

OSWALDO CRUZ NETO

**PLANTIOS MONOESPECÍFICOS DE *Inga vera* subesp. *affinis* (D.C.)
T.D. PENN. INFLUENCIANDO O SUCESSO REPRODUTIVO,
VARIAÇÃO GENÉTICA E FLUXO GÊNICO NA FLORESTA
ATLÂNTICA DO NORDESTE DO BRASIL**

RECIFE, 2013

OSWALDO CRUZ NETO

**PLANTIOS MONOESPECÍFICOS DE *Inga vera* subesp. *affinis* (D.C.)
T.D. PENN. INFLUENCIANDO O SUCESSO REPRODUTIVO,
VARIAÇÃO GENÉTICA E FLUXO GÊNICO NA FLORESTA
ATLÂNTICA DO NORDESTE DO BRASIL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal. Área de concentração: Ecologia Vegetal; Linha de pesquisa: Biologia Floral e Reprodutiva.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ariadna Valentina Lopes

RECIFE, 2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Neto, Oswaldo Cruz

Plantios monoespecíficos de *Inga vera* subesp. *affinis* (D.C.) T.D. Penn. Influenciando o sucesso reprodutivo variação genética e fluxo gênico na floresta Atlântica/ Recife: O Autor, 2013.

130 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Ariadna Valentina Lopes

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia Vegetal, 2013.

Inclui bibliografia

1. Genética Vegetal 2. Mata Atlântica 3. Ingá (Botânica) I. Lopes, Ariadna Valentina (orientadora) II. Título

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 279

OSWALDO CRUZ NETO

“PLANTIOS MONOESPECÍFICOS DE *Inga vera* subesp. *affinis* INFLUENCIANDO O SUCESSO REPRODUTIVO, VARIAÇÃO GENÉTICA E FLUXO GÊNICO NA FLORESTA ATLÂNTICA DO NORESCTE DO BRASIL”.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Ariadna Valentina de Freitas e Lopes (Orinetadora) - UFPE

Dr. André Maurício melo Santos – CAV/UFPE

Dra. Laís Angélica de Andrade Pinehiro Borges – UFPB

Dra. Isabel Cristina Sobreira Machado - UFPE

Dra. Andrea Pedrosa Harand – UFPE

Recife – PE
2013

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente aos meus familiares pelo constante e intenso apoio, compreensão, suporte e, acima de tudo, por terem me dado a oportunidade de trabalhar com algo de meu interesse.

À minha orientadora Ariadna Valentina Lopes, por ter sido uma grande fonte de inspiração para continuar pesquisando desde a minha graduação, pela dedicação e paciência eternas ao me guiar no desenvolvimento desta tese, e principalmente, por acreditar no meu potencial, e ter creditado a mim, a responsabilidade de conduzir um trabalho totalmente diferente de qualquer outra atividade que eu havia desenvolvido durante meus anos de universidade.

A Antonio Aguiar (Patriota) pela motivação e chuva de ideias indispensáveis para a condução dos artigos nesta tese, pela amizade, pelo auxílio no trabalho de campo e de laboratório.

À Jéssica Silva e Marcela Woolley por terem sido meus dois braços direitos, por todo auxílio no trabalho de campo e de laboratório, pela amizade e por toda contribuição ao meu crescimento profissional e pessoal.

À Profa. Isabel Machado pelo apoio, dedicação e empenho em manter, junto com Ariadna, a organização e bom funcionamento do Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva (POLINIZAR).

À Profa. Andrea Pedrosa e à Liliane Dantas por me guiarem nas etapas laboratoriais iniciais e cruciais para a obtenção de bons resultados, pelo apoio e estrutura física das dependências do Laboratório de Citogenética Vegetal e Evolução fornecidos, por toda amizade e incentivo que me fizeram seguir com confiança nestes quatro anos de doutorado.

Ao Dr. Toby Pennington por todo suporte e direcionamento durante parte da análise de dados desta tese.

À Fabiana Cavalcante por toda amizade e auxílio nos protocolos laboratoriais.

À Rita Fernandes por todo auxílio no trabalho de laboratório.

A todos os integrantes e pessoas que frequentaram o laboratório POLINIZAR (Elivania, Carol, Shirlei, Milena, Mellissa, Kelaine, Marcos Gabriel, Laís, Éville, Tarcila, Elisangela, Marcelo, Artur Maia, Artur, Camila, Lucinéia, Vanessa, Renata, Marcela Tomaz, Luciana Coe, Sandra, Isabelle, Talita, Natalia, George, Joel, entre outros) pelas conversas e discussões sobre os mais variados assuntos. Também aproveito para pedir desculpas por usar

quase metade da estrutura física do laboratório durante alguns experimentos, dificultando a execução de atividades paralelas durante minha presença no laboratório.

A todos os integrantes do Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal da UFPE.

Aos amigos, colegas, e à coordenação do Programa de Pós Graduação (PPGBV-UFPE) pelo apoio e estrutura fornecidos.

À FACEPE pela bolsa de doutorado durante o primeiro ano de curso, ao CNPq pela bolsa de doutorado nos últimos três anos de curso e à CAPES pela bolsa de seis meses de doutorado sanduíche na Escócia.

RESUMO

A troca de material genético entre populações e indivíduos é responsável pelo sucesso reprodutivo e manutenção da diversidade genética nas espécies de plantas em diferentes escalas geográficas. Perda e fragmentação das florestas, além de práticas de reflorestamento, originam paisagens com habitat distintos, os quais facilitam ou impedem o fluxo gênico entre indivíduos e populações. O objetivo dos artigos propostos nesta tese foi entender o efeito dos plantios monoespecíficos de *Inga vera* subesp. *affinis* sobre a manutenção do sucesso reprodutivo, da diversidade genética, e do fluxo gênico interpopulacional entre áreas naturais e plantadas. Foram amostrados 600 indivíduos, sendo 100 adultos e 500 plântulas de *I. vera* de cinco populações plantadas e cinco naturais. Todos os indivíduos foram genotipados para quatro locos microssatélites. O consumo de néctar e o sucesso reprodutivo geral são reduzidos nos plantios monoespecíficos em relação aos fragmentos de floresta natural. Foi encontrada redução na riqueza alélica, heterozigosidade esperada nos adultos das populações plantadas em relação às populações naturais, indicando que plantios monoespecíficos de *I. vera* apresentam baixa retenção de diversidade genética. Houve aumento na riqueza alélica e na heterozigosidade esperada das plântulas em relação aos adultos nos plantios monoespecíficos. Além disso, os alelos encontrados nas plântulas de plantios estavam presentes nos adultos de populações naturais, reforçando a ocorrência de fluxo entre populações naturais e plantadas. As populações plantadas de *I. vera* podem favorecer o fluxo polínico interpopulacional, visto que plantios de *Inga* apresentam baixa resistência ao fluxo gênico em relação aos outros tipos de habitat, como plantios de cana de açúcar e áreas urbanas. Estudos futuros devem investigar o sentido e intensidade do fluxo gênico entre áreas naturais e plantadas, buscando determinar os efeitos dos plantios de árvores sobre a conectividade da paisagem em ecossistemas fragmentados.

Palavras chaves: Fluxo Gênico; Fragmentação; Reflorestamento; Restauração florestal.

ABSTRACT

Gene flow between individuals and populations is the main responsible for the reproductive success and the genetic diversity maintenance in plant species, and can be pollen- or seed-mediated. Habitat loss, fragmentation and other human practices, as planting of trees, create landscapes with different patches regarding their resistance or permeability to the gene flow between different populations of plants. The aim of the papers proposed in this thesis was to understand the role of single species plantations of the tree *Inga* to the reproductive success, maintenance of genetic diversity, and gene flow and to the gene flow between natural and planted populations of *I. vera* subsp. *affinis*. In total, 100 adult trees and 500 seedlings from five natural and five stands of *I. vera* were collected. All individuals were genotyped at four microsatellite loci. The nectar consumption and the overall reproductive success were reduced in planted populations related to natural. Reduction of allelic richness and gene diversity of adult trees in planted relative to natural populations was detected, indicating that single species plantations of *I. vera* present low genetic diversity retention. There was a increase in allelic richness and gene diversity of seedlings from planted populations relative to their parents. Also, all the alleles present in seedlings from planted populations were found in adults of natural populations, showing the occurrence of outcrossing between planted and natural stands and the genetic diversity recovery in seedlings from planted populations relative to their parents. Planted populations of *I. vera* subsp. *affinis* positively contribute to the pollen flow between populations, whereas they present lower resistance to the gene flow relative to the sugarcane plantations and urban areas. Future studies may evaluate the direction and intensity of pollen flow between natural and planted populations in order to estimate the extension of gene flow and increase in landscape connectivity promoted by tree plantations in fragmented habitats.

Keywords: Geneflow; Fragmentation; Reforestation; Forest Restoration.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Mapa da América do Sul com destaque para o Brasil e a região nordeste (A); Localização da área de estudo na região nordeste (B); Mapa da área de estudo destacando a presença de fragmentos de floresta Atlântica, plantios de *Inga*, plantios de cana de açúcar e áreas urbanas. Pontos brancos dentro dos fragmentos e dos plantios de *Inga* representam a localização das populações amostradas (C). 37

Figura 2. Variação na quantidade de néctar, em volume (μ l) e miligramas (mg), ao longo da antese floral de *Inga vera* na floresta Atlântica nordestina. Padrão de secreção (A e B), disponibilidade (C e D) e consumo (E e F) de néctar em populações plantadas e naturais de *Inga vera*. As bolas representam as médias e as barras verticais representam os desvios padrões. 38

Capítulo 3

Figura 1. Descrição e localização da área de estudo. Mapa da América do Sul destacando região nordeste do Brasil e da extensão original da floresta Atlântica (A); distribuição original e remanescente da floresta Atlântica em Alagoas e Pernambuco (B; retângulo branco representa a área de estudo); Mapa da área de estudo destacando remanescentes de floresta Atlântica, plantações de *Inga*, plantações de cana de açúcar e áreas urbanas (C). 78

Figura 2. Riqueza alélica (A_R) e diversidade gênica (H_S) (média $\pm$ IC) entre indivíduos adultos e sementes de populações naturais e plantadas de *Inga vera* na floresta Atlântica, AL, Brasil. (Barras com a mesma cor seguidas por letras diferentes foram estatisticamente distintas ao nível de significância $P < 0,05$). 79

Capítulo 4

Figura 1. Mapa da América do Sul com destaque para o Brasil e a região nordeste (A); Localização da área de estudo na região nordeste (B); Mapa da área de estudo destacando a presença de fragmentos de floresta Atlântica, plantios de *Inga*, plantios de cana de açúcar e áreas urbanas. Pontos brancos dentro dos fragmentos e dos plantios de *Inga* representam a localização das populações amostradas (C). 109

Figura 2. Relação entre os grids de habitat, de paisagem e a estruturação genética (F_{ST}) de plântulas de *Inga vera*. Testes de Mantel (r) considerando a relação entre isolamento, pela distância efetiva (A e C) e por resistência (B e D), e F_{ST} pareado em grids de habitat e de paisagem. (Barras representam intervalos de confiança 95% após 10000 randomizações de Bootstrap; * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$). 110

Figura 3. Mapas de isolamento pela distância efetiva (IDE) e resistência (IDR) em *Inga vera*. Mapas de distância efetiva (“Least cost pathway”; A) e da resistência da paisagem (B) em grids de paisagem de 100% de variação na resistência entre as manchas de habitats mais e menos resistentes ao fluxo gênico, respectivamente. Consideramos resistência de 0 - 25% nos fragmentos de floresta Atlântica, 26 - 50% nos plantios monoespecíficos de *I. vera*, 51 - 75% nos plantios de cana de açúcar e 76 - 100% nas áreas urbanizadas. 111

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1.** Descrição das populações de *Inga vera* nos plantios monoespecíficos (P1 até P5) e fragmentos de floresta Atlântica (N1 até N5) na Usina Serra Grande. Área (km²), índice de isolamento geográfico baseado no percentual de cobertura vegetal natural ao redor das populações amostradas (ISG) e densidade de indivíduos medida pelo índice de vizinhança mais próxima (IVP). 39
- Tabela 2.** Dinâmica da oferta e utilização do néctar floral de *Inga vera*. Média e desvio padrão da quantidade de néctar produzida, disponível e consumida, em volume (µl) e miligramas (mg), em plantios monoespecíficos de *Inga* (populações plantadas), fragmentos de floresta Atlântica (populações naturais) e entre plantios de *Inga* e fragmentos. Valores de volume e miligramas na mesma coluna seguidos de letras distintas foram estatisticamente distintos com valor de $P < 0,05$ 40
- Tabela 3.** Variação de média ($\pm$ desvio padrão) dos componentes do sucesso reprodutivo entre populações plantadas e naturais de *Inga vera*. Valores de sucesso reprodutivo masculino (SRM), taxa de frutificação em condições naturais (Fruto/Flor), razão sementes por fruto/óvulo por ovário (Semente/Óvulo), sucesso reprodutivo feminino (SRF) e geral (SRG) seguidos de letras diferentes foram estatisticamente distintos ($P < 0,05$). 41

Capítulo 2

- Tabela 1.** Primers testados quanto a transferibilidade entre *Inga edulis* e *I. vera*. Os primers Inga03, 05, 08, 33 foram desenvolvidos para *Inga edulis* (Hollignsworth et al. 2005), enquanto o primer Pel05 foi desenvolvido para *Pithecelobium elegans* (Daynandan et al. 1997), mas amplificou locus polimórfico em *I. edulis*. 50
- Tabela 2.** Número e tamanho dos alelos amplificados em *Inga vera* utilizando primers de *Inga edulis* e *Pithecelobium elegans*. Temperatura de anelamento (Ta) para cada caso. 51

Capítulo 3

- Tabela 1.** Diversidade genética por loco em adultos e plântulas de *Inga vera* em populações plantadas e naturais. Nome do loco, referência dos primers, temperatura de anelamento (Ta), tamanho (pb) dos fragmentos amplificados, heterozigosidade observada (H_O), diversidade gênica (H_S), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e de diferenciação genética (F_{ST}). Os primers Inga03 e Inga33 foram marcados com 6-FAM, enquanto os primers Inga08 e Pel05 foram marcados com NED e PET, respectivamente. 80
- Tabela 2.** Coeficiente de endogamia (F_{IS}) e de diferenciação genética (F_{ST}) de adultos e sementes entre populações plantadas e naturais de *Inga vera*. (Valores na mesma coluna seguidos por letras distintas foram estatisticamente diferentes ao nível de significância $P \leq 0,05$, baseado em 1000 permutações). 81
- Tabela 3.** Diversidade genética por população de adultos e plântulas de *Inga vera* em áreas plantadas e naturais. Número total de alelos (A), riqueza alélica rarefacionada para 9 indivíduos (ver texto), diversidade gênica (H_S) e coeficiente de endogamia (F_{IS}) por população de adultos e plântulas entre populações plantadas e naturais. (Valores de F_{IS} em negrito foram estatisticamente diferentes de zero). 82

Capítulo 4

- Tabela 1.** Grids utilizados para identificação da resistência dos tipos de habitat e da paisagem ao fluxo gênico interpopulacional de *Inga vera*. Grids de habitat indicam alterações nos valores de resistência entre plantios de *Inga vera* (I), de cana de açúcar (C) e de áreas urbanas (A). Grids de paisagem indicam variações de 10 a 100% entre os habitats de menor e maior resistência, respectivamente. 112
- Tabela 2.** Diversidade genética de sementes por população de *Inga vera*. Número total de alelos por locus (A), riqueza alélica rarefacionada para 38 indivíduos (ver texto), diversidade gênica (H_S), coeficientes de endogamia (F_{IS}) e de estruturação genética global entre todas as populações (F_{ST}) em plântulas de *I. vera* originadas de plantios monoespecíficos e de áreas naturais. 113
- Tabela 3.** Variabilidade genética de plântulas de *Inga vera* entre plantios monoespecíficos de *Inga* e áreas naturais de floresta. Os atributos da variabilidade genética representam a riqueza alélica rarefacionada para 38 indivíduos (A_{38}), heterozigosidade observada (H_O), diversidade gênica (H_S), coeficientes de endogamia (F_{IS}) e de estruturação genética (F_{ST}). (Níveis de significância foram obtidos a partir de 10000 permutações). 114
- Tabela 4.** Estruturação genética pareada ($F_{ST}/[1-F_{ST}]$) de plântulas de *Inga vera* em plantios monoespecíficos e áreas naturais de floresta Atlântica. (Todos os valores foram estatisticamente diferentes a um nível de significância de 0,05 e 10000 permutações). 115

1. APRESENTAÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	2
2.1. <i>Diversidade genética e fluxo gênico em árvores</i>	2
2.2. <i>Perda de habitat, fragmentação e restauração da floresta Atlântica</i>	3
2.3. <i>Biologia reprodutiva e utilização de Inga em plantios monoespecíficos</i>	6
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
4. CAPÍTULO 1 - <i>Alterações no consumo de néctar e no sucesso reprodutivo de Inga vera subesp. affinis (D.C.) T.D. PENN. (Leguminosae) em plantios monoespecíficos na floresta Atlântica</i>	12
5. CAPÍTULO 2 - <i>Transferência de marcadores moleculares SSR entre as espécies Inga edulis e Inga vera subesp. affinis (D.C.) T.D. PENN. (Leguminosae-Mimosoideae)</i>	42
6. CAPÍTULO 3 - <i>Implicações genéticas e ecológicas do plantio de árvores, Inga vera subesp. affinis (Leguminosae), em uma paisagem fragmentada</i>	52
7. CAPÍTULO 4 - <i>Plantios monoespecíficos de Inga vera subesp. affinis promovendo o fluxo gênico interpopulacional na floresta Atlântica nordestina brasileira</i>	83
8. CONCLUSÕES	116
9. RESUMO	117
10. ABSTRACT	118
11. NORMAS PERIÓDICOS PRETENDIDOS	119

1. APRESENTAÇÃO

O uso indiscriminado dos recursos naturais data de aproximadamente 2000 e resulta em prejuízos diretos à humanidade, como a diminuição da qualidade da água e do solo (BROWN & BROWN, 1992). Alterações antrópicas promotoras de perda de habitat e redução da qualidade dos recursos naturais no Brasil foram intensificadas há cerca de 500 anos com o início do processo de colonização europeia pela costa leste da América do Sul (BUENO, 1998). A floresta Atlântica foi o ecossistema brasileiro mais intensamente degradado por ações antrópicas e encontra-se reduzida a cerca de 11 à 16% de sua cobertura original (RIBEIRO *et al.*, 2009). Além disso, muito do que resta de floresta Atlântica, encontra-se em fragmentos pequenos, isolados e circundados por matrizes diversas (VIANA *et al.*, 1997; RANTA *et al.*, 1998; MORELLATO & HADDAD, 2000). Como consequência da perda de habitat e fragmentação intensos na floresta Atlântica, muitos processos ecológicos, como a polinização, são comprometidos, e a distribuição de indivíduos e populações é alterada (*e.g.* GIRÃO *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2009).

Várias são as tentativas de recuperar características do habitat minimizando os efeitos negativos da fragmentação sobre a manutenção dos ecossistemas naturais, como a floresta Atlântica (RODRIGUES *et al.*, 2009). O plantio de árvores nativas pode contribuir para a atração de polinizadores, atuando no aumento da conectividade entre populações pela diminuição da resistência da paisagem ao fluxo gênico (NAVASCUÉS & EMERSON, 2007), possibilitando assim a manutenção dos ecossistemas. Por outro lado, práticas silviculturais podem potencialmente reduzir a diversidade genética das populações plantadas pela coleta de sementes a partir de poucos indivíduos doadores de sementes (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2005; DAWSON *et al.*, 2007; NAVASCUÉS & EMERSON, 2007).

O objetivo dos artigos propostos nesta tese foi entender qual é o efeito dos plantios monoespecíficos de *Inga vera* subesp. *affinis* na manutenção do sucesso reprodutivo e da diversidade genética de populações. No primeiro capítulo, foi analisado o consumo de néctar e o sucesso reprodutivo de *I. vera* em populações plantadas e naturais. No segundo capítulo, foi analisada a transferibilidade de marcadores moleculares SSR entre espécies de *Inga*. No terceiro capítulo foi analisado como a diversidade genética é retida nas populações de adultos plantados, e como esta diversidade genética é transmitida para plântulas em populações plantadas e naturais de *I. vera*. Por fim, no quarto capítulo, foi analisado qual o efeito dos plantios monoespecíficos sobre o fluxo gênico da espécie em um trecho extremamente degradado de floresta Atlântica.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Diversidade genética e fluxo gênico em árvores*

A variação genética pode ser descrita por três componentes principais. O primeiro componente é a quantidade de variação ou diversidade genética, a qual pode ser medida pelo número de alelos diferentes e pela proporção de indivíduos heterozigotos em uma determinada amostra (NEI, 1987; EL MOUSADICK & PETIT, 1996; LOWE *et al.*, 2004). O segundo componente, conhecido como diferenciação ou estruturação genética, é a distribuição da variação genética entre populações, e pode ser medida por índices baseados na frequência alélica dentro de uma subpopulação (F_{IS}), entre subpopulações (F_{ST}) ou considerando todas as subpopulações de uma amostra (F_{IT}) (WRIGHT, 1943; LOWE *et al.*, 2004). O terceiro componente, ou distância genética, é a quantidade de variação genética entre pares de populações e pode ser medido pelas estimativas de estruturação genética entre populações ($F_{ST}/[1 - F_{ST}]$; ROUSSET, 1997).

Aumentos em alguns componentes da variação genética, como na diversidade genética populacional, contribuem para a melhor adaptabilidade e permanência de uma determinada espécie no ambiente (HUGHES *et al.*, 2008). A troca de material genético entre populações e indivíduos é responsável pela manutenção da diversidade genética nas espécies de plantas em diferentes escalas geográficas, podendo ocorrer pelo fluxo polínico ou de sementes (ENNOS, 1994). Vários fatores, relacionados à paisagem e às características das populações, regulam o fluxo gênico entre populações e interferem diferencialmente na diversidade genética de espécies de plantas (*e.g.* AGUILAR *et al.*, 2008; DICK *et al.*, 2008; MORAES & SEBBEN, 2011; LLORENS *et al.*, 2012; STEINITZ *et al.*, 2012).

Elevados níveis de fragmentação das florestas interferem negativamente nas interações de polinização reduzindo o tamanho efetivo das populações e alterando a distribuição de árvores (*e.g.* GIRÃO *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2009). Diminuições no tamanho efetivo das populações reduz a diversidade genética que pode ser transmitida ao longo das gerações (*e.g.* NAVASCUÉS & EMERSON, 2007). Já a distribuição de indivíduos nas populações, regula a maneira como grãos de pólen e sementes são dispersos, interferindo diferencialmente nos níveis de estruturação genética nas populações (NAKANISHI *et al.*, 2009). Portanto, a composição genética das populações de plantas depende essencialmente da interação entre características do habitat, diversidade genética disponível na espécie, da distribuição de indivíduos e populações, além do comportamento dos polinizadores e dispersores de sementes (*e.g.* AGUILAR *et al.*, 2008; DICK *et al.*, 2008; MORAES & SEBBEN, 2011; LLORENS *et al.*, 2012; STEINITZ *et al.*, 2012).

A maneira como os polinizadores se locomovem entre flores e indivíduos é diretamente relacionada ao fluxo gênico e à manutenção da diversidade genética das espécies de plantas. Polinizadores com extensas áreas de forrageio promovem fluxo polínico entre indivíduos distantes, diminuindo a estruturação genética interpopulacional em plantas (*e.g.* GAIOTTO *et al.*, 2003; MORAES & SEBBEN, 2010). Além disso, os visitantes florais respondem positivamente a alterações na oferta de recursos no espaço, de maneira que flores distribuídas isoladamente recebem menor número de visitas que flores em manchas adensadas (HODGES, 1995; KLINKHAMER *et al.*, 2001). Desse modo, aumentos no isolamento dos indivíduos ocasionam maiores taxas de autopolinização em árvores e favorecem aumentos no coeficiente de endogamia (MORAES & SEBBEN, 2010). Em sentido oposto, aumentos no adensamento de indivíduos promovem redução na distância de dispersão de grãos de pólen (LLORENS *et al.*, 2012). Além disso, há uma tendência de populações mais distantes apresentarem maiores níveis de estruturação genética entre si (STEINITZ *et al.*, 2012). Portanto, características do habitat atuam paralelamente às interações de polinização regulando o fluxo polínico e níveis de estruturação genética entre populações (LLORENS *et al.*, 2012).

2.2. Perda de habitat, fragmentação e restauração da floresta Atlântica

Os registros mais antigos de degradação ambiental, derrubada de florestas e uso inadequado do habitat por ações antrópicas datam de 20000 anos atrás (BROWN & BROWN, 1992). Alterações antrópicas mais severas e promotoras de perda de habitat na floresta Atlântica brasileira datam de 500 anos atrás com o início do processo de colonização europeia pela costa leste da América do Sul (BUENO, 1998). A distribuição original da floresta Atlântica no Brasil abrangia a região leste entre os estados de Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul, em uma área equivalente à 1.315.460km² ou 15% do território brasileiro (COLLINS, 1990). O crescimento da população humana, seguido pelo uso indiscriminado do habitat e o avanço das fronteiras agrícolas no leste brasileiro resultaram na redução e fragmentação de extensas de floresta Atlântica nativa (DEAN, 1995; RANTA *et al.*, 1998; MORELLATO & HADDAD, 2000; PRANCE *et al.*, 2000; SILVA & TABARELLI, 2000).

Atualmente a floresta Atlântica encontra-se reduzida a cerca de 11 a 16% de sua cobertura original, os quais ainda sofrem forte pressão antrópica (RIBEIRO *et al.*, 2009; SILVA & TABARELLI, 2000). Além disso, muito do que resta de floresta Atlântica, encontra-se em fragmentos pequenos, isolados e circundados por matrizes diversas (VIANA *et al.*, 1997; RANTA *et al.*, 1998; MORELLATO & HADDAD, 2000). Mesmo com a intensa

degradação e fragmentação, a floresta Atlântica ainda retém uma das maiores biodiversidade e taxas de endemismo a nível mundial, sendo considerada o quarto *hotspot* em importância (MYERS, 2000; MITTERMEIER *et al.*, 2004). A perda e fragmentação do habitat reduzem o espectro de atributos funcionais das comunidades (GIRÃO *et al.*, 2007) e interferem negativamente nas interações de polinização pela redução do tamanho efetivo e distribuição das populações de polinizadores e plantas (*e.g.* GIRÃO *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2006, 2009).

Espécies de plantas polinizadas por morcegos (e vertebrados em geral), esfingídeos e com sistemas reprodutivos autoincompatíveis, por exemplo, são muito sensíveis à fragmentação e apresentam populações reduzidas em fragmentos pequenos (GIRÃO *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2009). Algumas espécies de polinizadores não sobrevoam áreas abertas como os plantios de cana de açúcar (MILLET & SCHLINDWEIN, 2005). Espécies de esfingídeos na floresta Atlântica nordestina, por exemplo, experimentam redução drástica, ou até mesmo extinção local de populações, em fragmentos pequenos e isolados (LOPES *et al.*, 2006), podendo não contribuir efetivamente para o fluxo polínico entre populações distantes de algumas espécies de plantas, como é o caso de *Inga*. Portanto, os efeitos deletérios da fragmentação podem comprometer a ocorrência de interações ecológicas fundamentais à manutenção da biodiversidade, como a polinização, em diversos níveis.

Ações efetivas mitigadoras dos efeitos negativos da degradação ambiental, por ação antrópica, são urgentes e necessárias para a manutenção da biodiversidade em habitats degradados (*e.g.* PARROTTA *et al.*, 1997; CHAZDON, 2003). Um número crescente de ações de reflorestamentos, envolvendo diversas técnicas, tem sido implementado na floresta Atlântica brasileira, sobretudo nos últimos 30 anos (RODRIGUES *et al.*, 2009).

A primeira fase dos reflorestamentos na floresta Atlântica se estendeu entre 1862 e 1982, sendo marcado pelo o plantio indiscriminado, e sem técnica alguma, de árvores exóticas e nativas (RODRIGUES *et al.*, 2009). Basicamente, este tipo de reflorestamento visava proteger e recuperar a qualidade do solo e da água (KAGEYAMA & CASTRO, 1989). As primeiras tentativas de reflorestamento utilizavam espécies exóticas, principalmente de *Pinus* e *Eucalyptus*, e árvores nativas em plantios puros ou mistos, geralmente com baixa diversidade (GURGEL-FILHO *et al.*, 1982). A recuperação de processos ecológicos não era avaliada neste tipo de reflorestamento e o critério de seleção das espécies não era estabelecido ainda.

Entre os anos de 1982 e 1985, período correspondente à segunda fase dos reflorestamentos na floresta Atlântica brasileira, o uso de espécies arbóreas nativas se tornou

predominante na maioria das iniciativas de restauração florestal (KAGEYAMA & CASTRO, 1989). O uso de conhecimentos sobre processos ecológicos, também passou a ser considerado e implementado nos reflorestamentos a partir desta fase. A técnica utilizada era o plantio com baixa diversidade de espécies e elevada densidade de árvores nativas com capacidade de crescimento rápido. O resultado era a reconstrução de fitofisionomias com baixo custo financeiro e sem capacidade de perpetuação (RODRIGUES *et al.*, 2009). Este tipo de plantio é ainda implantado e pode ser encontrado na floresta Atlântica nordestina, onde as principais espécies utilizadas são *Inga vera* subesp. *affinis* e *I. edulis* (ALVES-COSTA *et al.*, 2008).

A terceira fase dos reflorestamentos na floresta Atlântica brasileira ocorreu entre 1985 e 2000 e se baseava em conhecimentos prévios de ecologia das espécies de plantas para tentar recriar ecossistemas florestais nativos (RODRIGUES & GANDOLFI, 1996). A técnica utilizada nesta fase foi o plantio em módulos, os quais eram compostos pela combinação de espécies, de acordo com seus respectivos grupos ecológicos (RODRIGUES *et al.*, 2009). A vantagem dos módulos de plantios foi o número elevado de espécies, até 140, e sua utilização como alternativa para conservação de espécies *in situ*. O conceito da diversidade genética das mudas utilizadas em reflorestamentos começou a ser discutido, mas ainda não foi aplicado nesta fase (KAGEYAMA & CASTRO, 1989).

