

- Título do projeto: Movimentando sementes na paisagem: estrutura genética e variação genética quantitativa em traços iniciais de *Plathymenia reticulata*
- Tipo de bolsa: Doutorado
- Universidade Estadual de Santa Cruz/ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular
- Aluna: Taise Almeida Conceição, titulação: Engenheira Florestal, mestre em Recursos Genéticos Vegetais
- Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2559895272121851>
- Endereço profissional: Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, Bairro Salobrinho, CEP 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil

Orientador do projeto: Rafael Marani Barbosa, titulação: Bacharel em Agronomia, mestre e doutor em Agronomia (Produção Vegetal), Professor Adjunto, Professor Efetivo

- Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9955687121978193>
 - Endereço profissional: Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, Bairro Salobrinho, CEP 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil
-
- Coorientadora: Fernanda Amato Gaiotto, titulação: Bacharela em Ciências Biológicas, mestra em Ciências Biológicas (Genética) e doutora em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), Professor titular.
 - Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7194205256185786>
 - Endereço profissional: Departamento de Ciências Biológicas, Rodovia Jorge Amado, Bairro Salobrinho, CEP 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil

INTRODUÇÃO

Em um grande paradoxo, embora as florestas sejam vitais à prestação de bens e serviços ambientais essenciais à vida humana, as atividades antrópicas figuram como principais responsáveis pela fragmentação florestal, degradação de áreas e vulnerabilização de tais serviços. É nesse cenário, que alcança todos os biomas, e em particular os dois *hotspots* de biodiversidade brasileiros, a saber Mata atlântica e Cerrado, que a exigência por regularização ambiental e mitigação dos impactos antrópicos sobre ecossistemas florestais têm fomentado a restauração ecológica, já que esta é vista como um importante instrumento de conservação e resgate ambiental (RODRIGUES; GANDOLFI, 2004; BRANCALION et al., 2013).

Estima-se, considerando a Lei 12.651/12 (Código Florestal brasileiro), que a área total a ser restaurada no Brasil seja de cerca de 21 milhões de hectares (SOARES-FILHO et al., 2014), sendo que o País assumiu no acordo de Paris a desafiadora meta de restaurar 12 milhões de hectares até 2030.

Em uma abordagem recente, restaurar uma área é propiciar a formação de florestas viáveis e com capacidade de autoperpetuação que, portanto, preconiza a existência de diversidade de espécies e diversidade genética (BRANCALION et al., 2009) especialmente, em um contexto de mudanças climáticas globais, que enfatiza o papel decisivo da variabilidade genética na sobrevivência das espécies (ISERNHAGEN et al., 2009) e funcionamento do ecossistema.

A partir da perspectiva do papel da diversidade genética, que nas áreas restauradas é introduzida mediante utilização de sementes de espécies nativas, por meio da semeadura direta ou plantio de mudas, entende-se que esta etapa de introdução é decisiva para moldar a trajetória das novas populações e assegurar o potencial evolucionário e de adaptação a cenários ambientais atuais e futuros.

No Brasil, a demanda por sementes com qualidade genética e fisiológica (SOUSA et al., 2015) é estimada que atinja a ordem de 4.443 toneladas anuais para atender o Decreto nº 8.972/17 (Plano Nacional de Recuperação da Vegetação Nativa) e honrar os compromissos internacionais firmados no Acordo de Paris (Contribuição Nacionalmente Determinada, 2016).

Contudo, uma das principais questões levantadas é de onde obtê-las para restabelecer as comunidades vegetais (BRANCALION et al., 2013; BUCCHAROVA et al., 2018). Visto que a inadequação de fonte de sementes pode ter consequências importantes para o sucesso imediato e a viabilidade a longo prazo das áreas restauradas (BOSHIER et al., 2015) e é considerada umas das razões para o não sucesso de projetos de restauração (GODEFROID et al., 2011). O que representa prejuízos do ponto de vista ecológico, por tratar-se do recomeço da trajetória de recuperação da área e também financeiro, dado o ainda elevado custo da cadeia produtiva envolvida na prática da restauração ecológica.

Movimentar sementes e mudas e, portanto, fontes genéticas em grandes escalas ou entre populações adaptadas a diferentes ambientes pode proporcionar redução da aptidão das populações resultantes, em decorrência do cruzamento entre populações divergentes (*Outbreeding depression*) (WEEKS et al., 2011) e reduzir o sucesso dos projetos de restauração se forem mal adaptados e/ou afetarem negativamente as populações nativas adjacentes (MCKAY et al., 2005). Ademais, Sousa et al. (2015) abordam que sementes de espécies nativas devem ser utilizadas próximas ao seu local de origem, pois isto propiciaria que genes ou blocos gênicos de adaptação local sejam mantidos.

Entretanto, em um contrabalanço, é preciso também considerar que sementes de populações locais nem sempre serão as mais adequadas, pois podem não abrigar variabilidade suficiente para que as populações restauradas possam adaptar-se e sobreviver em virtude do estabelecimento de árvores com diversidade genética restrita e potencial adaptativo limitado (BOSHIER et al., 2015; BUCHOROVA et al., 2018).

Especialmente considerando que na prática restringir o uso de sementes (e sob o mesmo princípio mudas) a apenas fontes locais, nos casos em que não há diferenciação entre procedências, pode significar o não suprimento da demanda, dada a frequente limitação do ainda deficitário setor de mudas e sementes de espécies nativas e mesmo a ausência e/ou degradação de remanescentes florestais locais de onde sementes possam ser colhidas.

Outro ponto é que, provavelmente, presumir que as populações sempre serão adaptadas localmente e que a definição do que é local é baseada em limites geopolíticos pode ser uma estratégia errônea, tendo em conta que tais limites frequentemente não condizem com os padrões de variabilidade genética das espécies (BOSHIER et al., 2015).

Torna-se então evidente que, independentemente de modelos teóricos de translocação, é necessário entender como as populações são estruturadas na paisagem, pois o entendimento da variação genética neutra e adaptativa entre procedências na paisagem pode ser usado como insight chave para nortear a escala de movimentação de sementes (AITKEN, 2004) de modo a estabelecer o quão amplo ou restritivo este deve ser.

