaceae, Caesalpinoidae). **Revista Brasileira de Botânica**, 27. 2004.

POR, F.D. (1992) Sooretama, the Atlantic rain forest of Brazil. SPB Academic Publishing, The Hague.

REIS, A.; BECHARA, F.C.; ESPÍNDOLA, M.B.; VIEIRA, N.K.; SOUZA, L.L. Restauração de áreas degradadas: a nucleação como base para incrementar os processos sucessionais. **Natureza e Conservação**, 1 (1): 28:36. 2003.

REUSCH, T.B.H.; EHLERS, A.; HAMMERLI, A., WORM, B. Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. **PNAS**, 102 (8): 2826-2831. 2005.

RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, 142: 1141-1153. 2009.

RIBEIRO, R.A.; LEMOS-FILHO, J.P.; RAMOS, A.C.S.; LOVATO, M.B. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, 106: 46–57. 2011.

RODRIGUES, R. R.; LIMA, R. A. F.; GANDOLFI, S.; NAVE, A. G. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Conservation**, 142: 1242–1251. 2009.

RODRIGUES, R. R.; GANDOLFI, S.; NAVE, A.G.; ARONSON, J.; BARRETO, T.E.; VIDALA, C.Y.; BRANCALION, P.H.S. Large-scale ecological restoration of high-diversity tropical forests in SE Brazil. **Forest Ecology and Management**, 61:1605–1613. 2011.

ROGALSKI, J. M.; BERKENBROCK, I. S.; REIS, A. Sucessão e manutenção da Diversidade biológica e variabilidade genética: ferramentas básicas para a restauração ambiental. **Anais do Simpósio Nacional de Recuperação de Áreas Degradadas**. Foz do Iguaçu, no prelo. 2003.

ROY, A. FRASCARIA, N.; MACKAY, J.; BOUSQUET, J. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. **Theoretical and Applied Genetics**, 85: 173-180. 1992.

SACKVILLE HAMILTON, N.R. Is local provenance important in habitat creation? A reply. **Journal of Applied Ecology**, 38: 1374–1376. 2001.

SANCHOTENE, M.C.C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre: FEPLAM, 1985. 71p.

SANTOS, J. 2011. Estrutura populacional de *Dicksonia sellowiana* Hook. (Dicksoniaceae) no Brasil: subsídios para a conservação. Dissertação de Mestrado. Universidade federal do Paraná.

SEZEN, U. U.; CHAZDON, R.L.; HOLSINGER, K. E. Genetic Consequences of Tropical Second-Growth Forest Regeneration. **Science**, 307:891. 2005.

SHAW, J.; LICKEY, E.B.; BECK, J.T.; FARMER, S. B.; LIU, W.; MILLER, J.; SIRIPUN, K.C.; WINDER, C.T.; SCHILLING, E. E.; SMALL, R.L. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, 92(1): 142–166. 2005.

SILVA, J. M. C, & CASTELETI C. H. M.. 2003. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. Pages 43–59 in C. Galindo-Leal and I. de G. Câmara, editors. The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook. Center for Applied Biodiversity Science and Island Press, Washington, D.C.

SINCLAIR, E.A.; HOBBS, R.J. Sample Size Effects on Estimates of Population Genetic Structure: Implications for Ecological Restoration. **Restoration ecology**, 17 (6): 837-844. 2009.

SMALL, R. L.; LICKEY, E.B.; SHAW, J.; HAUKE, W. D. Amplification of noncoding chloroplast DNA for phylogenetic studies in lycophytes and monilophytes with a comparative example of relative phylogenetic utility from Ophioglossaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 36: 509–522. 2005.

SOARES, T.N.; CHAVES, L.J.; TELLES, M.P.C.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; RESENDE, L.V. Landscape conservation genetics of *Dipteryx alata* (“baru” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. **Genetica**, 132: 9–19. 2008.

SPVS. 2006. Sociedade de Pesquisa em vida Selvagem e Educação Ambiental. Plano de Manejo da Reserva Natural do Rio Cachoeira.

STORFER, A.; MURPHY, M.A.; EVANS, J.S.; GOLDBERG, C.S.; ROBINSON, S.; SPEAR, S.F.; DEZZANI, R.; DEMELLE, E., VIERTLING, L.; WAITS, L.P. Putting the ‘landscape’ in landscape genetics. **Heredity**, 98: 128-142. 2007.

Superintendência de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental (SUDERSA). 1998. Atlas de recursos hídricos do estado do Paraná, Governo do Estado do Paraná, SUDERSA, Curitiba, Brasil.

THOMÉ, M. T. C.; ZAMUDIO, K. R.; GIOVANELLI, J. G. R.; HADDAD, C.F.B.; BALDISSERA, F.A. Jr; ALEXANDRINO, J. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 55: 1018–1031. 2010.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. T. 2009. Filogeografia e Sistemática Molecular de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Guapuruvu) através do sequenciamento de regiões cloroplásticas e nucleares. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. T.; CRUZ, F.; GIOVANNI G. VENDRAMIN, G.G.; SIMON, M.F.; SALGUEIRO, F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba*

(Fabaceae-Caesalpinioideae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. No prelo. 2012.

WATANABE, K.; KAJITA, T.; MURATA, J. Chloroplast DNA variation and geographical structure of the *Aristolochia kaempferi* group (Aristolochiaceae). **American Journal of Botany**, 93(3): 442–453. 2006.

WUETHRICH, B. Reconstructing Brazil's Atlantic Rainforest. **Science**, 315: 1070-1072. 2007.

YAMAMOTO, L. F.; KINOSHITA, L. S.; MARTINS, F.R. Síndromes de polinização e de dispersão em fragmentos da Floresta Estacional Semidecídua Montana, SP, Brasil. **Acta botânica brasileira**. 21(3): 553-573. 2007.

YOUNG, T.P.; PETERSEN, D.A.; CLARY, J.J., The ecology of restoration: historical links, emerging issues and unexplored realms. **Ecology Letters** 8, 662–673. 2005.