A quarta fase ocorreu no início dos anos 2000 e trouxe conceitos importantes no sentido da recriação de habitats baseados em processos ecológicos que acelerassem a sucessão natural, promovendo a capacidade de autoperpetuação. A restauração passou a ser vista como um processo não determinístico, o qual permitia a ocorrência de eventos estocásticos que poderiam conduzir a tipos distintos de comunidades clímax (PICKETT & CADENASSO, 2005). A seleção de espécies passou a ser fortemente influenciada pelo conhecimento dos mecanismos de polinização e dispersão de sementes, e cada vez mais foi utilizada em planos reflorestamentos na floresta Atlântica (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Atualmente, as ações de reflorestamentos visam combinar a composição florística e diversidade genética, as quais são elementos chave para a manutenção e evolução de qualquer sistema florestal (RODRIGUES *et al.*, 2009). Informações sobre origem das sementes são extremamente importantes para inferências sobre a diversidade genética dos plantios. Uma estratégia eficiente para implementação de plantios com elevada diversidade genética, é coleta de sementes em populações naturais próximas das áreas a serem reflorestadas, seguida do cultivo de mudas em casa de vegetação antes do plantio (MCKAY *et al.*, 2005). Outra estratégia é o transplante de indivíduos regenerantes bem como de sementes presentes em bancos de sementes (RODRIGUES & GANDOLFI, 2000). Mesmo com os esforços de

manter a diversidade genética em reflorestamentos, muitos plantios de árvores resultam em populações com diversidade reduzida em relação a áreas naturais (e.g. HOLLINGSWORTH *et al.*, 2005; DAWSON *et al.*, 2007; NAVASCUÉS & EMERSON, 2007; STEINITZ *et al.*, 2012). O próximo desafio para a restauração florestal é aprimorar a distribuição das espécies nos plantios, considerando distâncias de dispersão dos grãos de pólen e de sementes com base no conhecimento da biologia reprodutiva das espécies (RODRIGUES *et al.*, 2009).

2.3. Biologia reprodutiva e utilização de *Inga* em plantios monoespecíficos

O gênero *Inga* Miller possui cerca de 300 espécies arbóreas com distribuição neotropical (PENNINGTON, 1997). As flores de espécies de *Inga* são do tipo pincel, apresentando tubos florais estreitos que acumulam o néctar como principal recurso floral aos polinizadores. A maioria das espécies de *Inga* parece apresentar antese floral noturna e ser polinizada por morcegos (quiropterófilas) ou por esfingídeos (esfingófilas) (KOPTUR, 1983, 1984; CRUZ-NETO *et al.*, 2007, 2011; AMORIM *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2012). Apesar de esfingídeos e morcegos serem os principais polinizadores de *Inga*, visitantes florais diurnos, como beija flores, também podem contribuir positivamente para a frutificação de algumas espécies (e.g. AMORIM *et al.*, 2012).

Espécies de *Inga* (Miller), estudadas até o momento, são fortemente autoincompatíveis, dependem de polinizadores especializados para a formação de frutos e sementes, além de apresentarem baixas taxas de frutificação, menos de 3% em média, em condições naturais (KOPTUR, 1983; CRUZ-NETO, 2007; AMORIM *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2012). Alguns dos polinizadores mais eficientes para espécies de *Inga* com flores noturnas, como os esfingídeos (CRUZ-NETO *et al.*, 2007, 2011; AMORIM *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2012), são sensíveis à fragmentação e apresentam populações drasticamente reduzidas, ou até mesmo localmente extintas, em fragmentos pequenos e isolados (LOPES *et al.*, 2006), como é o caso da maioria dos remanescentes de floresta Atlântica (VIANA *et al.*, 1997; MORELLATO & HADDAD, 2000).

A espécie *Inga vera* subsp. *affinis* (objeto de estudo da presente tese) ocorre na América Central e na América do Sul, entre a Colômbia e o Uruguai. A espécie apresenta hábito arbóreo, podendo alcançar entre 18 e 25m de altura e ocorre naturalmente ao longo de cursos d' água, compondo matas de galeria (PENNINGTON, 1997). A taxa de frutificação em condições naturais de *I. vera* subsp. *affinis* é baixa, aproximadamente 2%, e a síndrome de polinização é esfingófila, sendo efetivamente polinizada por esfingídeos, morcegos e até mesmo beija-flores (Cruz-Neto *et al.* submetido). A fenologia da floração de *I. vera* subsp.

affinis é subanual, com elevada sincronia entre indivíduos, os quais podem florescer com intensidade superior a 75% entre vários anos (CRUZ-NETO *et al.*, 2011).

Apesar das baixas taxas de frutificação em condições naturais e da dependência de polinizadores especializados e sensíveis à fragmentação para a formação de frutos e sementes, espécies de *Inga*, são amplamente utilizadas em plantios monoespecíficos, ou puros, em alguns países da América Central e do Sul (PENNINGTON, 1997). Na floresta Atlântica brasileira, referente ao seu trecho nordestino, as ações de reflorestamento em sua maioria utilizam baixa riqueza de espécies, 1 a 4 no caso de florestas ciliares e 1 a 8 em outras áreas, sendo as espécies mais utilizadas, tanto em número de plantios como em abundância de indivíduos, as representantes do gênero *Inga* (COSTA *et al.*, 2008).

A forma como os indivíduos são plantados nos plantios monoespecíficos, em espaçamentos 3 x 2 (RODRIGUES & GANDOLFI, 1996, 2000), a dificuldade de obtenção de sementes (COSTA *et al.*, 2008) e a utilização de poucas matrizes doadoras de propágulos, devem resultar em plantios com adensados de indivíduos com baixa variabilidade genética entre si, e muitas vezes desconectados fisicamente de áreas florestadas. A combinação de atributos florais e dos sistemas reprodutivos das espécies de *Inga* com as técnicas de plantios monoespecíficos aplicados na floresta Atlântica ao norte do Rio São Francisco devem exercer forte influência sobre a atratividade dos visitantes florais, no fluxo gênico interpopulacional e no sucesso reprodutivo dos indivíduos usados nos plantios.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOBO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 24, p. 5177-5188, 2008.
- ALVES-COSTA, C. P.; LÔBO, D.; LEÃO, T.; BRANCALION, P. H. S.; NAVE, A. G.; GANDOLFI, S.; SANTOS, A. M. M.; RODRIGUES, R. R.; TABARELLI, M. **Implementando reflorestamentos com alta diversidade na Zona da Mata Nordestina: Guia Prático**. Recife: J. Luiz Vasconcelos, 218 pp., 2008.
- AMORIM, F. W.; GALETTO, L.; SAZIMA, M. Behind the pollination syndrome: Nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae), **Plant Biology**, no prelo, 2012.
- BARROS, E. C. O.; WEBBER, A. C.; MACHADO, I. C. Limitação de polinizadores e mecanismo de autoincompatibilidade de ação tardia como causas da baixa formação de

- frutos em duas espécies simpátricas de *Inga* Mill. (Fabaceae–Mimosoideae) na Amazônia Central. **Rodriguesia**, no prelo, 2012.
- BROWN, K. S.; BROWN, G. G. Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: WHITMORE, T. C.; SAYER, J. A. (Eds.), **Tropical Deforestation and Species Extinction**. Chapman & Hall, London, pp. 119–142, 1992.
- BUENO, E. **A viagem do descobrimento: a verdadeira história da expedição de Cabral**. Coleção Terra Brasilis, vol. I, Ed. Objetiva Ltda., Rio de Janeiro, Brasil. 137 pp., 1998.
- CRUZ-NETO, O.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Ecologia da polinização de *Inga striata* (Benth.) (Leguminosae-Mimosoideae) em um remanescente de Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biosciências**, v. 5, p. 570-572, 2007.
- CRUZ-NETO, O.; MACHADO, I. C.; DUARTE, J. A.; LOPES, A. V. Synchronous phenology of hawkmoths (Sphingidae) and *Inga* species (Fabaceae–Mimosoideae): implications for the restoration of the Atlantic forest of northeastern Brazil. **Biodiversity & Conservation**, v. 20, p. 751-765, 2011.
- DEAN, W. **With Broadax and Firebrand: The Destruction of the Brazilian Atlantic Forest**. University of California Press, Berkeley, 1995.
- DICK, C. W.; HARDY, O. J.; JONES, F. A.; PETIT, J. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. **Tropical Plant Biology**, v. 1, p. 20-33, 2008.
- CHAZDON, R. L. Tropical forest recovery: legacies of human impact and natural disturbances. **Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics**, v. 6, p. 51–71, 2003.
- CORLETT, R.T. Environmental forestry in Hong Kong: 1871–1997. **Forest Ecology and Management**, v. 116, p. 93–105, 1999.
- DAWSON, I. K.; HOLLINGSWORTH, P. M.; DOYLE, J. J.; KRESOVICH, S.; WEBER, J. C.; SOTELO-MONTES, C.; PENNINGTON, T. D.; PENNINGTON, T. R. Origins and genetic conservation of tropical trees in agroforestry systems: a case study from Peruvian Amazon. **Conservation Genetics**, v. 9, p. 361-372, 2007.
- EL MOUSADIK, A.; PETIT, R. J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L) Skeels] endemic to Morocco. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 832–839, 1996.
- ENNOS, R.A. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. **Heredity**, v. 72, p. 250-259, 1994.

- GIRÃO, L. C.; LOPES, A. V.; TABARELLI, M.; BRUNA, E. M. 2007. Changes in tree reproductive traits reduce functional diversity in a fragmented Atlantic Forest landscape. **PloS One**, v. 2, n. 9, e908, 2007.
- GURGEL-FILHO, O. A.; MORAES, J. L.; MORAIS, E. Características silviculturais e competição entre espécies folhosas. **Silvicultura em São Paulo**, v. 16, p. 895–900, 1982.
- HODGES, S. A. The influence of nectar production on hawkmoth behaviour, self pollination and seed production in *Mirabilis multiflora* (Nyctaginaceae). **American Journal of Botany**, v. 82, p. 197-204, 1995.
- HOLLINGSWORTH, P. M.; DAWSON, I. K.; GOODALL-COPESTAKE, P.; RICHARDSON, J. E.; WEBER, J. C.; SOTELO-MONTES, C.; PENNINGTON, R. T. Do farmers reduce genetic diversity when they domesticate tropical trees? A case study from Amazonia. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 497-501, 2005.
- HUGHES, A. R.; INOUE, B. D.; JOHNSON, M. T. J.; INDERWOOD, N.; VELLEND, M. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology Letters**, v. 11, p. 609-623, 2008.
- KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, C. F. A. Sucessão secundária, estrutura genética e plantações de espécies arbóreas nativas. **IPEF**, v. 41/42, p. 83-93, 1989.
- KLINKHAMER P. G. L.; DE JONG, T.; LINNEBANK, L. A. Small-scale patterns determine ecological relationships: an experimental example using nectar production rates. **Ecology Letters**, v. 4, p. 559-567, 2001.
- KOPTUR, S. Flowering phenology and floral biology of *Inga* Fabaceae (Mimosoideae). **Systematic Botany**, v. 8, p. 354-368, 1983.
- KOPTUR S. Outcrossing and pollinator limitation of fruit set: Breeding systems of neotropical *Inga* trees (Fabaceae: Mimosoideae). **Evolution**, v. 38, p. 1130-1143, 1984.
- LLORENS, T. M.; BYRNE, M.; YAHTES, C. J.; NISTELBERGER, H. M.; COATES, D. J. Evaluating the influence of different aspect of habitat fragmentation on mating patterns and pollen dispersal in the bird-pollinated *Banksia sphaerocarpa* var. *caesia*. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 314-328, 2012.
- LOPES, A. V.; MEDEIROS, P. C.; AGUIAR-NETO, A. V.; MACHADO, I. C. Esfingídeos. In: TABARELLI, M.; PORTO, K.C. (orgs). **Diversidade Biológica no Centro de Endemismo Pernambucano: Sítios Prioritários para a Conservação**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2006.
- LOPES, A. V.; GIRÃO, L. C.; SANTOS, B. A.; PERES, C. A.; TABARELLI, M. Long-term erosion of tree reproductive trait diversity in edge-dominated Atlantic forest fragments. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1154-1165, 2009.

- LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: Design, analysis and application**. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, p. 326, 2004.
- 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, p. 432–440, 2005.
- MILLET-PINHEIRO, P.; SCHLINDWEIN, C. Do euglossine males (Apidae, Euglossini) leave tropical rainforest to collect fragrances in sugarcane monocultures? **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, p. 853-858, 2005.
- MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Pollen dispersal between isolated trees in the brazilian savannah: A case study of the Neotropical tree *Hymenaea stigonocarpa*. **Biotropica**, v. 43, p. 192-199, 2011.
- MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, p. 786-792, 2000.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.
- MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R.; HOFFMAN, M.; PILGIM, J.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOUREX, J.; FONSECA, G. A. B. **Hotspots revisited: Earth biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. CEMEX, Cidade do México, p. 390, 2004.
- NAKANISHI, A.; TOMARU, N.; YOSHIMARU, H.; MANABE, T.; YAMAMOTO, S. Effects of seed- and pollen-mediated gene dispersal on genetics structure among *Quercus salicina* saplings. **Heredity**, v. 102, p. 182-189, 2009.
- NAVASCUÉS, M.; EMERSON, B. C. Natural recovery of genetic conservation by gene flow in reforested areas of the endemic Canary Island pine, *Pinus canariensis*. **Forest Ecology and Management**, v. 244, p. 122-128, 2007.
- NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, 1987.
- PARROTTA, J. A.; TURNBULL, J. W.; JONES, N. Catalyzing native forest regeneration on degraded tropical lands. **Forest Ecology and Management**, v. 99, p. 1–7, 1997.
- PENNINGTON, T.D. **The genus Inga**. Royal Botanic Gardens, Kew, 1997.
- PICKETT, S. T. A.; CADENASSO, M. L. Vegetation dynamics. In: VAN DER MAAREL, E. 2 ed., **Vegetation Ecology**. Blackwell Publishing, Oxford, p. 172–198, 2005.
- PREVEDELLO, J. A.; VIEIRA, M. V. Does type of matrix matter? A quantitative review. **Biodiversity and Conservation**, v. 19, p. 1205-1223, 2010.

- RANTA, P.; BLOM, T.; NIEMELÄ, J.; JOENSUU, E.; SIITONEN, M. The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. **Biodiversity and Conservation**, v. 7, p. 385-403, 1998.
- 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**, v. 142, p. 1141-1153.
- RODRIGUES, R. R.; GANDOLFI, S. Recomposição de florestas nativas: princípios gerais e subsídios para uma definição metodológica. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 2, p. 4-15, 1996.
- RODRIGUES, R. R.; GANDOLFI, S. Conceitos, tendências e ações para a recuperação de florestas ciliares. In: RODRIGUES, R. R.; LEITÃO-FILHO, H. F. (Eds.), **Matas Ciliares: Conservação e Recuperação**. Editora da Universidade de São Paulo/FAPESP, São Paulo, p. 235-247, 2000.
- 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**, v. 142, p. 1241-1251, 2009.
- ROUSSET, F. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-Statistics under isolation by distance. **Genetics**, v. 145, p. 1219-1228, 1997.
- SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic Forest of northeast Brazil. **Nature**, v. 404, p. 72-73, 2000.
- STEINITZ, O.; ROBLEDO ARNUNCIO, J. J.; NATHAN, R. Effects of Forest plantations on the genetic composition of conspecific native Aleppo pine populations. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 300-313, 2012.
- TABARELLI, M. Dois Irmãos: o desafio da conservação biológica em um fragmento de floresta tropical. In: MACHADO I.C., LOPES A.V. & PÔRTO K.C. (orgs.), **Reserva Ecológica de Dois Irmãos: Estudos em um Remanescente de Mata Atlântica em área Urbana (Recife – Pernambuco – Brasil)**, Editora Universitária da UFPE, Recife, p.311-323, 1998.
- VIANA, V. M.; TABANEZ, A. A. J.; BATISTA, J. L. F. Dynamics and restoration of forest fragments in the brazilian Atlantic moist forest. In: LAURENCE, W. F.; BIERREGAARD JR., R. O. (eds.). **Tropical Forests Remnants - Ecology, management and conservation of fragmented communities**. The University of Chicago Press, Chicago, p. 351-365, 1997.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, p. 114-138, 1943.

CAPÍTULO 1

**Alterações no consumo de néctar e no sucesso reprodutivo de *Inga vera*
subesp. *affinis* (D.C.) T.D. PENN. (Leguminosae) em plantios
monoespecíficos na floresta Atlântica**

RESEARCH ARTICLE

Alterações no consumo de néctar e no sucesso reprodutivo de *Inga vera* subesp. *affinis* (D.C.) T.D. PENN. (Leguminosae) em plantios monoespecíficos na floresta Atlântica

Oswaldo Cruz-Neto¹; Jéssica Luiza Souza Silva¹; Marcela Masie Woolley de Melo Santos²; Antonio V. Aguiar-Neto³ & Ariadna V. Lopes^{4*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50372-970, Brasil. E-mail: ocruznt@gmail.com

² Laboratório de Biologia Floral e Reprodutiva (POLINIZAR), Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50372-970, Brasil.

³ Department of Wildlife Ecology and Conservation, University of Florida, P.O. Box 110430, Gainesville, FL 32611-0430, Florida, U.S.A. E-mail: patriota@ufl.edu

⁴ A.V. Lopes (Autor para correspondência)

Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50372-970, Brazil. E-mails: avflopes@ufpe.br, ariadna.lopes@pq.cnpq.br

Phone: +55 81 2126-8945; Fax: +55 81 2126-8348

RESUMO

A manutenção das interações de polinização e do sucesso reprodutivo das angiospermas está relacionada ao tamanho e distribuição das populações de plantas e de seus polinizadores. Objetivamos entender neste trabalho, os efeitos dos plantios monoespecíficos de *Inga*, do isolamento geográfico das populações e do adensamento de indivíduos sobre o consumo de néctar e sucesso reprodutivo de *Inga vera* em populações plantadas e naturais na floresta Atlântica nordestina. Selecionamos e georeferenciamos dez populações de *I. vera* sendo cinco localizadas em plantios monoespecíficos e cinco em fragmentos de floresta Atlântica. Medimos o sucesso reprodutivo masculino, relacionado ao fluxo de pólen, o feminino, referente às taxas de frutificação, e o geral para cada população estudada. O padrão de secreção de néctar foi contínuo para as populações estudadas, havendo maior consumo de néctar nas populações naturais em relação às plantadas. O sucesso reprodutivo masculino foi cerca de 7% maior nas populações naturais em relação às plantadas e se relacionou positivamente com aumentos no adensamento de indivíduos nas populações estudadas. Populações naturais apresentaram maiores taxas de frutificação em relação às plantadas, entretanto, os frutos formados nos fragmentos de floresta e plantios monoespecíficos de *Inga*, apresentaram quantidade semelhante de sementes. Houve redução no sucesso reprodutivo geral das populações plantadas em relação às naturais. Mostramos com este estudo a ocorrência de redução no sucesso reprodutivo de *I. vera* nos plantios monoespecíficos, a qual pode ter sido ocasionada por alterações no fluxo polínico e pela distribuição adensada de indivíduos co-específicos dentro das populações plantadas.

Palavras chave: Esfingídeos; fluxo polínico; fragmentação; restauração florestal; polinização.

Introdução

O sucesso reprodutivo pode ser entendido como o potencial dos organismos em produzir descendentes férteis. No caso das angiospermas, o sucesso reprodutivo, é resultado da interação entre os componentes masculino e feminino, os quais dizem respeito ao fluxo de grãos de pólen e taxas de produção de frutos e sementes, respectivamente (e.g. Parra-Tabla *et al.* 2000; Aguilar & Galetto 2004; Quesada *et al.* 2004). Alterações no fluxo polínico podem ser promovidas pela oferta de recursos florais e distribuição dos indivíduos e populações (Hodges 1995; Fisogni *et al.* 2011; Llorens *et al.* 2012). Neste caso, grande oferta de recursos, associada à distribuição agrupada de indivíduos co-específicos e maior homogeneidade de características abióticas do ambiente favorecem a dispersão de grãos de pólen entre flores e indivíduos (e.g. Ghazoul *et al.* 1998; Parra-Tabla *et al.* 2000; Aguilar & Galetto 2004; Llorens *et al.* 2012), contribuindo positivamente para o sucesso reprodutivo das angiospermas.

Aumentos na disponibilidade de recursos florais, como néctar, favorecem a atração dos polinizadores (Hodges 1995; Klinkhamer *et al.* 2001) e interferem indiretamente no fluxo de pólen entre indivíduos e populações diferentes. Por outro lado, populações de plantas com polinização biótica, geograficamente isoladas e com número reduzido de indivíduos tendem a apresentar sucesso reprodutivo reduzido, pela limitação do fluxo polínico e promoção da redução na quantidade de sementes produzidas (Llorens *et al.* 2012). Ações antrópicas promotoras de perda e fragmentação do habitat interferem negativamente nas interações de polinização pela redução do espectro de atributos funcionais das comunidades e alterações na distribuição das populações de polinizadores e plantas (Girão *et al.* 2007; Lopes *et al.* 2006, 2009).

O crescimento da população humana, o uso indiscriminado do habitat e o avanço das fronteiras agrícolas vêm expondo a maioria das populações e comunidades de plantas aos efeitos deletérios das ações antrópicas diretas ou indiretas (e.g. Aizen & Feinsinger 1994;

Girão *et al.* 2007; Lopes *et al.* 2009). A floresta Atlântica vem sendo exposta a ações antrópicas severas nos últimos 500 anos (Dean 1995; Silva & Tabarelli 2000). A distribuição original da floresta Atlântica abrangia a região leste brasileira entre os estados de Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul, em uma área equivalente à 1.315.460km² ou 15% do território brasileiro (Collins 1990). Atualmente, restam aproximadamente 16% de floresta Atlântica, a qual encontra-se distribuída em pequenos fragmentos circundados por matrizes diversas (Ribeiro *et al.* 2009).

Ações de reflorestamento diversas com o objetivo de recuperar características do habitat minimizando os efeitos negativos da fragmentação sobre interações ecológicas chave, como a polinização (*sensu* Rodrigues *et al.* 2009), são urgentes para ecossistemas degradados. O plantio adensado, utilizando uma ou poucas espécies, de árvores nativas é uma técnica ultrapassada, mas ainda muito utilizada na floresta Atlântica (Rodrigues *et al.* 2009). A floração destas populações com indivíduos distribuídos adensadamente pode contribuir para a atração de polinizadores, atuando no aumento da conectividade entre populações (Navascués & Emerson 2007) e no sucesso reprodutivo de espécies de plantas. Muito se conhece sobre os efeitos negativos da fragmentação na reprodução de angiospermas (Aizen & Feisinger 1994; Aguilar & Galetto 2004; Girão *et al.* 2007; Lopes *et al.* 2009; Llorens *et al.* 2012), mas as consequências dos plantios adensados de árvores sobre o sucesso reprodutivo das espécies utilizadas em reflorestamentos, ainda são pouco compreendidas (*e.g.* Navascués & Emerson 2007; Steinitz *et al.* 2012).

O objetivo deste estudo foi entender como o grau de isolamento de populações, a densidade de indivíduos co-específicos e o plantio monoespecífico de árvores interferem na reprodução da espécie arbórea *Inga vera* subesp. *affinis* na floresta Atlântica. Testamos as hipóteses de que a prática de plantios monoespecíficos de *Inga* associada ao aumento no grau de isolamento populacional e à diminuição na densidade de indivíduos interferem

negativamente no (i) consumo de néctar e no (ii) sucesso reprodutivo geral em populações de *Inga vera*. Esperamos encontrar (a) maior quantidade de néctar extraída das flores e (b) maior sucesso reprodutivo geral em populações de *I. vera* localizadas em fragmentos naturais de floresta Atlântica em relação aos plantios monoespecíficos; e que populações plantadas e naturais com menor grau de isolamento geográfico e com indivíduos distribuídos em maior densidade apresentam (c) maior quantidade de néctar consumida e (d) maior índice de sucesso reprodutivo geral.

Métodos

Área de estudo

Realizamos este estudo numa área pertencente à Usina Serra Grande, uma propriedade privada, produtora de álcool e açúcar, localizada na divisa entre os estados de Pernambuco e Alagoas (8°58'50"S, 36°04'30"O). A área de estudo caracteriza-se pela presença de uma matriz uniforme de cana de açúcar, a qual circunda remanescentes naturais de floresta Atlântica, plantios monoespecíficos de árvores e áreas urbanas (Figura 1). A usina apresenta área total de 24000 ha dos quais 9000 ha são fragmentos de floresta Atlântica com tamanho e formato variados (Girão *et al.* 2007; Lopes *et al.* 2009).

Os plantios de árvores na área de estudo utilizam entre quatro e oito espécies, sendo principalmente, as espécies nativas *Inga vera* subesp. *affinis* e *I. edulis*, e as espécies exóticas *Eucalyptus camaldulensi* e *Eucalyptus citriodora* (Alves-Costa *et al.* 2008; Cruz-Neto pers. com.). Os plantios de *Inga* são feitos geralmente nas margens de cursos d' água ou de fragmentos e o espaçamento médio entre os indivíduos, em cada plantio, é 2,5m (*sensu* Rodrigues *et al.* 2009). No total, aproximadamente 160.000 mudas de *Inga* foram plantadas e em 144 ha, sendo 20 ha com *I. edulis* e 124 ha com *I. vera*.

A área de estudo está associada ao centro de endemismo Pernambuco (*sensu* Prance 1982), situa-se no planalto da Borborema e apresenta vegetação do tipo Floresta Ombrófila Aberta Baixo Montana segundo a classificação de Veloso et al (1991). O clima é do tipo As' (Köppen 1931), quente-úmido e apresenta sazonalidade climática, sendo uma estação seca entre outubro e fevereiro e uma chuvosa entre abril e setembro com pluviosidade anual de aproximadamente 2000 mm (dados meteorológicos de 1922-2001, USGA). O cultivo de cana de açúcar na região se iniciou há cerca de 300 anos e resultou na perda de extensas áreas de floresta em estágio avançado de sucessão (Coimbra-Filho & Câmara 1996). Atualmente as famílias de plantas com maior número de espécies na área de estudo são Leguminosae (30 spp., das quais 14 pertencem a sub família Mimosoideae e oito ao gênero *Inga*), seguida por Sapotaceae (13spp.), Lauraceae (11spp.) e Sapindaceae (8 spp.) (Girão et al 2007).

Espécie estudada

Inga vera subesp. *affinis* é arbórea e distribui-se na América Central e na América do Sul, entre Colômbia e Uruguai. A espécie estudada ocorre naturalmente em áreas de regeneração secundária e ao longo de cursos d' água, compondo matas de galeria (Pennington 1997). O sistema sexual de *I. vera* é autoincompatível, sendo a polinização realizada efetivamente por esfingídeos e morcegos (Cruz-Neto *et al.* no prelo). A floração de *I. vera* é sub anual, havendo elevada sincronia entre indivíduos (Cruz-Neto *et al.* 2011). As sementes de *I. vera* apresentam arilo espesso e adocicado sendo dispersas por mamíferos (Pennington 1997). Acreditamos que *I. vera* representa um bom modelo de estudo para entender os efeitos da distribuição de indivíduos e populações na utilização de néctar floral e no sucesso reprodutivo devido à dependência biótica para a polinização, além da ocorrência em plantios monoespecíficos e em fragmentos de floresta Atlântica.

Amostragem, isolamento geográfico e densidade populacional

Selecionamos e georeferenciamos dez populações de *I. vera* sendo cinco localizadas em plantios monoespecíficos e cinco em fragmentos de floresta Atlântica (Figura 1). Consideramos cada plantio e cada fragmento de floresta Atlântica como populações distintas para garantirmos isolamento espacial entre as unidades amostrais. Marcamos dez indivíduos adultos de *I. vera* em cada população, totalizando 100 indivíduos amostrados, os quais foram usados nos experimentos de sucesso reprodutivo.

Inferimos o grau de isolamento geográfico das populações a partir dos pontos georeferenciados e de mapas pré-existentes para área de estudo, com auxílio do software ArcGis 10. Medimos um buffer de 1km a partir da borda dos fragmentos e plantios de *Inga* selecionados. Calculamos o índice de isolamento geográfico (ISG) das populações de *Inga* estudadas pelo percentual da área dos buffers que foi representado por fragmentos de floresta Atlântica (Santos *et al.* 2008). Quanto maior é o valor do índice de isolamento geográfico, menor é o grau de isolamento de uma determinada população amostrada.

Estimamos a densidade de indivíduos das populações por meio do cálculo do índice de vizinhança mais próxima (IVP – “*nearest neighbour index – NNI*”). Selecionamos os indivíduos focais, a partir dos quais fizemos os experimentos de sucesso reprodutivo, e medimos as distâncias (d1 e d2), em metros, para os dois indivíduos co-específicos mais próximos. O cálculo do índice de vizinhança mais próxima consiste na raiz quadrada da multiplicação das duas distâncias, d1 e d2. Quanto menor é o valor do índice, maior é a densidade de indivíduos em uma população (Ghazoul *et al.* 1998).

Padrão de secreção, disponibilidade e consumo de néctar em I. vera

Investigamos o padrão de secreção, de acordo com Galetto & Bernardello (2005), e a disponibilidade de néctar em flores de *I. vera*, para testarmos a hipótese de que diminuição no

grau de isolamento geográfico (ISG) populacional associada à aumento na densidade de indivíduos (IVP) interferem positivamente no consumo de néctar. Isolamos, com sacos de tecido voal, aproximadamente 60 botões florais em pré-antese para cada população, os quais foram separados em seis grupos com 10 botões, para identificarmos o padrão de secreção de néctar de *I. vera*. Às 20:00 h extraímos o néctar e medimos o seu volume e concentração de açúcares em cada uma das dez flores do primeiro grupo. Às 22:00 h realizamos as medições de néctar nas 10 flores do segundo grupo, e repetimos o experimento até às 6:00 h da manhã seguinte a antese. Desta forma, a cada duas horas, acrescentamos à nossa amostragem uma nova medida da quantidade de néctar acumulado nas flores desde o início da antese.

Extraímos o néctar, medimos volume e concentração de açúcares, de flores mantidas em condições naturais (e.g. acessíveis aos visitantes florais) para investigarmos a disponibilidade de néctar de *I. vera* ao longo da antese. Utilizamos, neste experimento, 60 flores divididas em seis grupos de 10, e realizamos as extrações de néctar em intervalos de duas horas, como já foi descrito para o experimento de determinação do padrão de secreção de néctar. Fizemos todas as extrações de néctar durante o pico de floração de *I. vera*. Consideramos picos de floração, uma intensidade de emissão de flores a nível populacional igual ou superior a 75% (ver Cruz-Neto *et al.* 2011 para detalhes). Calculamos o consumo de néctar pela diferença entre a quantidade de néctar produzida e disponível na flor ao final do período de secreção ativa.

Utilizamos, respectivamente, microseringas (Microliter® 10 e 25 µl) e refratômetro de bolso (Atago® 0-50%) para as medições do volume e concentração de açúcares no néctar. Consideramos neste estudo, volume (µl) e miligramas de açúcares (mg de néctar/flor) como variáveis operacionais da quantidade de néctar produzida por flor. Os valores de miligramas de açúcares no néctar foram obtidos pela associação entre volume e concentração de açúcares no néctar de acordo com Galetto & Bernardello (2005).