JUSTIFICATIVA

O cenário de degradação dos diversos biomas implica, necessariamente, na tomada de medidas mitigatórias e conservacionistas. A genética de populações consiste, em ferramenta essencial para embasar estratégias de conservação de remanescentes florestais e nortear a restauração ecológica, sobretudo, em um campo cuja atenção deve ser dada diante das mudanças climáticas associadas ao

Antropoceno: As atividades relacionadas à coleta e uso de sementes florestais nativas, particularmente, a movimentação destas na paisagem diante da demanda por sementes que cresce concomitantemente com a urgência por restaurar áreas.

Sementes de espécies nativas representam o recomeço para áreas que perderam a capacidade de regeneração e, portanto, as diretrizes de coleta e uso de sementes (fontes genéticas) terão efeitos presentes e futuros na dinâmica de restabelecer florestas, influenciando tanto às áreas alvo da restauração como o entorno destas e, conseqüentemente interações, processos e serviços ecossistêmicos.

Movimentá-las requer a compreensão de como variação adaptativa e neutra é distribuída entre as populações no contexto da área de ocorrência das espécies, aspecto extremamente relevante para espécies florestais neotropicais. Para isso proponho entender a influência da heterogeneidade ambiental e da escala geográfica na diferenciação genética de populações e em traços quantitativos iniciais da história de vida em uma espécie florestal.

Utilizo como modelo biológico o vinhático (*Plathymenia reticulata* Benth. heterotípico *Plathymenia foliolosa* Benth.), espécie florestal de grande importância ecológica inserida no contexto dos dois *hotspots* brasileiros, nativa da América do Sul ocorrendo na Bolívia, Paraguai, Suriname e no Brasil e que apresenta neste uma ampla distribuição, o que a torna um modelo biológico excelente para este estudo.

Pertencente à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, a espécie ocorre nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (WARWICK; LEWIS, 2003; MORIM, 2015). Conhecida popularmente também como vinhático-da-mata, amarelinho, candeia, dentre outros nomes, *Plathymenia reticulata*, apresenta alta diversidade ecofisiológica que permite sua ocorrência em ampla faixa geográfica (LEMOS-FILHO; GOULART; LOVATO, 2008) distribui-se ao longo de gradientes de altitude, latitude, precipitação, temperatura e solos (CARVALHO, 2009). Sendo constatada diferenças entre as populações de savana e floresta sugerindo a existência de ecótipos do Cerrado e Mata Atlântica (LEMOS-FILHO; GOULART; LOVATO, 2008).

Utilizada para recomposição de áreas degradadas (LORENZI, 2008), há relevante importância no vinhático, também do ponto de vista econômico, pois destaca-se por apresentar madeira de alta qualidade, leve, de fácil trabalhabilidade e alta resistência natural a organismos xilófagos (LACERDA et al., 2004; LORENZI, 2008) o que resulta no seu amplo emprego na construção naval, civil e utilização em mobiliário de luxo, estacas, esteios e mourões (CARVALHO, 2009).

Dado tais atributos a espécie vêm sendo utilizada por empresas do setor florestal, para plantios comerciais, e é uma das espécies mais presentes e desejadas por agricultores em sistemas agroflorestais

na região cacauera do Sul da Bahia (SAMBUICHI et al., 2012). Sendo seu potencial observado desde à antiga Capitania de Ilhéus, onde já era intensamente explorada para ser utilizada como forro de navios, e ainda hoje há relatos de sua exploração para fabricação de canoas.

Assim, enfatizo que a escolha desta espécie como modelo biológico trata-se, estrategicamente, de uma tentativa de contribuir para práticas de restauração e conservação da espécie, através do conhecimento dos aspectos já descritos para uma espécie de relevante papel ecológico, mas também fornecerá contribuições para utilização da espécie em plantios comerciais e sistemas agroflorestais, contribuindo para o desenvolvimento econômico, social e ambiental, dado o potencial econômico da espécie e diretrizes a serem fornecidas mediante a realização do presente projeto.

OBJETIVO GERAL:

Caracterizar a estrutura, diversidade genética e a variação genética quantitativa em traços iniciais de *Plathymenia reticulata*, no contexto do Antropoceno e da heterogeneidade ambiental

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- I. Estudar a variação fenotípica entre procedências de sementes de *Plathymenia reticulata*;
- II. Investigar a influência da heterogeneidade ambiental na variação fenotípica e possível variância adaptativa de traços da biometria de frutos e sementes, germinação e desenvolvimento inicial de mudas de *Plathymenia reticulata*;
- III. Estudar a influência da heterogeneidade climática e de variáveis ambientais individuais na estrutura genética de populações de *Plathymenia reticulata*;
- IV. Estudar a diversidade e estrutura genética ao longo da área de ocorrência da espécie;
- V. Avaliar o efeito da escala geográfica na diferenciação genética populacional.

METODOLOGIA

Para atingir os objetivos I a III utilizou-se, concomitantemente, dois critérios para direcionamento dos municípios de coleta: tipologia climática e ocorrência registrada de *Plathymenia reticulata*. Para tal fim empregou-se o mapa de classificação climática de Koppen para o Brasil (ALVARES et al., 2013), que pauta-se na sazonalidade e nos valores médios anuais e mensais da temperatura do ar e da precipitação (KOPPEN, 1936), e em dados de ocorrência da espécie na Bahia disponíveis em herbários e levantamentos fitossociológicos. Definiu-se para este estudo 11 populações distribuídas em quatro tipos climáticos sendo eles: Af, Aw, BSh e Cfb do estado da Bahia (Figura 1), nos quais serão amostradas

três populações por tipo climático (exceto para o tipo Cfb no qual serão amostradas duas populações). Somados os tipos climáticos ocorrem em 55.9% da área total do Brasil e em 77.1% do estado da Bahia.