Índices de sucesso reprodutivo masculino, feminino e geral em I. vera

Os grãos de pólen de *I. vera* são dispersos em políades com aproximadamente 20 grãos de pólen (Cruz-Neto *et al.* 2011). Sendo assim, todas as contagens dos grãos de pólen no presente estudo foram baseadas no número de políades.

Estimamos o índice de sucesso reprodutivo masculino (SRM) pela razão entre a quantidade de políades removidas de cada flor e o número de políades produzidas por flor (Aguilar & Galetto 2004). Coletamos botões em pré-antese, os quais foram fixados em álcool 70%, para a contagem do número de políades produzidas por flor de *I. vera*. Extraímos anteras e políades dos botões em pré-antese para a montagem de lâminas de microscópio. Coramos as políades utilizando gelatina glicerizada (Dafni 2005). Coletamos ainda políades de flores mantidas sob condições de polinização natural ao final da antese para estimarmos a quantidade de políades removidas durante a antese floral. Espetamos um cubo de gelatina glicerizada, com 0,5cm de aresta, em uma agulha, e o esfregamos nas anteras de uma flor de *I. vera*. Utilizamos um cubo de gelatina por flor amostrada. Colocamos cada cubo de gelatina glicerizada, contendo as políades de *I. vera*, em uma lâmina de microscópio, a qual foi ligeiramente aquecida para o derretimento da gelatina e melhor visualização das políades. Utilizamos 200 botões florais em pré-antese e 200 flores no final da antese, sendo 20 botões e 20 flores para cada população amostrada, para analisarmos o sucesso reprodutivo masculino. Observamos todas as lâminas em microscópio óptico e contamos o número de políades produzido e remanescente nas flores *I. vera*. Estimamos a remoção das políades pela diferença entre o número total de políades produzidas por flor e a quantidade de políades remanescentes nas flores ao final da antese.

Calculamos o índice de sucesso reprodutivo feminino (SRF) pela multiplicação entre a taxa de frutificação natural e a taxa de formação de sementes (Aguilar & Galetto 2004). Estimamos a taxa de frutificação natural pela marcação de aproximadamente 500 flores por

população, seguida do acompanhamento do número de frutos formados em relação às flores. Marcamos flores isoladas ou inflorescências inteiras, as quais foram mantidas em condições naturais de polinização, e consideramos apenas frutos maduros nesta análise.

Medimos a taxa de formação de sementes pela razão entre quantidade de sementes por fruto e número de óvulos por ovário. Coletamos aproximadamente 30 frutos maduros em cada população e contamos o número de sementes formadas em cada fruto. Além disso, coletamos 30 flores por população, as quais foram fixadas em álcool 70%, realizamos cortes transversais nos ovários destas flores e contamos o número de óvulos em cada ovário sob microscópio estereoscópico. Calculamos o índice de sucesso reprodutivo geral (SRG) pela multiplicação entre os índices de sucesso reprodutivo masculino e feminino de acordo com a fórmula, adaptada de Aguilar & Galetto (2004): $[(\text{políades removidas por flor} / \text{políades produzidas por flor}) \times (\text{frutos formados} / \text{flores marcadas}) \times (\text{sementes por fruto} / \text{óvulos por ovário})]$.

Análise de dados

Extraímos a raiz quadrada de todas as variáveis para obtermos maior linearidade dos dados e atendermos aos princípios da normalidade e homocedasticidade. Testamos a normalidade por meio do teste de Liliefors e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene (Sokal & Rohlf, 1981). Utilizamos GLMs (Modelos Lineares Gerais) para identificarmos as relações de adensamento de indivíduos co-específicos e de isolamento geográfico com a dinâmica de néctar e o sucesso reprodutivo das populações plantadas e naturais de *I. vera*. Comparamos a quantidade de néctar consumida, além das variáveis do sucesso reprodutivo, entre populações plantadas e naturais por meio de testes *t* para testarmos a hipótese de que a prática de plantios monoespecíficos de *Inga* interfere negativamente no consumo de néctar e no sucesso reprodutivo geral em populações de *I. vera*.

Utilizamos regressões lineares para identificarmos as relações entre os fatores (*i.e.* adensamento de indivíduos co-específicos e isolamento geográfico das populações) e as

variáveis dependentes (*i.e.* dinâmica de néctar e as variáveis do sucesso reprodutivo de *I. vera*). Identificamos diferenças na quantidade de néctar consumida e no sucesso reprodutivo de *I. vera* em populações plantadas e naturais utilizando ANOVA. Realizamos as análises no programa STATISTICA (Statsoft Inc. 2007), para as comparações de volume e miligramas de néctar entre populações naturais e plantadas, e R (R Development Core Team 2012) para o restante das comparações.

Resultados

Caracterização das populações plantadas e naturais de I. vera

Os plantios de *I. vera* apresentaram área média de 0,066 km² ($\pm 0,05$) variando entre 0,016 e 0,117 km². A área média dos fragmentos amostrados foi 9,16 km² variando entre 0,524 e 29,93 km² (Tabela 1). A distância média entre os plantios foi de 11,21 km, variando entre 1,12 e 23,67 km, e entre plantios de *I. vera* e fragmentos de floresta, foi de 11,23 km, variando entre 0,65 e 29,4 km.

O índice de isolamento geográfico para os plantios de *I. vera* foi de 0,011 e variou entre 0,0004 e 0,052, indicando a presença de pouca cobertura vegetal ao redor dos plantios. Fragmentos de floresta apresentaram índice de isolamento geográfico igual a 25,546, o qual variou entre 7,68 e 37,64, indicando moderada quantidade de cobertura vegetal nas proximidades dos fragmentos (Tabela 1). O índice de vizinhança mais próxima para os plantios de *I. vera* variou entre 3,482 e 5,03, enquanto que para os fragmentos de floresta natural variou entre 9,051 e 13,341. Encontramos ainda que o adensamento de indivíduos nos plantios de *I. vera* é, em média, três vezes maior ($3,375 \pm 1,99$) que em fragmentos naturais de floresta ($10,622 \pm 1,62$; Tabela 1).

Dinâmica de oferta e consumo de néctar em populações naturais e plantadas de I. vera

Identificamos um período de secreção ativa, entre 20:00 e 04:00 h, seguida de reabsorção de néctar, entre 4:00 e 6:00 h, em flores das populações plantadas e naturais de *I. vera* (Fig 2 A e B). As flores produziram em média 51,8 μl ($\pm 0,5$) ao final do período de secreção, variando entre 52,1 μl nas populações plantadas e 51,4 μl nas naturais. A quantidade de néctar secretada em miligramas de açúcares por flor foi, em média, 10,7 mg ($\pm 1,2$) variando entre 11,5 mg nas populações plantadas e 9,8 mg nas naturais. Não encontramos diferenças na quantidade de néctar secretada em volume ($t = 0,395$; $P = 0,053$) e miligramas de açúcares por flor ($t = 4,72$; $P = 0,077$) entre populações plantadas e naturais de *I. vera* (Tabela 2).

Não identificamos variação na disponibilidade de néctar em volume ($F = 0,48$; $P = 0,78$) e miligramas ($F = 0,04$; $P = 0,97$) ao longo da antese para populações de *I. vera* estudadas (Fig 2 C e D). A quantidade de néctar disponível ao final do período de secreção nas flores de *I. vera* foi em média 17,4 μl ($\pm 8,7$) e 4,2 mg ($\pm 0,6$). Encontramos redução no volume de néctar disponível de 23,6 μl , nas populações plantadas, para 11,3 μl , nas populações naturais ($t = 13,03$; $P = 0,0007$). A quantidade de néctar disponível em miligramas também foi reduzida de 5,9 mg, nas populações plantadas, para 2,4 mg, nas populações naturais ($t = 14,88$; $P = 0,0003$) de *I. vera* (Tabela 2).

Registramos aumento no consumo de néctar entre 0:00 e 4:00 h tanto em volume ($F = 8,001$; $P < 0,0001$) quanto em miligramas ($F = 8,19$; $P < 0,0001$) de néctar nas flores das populações plantadas e naturais (Fig. 2 E e F). O consumo médio de néctar por população foi 34,2 μl ($\pm 5,4$) e 6,6 mg ($\pm 0,6$). Registramos ainda que o consumo de néctar por população aumentou de 28 μl , nas populações plantadas, para 40,1 μl , nas naturais ($t = 5,46$; $P = 0,023$). A quantidade de néctar consumida, em miligramas, foi aumentada de 5,7 mg, nas populações plantadas, para 7,4 mg nas populações naturais ($t = 3,77$; $P = 0,048$), semelhante ao ocorrido para as comparações de volume consumido (Tabela 1). O consumo total de néctar foi

aproximadamente 30%, em volume, e 23%, em miligramas, maior nas populações naturais em relação às populações plantadas. Apesar das alterações na quantidade de néctar consumida entre populações plantadas e naturais, não há relação do consumo de néctar, seja em volume ($r^2 = 0,36$; $P = 0,39$) ou miligramas ($r^2 = 0,247$; $P = 0,64$), com aumento na densidade de indivíduos e diminuição no isolamento geográfico das populações de *I. vera*.

Sucesso reprodutivo de I. vera em populações naturais e plantadas

As flores de *I. vera* produziram em média 1.158 políades tanto em populações plantadas quanto em naturais. A remoção de políades por flor foi elevada variando entre $983,5 \pm 47$ nas populações plantadas e $1.072,7 \pm 33$ nas naturais. O índice de sucesso reprodutivo masculino aumentou de 0,85 nos plantios de *Inga* para 0,91 nos fragmentos naturais de floresta ($t = -2,803$; $P = 0,031$; Tabela 3). Encontramos que aumentos no adensamento de indivíduos co-específicos (IVP) contribuem para o aumento do índice de sucesso reprodutivo masculino ($F = 8,7$; $P = 0,02$). Além disso, alterações no índice de isolamento geográfico (ISG) não interferem no sucesso reprodutivo masculino das populações na paisagem estudada ($F = 0,15$; $P = 0,71$).

A taxa de frutificação média em condições naturais foi $0,021 (\pm 0,01)$ nas populações estudadas e aumentou de 0,013, nas populações plantadas, para 0,03 nas populações naturais ($t = 0,56$; $P = 0,05$; Tabela 3). Registramos aproximadamente $10,02 \pm 3,3$ e $10,06 \pm 3,2$ sementes por fruto nas populações plantadas e naturais, respectivamente. O número de óvulos por ovário foi $14,7 \pm 2,4$ nas populações plantadas e $15,3 \pm 2,8$ nas naturais. Registramos aumento no índice de sucesso reprodutivo feminino de 0,009 nas populações plantadas para 0,019 nas populações naturais ($t = 0,98$; $P = 0,03$; Tabela 3). Não encontramos relação entre o índice de sucesso reprodutivo feminino e alterações no adensamento de indivíduos ($F = 2,24$; $P = 0,18$) e isolamento geográfico ($F = 2,52$; $P = 0,16$).

O índice de sucesso reprodutivo geral variou entre 0,001 e 0,025 nas populações estudadas, havendo aumento de 0,008 nas populações plantadas para 0,18 nas naturais ($F = 14,4$; $P = 0,009$; Tabela 3). Alterações no adensamento de indivíduos ($F = 0,45$; $P = 0,52$) e no grau de isolamento geográfico ($F = 3,91$; $P = 0,09$) não se relacionaram com o índice de sucesso reprodutivo geral.

Discussão

Caracterização das populações de I. vera em plantios e fragmentos de floresta

Encontramos baixo percentual de cobertura vegetal remanescente ao redor dos plantios (ca. 3%) e fragmentos naturais de floresta (ca. 25%), indicando elevado grau de isolamento geográfico das populações estudadas. A floresta Atlântica é um ecossistema extremamente ameaçado por atividades antrópicas, sobretudo no seu trecho nordestino (Dean 1995; Silva & Tabarelli 2000). A intensificação das atividades antrópicas nos últimos séculos contribuiu para o nível atual de fragmentação e explica o elevado grau de isolamento geográfico dos fragmentos e plantios de *Inga* no trecho da floresta Atlântica estudado.

As populações de *I. vera* nos plantios monoespecíficos, apresentaram densidade de indivíduos distintas entre-si e, ao mesmo tempo, três vezes maior em relação às populações naturais, fato que pode trazer consequências para o sucesso reprodutivo masculino de *I. vera* como será discutido adiante. Os plantios de *Inga* na região de estudo datam de 18 anos atrás, são feitos com distância média de 2,5 m entre indivíduos e o seu principal objetivo é a manutenção do solo e dos recursos hídricos. Após sua implementação, os plantios de *Inga*, ficam sujeitos ao fluxo intenso de pessoas, consumo dos frutos produzidos pelos seus indivíduos por meio de polinização natural e até mesmo caça de pequenos mamíferos, que são atraídos para os plantios, com utilização de armadilhas (J. C. Bakker, com. pessoal), fatos que, conjuntamente, dificultam a regeneração natural das áreas plantadas. Este tipo de utilização

dos plantios de *Inga* interfere diferencialmente na mortalidade dos indivíduos, resultando em populações plantadas com diferentes densidades de indivíduos entre-si, como observamos no presente trabalho.

Utilização de néctar em populações plantadas e naturais de I. vera

O padrão de secreção de néctar em *I. vera* é contínuo não havendo alterações entre populações plantadas e naturais. Além disso, a quantidade de néctar produzida foi similar para todas as populações estudadas, indicando que o manejo de *I. vera*, para a implementação de plantios monoespecíficos, não interfere na sua fisiologia da secreção de néctar. Padrão contínuo de secreção de néctar também já foi encontrado para *Inga ingoides* e *Inga striata* na área estudada (Cruz-Neto *et al.* no prelo), e para *Inga sessilis*, na floresta Atlântica do sudeste brasileiro (Amorim *et al.* 2012).

Encontramos menor disponibilidade e maior consumo de néctar nas populações naturais em relação às populações plantadas de *I. vera*, indicando uma menor utilização dos recursos florais nos plantios monoespecíficos. Além disso, alterações no adensamento de indivíduos e no grau de isolamento geográfico das populações não interferem no consumo de néctar de *I. vera* em populações plantadas e naturais. As flores de *I. vera* são polinizadas principalmente por cinco espécies de esfingídeos, podendo também ocorrer visitas de morcegos e beija-flores, na área de estudo (Cruz-Neto *et al.* no prelo). Esfingídeos, morcegos e beija-flores podem sobrevoar longas áreas durante suas rotas de forrageio (Elmore *et al.* 2004; Amorim *et al.* 2012) e acessar o néctar de flores muito distantes entre-si.

Os elevados níveis de fragmentação e perda de habitat na floresta Atlântica nordestina resultaram na redução e extinção local de populações de esfingídeos, visto que fragmentos pequenos e isolados na área de estudo apresentam populações com número reduzido de indivíduos (Lopes *et al.* 2006). A fragmentação provoca ainda alterações na distribuição dos

indivíduos e perda de espécies de plantas (Girão *et al.* 2007; Lopes *et al.* 2009), promovendo a homogeneização das características abióticas e estruturais do habitat.

Alguns animais, como esfingídeos, necessitam de condições abióticas específicas para o desenvolvimento do ciclo de vida até a fase adulta (Kitching & Cadiou 2000). Plantios monoespecíficos de *Inga* representam habitats estruturalmente mais simples, no que diz respeito à composição dos estratos vegetacionais, em relação às florestas naturais, sendo, portanto, locais inapropriados para o desenvolvimento do ciclo de vida de alguns animais, como os esfingídeos. O fato dos plantios de *Inga* não representarem habitats adequados ao estabelecimento de populações de polinizadores, indica que as visitas florais realizadas em flores de *I. vera* nos plantios monoespecíficos, são feitas por polinizadores vindos das áreas naturais. A maior distância entre o recurso floral nos plantios específicos e o habitat natural das populações de polinizadores, associada à sensibilidade de alguns organismos aos efeitos deletérios da fragmentação, devem resultar em menor utilização do néctar pelos polinizadores, como é o caso das populações plantadas de *I. vera*.

Sucesso reprodutivo de I. vera em plantios monoespecíficos e fragmentos de floresta Atlântica

Encontramos maior valor do índice de sucesso reprodutivo masculino nas populações naturais em relação às populações plantadas, indicando que a quantidade de políades removidas por população foi maior nos fragmentos de floresta Atlântica em relação aos plantios monoespecíficos de *Inga*. Mesmo assim, a quantidade de políades removidas foi alta, ca. de 85%, para populações plantadas e naturais estudadas, indicando grande eficiência de dispersão dos grãos de pólen de *I. vera* nos plantios monoespecíficos e fragmentos de floresta.

Menor remoção de grãos de pólen é um indicativo de redução na quantidade de visitas recebidas pelas flores (Hodges 1995; Quesada *et al.* 2004; Fisogni *et al.* 2011) fato que deve

estar ocorrendo nas populações plantadas de *I. vera*. Reduções na remoção de grãos pólen ocasionadas por aumentos nos níveis de fragmentação foram encontradas em *Cestrum parqui*, outra espécie de árvore com síndrome de polinização esfingófila (Aguilar & Galetto 2004). Com nossos resultados de taxa de remoção de políades, demonstramos que o plantios monoespecíficos de árvores isolados geograficamente em relação à fragmentos de floresta também resultam em redução do fluxo de pólen nas populações plantadas em relação às naturais.

Quanto à distribuição de indivíduos em cada população, encontramos que aumento no adensamento na densidade populacional contribui para o incremento do índice de sucesso reprodutivo masculino em populações plantadas e naturais. Aumentos na intensidade de fluxo polínico entre flores e indivíduos podem ser promovidos pelo aumento na oferta de recursos florais e pela distribuição mais adensada dos indivíduos (Hodges 1995; Quesada *et al.* 2004; Fisogni *et al.* 2011; Llorens *et al.* 2012), fato que está ocorrendo em plantios monoespecíficos de *I. vera* e fragmentos de floresta Atlântica.

Registramos redução de 50% na frutificação de *I. vera* nas populações plantadas em relação às naturais, fato que pode estar relacionado à limitações do fluxo polínico inter e intrapopulacional. Aumentos na distância geográfica e no grau de isolamento geográfico das populações promovem conjuntamente redução ou até mesmo interrupção do fluxo polínico interpopulacional, diminuindo a quantidade de grãos de pólen que pode ser depositada em estigmas florais receptivos localizados em populações diferentes (Aguilar & Galetto 2004; Quesada *et al.* 2004). Por outro lado, a distribuição adensada de indivíduos intensifica o fluxo polínico e contribui para a deposição de grãos de pólen nas superfícies estigmáticas das flores em uma determinada população (Ghazoul *et al.* 1998). Excesso de visitas florais podem danificar os estigmas das flores além de remover grãos de pólen previamente depositados nas superfícies estigmáticas, reduzindo as taxas de frutificação das plantas (Ghazoul *et al.* 1998;

Parra-Tabla *et al.* 2000; Aguilar & Galetto 2004; Quesada *et al.* 2004). Plantios de *Inga* são muito isolados geograficamente e apresentam elevada densidade de indivíduos, indicando que deve haver limitação no fluxo polínico interpopulacional, pela redução do fluxo polínico entre populações, e intrapopulacional, por excesso de políades depositadas nos estigmas florais em populações com distribuição adensada de indivíduos. Limitações no fluxo polínico nas populações plantadas ocasionam redução nas taxas de frutificação em relação à naturais de *I. vera*.

Apesar da frutificação reduzida nos plantios, não encontramos alterações na quantidade de sementes formadas por fruto nas populações estudadas. Os grãos de pólen em espécies de *Inga* encontram-se arranjados em políades e promovem grande eficiência na fertilização. Uma políade, desde que depositada em estigmas de flores compatíveis, pode, potencialmente, fecundar todos os óvulos existentes em um ovário (Cruden 1977; Koptur 1984). A estratégia, na qual políades são dispersas como unidades e qualquer grão de pólen pode eventualmente fecundar algum óvulo é chamada de “reprodução por loteria” (Cruden 1977).

Encontramos neste trabalho reduções nos índices de sucesso reprodutivo masculino, feminino e geral nas populações plantadas em relação às naturais e que aumentos no adensamento de indivíduos promovem incremento nas taxas de remoção de grãos de pólen das flores. Polinizadores apresentam grande plasticidade comportamental, na qual aumentos na quantidade de recurso floral oferecido, como maior número de flores distribuídas adensadamente, exercem influência positiva na atratividade dos visitantes florais (Waser *et al.* 1996; Klinkhamer *et al.* 2001). Grandes quantidades de visitas às flores podem ter implicado nas elevadas taxas de remoção de grãos de pólen das populações estudadas, interferindo diferencialmente nos índices de sucesso reprodutivo de *I. vera*. Concluímos, portanto, que o sucesso reprodutivo de espécies de árvores autoincompatíveis, como as representantes do

gênero *Inga*, usadas em plantios monoespecíficos é reduzido em relação às populações naturais por alterações no fluxo polínico e distribuição adensada de indivíduos co-específicos dentro das populações plantadas.

Agradecimentos

Agradecemos a L. A. Bezerra e C. Bakker por autorizar a execução do trabalho de campo nas terras da Usina Serra Grande. Ao CNPq e à FACEPE pelas bolsas de doutorado concedida a O.C.N. (Proc. N° 556990/2010-2) e pela Bolsa de Pesquisa e concessão de financiamentos à projeto (N° 567739/2008-2) coordenado por A. V. L. Aos auxílios financeiros adicionais pelo Projeto Serra Grande e CEPAN, por projetos coordenados por M. Tabarelli (UFPE).

Referências

- Aguilar R., Galetto L. 2004. Effects of forest fragmentation on male and female reproductive success in *Cestrum parqui* (Solanaceae). *Oecologia*, 138: 513-520.
- Aizen M.A., Feinsinger P. 1994. Forest fragmentation, pollination and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. 75: 330-351.
- Alves-Costa C.P., Lôbo D., Leão T., Brancalion P.H.S., Nave A.G., Gandolfi S., Santos A.M.M., Rodrigues R., Tabarelli M. 2008. Implementando reflorestamentos com alta diversidade na Zona da Mata Nordestina: Guia Prático. J. Luiz Vasconcelos, Recife.
- Amorim F.W., Galetto L., Sazima M. 2012. Beyond the pollination syndrome: Nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant Biology*, 15: 317-327.
- Coimbra-Filho F., Câmara I.G. 1996. Os Limites Originais do Bioma Mata Atlântica na Região Nordeste do Brasil. Fundação Brasileira para Conservação da Natureza – FBCN, Rio de Janeiro.

- Collins M. 1990. The last rain forests. Mitchell Beazley Publ./IUCN, London, 200 pp.
- Cruden, R.W. 1977. Pollen-Ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31: 32-46.
- Cruz-Neto O., Machado I.C., Duarte J.A., Lopes A.V. 2011. Synchronous phenology of hawkmoths (Sphingidae) and *Inga* species (Fabaceae–Mimosoideae): implications for the restoration of the Atlantic forest of northeastern Brazil. *Biodiversity and Conservation* 20: 751-765.
- Dafni A., Kevan P.G., Husband B.C. 2005. Practical pollination biology. Enviroquest Ltd, Cambridge, Ontario, Canada.
- Dean, W. 1995. With Broadax and Firebrand: The Destruction of the Brazilian Atlantic Forest. University of California Press, Berkeley.
- Elmore L.W., Miller D.A., Vilella F.J. 2004. Foraging area size and habitat use by red bats (*Lausirus borealis*) in an intensively managed pine landscape in Mississippi. *The American Midland Naturalist*, 153: 405-417.
- Fisogni A., Cristofolini G., Rossi M., Galloni M. 2011. Pollinator directionality as a response to nectar gradient: promoting outcrossing while avoiding geitonogamy. *Plant Biology* 13: 848-856.
- Galetto L., Bernardello L.M. 2005. Rewards in flowers - nectar. In: Dafni A., Kevan P., Husband B.C. (Eds), Practical pollination biology. Enviroquest Ltd, Cambridge, Ontario, Canada, pp 231- 328.
- Ghazoul J., Liston K.A., Boyle T.J.B. 1998. Disturbance-induced density-dependent set in *Shorea siamensis* (Dipterocarpaceae), a tropical forest tree. *Journal of Ecology*, 86: 462-473.
- Girão L.C., Lopes A.V., Tabarelli M., Bruna E.M. 2007. Changes in tree reproductive traits reduce functional diversity in a fragmented Atlantic forest landscape. *PLoS One* 2: e908.

- Hodges S.A. 1995. The influence of nectar production on hawkmoth behaviour, self pollination and seed production in *Mirabilis multiflora* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany*, 82: 197-204.
- Kitching I.J., Cadiou J.M. 2000. *Hawkmoths of the world – an annotated and illustrated revisionary checklist* (Lepidoptera: Sphingidae). Cornell University Press, New York, USA.
- Klinkhamer P.G.L., De Jong T., Linnebank L.A. 2001. Small-scale patterns determine ecological relationships: an experimental example using nectar production rates. *Ecology Letters*, 4: 559-567.
- Koptur S. 1984. Outcrossing and pollinator limitation of fruit set: Breeding systems of neotropical *Inga* trees (Fabaceae: Mimosoideae). *Evolution*, 38: 1130-1143.
- Köppen W. 1931. *Grundriss der Klimakunde*. Walter de Gruyter, Berlin, GER.
- Llorens T.M., Byrne M., Yahtes C.J., Nistelberger H.M., Coates D.J. 2012. Evaluating the influence of different aspect of habitat fragmentation on mating patterns and pollen dispersal in the bird-pollinated *Banksia sphaerocarpa* var. *caesia*. *Molecular Ecology*, 21: 314-328.
- Lopes A.V., Medeiros C.P., Aguiar-Neto A.V., Machado I.C. 2006. Esfingídeos. In: Tabarelli, M, Porto KC (orgs). *Diversidade Biológica no Centro de Endemismo Pernambucano: Sítios Prioritários para a Conservação*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp 228-235.
- Lopes A.V., Girão L.C., Santos B.A., Peres C.A., Tabarelli M. 2009. Long-term erosion of tree reproductive trait diversity in edge-dominated Atlantic forest fragments. *Biological Conservation*, 142: 1154–1165.

- Navascués M., Emerson B.C. 2007. Natural recovery of genetic conservation by gene flow in reforested areas of the endemic Canary Island pine, *Pinus canariensis*. *Forest Ecology and Management*, 244: 122-128.
- Parra-Tabla V., Vargas C.F., Magaña-Rueda S., Navarro J. 2000. Female and male pollination success of *Oncidium ascendens* Lindey (Orchidaceae) in two contrasting habitat patches: forest vs agricultural field. *Biological Conservation*, 94: 335-340.
- Pennington T.D. 1997. The genus *Inga*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Prance G.T. 1982. Forest refuges: evidence from woody angiosperms. In: Prance GT (ed) *Biological Diversification in the Tropics*. Columbia University Press, New York, pp 137–158.
- Quesada M., Stoner K.E., Lobo J.A., Herrerías-Diego Y., Palacios-Guevara C., Munguía-Rosas M.A., Salazar K.A.O., Rosas-Guerrero V. 2004. Effects of Forest fragmentation on pollinator activity and consequences for plant reproductive success and mating patterns in bat-pollinated bombacaceous trees. *Biotropica*, 36(2): 131-138.
- R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Ribeiro M.C., Metzger J.P., Martensen A.C., Ponzoni F.J., Hirota M.M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142: 1141-1153.
- Rodrigues R.R., Lima R.A.F., Gandolfi S., Nave A.G. 2009. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Conservation*, 142: 1241-1251.

- Santos B.A., Peres C.A., Oliveira M.A., Grillo A., Alves-Costa C.P., Tabarelli, M. 2008. Drastic erosion in functional attributes of tree assemblages in Atlantic Forest fragments of northeastern Brazil. *Biological Conservation*, 141: 249-260.
- StatSoft, Inc. (2007) *STATISTICA (data analysis software system), version 8.0*.
www.statsoft.com
- Silva J. M. C., Tabarelli M. 2000. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic Forest of northeast Brazil. *Nature*, 404: 72-73.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. 1981. *Biometry*. 2nd ed. Freeman, New York.
- Steinitz O., Robledo-Arnuncio J.J., Nathan R. 2012. Effects of Forest plantations on the genetic composition of conspecific native *Aleppo pine* populations. *Molecular Ecology*, 21: 300-313.
- Veloso H.P., Rangel-Filho A.L.R., Lima J.C.A. 1991. *Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal*. IBGE, Rio de Janeiro.
- Waser N.M., Chittka L., Price M.V., Williams N.M., Ollerton, J. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77: 1043-1060.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da América do Sul com destaque para o Brasil e a região nordeste (A); Localização da área de estudo na região nordeste (B); Mapa da área de estudo destacando a presença de fragmentos de floresta Atlântica, plantios de *Inga*, plantios de cana de açúcar e áreas urbanas. Pontos brancos dentro dos fragmentos e dos plantios de *Inga* representam a localização das populações amostradas (C).

Figura 2. Variação na quantidade de néctar, em volume (μl) e miligramas (mg), ao longo da antese floral de *Inga vera* na floresta Atlântica nordestina. Padrão de secreção (A e B), disponibilidade (C e D) e consumo (E e F) de néctar em populações plantadas e naturais de *Inga vera*. As bolas representam as médias e as barras verticais representam os desvios padrões.

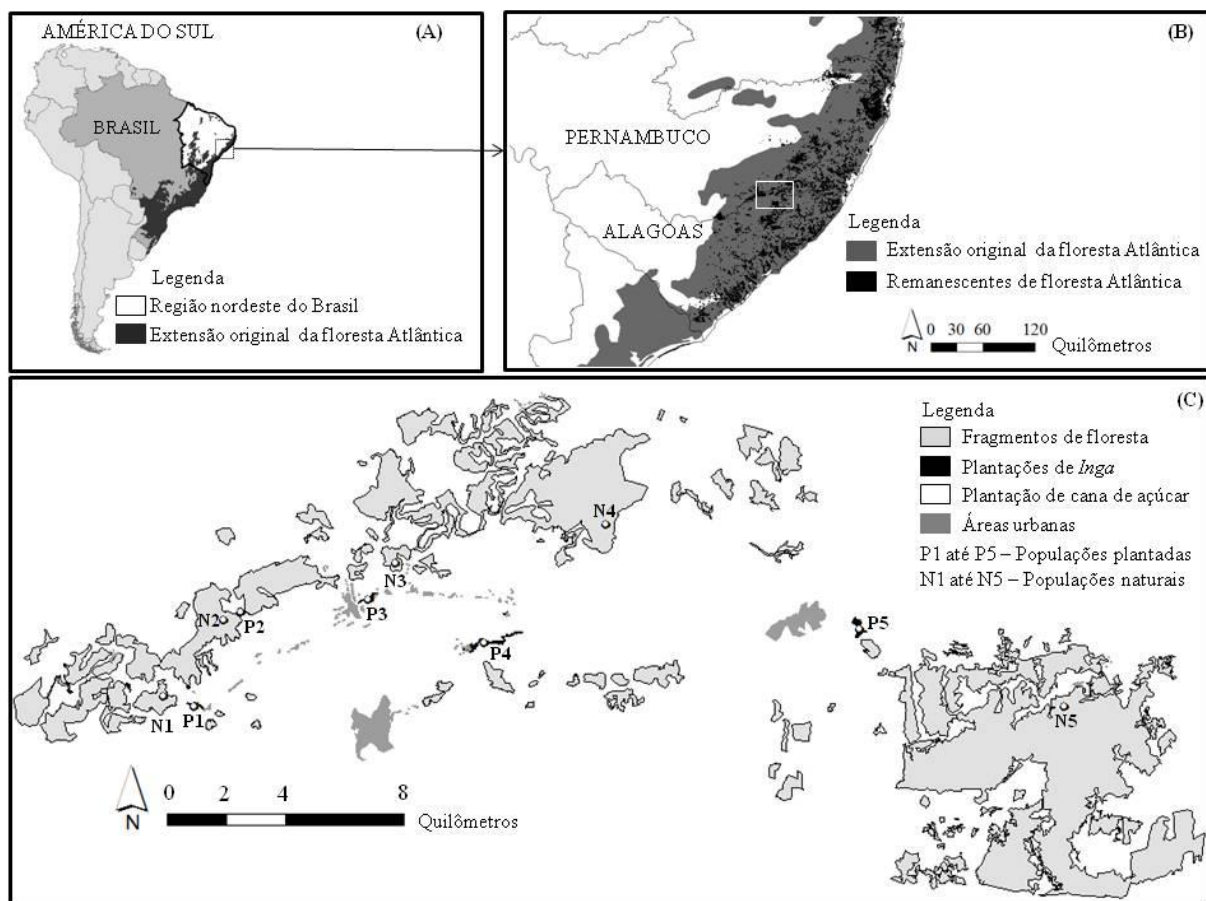


Figura 1

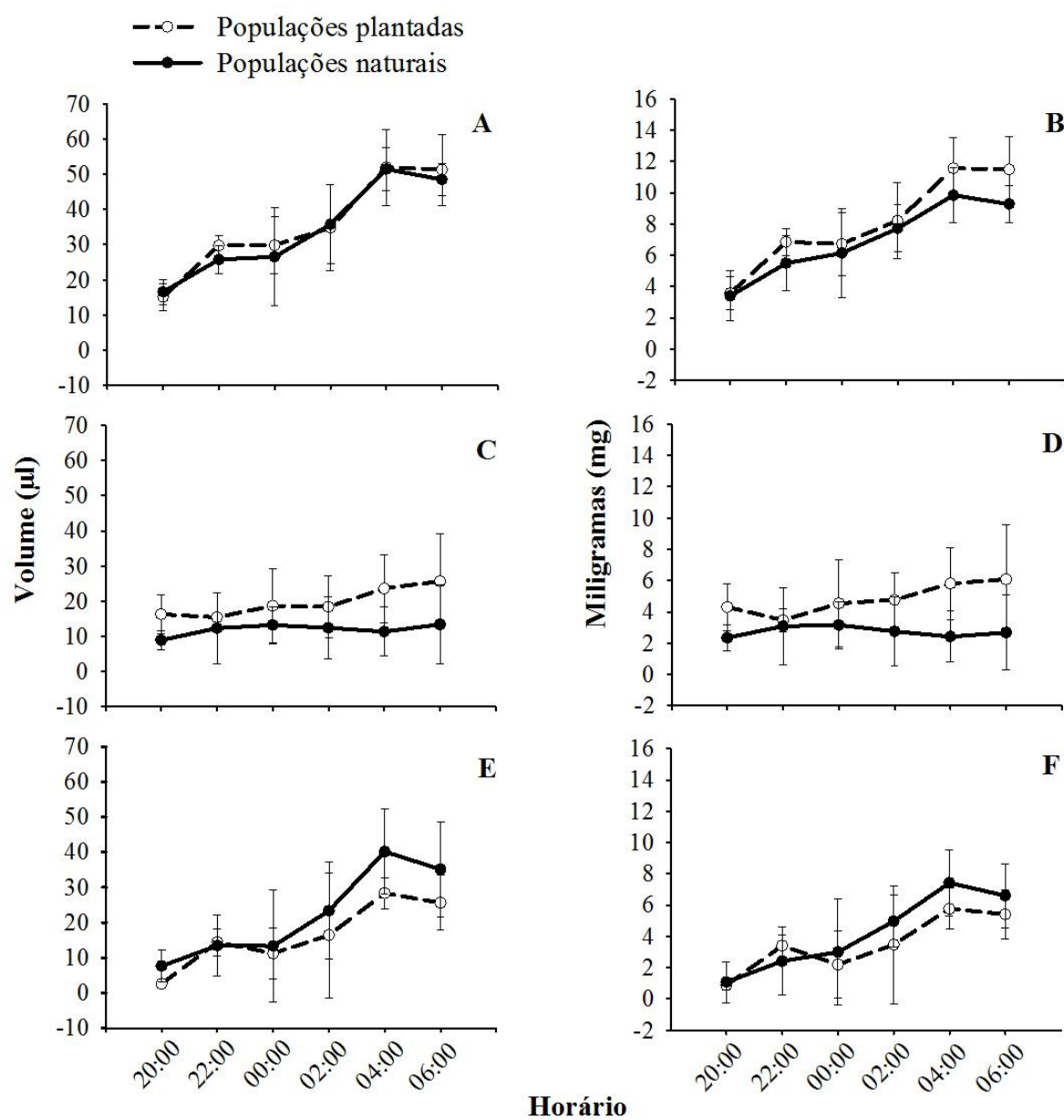


Figura 2

Tabela 1. Descrição das populações de *Inga vera* nos plantios monoespecíficos (P1 até P5) e fragmentos de floresta Atlântica (N1 até N5) na Usina Serra Grande. Área (km²), índice de isolamento geográfico baseado no percentual de cobertura vegetal natural ao redor das populações amostradas (ISG) e densidade de indivíduos medida pelo índice de vizinhança mais próxima (IVP).

População	Área (km ²)	ISG	IVP
Plantada			
P1	0,027	0,014	4,965
P2	0,016	0,052	3,588
P3	0,034	0,003	4,782
P4	0,104	0,0004	3,482
P5	0,117	0,002	5,03
Média (±DP)	0,066 (± 0,05)	0,011 (± 0,02)	3,375 (± 1,99)
Natural			
N1	0,825	37,641	9,925
N2	4,53	17,674	13,341
N3	0,524	21,55	10,453
N4	10,02	7,685	10,364
N5	29,93	18,195	9,051
Média (±DP)	9,162 (± 12,2)	20,542 (± 10,87)	10,622 (± 1,62)

Tabela 2. Dinâmica da oferta e utilização do néctar floral de *Inga vera*. Média e desvio padrão da quantidade de néctar produzida, disponível e consumida, em volume (μl) e miligramas (mg), em plantios monoespecíficos de *Inga* (populações plantadas), fragmentos de floresta Atlântica (populações naturais) e entre plantios de *Inga* e fragmentos. Valores de volume e miligramas na mesma coluna seguidos de letras distintas foram estatisticamente distintos com valor de $P < 0,05$.

Populações	Néctar (Média $\pm$ DP)		
	Volume (μl)		
	Produzido	Disponível	Consumido
Plantadas	52,1 $\pm$ 12,4 ^a	23,6 $\pm$ 11,1 ^a	28 $\pm$ 4,4 ^a
Naturais	51,4 $\pm$ 7,2 ^a	11,3 $\pm$ 8,1 ^b	40,1 $\pm$ 12 ^b
Média	51,8 $\pm$ 0,5	17,4 $\pm$ 8,7	34,2 $\pm$ 5
Populações	Miligramas (mg)		
	Volume (μl)		
	Produzido	Disponível	Consumido
Plantadas	11,5 $\pm$ 2,2 ^a	5,9 $\pm$ 2,6 ^a	5,7 $\pm$ 1,31 ^a
Naturais	9,8 $\pm$ 2 ^a	2,4 $\pm$ 1,8 ^b	7,4 $\pm$ 2,1 ^b
Média	10,7 $\pm$ 1,2	4,2 $\pm$ 0,6	6,6 $\pm$ 0,6

Tabela 3. Variação de média ($\pm$ desvio padrão) dos componentes do sucesso reprodutivo entre populações plantadas e naturais de *Inga vera*. Valores de sucesso reprodutivo masculino (SRM), taxa de frutificação em condições naturais (Fruto/Flor), razão sementes por fruto/óvulo por ovário (Semente/Óvulo), sucesso reprodutivo feminino (SRF) e geral (SRG) seguidos de letras diferentes foram estatisticamente distintos ($P < 0,05$).

Variável	População	
	Plantada	Natural
SRM	$0,85 \pm 0,04^a$	$0,91 \pm 0,05^b$
Fruto/flor	$0,013 \pm 0,07^a$	$0,030 \pm 0,01^b$
Semente/óvulo	$0,70 \pm 0,07^a$	$0,67 \pm 0,09^a$
SRF	$0,009 \pm 0,005^a$	$0,019 \pm 0,005^b$
SRG	$0,008 \pm 0,004^a$	$0,018 \pm 0,005^b$

CAPÍTULO 2

Transferência de marcadores moleculares SSR entre as espécies

***Inga edulis* MART. e *Inga vera* subesp. *affinis* (D.C.) T.D. PENN.**

(Leguminosae-Mimosoideae)

A ser submetido ao periódico Applications in Plant Sciences

Transferência de marcadores moleculares SSR entre as espécies *Inga edulis* MART. e *Inga vera* subesp. *affinis* (D.C.) T.D. PENN. (Leguminosae-Mimosoideae)

Oswaldo Cruz Neto¹, Liliane Gallindo Dantas de Oliveira¹, Andrea Pedrosa Harand² & Ariadna Valentina Lopes^{2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50372-970, Brazil

² Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50372-970, Brazil

*E-mails: avflop@ufpe.br, ariadna.lopes@pq.cnpq.br

RESUMO

Marcadores moleculares SSR são ferramentas poderosas para acessar as mais diversas questões biológicas, incluindo a realização de testes de paternidade, fluxo gênico e mapeamento genético ou análises de estruturação genética entre populações. A transferência de *primers* que amplifiquem locos polimórficos entre diferentes espécies ou gêneros representa uma grande vantagem para pesquisadores de diversas áreas, possibilitando o melhor entendimento das relações genéticas entre espécies. O objetivo deste estudo foi testar a taxa de transferência de marcadores moleculares SSR entre espécies de *Inga*. Extraímos DNA a partir de 600 indivíduos de *Inga vera* subsp. *affinis* seguindo um protocolo de extração de DNA com CTAB. Utilizamos cinco *primers* desenvolvidos para *I. edulis* e testamos suas respectivas amplificações e níveis de polimorfismo em *I. vera*. Realizamos reações de PCR gradiente com temperaturas de anelamento variando entre 55 e 70°C para escolhermos a temperatura adequada de amplificação para cada *primer* nas amostras de *I. vera*. Todos os *primers* testados, *Inga 03*, *05*, *08* e *33*, *Pel05*, amplificaram em *I. vera*, havendo apenas algumas modificações na temperatura de anelamento em relação a estudos anteriores. Apenas o loco *Inga05*, dentre os cinco *primers* testados, não apresentou polimorfismo. Os locos amplificados em *I. vera* no presente estudo foram tão polimórficos quanto os locos encontrados em um estudo anterior para *I. edulis*. Enfatizamos neste estudo que a taxa de transferência de marcadores moleculares SSR é bastante elevada, aproximadamente 80%, entre espécies de *Inga*.

Palavras-chave: *Inga edulis*, *Inga vera*, locos polimórficos, microsatélites, PCR.

INTRODUÇÃO

Marcadores moleculares se tornaram ferramentas eficientes, poderosas, flexíveis e, portanto, vêm sendo muito utilizados para acessar diversas questões biológicas (SELKOE & TOONEN, 2006). Os microssatélites, conhecidos como repetições de sequências simples (*simple sequence repeats* - SSR) ou repetições curtas aleatórias (*short tandem repeats* - STR), são os marcadores moleculares mais comumente utilizados em estudos de genética de populações (GUICHOUX *et al.*, 2011). Microssatélites consistem de repetições, de um a seis nucleotídeos, espalhadas em *tandem* pelo genoma dos organismos e apresentam elevado comportamento mutacional seja pela remoção ou acréscimo de unidades de repetições do loco (GUICHOUX *et al.*, 2011). Taxas mutacionais elevadas implicam na existência de microssatélites com diferentes números de repetições entre indivíduos co-específicos, fato que torna os microssatélites extremamente úteis em análises de paternidade, mapeamento genético ou análises de estruturação genética (JONES *et al.*, 2010).

A transferibilidade de *primers* que amplifiquem *loci* polimórficos entre diferentes espécies ou gêneros representa uma grande vantagem para pesquisadores de diversas áreas, considerando a economia de tempo e dinheiro que seriam gastos no desenvolvimento de novos pares de *primers* (KULEUNG *et al.*, 2004). Além disso, a transferência de *primers* é conhecida para algumas espécies de plantas, e vem sendo utilizada com frequência crescente nas pesquisas envolvendo o uso de microssatélites (GUICHOUX *et al.*, 2011). Estudos de transferibilidade de *primers* são mais frequentes para espécies de plantas cultivadas e com importância econômica em relação às espécies de plantas selvagens (i.e. PEAKALL *et al.*, 1998; SOURDILLE *et al.*, 2001; KULEUNG *et al.*, 2004).

Dentre as espécies de *Inga*, apenas *Inga edulis* Mart. apresenta *primers* descritos na literatura (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2005). O gênero *Inga* Miller possui cerca de 300 espécies arbóreas com distribuição neotropical (PENNINGTON, 1997). Espécies de *Inga* (Miller) são fortemente autoincompatíveis, dependem de polinizadores especializados para a formação de frutos e sementes, além de apresentarem baixas taxas de frutificação, menos de 3% em média, em condições naturais (KOPTUR, 1983). Espécies de *Inga*, como *I. edulis* e *Inga vera* Willd., são amplamente utilizadas em planos de restauração florestal na América do Sul (PENNINGTON, 1997; HOLLINGSWORTH *et al.*, 2005; ALVES-COSTA *et al.*, 2008), tendo ainda suas sementes, mudas e frutos comercializados na região nordeste brasileira (ALVES-COSTA *et al.*, 2008).

Práticas silviculturais podem potencialmente reduzir a diversidade genética das populações plantadas pela coleta de sementes a partir de poucos indivíduos doadores de

sementes (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2005; NAVASCUÉS & EMERSON, 2007). O desenvolvimento de novos *primers* associado à transferência de *primers* já existentes entre espécies aparentadas, como as pertencentes ao gênero *Inga*, pode contribuir intensamente para estudos futuros abordando questões relacionadas à viabilidade das práticas silviculturais empregadas na região nordeste do Brasil. O objetivo deste estudo foi avaliar a transferibilidade de marcadores SSR entre *I. edulis* e *I. vera*, as quais são amplamente utilizadas em reflorestamentos na floresta Atlântica nordestina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extração de DNA e PCR

Foi extraído DNA a partir de 600 indivíduos de *Inga vera* subsp. *affinis* seguindo um protocolo de extração de DNA com Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Foram utilizados cinco pares de *primers* para testarmos a transferibilidade de marcadores moleculares SSR entre espécies de *Inga*. Um dos *primers* utilizados no presente estudo foi desenvolvido para *Pithecelobium elegans* Ducke (DAYANANDAN *et al.*, 1997), mas amplifica também locus polimórficos em *Inga edulis* (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2005) (Tabela 1). Os quatro *primers* restantes foram desenvolvidos especificamente para *Inga edulis* (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2005).

Reações de PCR com volume total de 20µl foram realizadas no termociclador Veriti 384-well (Applied Biosystems). O mix das reações de PCR foi composto por aproximadamente 1,5 ng de DNA, 0,32 mM de cada *primer* (sendo o *primer forward* marcado com fluorescências 6-FAM, NED e PET de acordo com a tabela 1), 4 mM KCl-MgCl₂, 3 mM MgCl₂, 160 µM de dNTPs, 40 µM de Taq DNA polymerase (Fermentas). Foram realizadas reações de PCR gradiente com temperaturas de anelamento variando entre 55 e 70°C para escolhermos a temperatura de amplificação adequada para cada *primer* nas amostras de *I. vera*. Seguimos o seguinte ciclo de PCR para todas as reações: 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56/62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; 72°C por 15 minutos (adaptado de HOLLINGSWORTH *et al.*, 2005).

Polimorfismo revelado pelos marcadores SSR

Diluímos os produtos da PCR para uma concentração de 10ng final, em água HPLC. Preparamos as reações de genotipagem misturando 1µl dos produtos diluídos da PCR de cada loco por indivíduo com 6µl de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems). Os fragmentos de DNA amplificados nas PCRs foram identificados usando o sequenciador ABI3730 (Applied

Biosystems). Checamos manualmente o tamanho de cada alelo amplificado usando como referência a escada padrão 500-Liz no programa Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems). Categorizamos os alelos de acordo com os seus respectivos motivos utilizando o programa Flexibin (AMOS *et al.*, 2007).

RESULTADOS

Os *primers Inga 03, 05, 08 e 33*, desenvolvidos para *I. edulis*, e *Pel05*, para *P. elegans*, amplificaram em *I. vera*. Realizamos apenas algumas alterações na temperatura de anelamento de todos os *primers* para obtermos melhores resultados nas reações de PCR. Aumentamos a temperatura de anelamento dos *primers* para os *loci Inga 08*, de 55 para 56°C, e *Inga33* e *Pel05*, de 55 para 62°C. Por outro lado, reduzimos a temperatura de anelamento dos *primers* para os *loci Inga03* e *Inga 05* de 59 para 56°C (Tabela 2).

O tamanho dos fragmentos amplificados nas reações de PCR em *I. vera* variou entre 58 pares de base, para *Inga03*, e 244, para *Inga33*. Encontramos elevada quantidade de alelos amplificados para quatro dos cinco *primers* analisados. O loco *Inga08* foi o mais polimórfico, apresentando 21 alelos. Os *lócus Inga03* e *Inga33* apresentaram 17 alelos, enquanto o loco *Pel05* apresentou 10 alelos. O loco *Inga05* amplificou apenas um alelo com 140 pares de base (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Demonstramos com este estudo a existência de elevada taxa de transferência de *primers*, 80% considerando apenas os *lócus* polimórficos, entre espécies de *Inga*. Muitos autores demonstraram que *primers* desenvolvidos para uma espécie podem amplificar amostras de DNA de espécies aparentadas (BROWN *et al.*, 1996; DAYANANDAN *et al.*, 1997; VAN DEYNZE *et al.*, 1998; KULEUNG *et al.*, 2004). A amplificação de *primers* pode ser resultado da grande semelhança e conservação do conteúdo e organização dos genes entre espécies aparentadas (KULEUNG *et al.*, 2004; SELKOE & TOONEN, 2006). Dados de sequências de trechos de DNA entre espécies cultivadas relacionadas, por exemplo, indicam uma homologia elevada nas regiões flanco dos *loci* SSR (VAN DEYNZE *et al.*, 1998; KULEUNG *et al.*, 2004). Portanto, um par de *primers* desenvolvido para uma espécie pode funcionar e amplificar *loci* polimórficos em espécies relacionadas filogeneticamente (i.e. KULEUNG *et al.*, 2004). Nosso estudo reforça o padrão anteriormente encontrado e mostra mais um caso em que a transferência de *primers* entre espécies aparentadas foi bem sucedida.

Apesar de todos os cinco *primers* usados em *I. edulis* terem amplificado em *I. vera*, apenas quatro loci foram polimórficos. Os loci amplificados em *I. vera* neste estudo, foram tão polimórficos quanto os loci encontrados em um estudo anterior para *I. edulis* (HOLLINGSWORTH *et al.*, 2005). A semelhança no polimorfismo de loci entre *I. vera* e *I. edulis* pode indicar a conservação do conteúdo genético, como já proposto anteriormente para outras espécies aparentadas (i.e. KULEUNG *et al.*, 2004; SELKOE & TOONEN, 2006).

Acreditamos que espécies de *Inga* representam um bom modelo de estudo para acessar diversas questões biológicas, como as associadas aos efeitos de ações antrópicas sobre a variação genética e fluxo gênico em populações de árvores. Espécies do gênero *Inga* distribuem-se amplamente na América Central e do Sul (PENNINGTON, 1997), sendo, portanto, facilmente encontradas em diversos ecossistemas. Outro fator é que a polinização e dispersão de sementes são fortemente dependentes de interações bióticas, as quais podem ser interrompidas em ambientes degradados. Espécies de *Inga* são cultivadas e amplamente utilizadas em planos de restauração florestal, salientando a importância do melhor entendimento dos efeitos do manejo sobre a variabilidade genética dos plantios de espécies de *Inga*. Por fim, a elevada taxa de transferência de *primers* entre espécies de *Inga*, encontrada neste estudo, representa uma boa alternativa para estudos que visam a aplicação de ferramentas moleculares para acessar questões biológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-COSTA, C. P.; LÔBO, D.; LEÃO, T.; BRANCALION, P. H. S.; NAVE, A. G.; GANDOLFI, S.; SANTOS, A. M. M.; RODRIGUES, R. R.; TABARELLI, M. **Implementando reflorestamentos com alta diversidade na Zona da Mata Nordestina: Guia Prático**. Recife: J. Luiz Vasconcelos, 218 pp., 2008.
- AMOS, W., HOFFMAN, J. I., FRODSHAM, A., ZHANG, L., BEST, S., HILL, V.S. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 10-14, 2007.
- DAYANANDAN, S., BAWA, K. S., KESSELI, R. Conservation of microsatellites among tropical trees. **American Journal of Botany**, v. 84, p. 1658-1663, 1997.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Protocolos: Extração de DNA genômico total de plantas. In: FERREIRA M. E.; GRATTAPAGLIA, D. (Eds.), **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**, 2nd ed. Embrapa Cenargen, Brasília, p. 121-138, 1998.

- GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LEGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T., REVARDEL, E.; SALIN, F.; PETIT, R. J. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 591-611, 2011.
- HOLLINGSWORTH, P. M.; DAWSON, I. K.; GOODALL-COPESTAKE, P.; RICHARDSON, J. E.; WEBER, J. C.; SOTELO-MONTES, C.; PENNINGTON, R. T. Do farmers reduce genetic diversity when they domesticate tropical trees? A case study from Amazonia. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 497-501, 2005.
- JONES, A. G.; SMALL, C. M.; PACZOLT, K. A.; RATTERMAN, N. L. A practical guide to methods of parentage analysis. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 6-30, 2010.
- KOPTUR, S. Flowering phenology and floral biology of *Inga* Fabaceae (Mimosoideae). **Systematic Botany**, v. 8, p. 354-368, 1983.
- KULEUNG, C.; BAENZIGER, P. S.; DWEIKAT, I. Transferability of SSR markers among wheat, rye and triticales. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 1147-1150, 2004.
- NAVASCUÉS, M.; EMERSON, B. C. Natural recovery of genetic conservation by gene flow in reforested areas of the endemic Canary Island pine, *Pinus canariensis*. **Forest Ecology and Management**, v. 244, p. 122-128, 2007.
- PEAKALL R., GILMORE, S., KEYS, W., MORGANTE, M., RAFASKE, A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeat (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p. 1275–1287, 1998.
- PENNINGTON, T.D. **The genus *Inga***. Royal Botanic Gardens, Kew, 1997.
- SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, p. 615-629, 2006.
- SOURDILLE, P., TAVAUD, M., CHARMET, G., BERNARD, M. Transferability of wheat microsatellites to diploid Triticeae species carrying the A, B and D genomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 103, p. 346– 352, 2001.
- VAN DEYNZE, A. E, SORRELLS, M. E., PARK, W. D., AYRES, N. M., FU, H., CARTINHO, S. W., PAUL, E., MCCOUCH, S. R. Anchor probes for comparative mapping of grass genera. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, p. 356–369, 1998.

Tabela 1. *Primers* testados quanto a transferibilidade entre *Inga edulis* e *I. vera*. Os *primers* *Inga03*, *05*, *08*, *33* foram desenvolvidos para *Inga edulis* (Hollingsworth *et al.* 2005), enquanto o *primer* *Pel05* foi desenvolvido para *Pithecelobium elegans* (Daynandan *et al.* 1997), mas amplificou *locus* polimórfico em *I. edulis*.

<i>Locus</i>	Sequência do <i>primer</i> (a partir da extremidade 5')	Motivo	Referência
<i>Inga03</i>	F: TTCCAAGCTTATACAAACCTCC R: AGATCCGTACGTGTGATGGT	(CA) ₁₀	Hollingsworth <i>et al.</i> 2005
<i>Inga05</i>	F: GACTACAGTTCGAGCAAAACAAAG R: TATTCATCTCTAACACGGTCGG	(TG) ₅ CA(TG) ₆	Hollingsworth <i>et al.</i> 2005
<i>Inga08</i>	F: TTTGAGATGAATAGAGAAAGCC R: GATTTAGCTTGTTGGTGTTTG	(CT) ₄ GT(CT) ₃	Hollingsworth <i>et al.</i> 2005
<i>Inga33</i>	F: TATAACCGATTACCCCCTTGATG R: AAAGCACTATAAGATATGTGTGTC	(CT) ₈ (CA) ₈	Hollingsworth <i>et al.</i> 2005
<i>Pel05</i>	F: TCTCTGCACACAGGAACCCTTTTGC R: CCCAGAAATAAGGCTCTTTTGCACA	(AAAG) ₆	Dayanandan <i>et al.</i> 1997

Tabela 2. Número e tamanho dos alelos amplificados em *Inga vera* utilizando *primers* de *Inga edulis* e *Pithecelobium elegans*. Temperatura de anelamento (T_a) para cada caso.

Locus	T_a (°C)	Tamanho dos fragmentos amplificados (bp)	Número de alelos
<i>Inga03</i>	56	58-90	17
<i>Inga05</i>	56	140	1
<i>Inga08</i>	56	130-174	21
<i>Inga33</i>	62	216-244	17
<i>Pel05</i>	62	179-215	10

CAPÍTULO 3

Implicações genéticas e ecológicas do plantio de árvores, *Inga vera* subesp. *affinis* (Leguminosae), em uma paisagem fragmentada

A ser submetido ao periódico Conservation Biology

Implicações genéticas e ecológicas do plantio de árvores, *Inga vera* subesp. *affinis* (D.C.) T.D. PENN. (Leguminosae), em uma paisagem fragmentada Running head:

Implicações do plantio de árvores em uma paisagem fragmentada

OSWALDO CRUZ-NETO,^{§ +} ANTONIO V. AGUIAR,^{‡ §§} ALEX TWYFORD,[†] LINDA E. NEAVES,[†] RICHARD T. PENNINGTON,[†] e ARIADNA V. LOPES,^{§ *}

[§] Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50372-970, Brazil

⁺ Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV), Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50372-970, Brasil

[†] Royal Botanic Garden Edinburgh, 20a Inverleith Row, Edinburgh, EH3 5LR, UK

[‡] Department of Wildlife Ecology and Conservation, University of Florida, P.O. Box 110430, Gainesville, FL 32611-0430, Florida, U.S.A.

^{§§} AMANE - Associação para a Proteção da Mata Atlântica do Nordeste, Rua Aluísio de Azevedo, 200/1005, Santo Amaro, Recife-PE, 50100-090, Brazil

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: avflop@ufpe.br

Palavras chave: esfingofilia , floresta Atlântica, fluxo gênico, fragmentação, polinização, restauração florestal.

Tipo de manuscrito: Contributed Papers

Informações sobre o manuscrito: Este manuscrito contém 6918 palavras, 02 figuras, 03 tabelas, e 54 referências.

Resumo

Plantios de árvores nativas feitos com sementes coletadas a partir de poucos indivíduos doadores devem apresentar redução na diversidade genética e produtividade a longo prazo. Uma maneira pela qual a diversidade genética nos plantios de árvores pode ser restaurada sem qualquer ação de conservação, é por meio de cruzamento com populações naturais. Escolhemos a espécie arbórea *Inga vera* subsp. *affinis* como modelo de estudo, e genotipamos cinco populações plantadas e cinco naturais usando quatro locos microssatélites para testar (i) quanto da riqueza alélica encontrada nas populações naturais é presente nos plantios monoespecíficos de *I. vera*. Genotipamos sementes de populações plantadas e naturais para testar (ii) se a diversidade genética das populações plantadas é restaurada pelo cruzamento com populações naturais. Confirmamos a ocorrência de xenogamia obrigatória em *I. vera* ($F_{IS} = -0.084$), visto que as populações apresentaram baixos níveis de estruturação genética ($F_{ST} = 0.084$). A diversidade genética nas populações plantadas foi reduzida em relação às naturais (plantadas: $A_R = 14,9$, $H_O = 0,865$ e naturais: $A_R = 30,8$, $H_O = 0,655$). Sementes de populações plantadas apresentaram um aumento de 37% na riqueza alélica em relação aos adultos dos plantios (sementes: $A_R = 10,468$, adultos: $A_R = 7,599$), suportando nossa hipótese de recuperação da diversidade genética nos plantios por cruzamento com populações naturais. Ações de reflorestamento com *I. vera* devem considerar a diversidade genética das populações plantadas em relação às naturais, afim de manter a variabilidade genética das populações plantadas e promover a recuperação de interações ecológicas (*i.e.* polinização) e a conectividade de populações espalhadas em paisagens fragmentadas.

Introdução

Diversidade genética é a quantidade de variação genética existente em uma espécie e pode ser influenciada pelas relações entre os organismos e o ambiente (Hughes et al. 2008). Nas angiospermas, a retenção da diversidade genética nas plântulas em relação aos adultos depende da maneira como o fluxo polínico entre indivíduos co-específicos ocorre (e.g. Nakanishi et al. 2009; Moraes & Sebbenn 2010; Steinitz et al. 2012). Intenso fluxo polínico entre um ou poucos indivíduos deve contribuir para a produção de sementes com diversidade genética reduzida e mais dissimilar em relação aos adultos (Nakanishi et al. 2009). Além disso, algumas características ambientais, como perda e fragmentação do habitat (Young et al. 1996; Kettle et al. 2007; Llorens et al. 2012), além de atributos das populações, como número reduzido de indivíduos com distribuição esparsa (Moraes & Sebbenn 2010), interferem negativamente no fluxo gênico em plantas pela limitação da transferência de pólen entre indivíduos diferentes. Portanto, alterações nos padrões de fluxo polínico, promovidas por modificações no habitat e no tamanho das populações, devem controlar a retenção da diversidade genética entre gerações de angiospermas (Navascués & Emerson 2007).