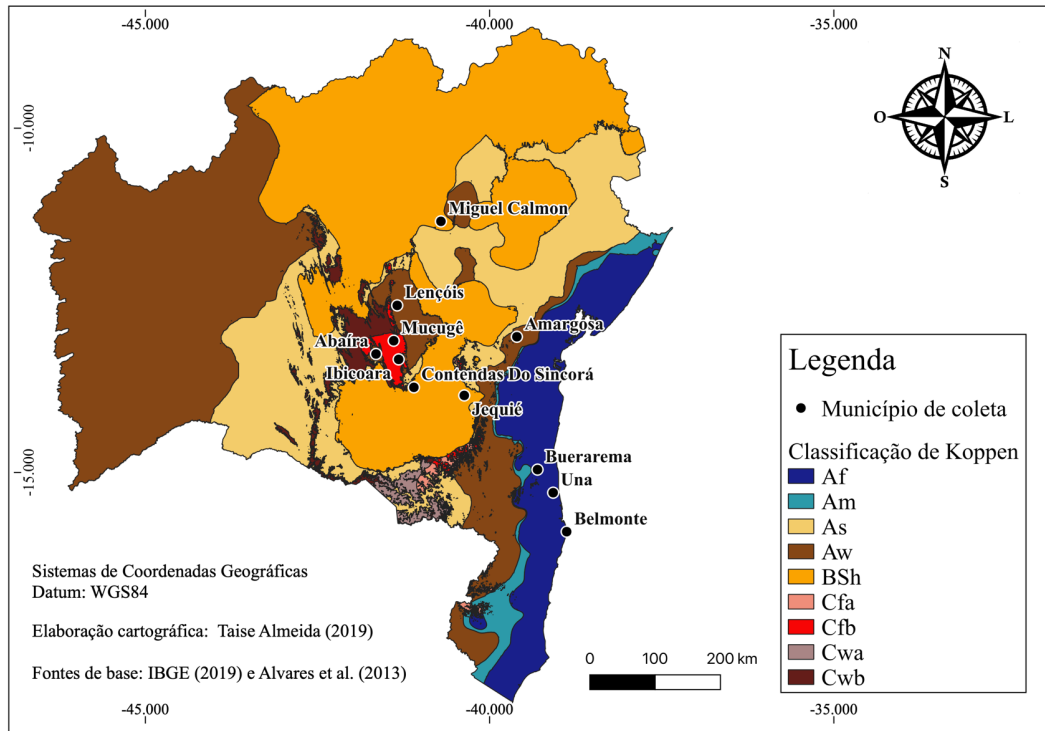


Figura 1. Classificação de Köppen para a Bahia e municípios onde serão amostradas populações de *Plathymenia reticulata*

Será considerado, a priori, como uma população um grupo de vinháticos distribuídos naturalmente e aleatoriamente dentro de um raio de no máximo 40 km. A altitude entre os municípios de coleta varia entre 74 a 1115m, a temperatura mínima entre 17 e 21.9 °C, temperatura máxima entre 21.1 e 26.6 °C e precipitação anual total de 649 a 1494 mm (Tabela 1). As distâncias entre pares de municípios de coleta variam entre 42 e 527 km.

Tabela 1. Municípios de coleta, classificação de Köppen, altitude e dados climáticos.

Município	Vegetação	Local de coleta	Köppen	Altitude (m)	Temperatura min (°C)	Temperatura max(°C)	Precipitação mensal min (mm)	Precipitação mensal Max(mm)	Precipitação anual total(mm)
Belmonte	FOD	RPPN	Af	74	21.9	26.6	98	164	1494
Buerarema	FOD	Área privada	Af	203	21.5	26	66	137	1248
Una	FOD	REBIO	Af	122	21.9	26.4	71	148	1379
Abaíra	Caatinga	RPPN	Aw	961	18	22.1	17	145	873
Amargosa	FES	RPPN	Aw	457	20.7	24.8	39	110	904
Lençóis	FE	PNCD	Aw	693	20	23.6	27	153	968
Contendas do Sincorá	Caatinga	FLORA	BSh	464	20.8	24.8	6	132	649
Jequié	FED	Área privada	BSh	499	20.2	24.5	33	110	820

Miguel Calmon	FES	PESP	BSh	658	20.3	23.8	20	94	691
Ibicoara	CSL	Área privada	Cfb	1042	17.3	21.5	35	137	872
Mucugê	CSL	RPPN	Cfb	1115	17	21.1	17	150	892

FOD= Floresta ombrófila densa; FES=Floresta estacional semidecidual; FED=Floresta estacional decidual; CSL=Cerrado sensu lato. RPPN= Reserva Particular do Patrimônio Natural; REBIO= Reserva Biológica; PNCD= Parque Nacional da Chapada Diamantina; PESP= Parque Estadual das Sete Passagens; FLORA= Floresta Nacional;

Objetivo I e II. Biometria, germinação e desenvolvimento de mudas em resposta a procedências de sementes de *Plathyenia reticulata* e tipos climáticos

Para estudar a variação fenotípica em traços de sementes entre procedências e a influência da heterogeneidade ambiental em tais traços serão amostrados, por população, 10 indivíduos adultos (critério de inclusão circunferência a altura do peito ≥ 15 cm) de *Plathyenia reticulata* com distâncias mínimas de 125 m. Destes serão coletados frutos diretamente da copa da árvore antes do início da deiscência dos frutos. A localização de todos os indivíduos será registrada por sistema de posicionamento global (GPS).

Frutos e sementes serão caracterizados quanto a biometria sendo para isso determinado, por população, a massa fresca, comprimento (cm), largura (cm), espessura (mm) em 100 frutos e 200 sementes, número total e número de sementes danificadas por fruto, em 100 frutos.

O peso de 1000 sementes será determinado mediante a pesagem de oito repetições de 100 sementes (BRASIL, 2009). O Teor de água das sementes será determinado pelo método da estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas, utilizando duas repetições de 25 sementes para cada tratamento (BRASIL, 2009), com resultados expressos em porcentagem (base úmida).

A qualidade fisiológica será avaliada mediante teste de germinação, envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, emergência de plântulas e desenvolvimento inicial de mudas.