Em florestas tropicais, a perda de habitat e a fragmentação são processos recorrentes que resultam do deslocamento de habitat devido ao crescimento da população humana e ao aumento de áreas agrícolas (Brook et al. 2006; Wright & Muller-Landau 2006a, 2006b). A floresta Atlântica é um exemplo deste padrão e encontra-se reduzida à fragmentos pequenos e isolados, representando apenas 16% da cobertura original (Dean 1995; Morellato & Haddad 2000; Myers et al. 2000; Prance et al. 2000; Silva & Tabarelli 2000; Ribeiro et al. 2009). As consequências da fragmentação e redução do habitat para o sucesso reprodutivo incluem redução do espectro de atributos funcionais reprodutivos das comunidades de plantas (Girão et al. 2007), rompimento de interações entre plantas e polinizadores (Aguilar & Galetto 2006), decréscimo do fluxo gênico entre populações (Young et al. 1996; Aguilar et al. 2008; Llorens

et al. 2012) e, portanto, estreitamento da transmissão da diversidade genética entre gerações (Kettle et al. 2007). De fato, espécies de árvores autoincompatíveis dependentes de polinizadores especializados não ocorrem em fragmentos pequenos e isolados na floresta Atlântica nordestina (Lopes et al. 2009).

Planos de reflorestamento, como as ocorrentes na floresta Atlântica nordestina, objetivam minimizar os efeitos deletérios da perda de habitat e fragmentação (Alves-Costa et al. 2008; Rodrigues et al. 2009). Ações de reflorestamento devem considerar explicitamente a diversidade genética dos indivíduos e espécies que serão utilizados nos plantios, fato que não ocorre na maioria dos casos. Grande parte das populações de árvores plantadas é fundada a partir de sementes de um número limitado de indivíduos, os quais representam apenas uma parcela da diversidade genética presente nas populações naturais (Lengkeek et al. 2004; Hollingsworth et al. 2005; Dawson et al. 2007; Navascués & Emerson 2007; Paquette & Messier 2010).

Apesar da diversidade genética reduzida em florestas restauradas em relação às florestas naturais, populações plantadas podem contribuir para a conectividade de populações naturais em fragmentos florestais diferentes, amenizando as consequências da fragmentação (Navascués & Emerson 2007). No entanto, poucos estudos analisaram a diversidade genética de plantios monoespecíficos de árvores em relação às populações naturais (Hollingsworth et al. 2005; Navascués & Emerson 2007) e quais seriam os impactos dos plantios monoespecíficos para o fluxo gênico interpopulacional na paisagem (e.g. Steinitz et al. 2012).

Espécies de *Inga* são frequentemente utilizadas em plantios monoespecíficos em alguns países da América Central e América do Sul (Pennington 1997), apesar das baixas taxas de formação de frutos e da dependência de polinizadores especializados, como esfingídeos, para a reprodução (Amorim et al. 2012; Cruz-Neto et al. no prelo). Na floresta Atlântica nordestina, a maioria das iniciativas de restauração utilizam poucas espécies de árvores,

variando entre uma e quatro espécies quando são implementadas nas margens de cursos d'água, e até oito espécies, quando os reflorestamentos são implementados em outras áreas (Alves-Costa et al. 2008). As espécies mais utilizadas, tanto em número de plantios quanto em abundância de indivíduos, são do gênero *Inga*, principalmente *Inga edulis* e *Inga vera* (Alves-Costa et al. 2008).

Objetivamos, neste estudo, descrever o sistema de cruzamento e investigar como plantios monoespecíficos de árvores interferem na diversidade e estruturação genética de populações naturais e plantadas de *Inga vera*. Especificamente, nós objetivamos determinar o nível de diversidade genética das populações plantadas em relação às naturais, e como a diversidade genética é transmitida de adultos para sementes em populações plantadas e naturais. Partindo da premissa que o plantio de árvores é feito a partir de poucos indivíduos doadores de sementes, hipotetizamos que (i) indivíduos adultos de populações plantadas apresentam diversidade genética reduzida em relação a adultos das populações naturais, e que (ii) o cruzamento, por meio de fluxo de grãos de pólen, entre populações naturais e plantadas deve contribuir para o aumento da diversidade genética das sementes em relação aos adultos nas populações plantadas.

Métodos

Área de estudo

Conduzimos este estudo na Usina Serra, uma propriedade privada de 670km² de área localizada na divisa entre os estados de Pernambuco e Alagoas (8°30'S, 35°50'O). A área total pertencente à Usina é de 24.000 ha, sendo aproximadamente 9000 ha desta área, representado por fragmentos de floresta Atlântica, de tamanhos e formatos variados (Girão et al. 2007; Lopes et al. 2009). Os fragmentos de floresta Atlântica são imersos em uma matriz homogênea de cana de açúcar a qual também apresenta pequenas áreas representadas por

plantios monoespecíficos de *Inga* e por áreas urbanas (Fig. 1). As áreas reflorestadas são geralmente implementadas nas margens de cursos de água e consistem em plantações monoespecíficas de espécies de árvores, as quais são geralmente isoladas (não contíguas) de remanescentes florestais naturais. As espécies mais utilizadas nas áreas reflorestadas no local de estudo são as espécies nativas de *Inga*, *I. vera* e *I. edulis*, ou as espécies exóticas de *Eucalyptus*, *E. camaldulensi* e *E. citriodora* (Alves-Costa et al. 2008; Cruz-Neto pers. com.). Os plantios de *Inga* tiveram início em 1984 na área de estudo e consistem em populações adensadas de indivíduos, variando entre 20 a 240 ($159 \pm 89,8$) árvores por hectare. Até o momento, foram utoizadas 160 mil mudas de *Inga* para reflorestar 20 hectares com *I. edulis* e 124 ha com *I. vera*. O objetivo principal deste tipo de prática é a manutenção da qualidade da água e do solo, numa tentativa de contribuir para a regeneração natural nas áreas plantadas.

A área de estudo está localizada no planalto da Borborema e apresenta vegetação do tipo Floresta Ombrófila Aberta Baixo Montana de acordo com a classificação de Veloso et al (1991). A região estudada encontra-se em uma região biogeográfica única de floresta Atlântica, o centro de endemismo Pernambuco (*sensu* Prance 1982). O clima é do tipo As' (Köppen 1931), quente-úmido e apresenta sazonalidade climática, sendo uma estação seca entre outubro e fevereiro e uma chuvosa entre abril e setembro com pluviosidade anual de aproximadamente 2000 mm (dados meteorológicos de 1922-2001, USGA). O cultivo de cana de açúcar na região se iniciou no século 18 e resultou na perda de extensas áreas de floresta em estágio avançado de sucessão (Coimbra-Filho & Câmara 1996). Atualmente as famílias de plantas com maior número de espécies na área de estudo são Leguminosae (30 spp., das quais 14 pertencem a sub família Mimosoideae e oito ao gênero *Inga*), seguida por Sapotaceae (13spp.), Lauraceae (11spp.) e Sapindaceae (8 spp.) (Girão et al. 2007).

Espécies estudadas

I. vera subesp. *affinis* é distribuída na América do sul, entre Colômbia e Uruguai, e inclui alguns registros na América Central. É uma espécie muito comum na América do Sul, atinge entre 18 e 25 metros de altura e habita preferencialmente margens de cursos d'água e áreas em regeneração secundária (Pennington 1997), como por exemplo, bordas de fragmento na área de estudo.

A espécie *I. vera* é autoincompatível, apresenta baixas taxas de frutificação em condições naturais e flores com atributos que favorecem a visitas por esfingídeos, apesar de ser também legitimamente polinizada por morcegos e beija-flores (Cruz-Neto et al. no prelo). Existe ainda uma elevada sincronia na floração entre indivíduos de populações diferentes, os quais podem produzir grande quantidade de flores por pelo menos sete anos consecutivos (Cruz-Neto et al. 2011). A elevada sincronia de floração sugere que a maioria dos indivíduos deve contribuir igualmente com grãos de pólen para a geração seguinte, em um determinado evento reprodutivo, havendo pouca variação entre os anos. Considerando a dependência biótica para a formação de sementes e a ocorrência em aglomerados de indivíduos nas populações plantadas, as quais são frequentemente isoladas de fragmentos de floresta, acreditamos que *I. vera* representa um bom modelo de estudo para detectar os efeitos dos reflorestamentos na composição genética de adultos e sementes das populações plantadas.

Amostragem e coleta de dados

Selecionamos 100 árvores adultas localizadas em cinco plantios monoespecíficos e cinco populações naturais, sendo 10 árvores por população. Consideramos cada fragmento de floresta e cada plantio monoespecífico com uma única população a fim de garantirmos independência espacial entre nossas amostras. Coletamos folhas e um fruto por indivíduo adulto, totalizando 100 frutos. Esterilizamos as sementes com hipoclorito de sódio 1% por

três minutos antes do plantio em um substrato estéril à germinação. Coletamos folhas das plântulas produzidas quatro meses após o plantio das sementes, sendo uma plântula por indivíduo adulto. Acondicionamos as folhas em sílica gel para secagem e extração de DNA.

Extração de DNA, PCR e genotipagem

Extraímos DNA de 200 indivíduos, 100 adultos e 100 plântulas, seguindo o protocolo de extração com Brometo de Cetil-trimetil-amônio (CTAB) (Ferreira and Grattapaglia 1998). Todos os indivíduos foram genotipados em quatro locos microssatélites (Tabela 1) utilizando *primers* desenvolvidos para outras espécies de leguminosas, *Pithecelobium elegans* e *I. edulis* (Dayanandan et al. 1997, Hollingsworth et al. 2005). Reações de PCR simplex, com volume total de 20 µl, foram feitas no termociclador Veriti 384-well (Applied Biosystems). O mix das reações continha ~ 1.5 ng de DNA, 0.32 mM de cada *primer* (utilizamos as marcações fluorescentes 6-FAM, NED e PET nos *primers forward*, Tabela 1), 4 mM KCL-MgCl₂, 3 mM MgCl₂, 160 µM de dNTPs, 40 µM de Taq DNA polimerase (Fermentas). Utilizamos o seguinte ciclo de PCR: 95°C por 2min seguidos por 30 ciclos de 95°C por 15 seg, 56/62°C por 30 seg, 72°C por 30 seg; 72°C por 15 min. Os produtos das PCRs foram diluídos, para uma concentração final de 10 ng, em água HPLC. Misturamos os produtos das PCRs de cada *primer* para cada indivíduo em uma única reação contendo 1µl dos produtos de PCRs diluídos e 6 µl de formamida Hi-DiTM (Applied Biosystems) para a análise dos tamanhos dos fragmentos produzidos.

Os fragmentos de DNA amplificados nas PCRs foram identificados usando o sequenciador ABI3730 (Applied Biosystems). Checamos manualmente o tamanho de cada alelo amplificado usando como referência a escada padrão 500-Liz no programa Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems). Categorizamos os alelos de acordo com os seus respectivos motivos utilizando o programa Flexibin (Amos *et al.*, 2007).

Análise de dados

Testamos cada população de adultos e plântulas quanto ao enquadramento no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio de ligação usando o programa FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet 2001) e ajustamos os níveis de significância em nossas comparações utilizando o procedimento de Bonferroni (Rice 1989). Checamos a presença de alelos nulos usando o programa Micro-checker (Van-Oosterhout et al. 2004) e aplicamos o método INA de correção de alelos nulos, quando necessário, utilizando o programa Freena (Chapius & Estoup 2007). Por fim, avaliamos (i) o sistema reprodutivo e estruturação populacional, (ii) a diversidade genética das populações plantadas em relação às naturais e (iii) a transmissão de diversidade genética dos adultos para sementes nas populações plantadas e naturais de *I. vera*.

Sistema sexual e estruturação genética em populações naturais

Calculamos o coeficiente de endogamia (F_{IS} ; Weir & Cockerham 1984) isoladamente para cada população natural de *I. vera*, para identificarmos o sistema sexual da espécie. Devido a sensibilidade do F_{IS} a pequenos tamanhos amostrais, calculamos também a média de F_{IS} entre populações naturais e plantadas. Realizamos todos os cálculos no programa FSTAT e acessamos os níveis de significância por meio do método de Bootstrap com 1000 replicações.

Utilizamos duas abordagens para investigar a estruturação genética das populações. Calculamos inicialmente o valor de F_{ST} entre todas as populações naturais (Weir & Cockerham 1984). Utilizamos ainda uma análise Bayesiana de agrupamento no programa BAPS 5.3 (Corander et al. 2008) para inferirmos o número de *clusters* genéticos para adultos e sementes das populações naturais.

Diversidade genética de adultos de populações plantadas e naturais

Comparamos a diversidade genética entre adultos das populações plantadas e naturais de *I. vera* para testar nossa primeira hipótese de que há uma redução na diversidade genética das populações plantadas em relação às naturais. Estimamos separadamente para populações plantadas e naturais o número total de alelos por população (A), riqueza alélica rarefacionada (A_R ; El Mousadick & Petit 1996), heterozigosidade observada e diversidade gênica (H_O e H_S ; Nei 1987) utilizando o programa FSTAT.

Diversidade genética de adultos e plântulas de *I. vera*

Comparamos A , A_R , H_O e H_S entre adultos e plântulas das populações plantadas para testarmos nossa segunda hipótese de ocorrência de recuperação da diversidade nas populações plantadas por cruzamento com populações naturais. Repetimos as mesmas comparações para adultos e plântulas das áreas naturais como tratamento controle. Checamos o nível de significância das diferenças de diversidade genética em populações plantadas e naturais usando uma análise hierárquica no programa FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet 2001) seguida do método de correção de Bonferroni (Rice 1989).

Identificamos o número de alelos encontrados exclusivamente em populações naturais ou plantadas usando o programa HP-Rare (Kalinowski 2005). Checamos a presença de alelos exclusivos nas plântulas das populações plantadas, os quais deveriam representar fluxo polínico das áreas naturais para os plantios. As análises de alelos exclusivos foram baseadas em todos os 50 indivíduos das populações naturais e os 50 indivíduos das plantadas para evitar um resultado falso positivo ocasionado pelo tamanho amostral reduzido de 10 indivíduos por população.

Resultados

Análise dos microssatélites, sistema sexual e estrutura genética de *I. vera*

Não encontramos evidências de alelos nulos para os indivíduos, mas registramos alelos nulos nas plântulas da população N3 para o loco *Inga08*. Mantivemos esta população nas análises subsequentes após a correção para a presença de alelos nulos. Nenhuma evidência de desequilíbrio de ligação foi encontrada para as populações e locos estudados, além disso, todas as populações estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg para pelo menos dois locos. O loco mais polimórfico apresentou 21 alelos e o menos polimórfico apresentou 10 alelos. Medidas de diversidade genética (H_O , H_S) e estruturação populacional (F_{ST}) foram consistentes entre os locos (Tabela 3).

Encontramos baixo valor de coeficiente de endogamia (média $F_{IS} = 0,065$), o qual não foi diferente de zero, e estruturação genética fraca ($F_{ST} = -0,007$) envolvendo todos os locos para as populações naturais de adultos e plântulas (Tabela 2). Registramos ainda a presença de apenas um *cluster* genético ($K = 1$) para adultos e sementes das populações naturais, de acordo com as análises baiesianas.

Variação genética de adultos das populações plantadas em relação a adultos das populações naturais

Identificamos 63 alelos presentes em adultos das populações naturais, dos quais 12 foram únicos (*i.e.* presentes em apenas uma população). O número médio de alelos nas populações naturais de adultos foi $8,3 (\pm 0,48)$, variando de 7,8 até 9,0 (Tabela 3), e o valor heteozigosidade observada foi elevado ($H_O = 0,887$).

Registramos redução de 50% na riqueza alélica dos adultos das populações plantadas ($A_{38} = 7,599$) em relação aos adultos das populações naturais ($A_{38} = 14,128$; Fig. 2). A riqueza alélica por população plantada foi baixa ($A_9 = 3,7 \pm 0,36$), variando entre 3,42 e 4,26. O

número médio de alelos em cada população plantada foi similarmente baixo ($A = 4,4 \pm 0,33$) variando entre 4,0 e 4,8 (Tabela 3). Encontramos redução na diversidade gênica dos adultos das populações naturais ($H_S = 0,885$) para adultos das populações plantadas ($H_S = 0,696$, $P = 0,013$; Fig. 2). A diversidade gênica de adultos das populações plantadas variou entre 0,611 e 0,726. As populações plantadas de *I. vera* mantiveram ainda altos valores de heterozigosidade observada ($H_O = 0,701$).

O coeficiente de endogamia para adultos de populações plantadas e naturais foi baixo e não diferiu de zero. Não encontramos diferenças no coeficiente de endogamia de adultos de populações plantadas e naturais ($P = 0,659$; Tabela 2). Identificamos três *clusters* genéticos ($k = 3$) para as populações plantadas de *I. vera* por meio da análise baiesiana. Populações plantadas apresentaram maior valor de estruturação genética ($F_{ST} = 0,084$) em relação às populações naturais ($F_{ST} = 0,028$; Tabela 2).

Diversidade genética de plântulas em relação a adultos

A riqueza alélica média foi maior nas plântulas ($A_{38} = 10,468$) em relação aos adultos nas populações plantadas ($A_{38} = 7,59$; Fig. 2). Encontramos aumento na diversidade gênica das plântulas ($H_S = 0,759$) em relação aos adultos ($H_S = 0,655$) nas populações plantadas (Fig. 2). A diversidade gênica variou de 0,865 nos adultos e 0,867 nas plântulas de populações naturais, não havendo diferenças estatísticas entre estes valores ($P = 0,964$). Também não houve alteração na riqueza alélica entre das populações naturais ($P = 0,567$), a qual variou entre ($A_{38} = 14,128$) nos adultos e ($A_{38} = 13,195$) nas plântulas (Fig. 2).

O número de médio de alelos nas plântulas das populações naturais foi 6,0, variando entre 5,25 e 6,5, enquanto que a diversidade gênica foi 0,759 e variou entre 0,721 e 0,811 (Tabela 3). O coeficiente de endogamia nas plântulas das populações naturais foi moderado ($F_{IS} = 0,303$) e significativamente maior em relação ao FIS das plântulas de populações naturais (F_{IS}

= - 0,084). O nível de estruturação genética das plântulas de populações plantadas foi baixo ($F_{ST} = 0,041$; Table 3).

Discussão

A degradação e fragmentação do habitat tem sido intensas na Mata Atlântica ao longo dos últimos 500 anos (Dean 1995; Silva & Tabarelli 2000). A Mata Atlântica é atualmente o quarto maior hotspot global, devido ao seus altos níveis de endemismo de espécies e fragmentação (Mittermeier et al. 2004), sendo portanto, uma área prioritária para implementação de projetos e ações de restauração florestal. Este estudo é o primeiro a analisar a retenção de diversidade genética em adultos de populações plantadas, e a transmissão desta diversidade genética entre adultos e plântulas nas populações plantadas de *Inga vera*, na floresta atlântica nordestina localizada ao norte do Rio São Francisco. Discutimos os resultados de nosso estudo de genética de populações de *I. vera* em relação ao sistema reprodutivo e estrutura genética de populações fragmentadas, a proporção de diversidade genética mantida em populações plantadas, e se a diversidade genética em populações plantadas é recuperada pelo cruzamento com populações naturais. Em seguida, consideramos as implicações dos nossos resultados para a conservação da floresta Atlântica.

Sistema reprodutivo e estrutura genética de populações naturais de *I. vera*

Encontramos valores uniformemente baixos para o coeficiente de endogamia em populações naturais de *Inga vera*. Embora as estimativas dos F_{IS} sejam sensíveis a pequenas amostras, como os dados aqui analisados (10 plantas por população), nossos resultados são apoiados por uma série de outras linhas de evidência. Encontramos alta diversidade genética (e.g. riqueza alélica) e heterozigosidade em adultos e plântulas de populações naturais de *I. vera*, permitindo-lhe manter um grande número de alelos em equilíbrio, como já era esperado para

uma espécie de árvore autoincompatível com elevado tamanho efetivo populacional. Baixos valores de endogamia e alta diversidade genética foram encontrados em um estudo com *I. edulis* na Floresta Amazônica Peruana (Hollingsworth et al. 2005). Experimentos prévios de polinização manual com 13 espécies de *Inga*, incluindo *I. vera*, sugerem que todas as espécies analisadas são xenogâmicas obrigatórias, dependentes de polinização cruzada com indivíduos não aparentados para formar frutos e sementes (Koptur 1984; Cruz -Neto et al. 2007; Amorim et al. 2012; Barros et al. 2012). No geral, os resultados aqui apresentados, e aqueles de estudos anteriores, apoiam xenogamia obrigatória como o sistema reprodutivo dominante em espécies de *Inga*.

Nossos resultados do sistema reprodutivo também foram suportados por meio de análises de estruturação genética. As populações naturais de *I. vera* apresentaram baixos valores de F_{ST} e foram atribuídas a apenas um *cluster* genético de acordo com a análise Bayesiana. Fraca estruturação genética populacional pode ser consequência do sistema de polinização de *I. vera* e também reforça a ocorrência de cruzamento entre as populações estudadas. Espécies de *Inga* no local de estudo são polinizadas por esfingídeos (esfingófilas) ou por morcegos polinizadores (quiropterófilas), com visitas ocasionais de beija-flores (Cruz-Neto et al. no prelo). Esfingídeos e morcegos sobrevoam extensas áreas durante as suas rotas de forrageio transportando grãos de pólen entre árvores distantes (Elmore et al. 2004; Amorim et al. 2012), promovendo a polinização cruzada e exercendo influência positiva sobre a formação de frutos e sementes de espécies auto-incompatíveis de *Inga* (Koptur 1984; Amorim et al 2012; Barros et al 2012;. Cruz-Neto et al. no prelo). Portanto, o fluxo de pólen entre indivíduos de diferentes populações, ocasionado pelo comportamento dos polinizadores, contribui para a polinização cruzada e fraca estruturação genética encontradas em populações naturais de *I. vera*.

Diversidade genética de populações plantadas e naturais de *I. vera*

Populações plantadas apresentaram menor riqueza alélica e diversidade gênica em relação às populações naturais, indicando que os esforços de reflorestamento com *Inga* na floresta Atlântica nordestina não são eficientes na recuperação da diversidade genética presente nas populações naturais. Apesar da redução de quase 50% na riqueza alélica, populações plantadas apresentaram elevada proporção de indivíduos heterozigotos, cerca de 65%, para os locos analisados. Redução da diversidade genética de populações plantadas em relação às naturais também foi encontrada em *I. edulis* para DNA nuclear e plastidial (Hollingsworth et al. 2005; Dawson et al. 2007) e para outras espécies de árvores (Lengkeek et al. 2004; Steinitz et al. 2012). Uma provável explicação para a baixa diversidade genética em populações plantadas em relação às naturais é a coleta de sementes a partir de poucos indivíduos doadores de propágulos (Lengkeek et al. 2004; Navascués & Emerson 2007; Paquette & Messier 2010), a qual é uma prática usual das ações de reflorestamento na floresta Atlântica nordestina (Costa et al. 2008), e pode estar acontecendo com *I. vera*. No entanto, o aumento da estruturação genética de populações plantadas em relação a populações naturais, indicado pelo aumento pequeno, mas significativo, do valor de F_{ST} , associado a um maior número de *clusters* na análise Bayesiana, sugere que nem todas as populações plantadas são derivadas de frutos provenientes de um único progenitor maternal.

O agrupamento atípico do pólen de *Inga* em políades também pode influenciar os padrões de diversidade genética encontrados neste estudo. Grãos de pólen de *Inga* estão agrupados em políades com cerca de 20 grãos (Koptur 1984; Cruz-Neto et al. 2007; Amorim et al. 2012; Barros et al. 2012). Cada um dos grãos de pólen existentes em uma políade pode fertilizar todos os óvulos de uma mesma flor. A estratégia, onde os grãos de pólen são dispersos como uma unidade, e qualquer um dos grãos podem fertilizar os óvulos de um ovário, é chamada de reprodução por loteria (“*sweepstake reproduction*”; Cruden 1977). Apesar do fato de que a

reprodução por loteria otimiza o número de sementes formadas por fruto, a diversidade genética entre sementes do mesmo fruto pode ser reduzida (Cruden 1977). Portanto, o plantio de sementes a partir de poucos frutos deve interferir negativamente na diversidade genética de populações plantadas de *I. vera* na floresta Atlântica nordestina. Ressaltamos que os esforços de reflorestamento com espécies de *Inga* devem ser feitos com sementes de diferentes indivíduos e frutos para evitar relações de parentesco próximo entre as plântulas, prejudicando o sucesso reprodutivo a longo prazo (*e.g.* a qualidade e o vigor das sementes) das populações plantadas.

Recuperação da diversidade genética nas populações plantadas por cruzamento com populações naturais

Encontramos evidências de recuperação da diversidade genética nas populações plantadas, a qual pode ter ocorrido por meio de cruzamento com populações naturais. Detectamos um aumento de 30% na riqueza alélica em plântulas das populações plantadas, enquanto não identificamos nenhuma mudança na riqueza alélica entre plântulas e adultos de populações naturais, sendo estas últimas utilizadas como controle. A ocorrência de fluxo polínico das áreas naturais para os plantios de *Inga*, e consequente recuperação da diversidade genética das plântulas dos plantios, é reforçada pelos alelos que estão presentes apenas em plântulas das populações plantadas, e em adultos e plântulas das populações naturais. Contudo, reconhecemos que nosso desenho experimental, amostrando muitas populações, mas com baixa amostragem de indivíduos em cada população, é inapropriado para detectar a gama de diversidade alélica em uma dada população, e, portanto, esta análise não pode provar de forma abrangente o cruzamento entre populações plantadas e naturais.

Fluxo gênico de populações naturais para plantios monoespecíficos também foi detectado para *Pinus canariensis*, que é uma árvore polinizada pelo vento (Navascués & Emerson

2007). Neste caso, as taxas de imigração para as populações plantadas foram elevadas, variando entre 0,68 e 0,75, e também contribuíram para o aumento significativo e recuperação da diversidade genética em populações plantadas de *Pinus canariensis*, as quais eram cercadas por grandes populações naturais com elevados números efetivos de indivíduos (Navascués & Emerson 2007). Os nossos resultados são também consistentes com a recuperação genética em populações plantadas de árvores, mas, neste caso, em uma espécie arbórea de angiosperma, polinizada por insetos e localizada em uma área intensamente fragmentada. Salientamos ainda que, embora o plantio monoespecífico de árvores resulte em populações com menor riqueza alélica (Hollingsworth et al. 2005; Lengkeek et al. 2004; Steinitz et al. 2012) e limite a diversidade genética que pode ser transferida ao longo de gerações (Lengkeek et al. 2006), grande parte da diversidade genética pode ser recuperada por meio do fluxo polínico a partir das populações naturais.

Implicações para a conservação e restauração da floresta Atlântica

Muitos planos de restauração de habitat têm sido implementados na Mata Atlântica durante os últimos 30 anos (Rodrigues et al. 2009). Uma abordagem muito utilizada na floresta Atlântica nordestina tem sido o plantio de árvores nativas, como *I. vera*, em alta densidade (Alves-Costa et al. 2008). As árvores de *Inga* nos plantios da área de estudo são plantadas em espaçamentos de três metros entre árvores da mesma linha de plantio e dois metros entre linhas de plantio. Apesar de ser uma técnica ainda muito utilizada, o plantio monoespecífico de árvores em alta densidade, tende a declinar em 10 a 15 anos após o plantio (Rodrigues et al. 2009). O consenso atual é que os planos de restauração devem aliar a preservação tanto interações ecológicas, como serviços de polinização os quais podem ser essenciais para garantir o sucesso da restauração (Dixon 2009), e a diversidade genética de populações plantadas (Lengkeek et al. 2004; Paquette & Messier 2010).

O plantio de *I. vera* parece contribuir positivamente para a recuperação das interações de polinização, visto que encontramos fluxo gênico das populações naturais para os plantios monoespecíficos. Este pode ser o caso de *Inga*, cujas espécies possuem floração altamente sincrônica entre populações no trecho estudado de floresta Atlântica nordestina (Cruz-Neto et al. 2011). A constância nos eventos de floração das espécies de *Inga*, incluindo *I. vera*, significa populações plantadas podem ser uma fonte abundante de flores, atuando como recurso extra para as populações nativas de polinizadores.

O plantio de árvores com baixa diversidade genética promove estruturação genética das populações plantadas, podendo haver a necessidade de muitas gerações nas quais ocorram cruzamentos entre populações plantadas e naturais, para que a diversidade genética dos plantios seja restaurada. O tempo na recuperação da diversidade genética em plantios de árvores será particularmente incrementado se a diversidade genética em populações naturais já foi degradada por meio da fragmentação, como deve ser o caso de muitas espécies de árvores na floresta Atlântica. Portanto, planos de restauração futuros em ecossistemas intensamente fragmentados, devem considerar o potencial de dispersão de pólen em grandes escalas espaciais, e associação com esforços para manutenção da diversidade genética elevada em populações plantadas.

Agradecimentos

Agradecemos à L.G. Dantas, A.P. Harand, J. Silva, M. Woolley, e R. Fernandes (Universidade Federal de Pernambuco) pela ajuda essencial durante a execução das análises em laboratório; L.A. Bezerra e C. Bakker por autorizarem nosso trabalho de campo na Usina Serra Grande; Suporte financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (número do processo 567739/2008-2 para A.V.L. e 556990/2010-2 para O.C.N.), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (número do

processo 5998/11-5 para O.C.N.). Agradecemos também ao *Centro de Pesquisas Ambientais do Nordeste* e ao *Projeto Serra Grande* pelo apoio logístico.

Literatura citada

- Aguilar, R., L. Ashworth, L. Galetto, and M. A. Aizen. 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a metaanalysis. *Ecology Letters* **9**: 968–980.
- Aguilar, R., M. Quesada, L. Ashworth, Y. Herrerias-Diego, J. Lobo. 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology* **17**(24): 5177-5188.
- Alves-Costa, C. P., D. Lôbo, T. Leão, P. H. S. Brancalion, A. G. Nave, S. Gandolfi, A. M. M. Santos, R. R. Rodrigues, and M. Tabarelli. 2008. Implementando reflorestamentos com alta diversidade na Zona da Mata Nordestina: Guia Prático. Recife: J. Luiz Vasconcelos.
- Amorim, F. W., L. Galetto, and M. Sazima. 2012. Behind the pollination syndrome: Nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant Biology* in press.
- Amos, W., J. I. Hoffman, A. Frodsham, L. Zhang, S. Best, and V. S. Hill. 2007. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes* **7**: 10-14.
- Barros, E. C. O., A. C. Webber, and I. C. Machado. 2012. Limitação de polinizadores e mecanismo de autoincompatibilidade de ação tardia como causas da baixa formação de frutos em duas espécies simpátricas de *Inga* Mill. (Fabaceae–Mimosoideae) na Amazônia Central. *Rodriguesia* in press.
- Brook, B. W., C. J. A. Bradshaw, L. P. Koh, and N. S. Sodhi. 2006. Momentum drives the crash: Mass extinction in the tropics. *Biotropica* **38**:302-305.

- Chapius, M. P., A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 621-631.
- Coimbra-Filho, F., Câmara, I. G. 1996. Os Limites Originais do Bioma Mata Atlântica na Região Nordeste do Brasil. Fundação Brasileira para Conservação da Natureza – FBCN, Rio de Janeiro.
- Corander, J., P. Marttinen, J. Sirén, and J. Tang. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics* **9**:539.
- Cruden, R. W. 1977. Pollen-Ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* **31**: 32-46.
- Cruz-Neto, O., I. C. Machado, and A. V. Lopes. 2007. Ecologia da polinização de *Inga striata* (Benth.) (Leguminosae-Mimosoideae) em um remanescente de Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biosciências* **5**: 570-572.
- Cruz-Neto, O., I. C. Machado, J. A. Duarte, and A. V. Lopes. 2011. Synchronous phenology of hawkmoths (Sphingidae) and *Inga* species (Fabaceae–Mimosoideae): implications for the restoration of the Atlantic forest of northeastern Brazil. *Biodiversity & Conservation* **20**: 751-765.
- Dawson, I. K., P. M. Hollingsworth, J. J. Doyle, S. Kresovich, J. C. Weber, C. Sotelo-Montes, T. D. Pennington and T. R. Pennington. 2007. Origins and genetic conservation of tropical trees in agroforestry systems: a case study from Peruvian Amazon. *Conservation Genetics* **9**: 361-372.
- Dayanandan, S., K. S. Bawa, and R. Kesseli. 1997. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). *American Journal of Botany* **84**: 1658–1663.
- Dean, W. 1995. *With Broadax and Firebrand: The Destruction of the Brazilian Atlantic Forest*. University of California Press, Berkeley.
- Dixon, K. W. 2009. Pollination and restoration. *Science* **325**: 571-572.

- El Mousadik, A., R. J. Petit. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* **92**: 832–839.
- Elmore, L. W., D. A. Miller, and F. J. Vilella. 2004. Foraging area size and habitat use by red bats (*Lausirus borealis*) in an intensively managed pine landscape in Mississippi. *The American Midland Naturalist* **153**: 405-417.
- Ferreira, M. E., and D. Grattapaglia. 1998. Protocolos: Extração de DNA genômico total de plantas. Pages 121-138 in M. E. Ferreira and D. Grattapaglia editors. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2nd edition. Embrapa Cenargen, Brasília.
- Girão, L. C., A. V. Lopes, M. Tabarelli, and E. M. Bruna. 2007. Changes in tree reproductive traits reduce functional diversity in a fragmented Atlantic forest landscape. *Public Library of Science One* **2**: e908.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices, Version 2.9.3.2. Available from: <http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html> (accessed February 2012).
- Hollingsworth, P. M., I. K. Dawson, P. Goodall-Copestake, J. E. Richardson, J. C. Weber, C. Sotelo-Montes, and R. T. Pennington. 2005. Do farmers reduce genetic diversity when they domesticate tropical trees? A case study from Amazonia. *Molecular Ecology* **14**: 497-501.
- Grindeland, J. M., N. Sletvold, and R. A. IMS. 2005. Effects of floral display size and plant density on pollinator visitation rate in a natural population of *Digitalis purpurea*. *Functional Ecology* **19**: 383-390.
- Hodges, S. A. 1995. The influence of nectar production on hawkmoth behaviour, self pollination and seed production in *Mirabilis multiflora* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany* **82**: 197-204.

- Hughes, A. R., B. D. Inouye, M. T. J. Johnson, N. Underwood, and M. Vellend. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters* **11**: 609-623.
- Kalinowski, S. T. 2005. HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* **5**: 187-189.
- Kettle, C. J., P. M. Hollingsworth, T. J. Affré, B. Moran, and R. A. Ennos. 2007. Identifying the early genetic consequences of habitat degradation in a highly threatened tropical conifer, *Araucaria nemorosa* Laubenfels. *Molecular Ecology* **16**: 3581-3591.
- Koptur, S. 1984. Outcrossing and pollinator limitation of fruit set: Breeding systems of neotropical *Inga* trees (Fabaceae: Mimosoideae). *Evolution* **38**: 1130-1143.
- Köppen, W. 1931. *Grundriss der Klimakunde*. Walter de Gruyter, Berlin, GER.
- Lengkeek, A. G., H. Jaenicke, and I. K. Dawson. 2004. Genetic bottlenecks in agroforestry systems: results of tree nursery surveys in East Africa. *Agroforestry Systems* **63**: 149-155.
- Lengkeek, A. G., A. M. Mwangi, C. A. C. Agufa, J. O. Ahenda, and I. K. Dawson. 2006. Comparing genetic diversity in agroforestry systems with natural forest: a case study of the important timber tree *Vitex fischeri* in central Kenya. *Agroforestry Systems* **67**: 293-300.
- Llorens, T. M., M. Byrne, C. J. Yahtes, H. M. Nistelberger, and D. J. Coates. 2012. Evaluating the influence of different aspect of habitat fragmentation on mating patterns and pollen dispersal in the bird-pollinated *Banksia sphaerocarpa* var. *caesia*. *Molecular Ecology* **21**: 314-328.
- Lopes, A. V., L. C. Girão, B. A. Santos, C. A. Peres, and M. Tabarelli. 2009. Long-term erosion of tree reproductive trait diversity in edge-dominated Atlantic forest fragments. *Biological Conservation* **142**: 1154-1165.
- Mittermeier, R. A.; Gil, P. R.; Hoffman, M.; Pilgim, J.; Brooks, T.; Mittermeier, C. G.; Lamourex, J.; Fonseca, G. A. B. Hotspots revisited: Earth biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX, Cidade do México, p. 390, 2004.

- Moraes, M. L. T., and A. M Sebbenn. 2010. Pollen dispersal between isolated trees in the brazilian savannah: A case study of the Neotropical tree *Hymenaea stigonocarpa*. *Boitropica* **42**: 1-8.
- Morellato, L. P. C., and C. F. B. Haddad. 2000. The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* **32**: 786-792.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. Fonseca, and J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853-858.
- Nakanishi, A., N. Tomaru, H. Yoshimaru, T. Manabe, and S. Yamamoto. 2009. Effects of seed- and pollen-mediated gene dispersal on genetic structure among *Quercus salicina* saplings. *Heredity* **102**: 182-189.
- Navascués, M., and B. C. Emerson. 2007. Natural recovery of genetic conservation by geneflow in reforested areas of the endemic Canary Island pine, *Pinus canariensis*. *Forest Ecology and Management* **244**: 122-128.
- Nei, M. 1987. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583–590.
- Paquette, A., and C. Messier. 2010. The role of plantations in managing the world's forests in the Anthropocene. *Frontiers in Ecology and the Environment* **8**: 27–34.
- Peakall, R., and P. E. Smouse. 2006. GenAlex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288-295.
- Pennington, T. D. 1997. The genus *Inga*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Prance, G. T. 1982. Forest refuges: evidence from woody angiosperms. Pages 137–158 in G. T. Prance, editor, *Biological Diversification in the Tropics*. Columbia University Press, New York.
- Prance, G. T., H. Beentje, J. Dransfield, and R. Johns. 2000. The tropical flora remains undercollected. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **87**: 67-71.

- Ribeiro, M. C., Metzger, J. P., Martensen, A. C., Ponzoni F. J. and Hirota M. M. 2009. The brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* **142**: 1141-1153.
- Rice, W. R. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution* **43**:223-225.
- Rodrigues, R. R., R. A. F. Lima, S. Gandolfi, and A. G. Nave. 2009. On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Conservation* **142**: 1241-1251.
- Silva, J. M. C., and M. Tabarelli. 2000. Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic Forest of northeast Brazil. *Nature* **404**: 72-73.
- Steinitz, O., J. J. Robledo Arnuncio, and R. Nathan. 2012. Effects of Forest plantations on the genetic composition of conspecific native Aleppo pine populations. *Molecular Ecology* **21**: 300-313.
- Van-Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills, and P. Shipley. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**: 535-538.
- Veloso, H. P., A. L. R. Rangel Filho, and J. C. A. Lima. 1991. Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro.
- Weir, B. S., and C. C. Cockerham, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**:1358-1370.
- Wright, S. J., and H. C. Muller-Landau. 2006a. The future of tropical forest species. *Biotropica* **38**:287-301.
- Wright, S. J., and H. C. Muller-Landau. 2006b. The uncertain future of tropical forest species. *Biotropica* **38**:443-445.
- Young, A., T. Boyle, and T. Brown 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in ecology and evolution* **11**: 413-418.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Descrição e localização da área de estudo. Mapa da América do Sul destacando região nordeste do Brasil e da extensão original da floresta Atlântica (A); distribuição original e remanescente da floresta Atlântica em Alagoas e Pernambuco (B; retângulo branco representa a área de estudo); Mapa da área de estudo destacando remanescentes de floresta Atlântica, plantações de *Inga*, plantações de cana de açúcar e áreas urbanas (C).

Figura 2. Riqueza alélica (A_R) e diversidade gênica (H_S) (média $\pm$ IC) entre indivíduos adultos e sementes de populações naturais e plantadas de *Inga vera* na floresta Atlântica, AL, Brasil. (Barras com a mesma cor seguidas por letras diferentes foram estatisticamente distintas ao nível de significância $P < 0,05$).

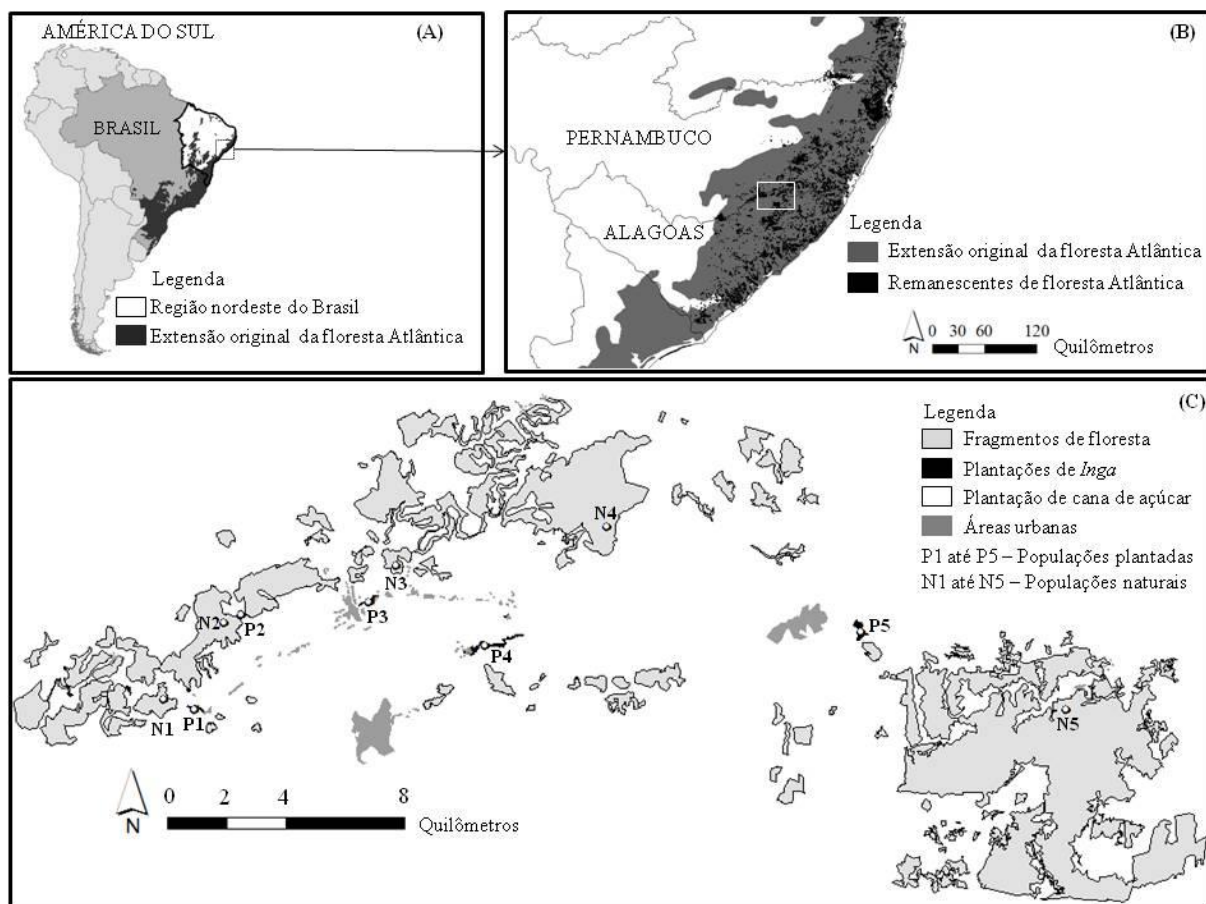


Fig. 1

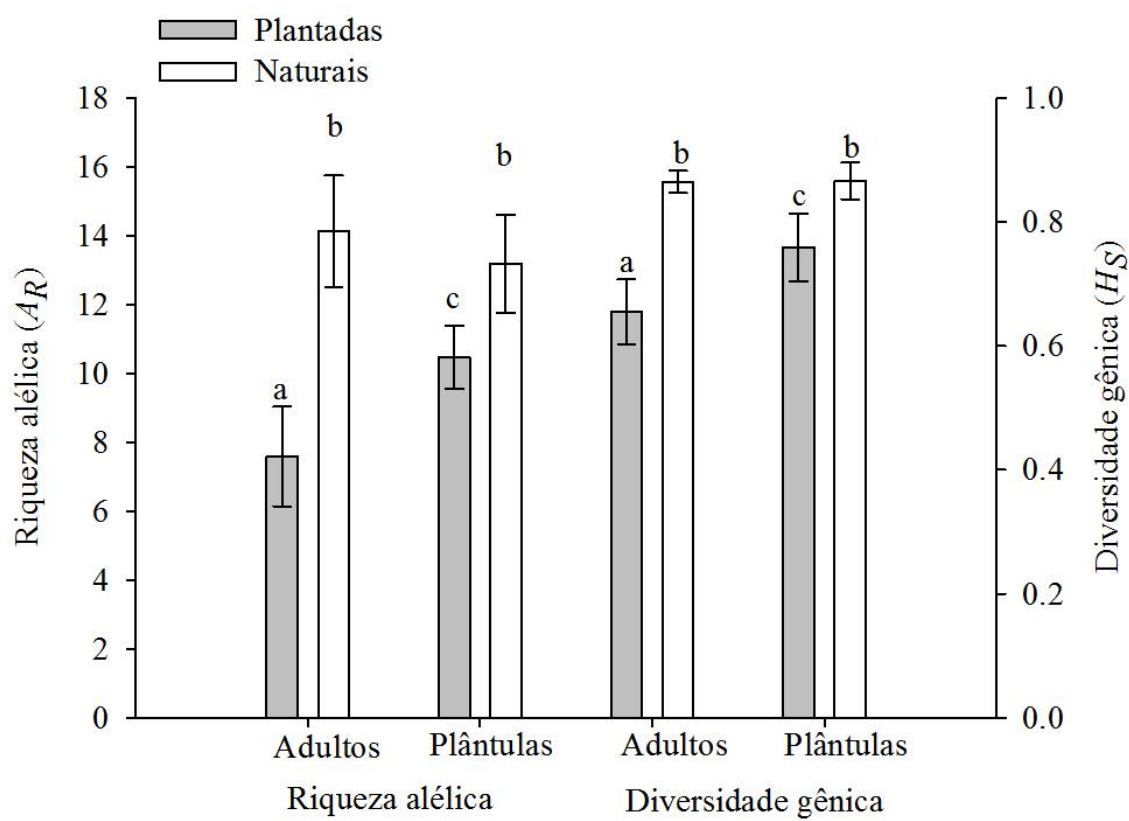


Fig. 2

TABELAS

Tabela 1. Diversidade genética por loco em adultos e plântulas de *Inga vera* em populações plantadas e naturais. Nome do loco, referência dos *primers*, temperatura de anelamento (T_a), tamanho (pb) dos fragmentos amplificados, heterozigosidade observada (H_O), diversidade gênica (H_S), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e de diferenciação genética (F_{ST}). Os *primers* *Inga03* e *Inga33* foram marcados com 6-FAM, enquanto os *primers* *Inga08* e *Pel05* foram marcados com NED e PET, respectivamente.

Loco	Referência	T_a (°C)	Tamanho (bp)	H_O	H_S	F_{IS}	F_{ST}
<i>Inga03</i>	Hollingsworth et al. 2005	56	58-90	0.841	0.807	-0.039	0.015
<i>Inga08</i>	Hollingsworth et al. 2005	56	130-174	0.658	0.78	0.164	0.052
<i>Inga33</i>	Hollingsworth et al. 2005	62	216-244	0.583	0.803	0.269	0.078
<i>Pel05</i>	Dayanandan et al. 1997	62	179-215	0.807	0.758	-0.062	0.072

Tabela 2. Coeficiente de endogamia (F_{IS}) e de diferenciação genética (F_{ST}) de adultos e sementes entre populações plantadas e naturais de *Inga vera*. (Valores na mesma coluna seguidos por letras distintas foram estatisticamente diferentes ao nível de significância $P \leq 0,05$, baseado em 1000 permutações).

	F_{IS}		F_{ST}	
	Por população	Geral	Por população	Geral
Plantadas				
Adultos	-0.084 ^a	0.178 ^a	0.084 ^a	0.003 ^a
Plântulas	0.303 ^b		0.041 ^b	
Natural				
Adultos	-0.061 ^a	0.065 ^b	0.027 ^b	-0.007 ^a
Plântulas	0.149 ^c		0.021 ^b	

Tabela 3. Diversidade genética por população de adultos e plântulas de *Inga vera* em áreas plantadas e naturais. Número total de alelos (A), riqueza alélica rarefacionada para 9 indivíduos (ver texto), diversidade gênica (H_S) e coeficiente de endogamia (F_{IS}) por população de adultos e plântulas entre populações plantadas e naturais. (Valores de F_{IS} em negrito foram estatisticamente diferentes de zero).

Populações	Adultos				Plântulas			
	A	A_9	H_S	F_{IS}	A	A_R	H_S	F_{IS}
Plantadas								
P1	4,3	3,62	0,612	0,082	6	3,96	0,684	0,316
P2	4,8	3,98	0,698	0,04	5,75	5,35	0,811	0,266
P3	4,0	3,42	0,637	-0,175	5,25	4,01	0,721	0,358
P4	4,3	3,45	0,611	-0,225	6,25	5,58	0,78	0,238
P5	4,8	4,26	0,726	-0,068	6,5	5,66	0,798	0,346
Média	4,4	3,7	0,655	-0,018	6,01	4,91	0,759	0,305
(±DP)	(0,33)	(0,36)	(0,05)	(0,13)	(0,48)	(0,85)	(0,05)	(0,05)
Naturais								
N1	8,3	8	0,867	-0,085	7,5	6,64	0,839	0,153
N2	7,8	7,29	0,861	0,019	8	7,06	0,881	0,243
N3	8,0	7,29	0,838	-0,096	7,25	6,37	0,831	0,014
N4	9,0	8,1	0,885	-0,046	8,25	7,26	0,886	0,295
N5	8,5	7,89	0,876	-0,106	9,5	7,95	0,897	0,025
Média	8,3	7,7	0,865	-0,063	8,1	7,16	0,867	0,146
(±DP)	(0,48)	(0,4)	(0,01)	(0,05)	(0,87)	(0,6)	(0,03)	(0,12)

CAPÍTULO 4

Plantios monoespecíficos de *Inga vera* subesp. *affinis* promovendo o fluxo gênico interpopulacional na floresta Atlântica nordestina brasileira

A ser submetido ao periódico Landscape Ecology

RESEARCH ARTICLE

Plantios monoespecíficos de *Inga vera* subesp. *affinis* promovendo o fluxo gênico interpopulacional na floresta Atlântica nordestina brasileira**Oswaldo Cruz-Neto • Antonio V. Aguiar-Neto • Ariadna V. Lopes**

O. Cruz-Neto

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50372-970, Brazil. E-mail: ocruznt@gmail.com

A.V. Aguiar-Neto

Department of Wildlife Ecology and Conservation, University of Florida, P.O. Box 110430, Gainesville, FL 32611-0430, Florida, U.S.A. E-mail: patriota@ufl.edu

A.V. Lopes (Autor para correspondência)

Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 50372-970, Brazil. E-mails: avflopes@ufpe.br, ariadna.lopes@pq.cnpq.br
Phone: +55 81 2126-8945; Fax: +55 81 2126-8348

Data desta versão do manuscrito: 04/11/2012

Contagem de palavras (incluindo texto, referências, tabelas): 7281

RESUMO

Alterações antrópicas nas características da paisagem originam tipos de habitat que interferem diferencialmente no fluxo gênico interpopulacional. Aumentos ou reduções na conectividade de manchas de habitat ocasionam alterações nos níveis de estruturação genética entre populações de plantas. Objetivamos neste trabalho, entender como tipos de manchas de habitat interferem no fluxo gênico interpopulacional de *Inga vera* subesp. *affinis*.

Amostramos plântulas de *I. vera* de cinco populações plantadas e cinco naturais.

Consideramos quatro tipos de habitat na área de estudo: fragmentos de floresta, plantios monoespecíficos de *Inga*, plantações de cana de açúcar e áreas urbanas nas análises de fluxo gênico. Genotipamos 500 plântulas para quatro locos de microssatélites, descrevemos a diversidade genética para cada população, e os efeitos da resistência dos tipos de habitat e da paisagem sobre o fluxo gênico em *I. vera*. Encontramos elevada diversidade gênica ($H_S = 0.772$), coeficiente de endogamia moderado ($F_{IS} = 0.223$) e baixos níveis de estruturação genética ($F_{ST} = 0.069$) nas populações estudadas. Plantios monoespecíficos de *I. vera* apresentaram menor resistência ao fluxo gênico em relação aos plantios de cana de açúcar e áreas urbanas ($r = 0.357$, $P = 0.02$). Registramos grande variação de resistência entre os tipos de habitat ($r = 0.361$, $P = 0.019$), onde as áreas urbanas apresentaram maior resistência ao fluxo gênico em relação aos plantios de *Inga* e de cana de açúcar. Este foi o primeiro trabalho a analisar as relações entre tipos de habitat na floresta Atlântica nordestina e fluxo gênico em uma espécie arbórea. Ressaltamos que plantios monoespecíficos de *Inga* podem atuar como “stepping stones”, favorecendo o fluxo polínico interpopulacional mesmo em paisagens com tipos de habitat que oferecem elevada resistência ao fluxo gênico.

Palavras chave: Fluxo polínico; fragmentação; microssatélites; modelo “stepping stones”; polinização; restauração florestal.

Introdução

O fluxo de pólen e sementes entre populações é responsável pela manutenção da diversidade genética em espécies de plantas (Dick et al 2008). Polinizadores com extensas áreas de forrageio promovem fluxo polínico entre indivíduos distantes, diminuindo a estruturação genética interpopulacional em plantas (*e.g.* Gaiotto et al 2003; Moraes e Sebben 2011). Ações antrópicas promotoras da perda e fragmentação das florestas, além de práticas de reflorestamento, originam paisagens com manchas de habitat distintas, facilitando ou impedindo o fluxo gênico entre indivíduos e populações distantes (Aguilar et al 2008; Llorens et al 2012). Portanto, manchas de habitat favoráveis ao fluxo gênico em cenários antropizados podem atuar como “*stepping stones*” (Kimura e Weiss 1964), promovendo o fluxo gênico e diminuindo os níveis de estruturação genética interpopulacional.

A polinização biótica ocorre na maioria das angiospermas, principalmente nos ecossistemas tropicais (Bawa 1990). Os visitantes florais respondem positivamente a aumentos na oferta de recurso, em que flores distribuídas adensadamente recebem maior número de visitas que flores isoladas (Hodges 1995; Klinkhamer et al 2001). A fragmentação das florestas interfere negativamente nas interações de polinização reduzindo o tamanho efetivo e distribuição das populações de polinizadores e plantas (*e.g.* Girão et al 2007; Lopes et al 2006, 2009), e contribuindo para a redução do fluxo polínico interpopulacional e aumento da estruturação genética em populações de plantas (Llorens et al 2012).

Ações de reflorestamento diversas objetivam recuperar características do habitat minimizando os efeitos negativos da fragmentação sobre interações ecológicas chave, como a polinização, e composição genética das populações de plantas (*sensu* Rodrigues et al 2009). O plantio de árvores nativas pode contribuir para a atração de polinizadores, atuando no aumento da conectividade entre populações pela diminuição da resistência da paisagem ao fluxo gênico (Navascués e Emerson 2007). Baixa resistência da paisagem ao fluxo gênico

pode favorecer a manutenção da polinização em muitas espécies de plantas, especialmente em ecossistemas fragmentados como a floresta Atlântica brasileira.

A distribuição original da floresta Atlântica abrangia a região leste brasileira entre os estados de Rio Grande do Norte e Rio Grande do Sul, em uma área equivalente à 1.315.460km² ou 15% do território brasileiro (Collins 1990). O crescimento populacional e agrícola no litoral brasileiro ocasionou a degradação e fragmentação de aproximadamente 93% da cobertura original da floresta Atlântica (Morellato e Haddad 2000). Atualmente, a floresta Atlântica, encontra-se distribuída em pequenos fragmentos circundados por matrizes diversas e apresenta elevada biodiversidade, sendo ainda considerada um dos 25 *hotspots* mundiais (Myers et al 2000). O melhor entendimento das influências de características do habitat sobre o fluxo gênico e estruturação genética em populações de plantas, é essencial para o manejo de ecossistemas degradados como a floresta Atlântica.

O objetivo deste estudo foi entender como modificações nas características do habitat se relacionam com padrões de variação genética de árvores utilizadas em planos de reflorestamento na floresta Atlântica. Estudamos a espécie *Inga vera* subesp. *affinis* e descrevemos as alterações na variabilidade genética em populações plantadas e naturais e os efeitos da distância geográfica sobre o nível de estruturação genética de plântulas produzidas nessas populações. Testamos as hipóteses de que plantios monoespecíficos de *I. vera* subsp. *affinis* contribuem para o fluxo gênico entre populações naturais atuando como “stepping stones” (i) e que elevado grau de fragmentação e influências antrópicas originam paisagens com manchas de habitat muito distintas (ii). Esperamos encontrar que (a) plantios de *I. vera* subsp. *affinis* apresentem menor resistência ao fluxo gênico que outros tipos de habitat (i.e. plantios de cana de açúcar, áreas urbanas); (b) e que paisagens com maiores diferenças de resistência entre tipos de habitat são mais intensamente relacionadas à estruturação genética de plântulas de *I. vera* subsp. *affinis*.

Métodos

Área de estudo

Realizamos este estudo em remanescentes de floresta Atlântica e plantios monoespecíficos com *Inga vera* subesp. *affinis*, pertencentes à Usina Serra Grande, uma propriedade privada localizada no Estado de Alagoas (8°58'50"S, 36°04'30"O). A usina apresenta área total de 24,000 ha dos quais 9000 ha são fragmentos de tamanhos e formatos variados de floresta Atlântica (Girão et al 2007; Lopes et al 2009) distribuídos em uma matriz homogênea composta de plantios de cana-de-açúcar, a qual também apresenta pequenas áreas cobertas por plantios monoespecíficos de árvores além de áreas urbanas (Figura 1). Os plantios de árvores na região utilizam entre uma e quatro espécies, sendo principalmente, as espécies nativas *Inga vera* e *I. edulis*, ou as espécies exóticas *Eucaplyptus camaldulensi* e *E. citriodora* (Alves-Costa et al 2008; Cruz-Neto pers. com.). No total foram utilizadas aproximadamente 160,000 mudas de *Inga* para reflorestar 144 ha, sendo 20 ha com *I. edulis* e 124 ha com *I. vera*.

A área situa-se no planalto da Borborema, apresenta vegetação do tipo Floresta Ombrófila Aberta Baixo Montana segundo a classificação de Veloso et al (1991), sendo associada a uma região biogeográfica única de floresta Atlântica, o centro de endemismo Pernambuco (*sensu* Prance 1982). O clima é do tipo As' (Köppen 1931), quente-úmido e apresenta sazonalidade climática, sendo uma estação seca entre outubro e fevereiro e uma chuvosa entre abril e setembro, com pluviosidade anual de aproximadamente 2000 mm (dados meteorológicos de 1922-2001, USGA). O cultivo de cana de açúcar na região se iniciou no século 18 e resultou na perda de extensas áreas de floresta em estágio avançado de sucessão (Coimbra-Filho e Câmara 1996). Atualmente, as famílias de plantas com maior número de espécies na área de estudo são Leguminosae (30 spp., das quais 14 pertencem à sub família Mimosoideae e oito ao gênero *Inga*), seguida por Sapotaceae (13spp.), Lauraceae (11spp.) e Sapindaceae (8 spp.) (Girão et al 2007).

Espécie estudada

Inga vera subesp. *affinis* ocorre na América do Sul, entre Colômbia e Uruguai, e na América Central. A espécie estudada é arbórea, pode alcançar entre 18 e 25m de altura e ocorre naturalmente ao longo de cursos d' água, compondo matas de galeria (Pennington 1997). A taxa de frutificação em condições naturais de *I. vera* é baixa, aproximadamente 2%, e a síndrome de polinização é esfingófila, sendo efetivamente polinizada por esfingídeos, morcegos e até mesmo beija-flores (Cruz-Neto et al no prelo). A fenologia da floração de *I. vera* é sub anual, com elevada sincronia entre indivíduos, os quais podem florescer com intensidade superior a 75% entre vários anos (Cruz-Neto et al 2011). Elevada sincronia de floração indica que a maioria dos indivíduos deve contribuir com grãos de pólen para a geração subsequente com baixa variação entre os anos. Acreditamos que *I. vera* representa um bom modelo de estudo para entender os efeitos de ações antrópicas sobre a variação genética e fluxo gênico em populações de árvores considerando a dependência biótica para a polinização e frutificação, além da ocorrência em plantios monoespecíficos e em fragmentos de floresta Atlântica.

Amostragem e coleta de dados

Selecionamos e georeferenciamos dez populações de *I. vera* sendo cinco localizadas em plantios monoespecíficos e cinco em fragmentos de floresta Atlântica (Figura 1).

Consideramos cada plantio e cada fragmento como populações distintas a fim de evitarmos amostrar uma mesma população duas vezes. Coletamos 638 frutos maduros, sendo aproximadamente 63 frutos por população. Examinamos todos os frutos e selecionamos as sementes viáveis para o plantio. Consideramos sementes viáveis aquelas que não apresentavam larvas de insetos ou marcas de herbivoria. Utilizamos recipientes de plástico, devidamente identificados e contendo o mesmo tipo e quantidade de substrato, para o plantio

das sementes. Acompanhamos a germinação e o desenvolvimento das plântulas por quatro meses. Selecionamos aleatoriamente uma plântula por fruto e coletamos folhas jovens, as quais foram acondicionadas em recipientes hermeticamente fechados para a secagem seguida da extração de DNA. Utilizamos 500 plântulas no total, sendo 50 por população.