Teste de germinação (G): As sementes serão previamente escarificadas com lixa na região oposta ao hilo. O teste será conduzido em delineamento inteiramente casualizado em condição de germinadores tipo Biochemical Oxygen Demand (BOD) com quatro repetições de 25 sementes. As contagens serão realizadas diariamente, sendo considerada germinada a semente em que houve protusão da radícula. Será avaliado o percentual de germinação, tempo médio, intervalos de tempo entre 16% e 84% de germinação (uniformidade), comprimento médio da parte aérea e radicular de plântulas normais, índice de velocidade de germinação e formação de plântulas normais. Ao término do experimento será contabilizado o percentual de sementes duras e mortas, mediante o teste de Tetrazólio.

Teste de condutividade elétrica (CE): Quatro repetições de 50 sementes serão colocadas em água deionizada e mantidas à temperatura de 20 °C, durante 24 h. Após cada período, a condutividade elétrica da solução será medida em condutivímetro (MARCOS-FILHO; VIEIRA, 2009).

Envelhecimento acelerado de sementes (EA): Cem sementes serão acondicionadas em caixas gerbox com tela metálica contendo água destilada (40 mL) (COSTA; TRZECIAK; VILLELA, 2008) proporcionando um ambiente com aproximadamente 100% de umidade relativa do ar no seu interior, exposta a 41 °C por 48 h. Após este período, serão submetidas ao teste de germinação e à determinação do teor de água, conforme descritos anteriormente.

Emergência (E) de plântulas: Quatro repetições de 50 sementes, com dormência previamente superada, serão semeadas em bandejas plásticas preenchidas com substrato comercial e dispostas em casa de vegetação. A contagem de sementes emergidas ocorrerá diariamente. Serão avaliados o percentual de emergência, índice de velocidade de emergência, sobrevivência e altura de plântulas ao 10º dia após o início da emergência.

Experimento de jardim comum: Para cada matriz quatro repetições de 25 sementes serão semeadas em bandejas plásticas e dispostas em casa de vegetação. Será contabilizado, diariamente, a emergência até sua estabilização e avaliado o percentual de emergência e índice de velocidade de emergência. Aos 30 dias, de 10 plântulas, selecionadas aleatoriamente, em cada matriz, será contabilizado o número folhas e folíolos, o comprimento de radícula e da parte aérea, massa fresca e seca total.

Dez plântulas de cada matriz, o que contabiliza 80 por tipo climático e 320 ao total serão transplantadas para tubetes plásticos preenchidos com substrato comercial e mantidos em casa de vegetação. Aos 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 e 120 dias (pós transplântio) será avaliado o número de folhas e folíolos, diâmetro do colo (DC), altura (H) das mudas e sobrevivência. Aos 120 dias será avaliado a altura (H) e comprimento de raiz, massa fresca (MF) e massa seca (MS) da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR). Serão calculadas as relações entre altura e diâmetro do colo, altura e massa de matéria seca da parte aérea, massa da matéria seca da parte aérea e de raízes, e índice de qualidade de Dickson ($MST/(H/DC + MSPA/MSR)$). Para correlacionar as variáveis avaliadas será empregado correlações de Pearson.

Traços relativos a biometria de frutos e sementes serão submetidos à estatística descritiva e a abordagem de Nested ANOVA. Serão considerados os seguintes níveis hierárquicos: Tipo climático, populações, matrizes e frutos. Serão obtidos os componentes de variância e partir destes estimadas as proporções da variação fenotípica total que se deve aos efeitos dos tipos climáticos, populações dentro

de tipos, matrizes dentro de populações e frutos dentro de matrizes. A divergência fenotípica (P_{st}) entre tipos climáticos e populações será estimada.

A partir das variáveis do experimento de jardim comum a variância nos níveis mencionados será desmembrada em seus componentes genéticos e ambientais. Será determinado a diferenciação genética quantitativa (Q_{st}) entre tipos climáticos e procedências (populações).

A fim de inferir sobre a existência de adaptação local, a divergência entre caracteres quantitativos será comparada com a diferenciação genética (F_{st}) obtida mediante genotipagem das mudas com marcadores microssatélites neutros.

Para avaliar correlações entre variáveis ambientais individuais e variáveis quantitativas oriundas da biometria, germinação e desenvolvimento inicial de mudas, anteriormente descritas, será empregada a Análise de Redundância (RDA) (MEIRMANS, 2015). As variáveis ambientais incluirão: temperatura e precipitação, inerentes a classificação de Koppen, altitude, evapotranspiração, radiação solar, declividade, dentre outras, disponíveis para os municípios de coleta em base de dados do Ambdata (INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2013) e Worldclim (HIJMANS et al., 2005).

Objetivo III. Genômica da paisagem: A heterogeneidade climática e variáveis ambientais impulsionam a diferenciação genética de *Plathymenia reticulata*?

Serão amostrados 25 indivíduos adultos de *Plathymenia reticulata* com distância mínima de 125 m por população dos quatro tipos climáticos, conforme delineamento de amostragem citado. Destas matrizes serão coletadas folhas jovens para extração de DNA genômico total que seguirá o protocolo de Novaes et al. (2009).

O DNA será visualizado por meio de eletroforese e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop. Marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) serão utilizados para realizar a varredura genômica.

Tais marcadores, ainda que dominantes, representam uma abordagem para realizar varreduras genômicas em espécies não-modelo, cujo genomas não foram sequenciados, pois não necessitam de informações prévias de sequenciamento e oferecem alta cobertura de densidade do genoma (LI et al., 2018), oferecem a possibilidade de identificar regiões genômicas possivelmente associadas à seleção divergente e, portanto uma estratégia para identificação de adaptação genética de loci relacionados com mudanças ambientais ao longo do alcance da espécie (YANG et al., 2016; YANG et al., 2019).

Para tanto, após ser quantificado e diluído, o DNA de cada indivíduo será clivado com duas enzimas restrição (EcoRI e MseI), posteriormente adaptadores específicos serão ligados aos terminais

dos fragmentos genômicos e pré amplificados por reação em cadeia de polimerase (PCR) em termociclador. Os fragmentos de AFLP gerados serão amplificados utilizando combinações de oligonucleotídeos seletivos, marcados com corantes fluorescentes. Em seguida, as amostras serão genotipadas, utilizando o Genetic Analyzer ABI/Hitachi 3500.