Extração de DNA, PCR e genotipagem

Extraímos DNA a partir de 100 mg de folhas secas para todas as 500 plântulas de acordo com o protocolo de extração com CTAB proposto por Ferreira e Grattapaglia (1998). Genotipamos todos os indivíduos para quatro locos de microssatélites usando *primers* desenvolvidos para *Pithecelobium elegans* e *Inga edulis* (Dayanandan et al 1997; Hollingsworth et al 2005).

Reações de PCR simplex, com volume total de 20 µl, foram feitas no termociclador Veriti 384-well (Applied Biosystems). O mix das reações continha ~ 1.5 ng de DNA, 0.32 mM de cada *primer* (utilizamos as marcações fluorescentes 6-FAM, NED e PET nos *primers forward*, Tabela 1), 4 mM KCL-MgCl₂, 3 mM MgCl₂, 160 µM de dNTPs, 40 µM de Taq DNA polimerase (Fermentas). Foi utilizado o seguinte ciclo de PCR: 95°C por 2min seguidos por 30 ciclos de 95°C por 15 seg, 56/62°C por 30 seg, 72°C por 30 seg; 72°C por 15 min. Os produtos das PCRs foram diluídos, para uma concentração final de 10 ng, em água HPLC. Misturamos os produtos das PCRs de cada *primer* para cada indivíduo em uma única reação contendo 1µl dos produtos de PCRs diluídos e 6 µl de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) para a análise dos tamanhos dos fragmentos produzidos.

Os fragmentos de DNA amplificados nas PCRs foram identificados usando o sequenciador ABI3730 (Applied Biosystems). Checamos manualmente o tamanho de cada fragmento usando como referência a escada padrão 500-Liz no programa Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems). Categorizamos os alelos de acordo com os seus respectivos motivos utilizando o programa Flexibin (Amos et al 2007). Testamos as amostras quanto a presença de

alelos nulos e quanto ao desequilíbrio de ligação usando os programas Micro-checker (Van-Oosterhout et al 2004) e FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet 2001), respectivamente.

Análise da variabilidade genética e fluxo gênico interpopulacional

Testamos cada população quanto ao enquadramento no Equilíbrio de Hardy-Weinberg e ajustamos os valores dos níveis de significância de acordo com correções de Bonferroni (Rice 1989). Calculamos o número total de alelos por locos por população (A), a riqueza alélica rarefacionada para o menor número de indivíduos diplóides por população (A_R ; El Mousadick e Petit 1996), a heterozigosidade observada e a diversidade gênica (H_O e H_S ; Nei 1987), o coeficiente de endogamia (F_{IS} ; Weir e Cockerham 1984) para cada população e de estruturação genética global (F_{ST} ; Weir e Cockerham 1984). Comparamos os índices de variabilidade genética entre populações plantadas e naturais usando uma análise hierárquica com 10,000 permutações no programa FSTAT v.2.9.3.2 (Goudet 2001).

Calculamos valores de F_{ST} pareado linearizado ($F_{ST}/[1 - F_{ST}]$; Rousset 1997) como uma medida de fluxo gênico entre todas populações e acessamos os valores dos níveis de significância por meio de 10,000 randomizações seguidas pelo método de correção de Bonferroni (Rice 1989). Utilizamos o programa FSTAT para calcular as estimativas de fluxo gênico nas populações estudadas.

Estimativas de isolamento pela distância geográfica (IDG), distância efetiva (IDE) e distância por resistência da paisagem (IDR)

Investigamos a relação entre fluxo gênico interpopulacional e características da paisagem na área de estudo analisando os efeitos do isolamento pela distância geográfica (IDG; Wright 1943), pela distância efetiva (IDE) e pela resistência dos tipos de habitat (IDR; McRae e Beier 2007), sobre os níveis de estruturação genética nas populações estudadas. Estimamos a

distância geográfica (IDG) a partir da obtenção das distâncias euclidianas entre todas as populações utilizando o Arctoolbox *Landscape Genetics* (Etherington 2011) no programa ArcGIS10 (ESRI).

O cálculo da distância efetiva (IDE) e da resistência (IDR) exige mapas de permeabilidade da paisagem, por isso, criamos grids de resistência com células de 900m² (30 x 30), a partir do mapa da área de estudo, e atribuímos valores de resistência diferentes para cada tipo de habitat encontrado (Mc Rae et al 2008). Consideramos quatro tipos de habitat na área de estudo: fragmentos de floresta, plantios monoespecíficos de *Inga*, plantações de cana de açúcar e áreas urbanas (*i.e.* cidades, vilarejos e a refinaria). No total, criamos 16 grids raster de resistência (Tabela 1) os quais foram divididos em duas categorias. Atribuímos valores fixos aos fragmentos de floresta, os quais foram considerados habitats de resistência baixa ou nula em todos os grids.

Na primeira categoria, utilizamos seis grids de resistência, os quais chamamos de grids de habitat, para identificarmos a contribuição relativa de cada tipo habitat para os níveis de estruturação genética nas populações estudadas. Para isto, mantivemos fixos os valores de resistência dos fragmentos em todos os grids e variamos as resistências dos outros habitats entre-si (Tabela 1). Os valores de resistência variaram 25% entre cada tipo de habitat, desta maneira incluímos na paisagem manchas de habitat variando entre 0 e 100% de resistência, indicando respectivamente áreas favoráveis e barreiras ao fluxo gênico.

Na segunda categoria, criamos dez grids de resistência, os quais intitulamos de grids de paisagem, para identificarmos se a paisagem estudada confere resistência elevada ao fluxo gênico entre as populações de *I. vera*. Seguimos a ordem de resistência entre os tipos de habitat obtida a partir da primeira categoria para criarmos grids variando entre 10 e 100% de resistência. Consideramos grids de 10% de resistência aqueles em que foram atribuídos valores de resistência variando no máximo em 10% entre os habitats de menor e maior

resistência. O mesmo critério foi utilizado para os outros grids até atingirmos uma variação de 100% entre os habitats de menor e maior resistência (Tabela 1).

Medimos a distância efetiva (IDE) entre as populações para todos os grids utilizando a função ‘*least cost paths*’ do Arctoolbox *Landscape genetics* (Etherington 2011). Esta análise gera uma matriz com valores de distância entre populações, a qual é calculada a partir do caminho que passa pelo menor número de células com valores máximos de resistência em um determinado grid.

A resistência da paisagem (IDR) foi medida para todos os grids no programa Circuitscape 3.5.7 (McRae e Shah 2008). Consideramos populações como pontos focais, os quais foram compostos por uma célula do grid, e ligação de um determinado ponto focal às suas oito células adjacentes, pelos valores médios de resistência, como parâmetros das análises. O cálculo de resistência assume a existência de um ponto focal como doador de corrente e outro ponto focal como receptor de corrente. O Circuitscape considera cada célula como um resistor elétrico o qual regula o fluxo de corrente dependendo dos valores de resistência de cada célula (McRae e Beier 2007; McRae et al 2008). Análises de resistência são biologicamente importantes para estudos de fluxo gênico (McRae et al 2008). As resistências são altamente correlacionadas a rotas aleatórias em uma determinada paisagem e indicam como tipos de habitats variam no que diz respeito à sua respectiva permeabilidade à dispersão.

Utilizamos um teste de Mantel para comparar as matrizes de estruturação genética baseada em F_{ST} pareado com a matriz de distância euclidiana entre as populações (IDG) e testar se aumento na distância geográfica favorece a estruturação genética entre populações de *I. vera*. Para testarmos nossa primeira hipótese, comparamos as matrizes de distância efetiva (IDE) e de resistência dos tipos de habitat (IDR) dos seis grids de habitat (primeira categoria) com a matriz de estruturação genética baseada em F_{ST} pareado, utilizando testes de Mantel.

Para testarmos nossa segunda hipótese de que o nível de resistência ao fluxo gênico da paisagem estudada é elevado, comparamos as matrizes de IDE e IDR de todos os grids de paisagem (segunda categoria) com a matriz de estruturação genética baseada em F_{ST} pareado utilizando testes de Mantel. Utilizamos ainda testes Parciais de Mantel nos casos em que mais de uma matriz de IDE ou IDR se relacionaram com a estruturação de genética das populações de acordo com Legendre e Legendre (1998). Testes parciais de Mantel nos auxiliaram a escolher quais modelos são mais intensamente relacionados à estruturação genética nas populações de *I. vera*. Acessamos o nível de significância por meio de 10000 randomizações entre os valores das matrizes para todas as comparações. Os intervalos de confiança a 95% para os valores de r foram estimados por meio de 10000 reamostragens de bootstrap. Utilizamos o programa Isolation by Distance Web Service 3.23 (IDGWS; Jensen et al 2005; disponível em <http://IDGws.sdsu.edu/>) para todas as comparações.

Resultados

Diversidade genética e fluxo gênico em Inga vera

Nenhuma evidência de alelos nulos e nem de desequilíbrio de ligação foi encontrada nas populações de plântulas *I. vera* e de locos amostrados. Todas as populações estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg para pelo menos dois locos.

Identificamos 64 alelos considerando todas as plântulas das dez populações amostradas. O número de alelos por loco foi aproximadamente 10, variando entre 6,75 e 13. A riqueza alélica média por população foi aproximadamente nove e variou entre 6,2 e 11,57. Encontramos aumento da riqueza alélica nas plântulas de plantios monoespecíficos de 7,18, para 10,31 nas plântulas de áreas naturais ($P = 0,008$; Tabela 3). A heterozigosidade observada nas plântulas amostradas foi elevada ($H_O = 0,603$). Encontramos ainda valores elevados de diversidade gênica para todas as populações ($H_S = 0,772$), a qual variou entre

0,665 e 0,874 (Tabela 2). Registramos aumento na diversidade gênica das plântulas de plantios monoespecíficos de 0,697 para 0,844 nas plântulas de áreas naturais ($P = 0,009$).

Registramos um valor moderado de coeficiente de endogamia ($F_{IS} = 0,223$), variando entre 0,083 e 0,325. O coeficiente de endogamia para plântulas de plantios monoespecíficos foi 0,269 e para plântulas de áreas naturais foi 0,179, não havendo diferença estatística entre estes valores ($P = 0,121$; Tabela 3). Encontramos baixo nível de estruturação genética entre as plântulas de *I. vera* ($F_{ST} = 0,069$; Tabela 2). O coeficiente de estruturação genética para plântulas de plantios monoespecíficos foi 0,07 e para plântulas de áreas naturais foi 0,036 ($P = 0,069$). Os valores de F_{ST} pareado variaram de 0,02 para 0,1226 (Tabela 4). Registramos que todos os valores de F_{ST} pareado foram estatisticamente diferentes uns em relação aos outros ($P < 0,05$). Populações mais distantes não produziram plântulas com maior estruturação genética de acordo com nossa análise de IDG ($r = 0,114$, $P = 0,24$).

Relação entre grids de habitat e estruturação genética em Inga vera

Alterações nos valores de resistência atribuídos aos diferentes tipos de habitat foram positivamente correlacionados com a estruturação genética das plântulas de *I. vera* para os grids de IDE 1, 2, 5 e 6 (Figura 2A). Os grids 1 e 2 de IDE representaram cenários nos quais os plantios de *I. vera* apresentavam baixa resistência em relação aos plantios de cana de açúcar e áreas urbanas. Os grids 5 e 6 representaram cenários nos quais áreas urbanas apresentaram menor resistência que os plantios de *Inga* e de cana de açúcar. Identificamos que o grid de habitat 1 é mais relacionado ao padrão de estruturação genética de plântulas de *I. vera* quando usamos os grids 2 ($r = 0,35$, $P = 0,009$), 5 ($r = 0,16$, $P = 0,018$) e 6 ($r = 0,23$, $P = 0,047$) como matrizes indicadoras nos testes parciais de Mantel entre os grids.

Todas as matrizes de IDR obtidas a partir dos grids de habitat foram positivamente correlacionadas com a estruturação genética das plântulas de *I. vera* (Figura 2B). A matriz do

grid de habitat 1 de IDR foi a mais positivamente relacionada ao padrão de estruturação genética das plântulas de *I. vera* quando usamos as matrizes dos grids 2 ($r = 0,35$, $P = 0,02$), 3 ($r = 0,13$, $P = 0,04$), 4 ($r = 0,33$, $P = 0,04$), 5 ($r = 0,36$, $P = 0,01$), 6 ($r = 0,37$, $P = 0,01$) como matrizes indicadoras nos testes parciais de Mantel. Encontramos ainda que a estruturação genética de plântulas de *I. vera* é melhor relacionada ao grid de habitat 1 de IDR em relação ao grid de habitat de IDE ($r = 0,36$, $P = 0,02$).

Relação entre a paisagem e fluxo gênico em Inga vera

Todos os grids de paisagem representaram plantios de *I. vera* como áreas de resistência menor que plantios de cana de açúcar e áreas urbanas, conforme os resultados do tópico anterior. Encontramos relação positiva entre alterações nos valores de resistência dos grids de distância efetiva (IDE) e estruturação genética de plântulas de *I. vera* nos grids de paisagem 8, 9 e 10 (Figura 2C). A variação entre os habitats de menor e maior resistência foi 80, 90 e 100%, respectivamente, para os grids 8, 9 e 10. O grid de IDE da paisagem 10 foi mais intensamente relacionado à estruturação genética de plântulas de *I. vera* quando comparado aos grids 8 ($r = 0,38$, $P = 0,006$) e 9 ($r = 0,38$, $P = 0,004$), representando portanto o caminho de menor custo ao fluxo gênico interpopulacional na paisagem estudada (Figura 3A).

Registrarmos relação positiva entre as matrizes de resistência (IDR) obtidas a partir dos grids de paisagem e estruturação genética de plântulas de *I. vera* em nove dos dez grids testados (Figura 2D). A matriz do grid de paisagem 10 de IDR apresentou maior relação com a estruturação genética de plântulas de *I. vera* quando comparada as matrizes dos grids 2 ($r = 0,43$, $P = 0,006$), 3 ($r = 0,42$, $P = 0,0093$), 4 ($r = 0,41$, $P = 0,012$), 5 ($r = 0,4$, $P = 0,013$), 6 ($r = 0,38$, $P = 0,016$), 7 ($r = 0,38$, $P = 0,02$), 8 ($r = 0,37$, $P = 0,02$) e 9 ($r = 0,35$, $P = 0,02$), representando o cenário de menor resistência ao fluxo gênico interpopulacional na paisagem estudada (Figura 3B). Encontramos que a estruturação genética de plântulas de *I. vera* é

melhor relacionada ao grid de paisagem 10 de IDR em relação ao grid de paisagem 10 de IDE ($r = 0,36$, $P = 0,01$).

Discussão

Diversidade genética e fluxo gênico em Inga vera

Encontramos grande quantidade de alelos, elevada diversidade gênica e baixos valores de coeficiente de endogamia (F_{IS}) e de estruturação genética (F_{ST}) nas plântulas de *I. vera*, indicando a provável existência de fluxo gênico entre as populações estudadas. Valores elevados de riqueza alélica e diversidade genética, além de baixos índices de endogamia e estruturação genética, também foram encontrados em *Inga edulis* na floresta Amazônica Peruana (Hollingsworth et al 2005; Dawson et al 2007) e em *I. vera* no trecho nordestino da floresta Atlântica brasileira.

Elevada diversidade e baixos níveis de estruturação genética devem estar relacionados ao sistema de polinização de *I. vera*. Espécies de *Inga* ocorrentes na área de estudo apresentam síndrome de polinização esfingófila ou quiropterófila, sendo polinizadas efetivamente por esfingídeos e morcegos, além de beija flores, com menor eficiência (Cruz-Neto et al no prelo). Esfingídeos e morcegos apresentam extensas áreas de forrageio podendo transportar grãos de pólen por longas distâncias (Amorim et al 2012; Elmore et al 2004), além de promoverem a polinização cruzada entre indivíduos e populações diferentes, e exercerem forte influência positiva na formação de frutos e sementes de espécies autoincompatíveis, como é o caso das espécies de *Inga* (Koptur 1984; Amorim et al 2012; Barros et al 2012; Cruz-Neto et al no prelo). O fluxo polínico entre indivíduos e populações distintas, devido ao comportamento dos polinizadores, explica os elevados valores de diversidade genética e baixos níveis de estruturação encontrados nas plântulas de *I. vera*.

Identificamos redução na diversidade genética das plântulas produzidas por populações plantadas em relação às plântulas de áreas de fragmento de floresta. Redução na diversidade genética em plântulas produzidas por populações plantadas de *I. vera* já foi encontrada na floresta Atlântica nordestina. Reforçamos, portanto, o padrão já encontrado, visto que utilizamos um tamanho amostral cinco vezes maior que no estudo anterior. O plantio de árvores a partir de poucos indivíduos doadores de sementes geralmente resulta na redução da riqueza alélica das populações plantadas (*e.g.* Hollingsworth et al 2005; Lengkeek et al 2006; Dawson et al 2007; Cruz-Neto dados não publicados), limitando a diversidade genética a ser transferida entre gerações diferentes (Lengkeek et al 2006; Navascués e Emerson 2007), fato que deve estar ocorrendo em *I. vera* na paisagem estudada. Além disso, modificações nas características do habitat e das populações devem interferir no fluxo gênico entre indivíduos e populações diferentes (Llorens et al 2012; Steinitz et al 2012), como será discutido adiante.

Papel dos plantios de Inga vera como facilitadores do fluxo gênico

As matrizes de isolamento pela resistência (IDR) apresentaram relação mais intensa com a estruturação genética de plântulas de *I. vera* que as matrizes de isolamento pela distância efetiva (IDE). Modelos de IDR também foram mais relacionados às estimativas de fluxo gênico em relação aos modelos de IDE em *Swietenia macrophylla*, outra espécie arbórea também polinizada por insetos na América Central (McRae e Beier 2007). Matrizes de IDE e IDR dos grids de habitat com menores valores de resistência nos plantios monoespecíficos de *Inga vera*, em relação aos outros tipos de habitat na paisagem, foram mais relacionadas à estruturação genética das populações de plântulas estudadas.

Menores valores de resistência indicam que plantios monoespecíficos de *Inga* podem atuar como “*stepping stones*” entre áreas de floresta natural, corroborando nossa primeira

hipótese. Ocorrência de fluxo gênico de fragmentos de floresta para plantios monoespecíficos já foi registrado para *I. vera* na floresta Atlântica, e pode apresentar relação direta com rotas de forrageio dos seus polinizadores. O comportamento dos visitantes florais depende essencialmente da presença e distribuição das flores e oferta dos recursos florais no tempo. Aumentos na disponibilidade de recursos florais, como o néctar, favorecem a atração dos polinizadores (Hodges 1995; Klinkhamer et al 2001) e interferem positivamente no fluxo polínico entre flores e indivíduos (Fisogni et al 2011). Além disso, populações ou árvores mais isoladas apresentam menor fluxo gênico entre si (Moraes e Sebben 2011; Steinitz et al 2012), e aumentos na densidade de indivíduos, contribuem para a diminuição na distância de dispersão dos grãos de pólen (Llorens et al 2012).

Flores de *I. vera* oferecem néctar em grandes quantidades, cerca de 55µl por flor ao final da antese, como principal recompensa aos polinizadores (Cruz-Neto et al no prelo). A floração de *I. vera* ocorre com elevada sincronia, na qual a maioria dos indivíduos em uma população exibe grande quantidade de flores em períodos sobrepostos (Cruz-Neto et al 2011). Além disso, os indivíduos de *Inga* em plantios monoespecíficos são plantados próximos uns dos outros, cerca de 2,5 m de distância entre cada árvore, o que confere elevada densidade de indivíduos às populações plantadas. Acreditamos que a oferta adensada de néctar e flores nas populações plantadas, atue na atração dos visitantes florais de *I. vera* vindos das áreas naturais, o que pode ajudar a explicar os baixos valores de resistência atribuídos aos plantios monoespecíficos de *Inga* e baixos níveis de estruturação genética entre populações.

Permeabilidade da paisagem ao fluxo gênico de Inga vera

Matrizes dos grids de paisagem com grande variação entre os habitats de maior e menor resistência foram intensamente relacionadas à estruturação genética de *I. vera* tanto para IDE quanto para IDR. Com este resultado, demonstramos que a paisagem estudada composta

principalmente por fragmentos de floresta Atlântica, plantios de *Inga* e cana de açúcar, além de áreas urbanas, apresenta tipos de habitat muito distintos no que diz respeito à permeabilidade ao fluxo gênico de *I. vera*, corroborando nossa segunda hipótese. Plantios de cana de açúcar e áreas urbanas são mais resistentes ao fluxo gênico que plantios monoespecíficos de *Inga* e fragmentos de floresta Atlântica, representando implicações distintas para a conectividade de populações de árvores localizadas em fragmentos diferentes.

A existência de fluxo polínico interpopulacional, mesmo em uma paisagem intensamente fragmentada como no presente estudo, depende da interação entre os polinizadores e as características do habitat (*e.g.* Klinkhamer et al 2001; Llorens et al 2012). Algumas espécies de polinizadores não sobrevoam por áreas abertas como os plantios de cana de açúcar (Milet e Schlindwein 2005), e não contribuem para o fluxo polínico entre fragmentos diferentes. Perda e fragmentação do habitat podem também alterar o tamanho populacional e distribuição de espécies de plantas (Girão et al 2007; Lopes et al 2009) e animais (*e.g.* Lopes et al 2006), comprometendo interações ecológicas, como a polinização, e o fluxo gênico entre populações. Espécies de esfingídeos na área do presente estudo, por exemplo, experimentam redução abrupta, ou até mesmo extinção local de populações em fragmentos pequenos e isolados (Lopes et al 2006), podendo não contribuir efetivamente para o fluxo polínico em algumas espécies de plantas, como é o caso de *Inga*.

Mesmo com o declínio de populações de esfingídeos, encontramos baixos níveis de estruturação genética entre as plântulas de *I. vera* em plantios monoespecíficos de *Inga* e fragmentos de floresta Atlântica. Outros polinizadores efetivos de *I. vera*, como os morcegos, podem contribuir para o fluxo polínico entre indivíduos de *Inga* localizados em fragmentos pequenos ou plantios monoespecíficos, onde esfingídeos apresentam populações reduzidas ou ausentes. Além disso, os baixos valores de F_{ST} nas gerações parentais pode influenciar a diversidade genética nas plântulas (Navascués e Emerson 2007; Cruz-Neto dados não

publicados) e também explicar os níveis de estruturação encontrados neste trabalho.

Sugerimos que estudos futuros abordem a direção e intensidade do fluxo polínico entre fragmentos e plantios monoespecíficos de *Inga* para aferir precisamente o quanto da estruturação genética nas plântulas de *I. vera* pode ser explicada pelas características da paisagem e pela diversidade genética presente nas gerações parentais.

A floresta Atlântica encontra-se extremamente fragmentada, possui elevados valores de biodiversidade e taxas de endemismo (Myers et al 2000). Ações efetivas mitigadoras dos efeitos negativos da degradação ambiental, por ação antrópica, são urgentes e necessárias para a manutenção da biodiversidade remanescente na floresta Atlântica. Este foi o primeiro trabalho a analisar as relações entre tipos de habitat em um trecho intensamente fragmentado da floresta Atlântica nordestina, e fluxo gênico em uma espécie arbórea nativa. Ressaltamos que plantios monoespecíficos de *Inga* podem atuar como “*stepping stones*”, exercendo forte influência positiva sobre o fluxo gênico interpopulacional de árvores em paisagem com manchas de habitat que oferecem elevada resistência ao fluxo gênico, como plantios de cana de açúcar e áreas urbanizadas.

Agradecimentos

Agradecemos L. G. Dantas e A. P. Harand (Laboratório de Citogenética Vegetal – UFPE) por todo auxílio e suporte durante o trabalho de laboratório; L. A. Bezerra e C. Bakker por autorizar a execução do trabalho de campo nas terras da Usina Serra Grande; J. Silva, M. Woolley e R. Fernandes (UFPE) pela ajuda nas extrações de DNA. Ao CNPq e FACEPE pela bolsa de doutorado concedida a O.C.N., à , CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche (Proc. nº 5998/11-5 para O.C.N.) e ao CNPq pela Bolsa de Pesquisa e concessão de financiamentos à projeto (Nº 567739/2008-2) coordenado por A. V. L. Aos auxílios financeiros adicionais pelo Projeto Serra Grande e CEPAN, por projetos coordenados por M. Tabarelli (UFPE).

Referências

- Aguilar R, Quesada M, Ashworth L, Herrerias-Diego Y, Lobo J (2008) Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology* 17: 5177-5188.
- Alves-Costa CP, Lôbo D, Leão T, Brancalion PHS, Nave AG, Gandolfi S, Santos AMM, Rodrigues R, Tabarelli M (2008) Implementando reflorestamentos com alta diversidade na Zona da Mata Nordeste: Guia Prático. J. Luiz Vasconcelos, Recife.
- Amorim FW, Galetto L, Sazima M (2012) Behind the pollination syndrome: Nectar ecology and the role of diurnal and nocturnal pollinators in the reproductive success of *Inga sessilis* (Fabaceae). *Plant Biology* no prelo.
- Amos W, Hoffman JI, Frodsham A, Zhang L, Best S, Hill VS (2007) Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes* 7: 10-14.
- Barros ECO, Webber AC, Machado IC (2012) Limitação de polinizadores e mecanismo de autoincompatibilidade de ação tardia como causas da baixa formação de frutos em duas espécies simpátricas de *Inga* Mill. (Fabaceae–Mimosoideae) na Amazônia Central. *Rodriguesia* no prelo.
- Bawa KS (1990) Plant-pollinators interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 21: 399-422.
- Coimbra-Filho F, Câmara IG (1996) Os Limites Originais do Bioma Mata Atlântica na Região Nordeste do Brasil. Fundação Brasileira para Conservação da Natureza – FBCN, Rio de Janeiro.
- Collins M (1990) The last rain forests. Mitchell Beazley Publ./IUCN, London, 200 pp.
- Cruz-Neto O, Machado IC, Duarte JA, Lopes AV (2011) Synchronous phenology of hawkmoths (Sphingidae) and *Inga* species (Fabaceae–Mimosoideae): implications for the

- restoration of the Atlantic forest of northeastern Brazil. *Biodiversity e Conservation* 20: 751-765.
- Dawson IK, Hollingsworth PM, Doyle JJ, Kresovich S, Weber JC, Sotelo-Montes C, Pennington TD, Pennington TR (2007) Origins and genetic conservation of tropical trees in agroforestry systems: a case study from Peruvian Amazon. *Conservation Genetics* 9: 361-372.
- Dayanandan S, Bawa KS, Kesseli R (1997) Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). *American Journal of Botany* 84: 1658–1663.
- Dick CW, Hardy OJ, Jones FA, Petit J (2008) Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. *Tropical Plant Biology* 1: 20-33.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 832–839.
- Elmore LW, Miller DA, Vilella FJ (2004) Foraging area size and habitat use by red bats (*Lausirus borealis*) in an intensively managed pine landscape in Mississippi. *The American Midland Naturalist* 153: 405-417.
- Etherington TR (2011) Phyton based GIS tools for landscape genetics: visualizing genetic relatedness and measuring landscape connectivity. *Methods in Ecology and Evolution* 2: 52-55.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Protocolos: Extração de DNA genômico total de plantas. In: Ferreira ME e Grattapaglia D (eds) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*, 2nd edn. Embrapa Cenargen, Brasília, pp 121-138.
- Fisogni A, Cristofolini G, Rossi M, Galloni M (2011) Pollinator directionality as a response to nectar gradient: promoting outcrossing while avoiding geitonogamy. *Plant Biology* 13: 848-856.

- Gaiotto FA, Grattapaglia D, Vencovsky R (2003) Genetic structure, mating system and long-distance gene flow in Heart Palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of Heredity* 94: 399-406.
- Girão LC, Lopes AV, Tabarelli M, Bruna EM (2007) Changes in tree reproductive traits reduce functional diversity in a fragmented Atlantic forest landscape. *PLoS One* 2: e908.
- Goudet J (2001) FSTAT: a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices, Version 2.9.3.2. Available from: <http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html> (accessed February 2012).
- Hollingsworth PM, Dawson IK, Goodall-Copestake P, Richardson JE, Weber JC, Sotelo-Montes C, Pennington RT (2005) Do farmers reduce genetic diversity when they domesticate tropical trees? A case study from Amazonia. *Molecular Ecology* 14: 497-501.
- Hodges SA (1995) The influence of nectar production on hawkmoth behaviour, self pollination and seed production in *Mirabilis multiflora* (Nyctaginaceae). *American Journal of Botany* 82: 197-204.
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.23 <http://IDGws.sdsu.edu/>
- Klinkhamer PGL, De Jong T, Linnebank LA (2001) Small-scale patterns determine ecological relationships: an experimental example using nectar production rates. *Ecology Letters* 4: 559-567.
- Koptur S (1984) Outcrossing and pollinator limitation of fruit set: Breeding systems of neotropical *Inga* trees (Fabaceae: Mimosoideae). *Evolution* 38: 1130-1143.
- Köppen W (1931) *Grundriss der Klimakunde*. Walter de Gruyter, Berlin, GER.
- Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical Ecology* 2nd edn. Elsevier Science, Canada, pp 870.

- Lengkeek AG, Mwangi AM, Agufa CAC, Ahenda JO, Dawson IK (2006) Comparing genetic diversity in agroforestry systems with natural forest: a case study of the important timber tree *Vitex fischeri* in central Kenya. *Agroforestry Systems* 67: 293-300.
- Llorens TM, Byrne M, Yahtes CJ, Nistelberger HM, Coates DJ (2012) Evaluating the influence of different aspect of habitat fragmentation on mating patterns and pollen dispersal in the bird-pollinated *Banksia sphaerocarpa* var. *caesia*. *Molecular Ecology* 21: 314-328.
- Lopes AV, Medeiros CP, Aguiar-Neto AV, Machado IC (2006) Esfingídeos. In: Tabarelli, M, Porto KC (orgs). *Diversidade Biológica no Centro de Endemismo Pernambucano: Sítios Prioritários para a Conservação*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp 228-235.
- Lopes AV, Girão LC, Santos BA, Peres CA, Tabarelli M (2009) Long-term erosion of tree reproductive trait diversity in edge-dominated Atlantic forest fragments. *Biological Conservation* 142: 1154–1165.
- McRae BH, Beier P (2007) Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. *PNAS* 104: 19885-19890.
- McRae BH, Shah VB (2008) Circuitscape 3.5.7. The University of California, Santa Barbara. Disponível em: <http://www.circuitscape.org>.
- McRae BH, Dickson BG, Keitt TH, Shah VB (2008) Using circuit theory model connectivity in ecology, evolution and conservation. *Ecology* 89: 2712-2724.
- Millet-Pinheiro P, Schlindwein C (2005) Do euglossine males (Apidae, Euglossini) leave tropical rainforest to collect fragrances in sugarcane monocultures? *Revista Brasileira de Zoologia* 22: 853-858.
- Moraes MLT, Sebbenn AM (2011) Pollen dispersal between isolated trees in the brazilian savannah: A case study of the Neotropical tree *Hymenaea stigonocarpa*. *Boitropica* 42: 192-199.