Serão calculadas as frequências alélicas, diversidade genética (H_e) de Nei e porcentagem de alelos polimórficos mediante o software AFLP-SURV (VEKEMANS et al., 2002). A estrutura genética das populações será avaliada usando o programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000). A diferenciação geral e pareada (F_{st}) e a significância estatística da estimativa ($H_0: F_{st}=0$) será testada com permutações (VEKEMANS et al., 2002).

Para detecção de locus outlier, loci que demonstram diferenciação genética significativamente maior ou menor entre as populações do que o esperado sob neutralidade (FENG; JIANG; FAN, 2015; WILLIAMS; NEVILL; KRAUSS, 2013) serão utilizadas duas abordagens baseadas em F_{st} : DFDIST e BayeScan e, posteriormente a interpolação destas (FENG; JIANG; FAN, 2015). De acordo com Yang et al. (2019), loci com um F_{st} incomumente alto são putativamente sob seleção direcional, enquanto locos com baixo valor de F_{st} são considerados potencialmente sob seleção estabilizadora.

Após a análise de assinaturas de seleção, os loci serão distribuídos em três sub conjuntos de dados AFLP de acordo com o padrão de detecção: todos os loci, loci neutros e loci sob seleção. Para cada subconjunto de dados, serão geradas matrizes de valores de F_{st} para estimar subseqüentemente a análise de Análise de variância molecular (AMOVA). A AMOVA será executada utilizando o GenAlEx (PEAKALL; SMOUSE, 2012) para particionar a diferenciação genética total em quatro níveis hierárquicos: entre e dentro de tipo climático, entre populações e dentro populações. O fluxo gênico (Nm) entre as populações, será calculado com base no F_{st} de locos neutros.

Para avaliar a hipótese de diferenciação genética mediada pela heterogeneidade ambiental será inicialmente realizado teste de Mantel no GenAlEx utilizando os três subconjuntos de dados AFLP, para testar se a diferenciação genética entre populações está relacionada com a distância geográfica (WRIGHT, 1943). Posteriormente será testado a correlação entre diferenciação genética e a distância ambiental, controlando o efeito da distância geográfica, de modo a evitar viés na resposta encontrada.

A Análise de Redundância (RDA) será utilizada para avaliar a influência das variáveis ambientais (univariadas) e as frequências alélicas não transformadas como matrizes de resposta, com o objetivo de verificar possíveis correlações entre loci AFLP e variáveis ambientais. As variáveis ambientais incluirão: temperatura, precipitação, altitude, evapotranspiração, radiação solar, declividade, dentre outras,

disponíveis para os municípios de coleta em base de dados do Ambdata (INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2013) e Worldclim (HIJMANS et al., 2005).

Objetivo IV e V. Estrutura e diversidade genética no Antropoceno: *Plathymenia reticulata* uma espécie amplamente distribuída no Brasil

Populações de vinhático serão amostradas a partir da aquisição de sementes junto a ONGs, redes de sementes e viveiros comerciais ao longo da área de distribuição natural da espécie que inclui os domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica.

Tal abordagem foi pensada de modo a gerar uma avaliação da diversidade genética e endogamia de lotes de sementes comercializados no Brasil, respondendo perguntas tais como se o número/distância entre matrizes de coleta de sementes tem sido suficiente, ou se tais lotes são advindos matrizes aparentadas, implicando na formação de populações restauradas com base genética restrita, baixo potencial adaptativo a condições ambientais atuais e futuras e comprometimento de processos ecossistêmicos.

Sementes oriundas destas populações serão germinadas e o DNA genômico total extraído de 30 plântulas por população. As amostras serão genotipadas para treze locos microssatélites nucleares (SSR-*Simple Sequence Repeats*) (OLIVEIRA et al., 2012), os produtos de PCR visualizados por eletroforese capilar em sequenciador Genetic Analyzer ABI/Hitachi 3500. A detecção e estimativa do tamanho de alelos em pares de base será realizada por meio do programa GeneScan.

Será estimado os seguintes parâmetros genéticos populacionais de diversidade e estrutura: Número de alelos por loco (\hat{A}), porcentagem de locos polimórficos (P), número efetivo de alelos por loco (A_e), número de alelos exclusivos (A_{ex}), riqueza alélica (A_r), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) (diversidade genética esperada sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg), heterozigosidade máxima e coeficiente de endogamia (índice de fixação de alelos (f)).

Para testar a diferenciação populacional, serão estimadas as estatísticas de F Wright: F_{IT} , F_{ST} e F_{IS} mensuradas a partir do modelo aleatório de Weir (1996). Valores de F_{ST} em pares de populações serão calculados no GenAlEx.

O fluxo gênico histórico entre as populações será estimado de forma indireta segundo o modelo de ilhas de Crow e Aoki (1984). A significância das estatísticas de estrutura genética (estatísticas F) será testada por meio reamostragem do tipo bootstrap, utilizando 10.000 reamostragens sobre os locos ao nível de 5%, utilizando correção de Bonferroni.

Para verificar o número de agrupamentos genéticos, uma simulação Bayesiana de agrupamento será implementada no software STRUCTURE. A decomposição da variação genética total em três níveis

hierárquicos (estado, entre populações e dentro de populações) será procedida por meio da análise da variância molecular (AMOVA) usando GenAlEx.

A matriz de distâncias geográficas entre as populações será correlacionada com a matriz de distância genética através da RDA e uma análise de semelhanças de paridade entre pares de populações será realizada utilizando análise de similaridades (ANOSIM). Inferindo a partir destas distâncias a partir da qual há diferenciação genética significativa ao longo da paisagem.

ATIVIDADES PREVISTAS

-Expedições a campo: Durante essa atividade serão realizados deslocamentos para as áreas de coleta visando marcação de indivíduos (utilizando GPS) e coleta de folhas e frutos (empregando tesoura de poda e podão). Serão realizadas expedições a campo com intuito de coletar material foliar para extração de DNA e coleta de frutos. A execução do projeto depende, indissociavelmente, da realização das expedições a campo, assim os custos inerentes ao deslocamento para as áreas de coleta e com pagamento de guias locais serão vitais para permitir amostragens amplas e representativas e viabilizar o projeto. A equipe de campo constará de além de mim e um guia local, de mais um pós-graduando que auxiliará durante as coletas. Assim os gastos com hospedagem, deslocamento, e alimentação estão previstas para 3 pessoas.

-Extração de DNA: Consiste na extração de DNA genômico dos indivíduos amostrados, mediante protocolo de extração e posterior verificação da qualidade deste. Serão utilizados para isso, e portanto comprados reagentes para tampões e géis como Agarose, Ácido Bórico, Tris, EDTA, Etanol, Isopropanol, Clorofórmio. Tubos, placas, caixas, ponteiras, etiquetas e canetas serão necessários.

-Amplificação de DNA: Etapa realizada após a extração do DNA genômico. Serão utilizados as enzimas de restrição, reagentes de PCR (Taq, Nucleotídeos, Tampões) e primers microssatélites (SSR). Tubos, placas, caixas, ponteiras, etiquetas e canetas serão necessários.

-Genotipagem: A genotipagem dos fragmentos gerados será realizada em analisador de ABI3500, requerendo a compra dos reagentes: POP7, Formamide Dye, Cation Buffer, Anion Buffer, Condition, LIS500.

-Condução de experimentos de germinação: Nesta etapa serão conduzidos os testes de germinação e vigor (em condição de laboratório) e experimento de jardim comum (em casa de vegetação). A realização destas atividades depende da compra, especialmente de papel de germinação, Trifenil cloreto de tetrazólio, caixa gerbox, tubetes e substrato comercial.

-Tabulação e análise de dados: Consistem na tomada, organização dos dados e análise destes com utilização de Softwares de acordo com a natureza dos dados. Inicialmente serão tabulados e analisados os oriundos dos aspectos de germinação e biometria e posteriormente de diversidade e estrutura de populações.

-Elaboração de cartilhas: Entendemos as lacunas do setor de sementes e mudas, e considerando o potencial do projeto para nortear diretrizes como de onde coletar, até onde mover sementes na paisagem, elaboraremos cartilhas voltadas a agricultores e viveristas. Para isso no orçamento estão previstas a compra de material de escritório (papel sulfite) e de impressora multifuncional. Para elaboração das cartilhas serão utilizados materiais fotográficos produzidos durante a execução do projeto, sendo para tal empregado a câmera DSLR.

-Preparo e submissão de artigos e Redação da tese: Redação da tese e artigos. Submissão destes em periódicos de alto impacto, visando compartilhar com a comunidade científica os resultados encontrados e as novas questões levantadas.

-Exame de Qualificação, Pré-Defesa e Defesa: Exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular para obtenção do título de Doutora.

DETALHAMENTO DA INFRAESTRUTURA FÍSICA E TECNOLÓGICA A SER UTILIZADA

O projeto será executado na Universidade Estadual de Santa Cruz, Campus Prof. Soane Nazaré de Andrade. As atividades serão desenvolvidas no Laboratório de Fitotecnia e Laboratório multifuncional de Marcadores moleculares, Centro de Biotecnologia e Genética (CBG), que dispõem da infraestrutura necessária para execução do projeto.

Do laboratório de Fitotecnia serão utilizados: Germinadores tipo Biochemical Oxygen Demand (B.O.D.), estufa secagem, condutivímetro, balança analítica de precisão. Do Laboratório de Marcadores moleculares capela de exaustão, freezer, termociclador, cubas de eletroforese, o sequenciador Genetic Analyzer ABI/Hitachi 3500 dentre outros equipamentos inerentes a realização das análises previstas. Ademais, a UESC dispõe de casas de vegetação para execução dos experimentos de emergência e desenvolvimento de mudas.

Para análises dos dados serão empregados Softwares livres como o ambiente computacional R.

Saliento que o projeto será executado em vínculo com grupo de genética da conservação, equipe de pós-graduandos sob coordenação da Docente Fernanda Amato Gaiotto, coorientadora do presente projeto, de vasta experiência, de forma tal que o projeto conta com recursos humanos capacitados e disponíveis para sua viabilização.

PLANILHA DE ORÇAMENTO COM ESTIMATIVA DOS GASTOS PREVISTOS

**Bolsas Funbio - Conservando o Futuro
ANEXO I - Orçamento Detalhado**

CHAMADA N° 02/2019

Título do projeto	Movimentando sementes na paisagem: estrutura genética e variação genética quantitativa em traços iniciais de <i>Plathymenia reticulata</i>	
Nome do Proponente	Taise Almeida Conceição	
Instituição de Ensino e Programa	Universidade Estadual de Santa Cruz/ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular	
Tipo de Bolsa (Mestrado ou Doutorado)	Doutorado	
Total requisitado (R\$)	R\$ 37.986,92	

Orçamento da Pesquisa						
Categoria de despesa	Descrição dos itens	Material será cedido para Instituição (Sim ou Não)	Quantidade	Unidade (un; litro; metro; dia; km)	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
	Tesoura de Poda Profissional Lâmina Intercambiável	Sim	1	un	R\$ 49,00	R\$ 49,00
	Papel Sulfite 75g 210x297 500 Fls	Não	3	un	R\$ 18,99	R\$ 56,97
	Oligonucleotídeos (Primer) (SSR) fluorescentes	Não	1	un	R\$ 3.000,00	R\$ 3.000,00
	Enzimas e reagentes de PCR (Taq , Nucleotídeos, Tampões, Enzimas de Restrição)	Não	1	un	R\$ 3.500,00	R\$ 3.500,00
	Plásticos (Tubos, placas, caixas, ponteiras, etiquetas, canetas)	Não	1	un	R\$ 1000,00	R\$ 1000,00
	Reagentes para analisador de ABI3500 (POP7, Formamide Dye, Cation Buffer, Anion Buffer, Condition, LIS500)	Não	1	un	R\$ 3.000,00	R\$ 3.000,00
	Reagentes para géis e tampões (Agarose, Ácido Bórico, Tris, EDTA, Etanol, Isopropanol, Clorofórmio)	Não	1	un	R\$ 2.000,00	R\$ 2.000,00
	Papel de germinação com 1000 folhas - FORMATO: 28X38CM	Não	5	un	R\$ 198,24	R\$ 991,20
	Bobina Plástica Picotada (20X30) c/700 Unidades	Não	3	un	R\$ 20,37	R\$ 61,11
	Trifenil cloreto de tetrazólio 10gr	Sim	1	un	R\$ 193,69	R\$ 193,69
	Caixa Gerbox Transparente Com Tela Inóx e Tampa	Sim	10	un	R\$ 63,19	R\$ 315,95
	Tubete de 120 cm ³	Sim	3000	un	R\$ 0,15	R\$ 450,00

	Bandeja para tubetes 96 células	Sim	30	un	R\$ 23,00	R\$ 690,00
	Substrato Completo Bioplant Plus Germinação - 40 Litros	Não	20	un	R\$ 63,00	R\$ 1.260,00
	Sementes de vinhático dos estados de ocorrência	Não	14	100g	R\$ 150	R\$ 2100,00
Serviço de Terceiros Pessoa Física	Guia Local	Não	22	dia	R\$ 140,00	R\$ 3.080,00
Viagens	Deslocamento, transporte para áreas de coleta (para 3 pessoas)	Não	1	un	R\$ 3.450,00	R\$ 3.450,00
	Hospedagem e alimentação (para 3 pessoas)	Não	66	un	R\$ 120,00	R\$ 6.600,00
Equipamentos	Câmera canon DSLR	Não	1	un	R\$ 3.400,00	R\$ 3.400,00
	GPS_GPSMAP® 64	Sim	1	un	R\$ 1.999,00	R\$ 1.999,00
	Impressora Multifuncional tanque de tinta	Sim	1	un	R\$ 790,00	R\$ 790,00
TOTAL						R\$ 37.986,92

Observações:

Unidade: é a unidade de medida. Ou seja, dias, litros, horas, ou "unidade" caso não seja o caso de especificar.
Quantidade: número de unidades a serem compradas ou contratadas.
Valor unitário: valor de cada unidade (valor de uma diária, valor de 1 litro de combustível, valor de uma consultoria...).
Valor total: multiplicação do valor unitário com a quantidade.
Valores devem estar em Reais (R\$).
A soma dos valores no cronograma de despesas deve ser igual ao valor total previsto.
Inclua linhas adicionais e certifique-se de que a fórmula está correta.

RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO PREVISTO

- Produção de contribuições técnicas direcionadas a estratégias para conservação de populações de *Plathymenia reticulata*;
- Aumento da compreensão dos aspectos que influenciam a estrutura e diversidade genética dentro e entre populações, contribuindo assim, para a conservação e restauração ecológica;
- Estabelecimento de diretrizes para coleta de sementes que sejam aplicáveis a projetos de restauração ecológica e estendíveis a produção e comercialização de sementes e mudas de vinhático, em escala regional e nacional;
- Sugestão de modelos de movimentação de sementes na paisagem;
- Elaboração de cartilhas técnicas para coleta de sementes voltadas aos principais agentes do setor de mudas e sementes: viveiristas, técnicos e produtores;
- Publicação de artigos em periódicos de alto impacto, que compartilhem com a comunidade científica os resultados encontrados e as novas questões levantadas.

REFERÊNCIAS

- ACORDO DE PARIS SOBRE O CLIMA. Disponível em:< <https://nacoesunidas.org/wp-content/uploads/2016/04/Acordo-de-Paris.pdf>>. Acesso em: 16 abril. 2019
- AITKEN, S. N. Genecology and Adaptation of Forest Trees. **Genetics and genetic resources**. 2004.
- ALVARES, C.A.; STAPE, J.L.; SENTELHAS, P.C.; GONÇALVES, J.L.M.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.
- BOSHIER, D.; BROADHURST, L.; CORNELIUS, J.; GALLO, L.; KOSKELA, J.; LOO, J., ... & ST CLAIR, B. Examining the evidence for local adaptation in trees and its scale. **Environmental Evidence**, v. 4, n. 1, p. 20, 2015.
- BRANCALION, P. H. S.; GANDOLFI, S.; RODRIGUES, R. R. Incorporação do conceito da diversidade genética na restauração ecológica. In: RODRIGUES, R. R.; SANTIN BRANCALION, P. H.; ISERNHAGEN, I. **Pacto pela restauração da mata atlântica: Referencial dos conceitos e ações de restauração florestal**. ERF/ESALQ: Instituto BioAtlântica. São Paulo, 2009.
- BRANCALION, P.H.S.; VIANI, R.A.G.; RODRIGUES, R.R.; GANDOLFI, S. Avaliação e Monitoramento de Áreas em Processo de Restauração. In: MARTINS, S.V. (Org.). **Restauração Ecológica de ecossistemas degradados**. Viçosa: Ed. UFV, 2013, p. 262.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pesca e Abastecimento. Brasília, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. 2009.
- BUCHAROVA, A.; BOSSDORF, O.; HOLZEL, N.; KOLLMANN, J.; PRASSE, R.; DURKA, W. Mix and match: regional admixture provenancing strikes a balance among different seed-sourcing strategies for ecological restoration. **Conservation Genetics**, v. 20, n. 1, p. 7-17, 2018.
- CARVALHO, P.E.R. **Vinhático-Plathymenia reticulata**. Colombo: Embrapa Florestas. Comunicado Técnico, 231, 2009. 11 p.
- COSTA, C.J.; TRZECIAK, M.B.; VILLELA, F.A. Potencial fisiológico de sementes de brássicas com ênfase no teste de envelhecimento acelerado. **Horticultura Brasileira**, v.26, n.2, p.144-148, 2008.
- CROW, J. F.; AOKI K. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 19, p. 6073-6077, 1984.
- LEMOS FILHO, J. P.; GOULART, M. F.; LOVATO, M. B. Populational approach in ecophysiological studies: The case of *Plathymenia reticulata*, a tree from Cerrado and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 3, p. 205–216, 2008.
- FENG, X. J.; JIANG, G. F.; FAN, Z. Identification of outliers in a genomic scan for selection along environmental gradients in the bamboo locust, *Ceracris kiangsu*. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–11, 2015.

GODEFROID, S.;PIAZZA, C.; ROSSI, G.; BUORD, S.; STEVENS, A. D.; AGURAIUJA, R....JOHNSON, I. How successful are plant species reintroductions? **Biological Conservation**, v. 144, n. 2, p. 672–682, 2011.

HIJMANS, R.J.; CAMERON, S.E.; PARRA, J.L.; JONES, P.G.; JARVIS, A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology**, v.25, p.1965-1978, 2005.

ISERNHAGEN, I.; BRANCALION, P. H. S.; GANDOLFI, S.; RODRIGUES, R. R. Abandono da cópia de um modelo de floresta madura e foco na restauração dos processos ecológicos responsáveis pela reconstrução de uma floresta (fase atual). In: RODRIGUES, R. R.; SANTIN BRANCALION, P. H.; ISERNHAGEN, I. **Pacto pela restauração da mata atlântica: Referencial dos conceitos e ações de restauração florestal**. ERF/ESALQ: Instituto BioAtlântica. São Paulo, 2009.

KOPPEN, W. **Das geographische System der Klimate**. In: KOPPEN, W., R. GEIGER (Eds.): **Handbuch der Klimatologie**.– Gebu“der Borntra“ger, Berlin, p. 1–44, part C, 1936.

KRAUSS, S.L.; SINCLAIR, E.A.; BUSSELL, J.D.; HOBBS, R.J. An Ecological Genetic Delineation of Local Seed-Source Provenance for Ecological Restoration. **Ecology and Evolution**, v. 7, n.3, p. 2138-2149, 2013.

LACERDA, D.R.; LEMOS FILHO, J.P.; GOULART, M.F.; RIBEIRO, R.A.; LOVATO, M.B. Seed dormancy variation in natural populations of two tropical leguminous tree species: *Senna multijuga* (Caesalpinoideae) and *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae). **Seed Science Research**, v.14, p.127-135, 2004.

LEWIS, G.P.; WARWICK, M.C. Revision of *Plathymenia* (Leguminosae-Mimosoideae). **Endinburgh Journal of Botany**, v.60, n.2, p.111-119, 2003.

LI, J. X.; ZHU, X. H.; LI, Y.; LIU, Y.; QIAN, Z. H.; ZHANG, X. X. ... JI, L. Y. Adaptive genetic differentiation in *Pterocarya stenoptera* (Juglandaceae) driven by multiple environmental variables were revealed by landscape genomics. **BMC plant biology**, v. 18, n. 1, p. 306, 2018.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 5.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 385p.

MARCOS-FILHO, J.; VIEIRA, R.D. Seed vigor tests: procedures conductivitytests. In: BAALBAKI, R.Z.; ELIAS, S.G.; MARCOS-FILHO, J.; MCDONALD, M.B. (Ed.). **Seed vigor tests handbook**. Ithaca: Association of Official Seed Analysts, p. 186-209, 2009.

MCKAY, J. K.; CHRISTIAN, C. E.; HARRISON, S.; RICE, K. J. “How Local Is Local?” A Review of Practical and Conceptual Issues in the Genetics of Restoration. **Restoration Ecology**, v. 13, n. 3, p. 432–440, 2005.

MCKAY, J. K.; LATTA, R.G. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. **Trends in ecology & evolution**, v. 17, n. 6, p. 285-291, 2002.

MEIRMANS, P. G. Seven common mistakes in population genetics and how to avoid them. **Molecular Ecology**, v. 24, p.3223–3231, 2015.

MORIM, M.P. *Plathymenia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB83636>>. Acesso em: Agosto, 2018.

NOVAES, R. M. L.; RODRIGUES, J. G.; LOVATO, M. B. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. **Genet Mol Res**, v. 8, n. 1, p. 86-96, 2009.

OLIVEIRA, F. A.; TARAZI, R.; MENEZES, I. P.; VAN DEN BERG, C.; TSAI, S. M.; GAIOTTO, F. A. Microsatellite markers for *Plathymenia reticulata* (Leguminosae). **American journal of botany**, v. 99, n. 10, p. e391-e393, 2012.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537-2539, 2012.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

RODRIGUES, R.R.; GANDOLFI, S. Conceitos, tendências e ações para recuperação de florestas ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO-FILHO, H. de F. (eds.). **Matas ciliares: conservação e recuperação**. São Paulo: EDUSP, 2004.

SAMBUICHI, R. H.; VIDAL, D. B.; PIASENTIN, F. B.; JARDIM, J. G.; VIANA, T. G.; MENEZES, A. A.; ...BALIGAR, V. C. Cabruca agroforests in southern Bahia, Brazil: tree component, management practices and tree species conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 4, p. 1055-1077, 2012.

SOARES-FILHO, B.; RAJÃO, R.; MACEDO, M.; CARNEIRO, A.; COSTA, W.. & ALENCAR, A. Cracking Brazil's forest code. **Science**, v. 344, n. 6182, p. 363-364, 2014.

VEKEMANS, X., BEAUWENS, T.; LEMAIRE, M.; ROLDÁN-RUIZ, I. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. **Molecular ecology**, v. 11, n. 1, p. 139-151, 2002.

WEEKS, A. R.; SGRO, C. M.; YOUNG, A. G.; FRANKHAM, R.; MITCHELL, N. J.; MILLER, K. A. ... BREED, M. F. Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments: a genetic perspective. **Evolutionary Applications**, v. 4, n. 6, p. 709-725, 2011.

WEIR, B. S. Methods for discrete population genetic data. **Genetic Data Analysis II**, 1996.

WILLIAMS, A. V.; NEVILL, P. G.; KRAUSS, S. L. Next generation restoration genetics: Applications and opportunities. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 8, p. 529–537, 2014.

WRIGHT, Sewall. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, n. 2, p. 114, 1943.

YANG, A. H.; WEI, N.; FRITSCH, P. W.; YAO, X. H. AFLP genome scanning reveals divergent selection in natural populations of *Liriodendron chinense* (Magnoliaceae) along a latitudinal transect. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 698, 2016.

YANG, M.; XU, C.; DUCHESNE, P.; MA, Q.; YIN, G.; FANG, Y.... ZHANG, W. Landscape genetic structure of *Scirpus mariqueter* reveals a putatively adaptive differentiation under strong gene flow in estuaries. **Ecology and Evolution**, 2019.