- Morellato LPC, Haddad CFB (2000) The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* 32: 786-792.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Navascués M, Emerson BC (2007) Natural recovery of genetic conservation by geneflow in reforested areas of the endemic Canary Island pine, *Pinus canariensis*. *Forest Ecology and Management* 244: 122-128.
- Pennington TD (1997) The genus *Inga*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Prance GT (1982) Forest refuges: evidence from woody angiosperms. In: Prance GT (ed) *Biological Diversification in the Tropics*. Columbia University Press, New York, pp 137–158.
- Rice WR (1989) Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223-225.
- Rodrigues RR, Lima RAF, Gandolfi S, Nave AG (2009) On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Conservation* 142: 1241-1251.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-Statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228.
- Steinitz O, Robledo-Arnuncio JJ, Nathan R (2012) Effects of Forest plantations on the genetic composition of conspecific native Aleppo pine populations. *Molecular Ecology* 21: 300-313.
- Van-Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima JCA (1991) Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro.

Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da América do Sul com destaque para o Brasil e a região nordeste (A); Localização da área de estudo na região nordeste (B); Mapa da área de estudo destacando a presença de fragmentos de floresta Atlântica, plantios de *Inga*, plantios de cana de açúcar e áreas urbanas. Pontos brancos dentro dos fragmentos e dos plantios de *Inga* representam a localização das populações amostradas (C).

Figura 2. Relação entre os grids de habitat, de paisagem e a estruturação genética (F_{ST}) de plântulas de *Inga vera*. Testes de Mantel (r) considerando a relação entre isolamento, pela distância efetiva (A e C) e por resistência (B e D), e F_{ST} pareado em grids de habitat e de paisagem. (Barras representam intervalos de confiança 95% após 10000 randomizações de Bootstrap; $*P < 0,05$; $**P < 0,005$).

Figura 3. Mapas de isolamento pela distância efetiva (IDE) e resistência (IDR) em *Inga vera*. Mapas de distância efetiva (“Least cost pathway”; A) e da resistência da paisagem (B) em grids de paisagem de 100% de variação na resistência entre as manchas de habitats mais e menos resistentes ao fluxo gênico, respectivamente. Consideramos resistência de 0 - 25% nos fragmentos de floresta Atlântica, 26 - 50% nos plantios monoespecíficos de *I. vera*, 51 - 75% nos plantios de cana de açúcar e 76 - 100% nas áreas urbanizadas.

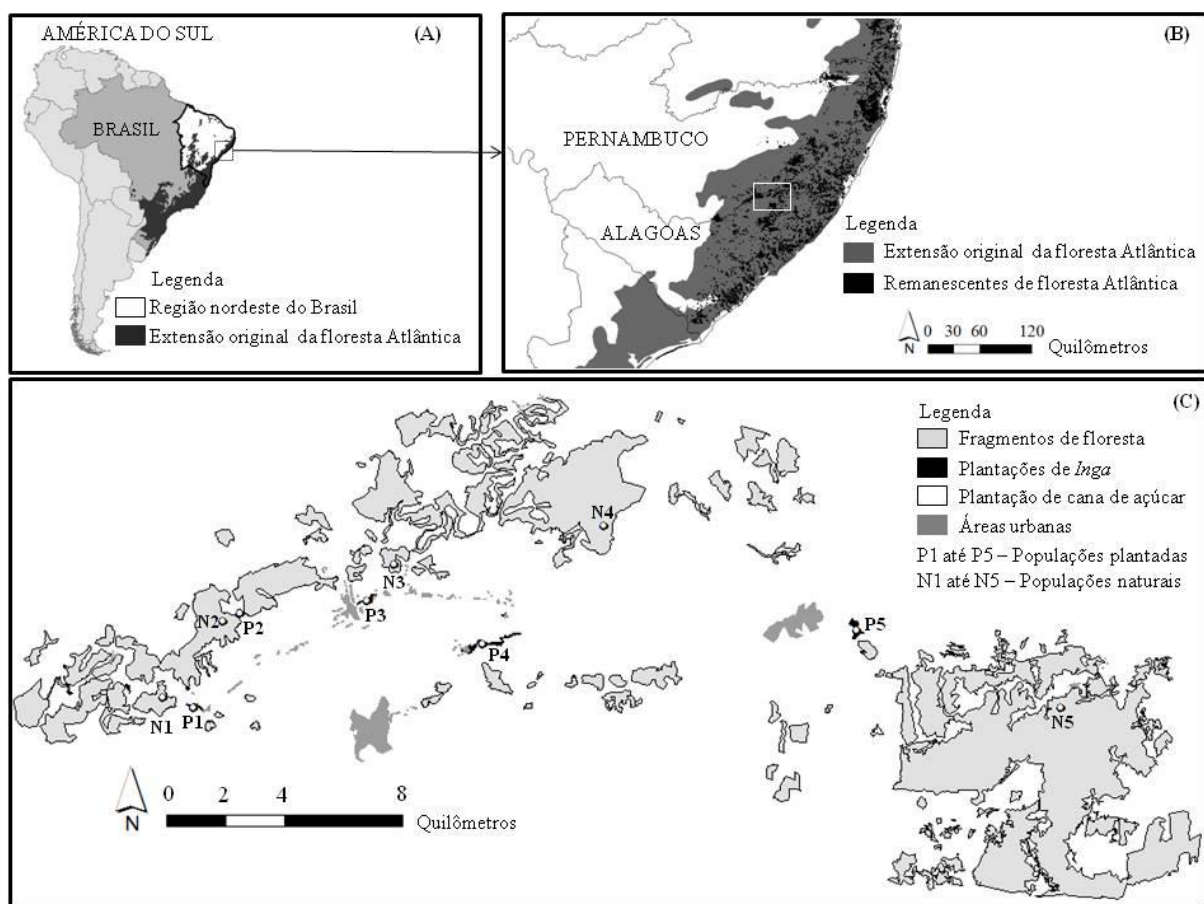


Figura 1

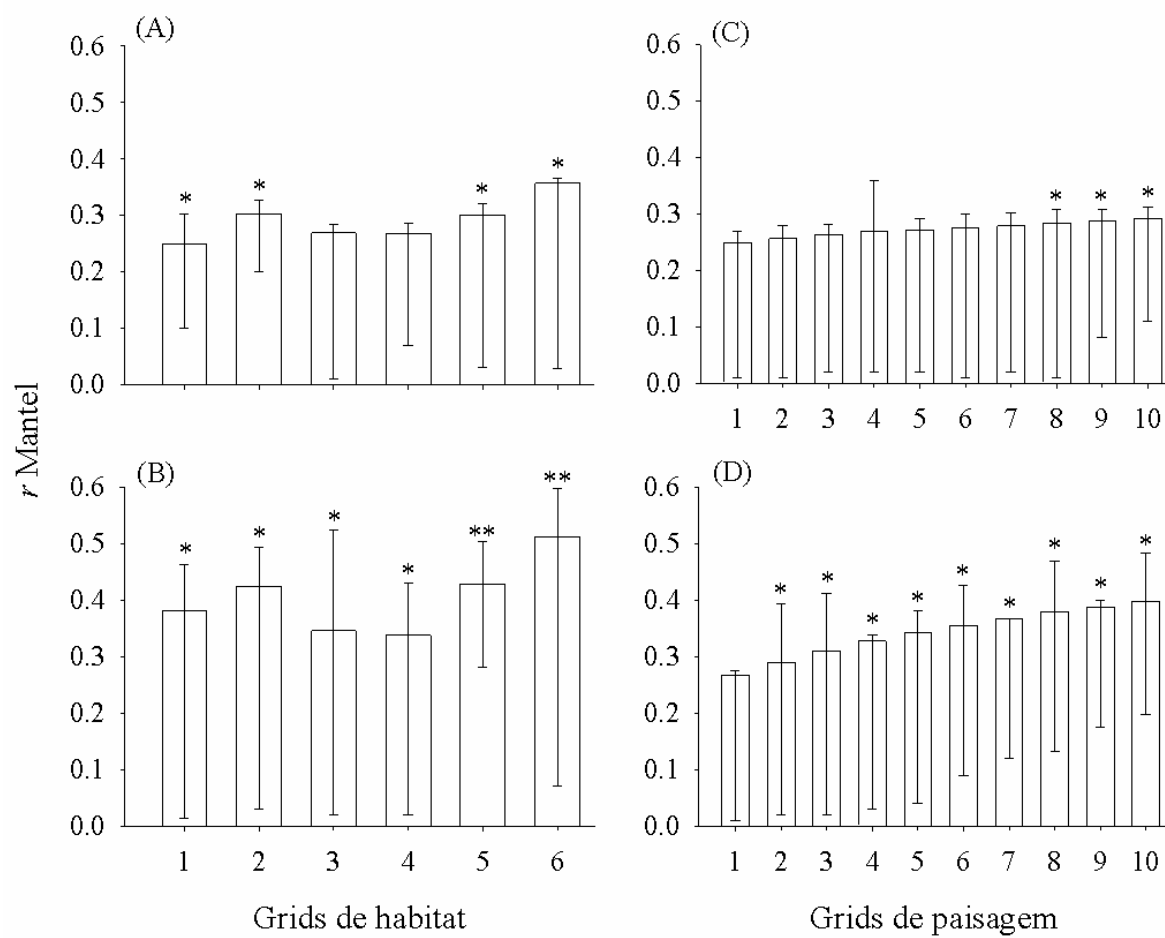


Figura 2

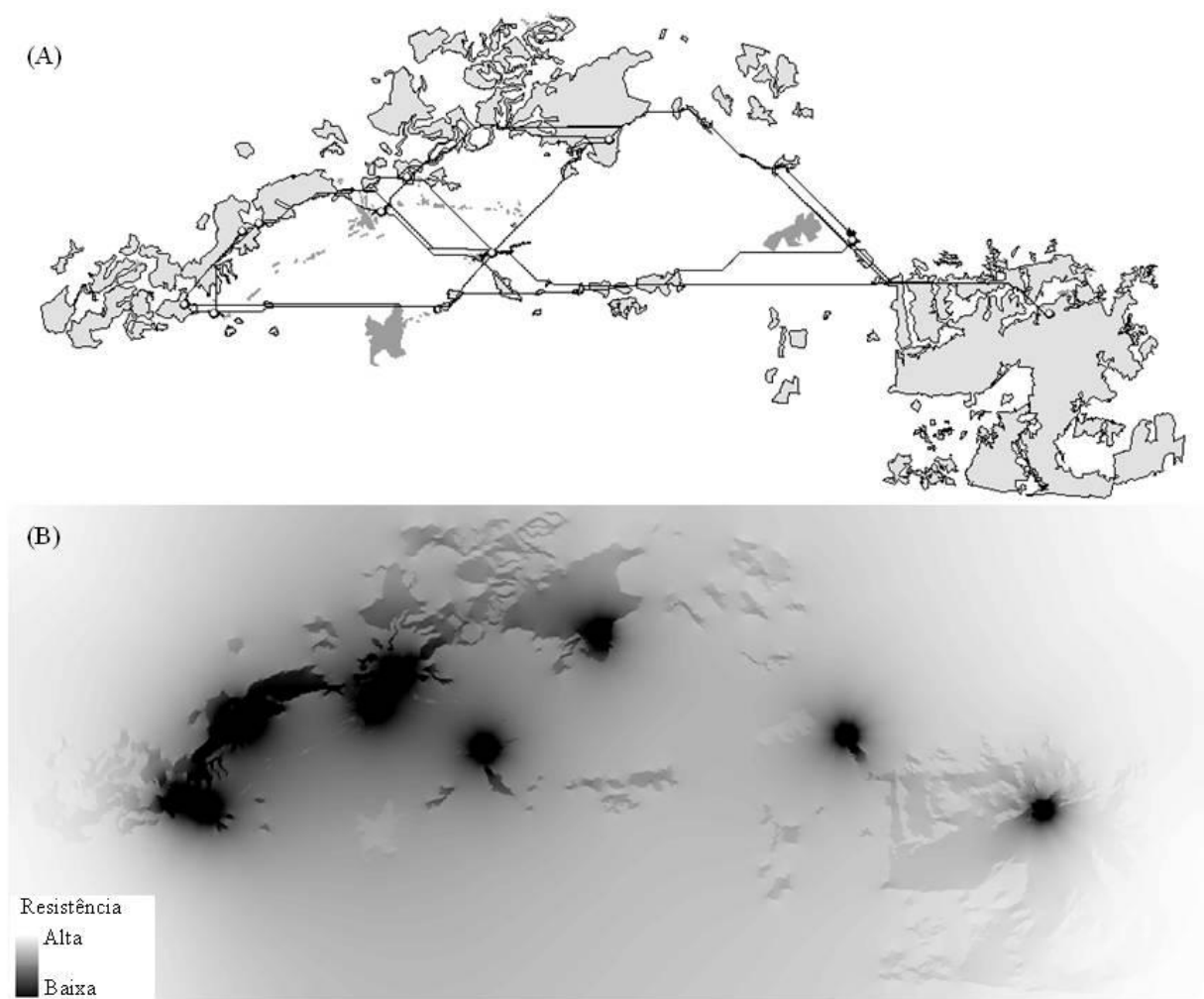


Figura 3

Tabela 1. Grids utilizados para identificação da resistência dos tipos de habitat e da paisagem ao fluxo gênico interpopulacional de *Inga vera*. Grids de habitat indicam alterações nos valores de resistência entre plantios de *Inga vera* (I), de cana de açúcar (C) e de áreas urbanas (A). Grids de paisagem indicam variações de 10 a 100% entre os habitats de menor e maior resistência, respectivamente.

Grids (resistência)	Valores de resistência atribuídos aos tipos de habitat			
	Fragmentos de floresta (F)	Plantios		
		<i>Inga vera</i> (I)	Cana de açúcar (C)	Áreas urbanas (U)
Habitat				
1 (I → C → U)	10,0	12,5	15,6	20,0
2 (I → U → C)	10,0	12,5	20,0	15,6
3 (C → U → I)	10,0	20,0	12,5	15,6
4 (C → I → U)	10,0	15,6	12,5	20,0
5 (U → I → C)	10,0	15,6	20,0	12,5
6 (U → C → I)	10,0	20,0	15,6	12,5
Paisagem				
1 (0-10%)	10,0	10,3	10,7	11,0
2 (11-20%)	10,0	10,7	11,3	12,0
3 (21-30%)	10,0	11,0	12,0	13,0
4 (31-40%)	10,0	11,4	12,7	14,0
5 (41-50%)	10,0	11,7	13,4	15,0
6 (51-60%)	10,0	12,0	14,0	16,0
7 (61-70%)	10,0	12,3	14,6	17,0
8 (71-80%)	10,0	12,7	14,6	18,0
9 (81-90%)	10,0	12,7	15,3	19,0
10 (91-100%)	10,0	13,0	16,0	20,0

Tabela 2. Diversidade genética de sementes por população de *Inga vera*. Número total de alelos por *locus* (A), riqueza alélica rarefacionada para 38 indivíduos (ver texto), diversidade gênica (H_S), coeficientes de endogamia (F_{IS}) e de estruturação genética global entre todas as populações (F_{ST}) em plântulas de *I. vera* originadas de plantios monoespecíficos e de áreas naturais.

População	<i>A</i>	<i>A</i> ₃₈	<i>H</i> _S	<i>F</i> _{IS}	<i>F</i> _{ST} global
Plantios de <i>Inga</i>					
P1	9,25	8,195	0,677	0,241	0,069
P2	8,5	7,388	0,74	0,317	
P3	6,75	6,203	0,665	0,309	
P4	8,5	7,425	0,699	0,207	
P5	7,25	6,578	0,721	0,287	
Áreas naturais					
N1	11,5	10,063	0,825	0,142	
N2	9,75	9,215	0,839	0,182	
N3	11	9,775	0,809	0,083	
N4	11,5	10,460	0,874	0,325	
N5	13	11,575	0,874	0,132	
Média	9,7	8,688	0,772	0,223	

*Todos os valores de F_{IS} foram diferentes de 0 ao nível de significância $P < 0,05$. Não houve diferença estatística entre os valores de F_{IS} ($P = 0,13$).

Tabela 3. Variabilidade genética de plântulas de *Inga vera* entre plantios monoespecíficos de *Inga* e áreas naturais de floresta. Os atributos da variabilidade genética representam a riqueza alélica rarefacionada para 38 indivíduos (A_{38}), heterozigosidade observada (H_O), diversidade gênica (H_S), coeficientes de endogamia (F_{IS}) e de estruturação genética (F_{ST}). (Níveis de significância foram obtidos a partir de 10000 permutações).

	Plantios de <i>Inga</i>	Áreas naturais	<i>P</i>
A_{38}	7,186	10,131	0,008
H_O	0,509	0,693	0,009
H_S	0,697	0,844	0,009
F_{IS}	0,269	0,179	0,121
F_{ST}	0,07	0,036	0,069

8. CONCLUSÕES

1. Populações plantadas de *Inga vera* apresentaram menor quantidade de néctar consumido e menor sucesso reprodutivo em relação às populações naturais, provavelmente, devido à reduções na taxa de visitação às flores nos plantios monoespecíficos.
2. A prática de plantios monoespecíficos resulta em menor consumo de néctar e sucesso reprodutivo geral reduzido nas populações plantadas de *Inga vera* em relação às naturais.
3. Demonstramos com este estudo a existência de elevada taxa de transferência de *primers*, 80% considerando apenas os locos polimórficos, entre espécies de *Inga*. Nosso estudo reforça o padrão anteriormente encontrado e mostra mais um caso em que a transferência de *primers* entre espécies aparentadas foi bem sucedida.
4. Plantios monoespecíficos de *Inga vera* apresentam baixa diversidade genética, uma vez que encontramos redução na riqueza alélica e na heterozigosidade esperada nos adultos das populações plantadas em relação às populações naturais.
5. Populações naturais de adultos de *Inga vera* contribuem para a manutenção da diversidade genética das plântulas produzidas em plantios monoespecíficos, considerando que houve aumento na riqueza alélica e na heterozigosidade esperada das plântulas em relação aos adultos nos plantios monoespecíficos. Além disso, todos os alelos encontrados nas plântulas de plantios estavam presentes nos adultos de populações naturais, reforçando a ocorrência de fluxo entre populações naturais e plantadas.
6. Populações plantadas de *Inga vera*, mesmo que de maneira monoespecífica, podem favorecer o fluxo gênico interpopulacional na floresta Atlântica, fato reforçado pela baixa resistência dos plantios monoespecíficos em relação aos outros tipos de habitat, como plantios de cana de açúcar e áreas urbanas.
7. Paisagens intensamente fragmentadas e sob efeitos de ações antrópicas, como a floresta Atlântica nordestina, apresentam manchas de habitat muito distintas entre si no que diz respeito à resistência ao fluxo gênico entre populações.

8. RESUMO

A troca de material genético entre populações e indivíduos é responsável pelo sucesso reprodutivo e manutenção da diversidade genética nas espécies de plantas em diferentes escalas geográficas. Perda e fragmentação das florestas, além de práticas de reflorestamento, originam paisagens com habitat distintos, os quais facilitam ou impedem o fluxo gênico entre indivíduos e populações. O objetivo dos artigos propostos nesta tese foi entender o efeito dos plantios monoespecíficos de *Inga vera* subesp. *affinis* sobre a manutenção do sucesso reprodutivo, da diversidade genética, e do fluxo gênico interpopulacional entre áreas naturais e plantadas. As seguintes hipóteses foram testadas: (i) a prática de plantios monoespecíficos associada a aumentos no grau de isolamento geográfico e diminuição no adensamento de indivíduos contribui para reduções no consumo de néctar e no sucesso reprodutivo geral de *I. vera*; (ii) populações plantadas de *I. vera* apresentam diversidade genética reduzida em relação às populações naturais; (iii) o cruzamento entre populações naturais e plantadas contribui para o aumento na diversidade genética de plântulas em relação aos adultos das populações plantadas; (iv) plantios monoespecíficos de *I. vera* contribuem para o fluxo gênico entre populações naturais atuando como “stepping stones” e (v) influências antrópicas originam paisagens com manchas de habitat muito distintas entre si. Foram amostrados 600 indivíduos, sendo 100 adultos e 500 plântulas de *I. vera* de cinco populações plantadas e cinco naturais. Todos os indivíduos foram genotipados para quatro locos microssatélites. O consumo de néctar e o sucesso reprodutivo geral são reduzidos nos plantios monoespecíficos em relação aos fragmentos de floresta natural. Foi encontrada redução na riqueza alélica, heterozigosidade esperada nos adultos das populações plantadas em relação às populações naturais, indicando que plantios monoespecíficos de *I. vera* apresentam baixa capacidade de retenção de diversidade genética. Houve aumento na riqueza alélica e na heterozigosidade esperada das plântulas em relação aos adultos nos plantios monoespecíficos, mostrando que populações naturais de *I. vera* promovem a manutenção da diversidade genética das plântulas produzidas em plantios monoespecíficos. Além disso, os alelos encontrados nas plântulas de plantios estavam presentes nos adultos de populações naturais, reforçando a ocorrência de fluxo entre populações naturais e plantadas. As populações plantadas de *I. vera* podem favorecer o fluxo polínico interpopulacional, visto que plantios de *Inga* apresentam baixa resistência ao fluxo gênico em relação aos outros tipos de habitat, como plantios de cana de açúcar e áreas urbanas. Estudos futuros devem investigar o sentido e intensidade do fluxo gênico entre áreas naturais e plantadas, buscando determinar os efeitos dos plantios de árvores sobre a conectividade da paisagem em ecossistemas fragmentados.

9. ABSTRACT

Gene flow between individuals and populations is the main responsible for the reproductive success and the genetic diversity maintenance in plant species, and can be pollen- or seed-mediated. Habitat loss, fragmentation and other human practices, as planting of trees, create landscapes with different patches regarding their resistance or permeability to the gene flow between different populations of plants. The aim of the papers proposed in this thesis was to understand the role of single species plantations of the tree *Inga* to the reproductive success, maintenance of genetic diversity, and gene flow and to the gene flow between natural and planted populations of *I. vera* subsp. *affinis*. The followed hypothesis were tested: (i) single species plantations associated to increases on population geographic isolation and reduction in population density negatively affect nectar consumption by pollinator and the overall reproductive success of *I. vera*; (ii) planted populations of *I. vera* present reduced genetic diversity relative to natural populations; (ii) the outcrossing between planted and natural populations will increase the genetic diversity of seedlings from planted populations relative to their parents; (iii) single species plantations of *I. vera* represent stepping stones patches and positively contribute to gene flow between natural and planted populations and (iv) humans actions create patches resistance or permeability to the gene flow between different populations of plants. In total, 100 adult trees and 500 seedlings from five natural and five stands of *I. vera* were collected. All individuals were genotyped at four microsatellite loci. The nectar consumption and the overall reproductive success were reduced in planted populations related to natural. Reduction of allelic richness and gene diversity of adult trees in planted relative to natural populations was detected, indicating that single species plantations of *I. vera* present low capacity of genetic diversity retention. There was a increase in allelic richness and gene diversity of seedlings from planted populations relative to their parents. Also, all the alleles present in seedlings from planted populations were found in adults of natural populations, showing the occurrence of outcrossing between planted and natural stands and the genetic diversity recovery in seedlings from planted populations relative to their parents. Planted populations of *I. vera* subsp. *affinis* positively contribute to the pollen flow between populations, whereas they present lower resistance to the gene flow relative to the sugarcane plantations and urban areas. Future studies may evaluate the direction and intensity of pollen flow between natural and planted populations in order to estimate the extension of gene flow and increase in landscape connectivity promoted by tree plantations in fragmented habitats.

11. NORMAS PERIÓDICOS PRETENDIDOS

11.1. Applications in Plant Sciences

Applications in Plant Sciences Instructions for Authors

Scope and Aims of the Journal

Applications in Plant Sciences (APPS) is a monthly, online-only, open access, peer-reviewed journal promoting the rapid dissemination of newly developed, innovative tools and protocols in all areas of the plant sciences, including genetics, structure, function, development, evolution, systematics, and ecology. Given the unprecedented rapid progress today in technology and its application in the plant sciences, the goal of APPS is to foster communication within the plant science community to advance scientific research. APPS is a publication of the Botanical Society of America (BSA), and is available as part of BioOne's Open Access Collection (www.bioone.org/loi/apps). The journal publishes the following types of articles:

- *Protocol Notes* describe new methods and technological advancements for the visualization or quantification of biological information.
- *Software Notes* detail new software applications with examples of how they are used and how results are interpreted.
- *Genomic Resources Notes* characterize the development and demonstrate the usefulness of newly developed genomic resources, including transcriptomes.
- *Application Articles* illustrate the application of a new protocol, method, or software application within the context of a larger study.
- *Review Articles* evaluate available techniques, methods, or protocols within any area of the plant sciences, providing a summary of advantages and disadvantages of the techniques that are reviewed.
- *Primer Notes* report novel genetic markers within a taxon or taxa with evidence of wide applicability.

The journal originated as the *American Journal of Botany's* online-only section, *AJB Primer Notes & Protocols in the Plant Sciences* (AJB PNP), which was begun in 2009 to serve as a publication outlet for researchers in genetic and molecular areas. The first issue of APPS published in January 2013; the journal now addresses all areas of the plant sciences and has been expanded to cover novel protocols, reviews, and applications of new technology in any area.

Articles published in the *AJB Primer Notes & Protocols in the Plant Sciences* section of the *American Journal of Botany* can be accessed online on the AJB website (<http://www.amjbot.org/>).

Editorial Procedure and Policy

Submission and Review Process—To facilitate automated publication, submissions should conform to the word count and the publication template (see below) for each type of article. Papers submitted to APPS will first be reviewed by an editor for content, suitability to the journal, and conformity to the guidelines. Depending upon the type of manuscript and the subject matter, manuscripts will be sent out for peer review by scientists with relevant experience, a panel of reviewing editors, and/or the Associate Editors. Review will generally be completed within one month for Primer Notes and two months for other types of articles. **Authors will be expected to return revised manuscripts within two weeks (for Primer, Software, Genomic Resources, and Protocol Notes) or four weeks (for Review and Application Articles) of an editorial decision.** Revisions will be evaluated for satisfactory response to editorial comments and checked for conformity to format guidelines; accepted manuscripts will undergo a light copyedit. Authors will be solely responsible for any errors that appear in the published version.

APPS requires that at least one colleague whose first language is English critically read and edit the manuscript before submission. Clear grammar, sentence structure, and spelling are essential for reader comprehension and are required of all manuscripts. Manuscripts may be returned without review if the English needs significant improvement.

Publication date—Each article will receive a unique digital object identifier (DOI), and the date of publication will be the date on which the article is posted to BioOne.

Open Access fees—All APPS papers are Open Access. Non-BSA members will be charged \$795 per article. BSA members will be assessed a reduced fee of \$250 for each published article. This policy applies to all articles accepted, except for invited articles for which the Editorial Board has agreed to waive fees at the time of article submission. Payment must be received before online publication. Note: As an Open Access journal, APPS does not provide free pages for BSA members, and papers published in APPS do not count against an author's annual allotment of free pages in AJB.

Indexing Information—*APPS* is indexed in AGRICOLA, Biological Abstracts, BIOSIS Previews, CAB Abstracts, CrossRef, Current Contents/Agriculture, Biology, and Environmental Sciences, the Directory of Open Access Journals (DOAJ), Google Scholar, Journal Citation Reports/Science Edition, Mendeley, NCBI, OIAster, PubMed, PubMed Central, Science Citation Index Expanded (SciSearch), and WorldCat. *APPS*'s first impact factor will be available in the 2014 Journal Citation Report, releasing in July 2015. *APPS* is archived in LOCKSS and Portico.

APPS Copyright and Licensing Information—*APPS* operates under a [Creative Commons Attribution 3.0 license](#) (CC-BY-NC-SA). Under the terms of this license, authors retain ownership of the copyright of their articles. Users are allowed to download, print out, extract, reuse, archive, and distribute the article for noncommercial use; this use is contingent upon appropriate credit being given to the authors and the source of the work and upon the new creation being licensed under the same terms. The license ensures wide availability of the article and that the article can be included in any scientific archive. Those wishing to use material for commercial purposes should contact the author. Papers authored by one or more US government employees are licensed under a Creative Commons public domain license (CC0), which allows unlimited distribution and reuse of the article for any lawful purpose. The Creative Commons license applies to all submissions on or after 31 October 2012.

Conflict of Interest—The Journal editors expect authors to follow the ethics guidelines of the Botanical Society of America (BSA) (www.botany.org/governance/ethics.php). Authors are responsible for recognizing and disclosing any duality of interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other personal connections. All funding sources, including the research funder and grant number, must be given in the acknowledgments section.

Copyrighted Material and Plagiarism—If copyrighted material is reproduced in the manuscript, full attribution must be provided in the text; proof of permission must be sent to the Editorial Office. It is the responsibility of the authors, not the BSA or the editors or reviewers, to ensure that proper attribution is given to data and/or text previously published elsewhere. If suspicion is raised about the originality of the material (unattributed to source), the Editorial Office may check the manuscript for plagiarism. In cases where plagiarism is verified, the manuscript will be returned without further review without the possibility of resubmission. Self-plagiarism (i.e., the use of identical sentences from previously published papers by the same author) is also not acceptable. If authors wish to reproduce copyrighted material published in *APPS* before the institution of the Creative Commons license (i.e., manuscripts submitted before 31 October 2012), the permission request form available online at <http://www.botany.org/APPS/BSAPermission.doc> must be completed and returned to the Editorial Office. Those wishing to use material published under the Creative Commons license for commercial purposes should contact the author.

Data Origin—When using unpublished data owned or created by a researcher who is not the author or a co-author, a formal statement from the owner of the data must be sent to the Editorial Office acknowledging the use of the data and granting formal permission.

Data Access—*APPS* requires that supporting data be deposited in an appropriate repository to facilitate reader access prior to submission of the manuscript. Genetic information, such as DNA, RNA, or protein sequences, should be submitted to an appropriate data bank, such as GenBank or EMBL. Alignments used to produce phylogenies must be submitted to TreeBase or to *APPS* to be published with the paper as supplementary material. The data matrices must be in an editable format (i.e., text files) for reanalysis by any interested readers following publication. Authors are encouraged to archive all sequences generated from next-generation sequencing techniques in a suitable public depository, such as the Sequence Read Archive of NCBI, the Sequence Read Archive of ENA, or Dryad (<http://datadryad.org/>). Ecological data or software information may also be deposited into Dryad or a similar publicly available site. Media files may also be housed on Figshare (<http://figshare.com/>). If necessary, raw data files (e.g., DNA sequences, gel images, chromatograms, data matrices) and/or electropherograms may be requested by the editors during the review process.

Nomenclature—*APPS* requires that nomenclature for all extant and extinct species conform to the current International Code of Nomenclature of Algae, Fungi and Plants. Taxonomic authorities are given at first mention in the text (not in the manuscript title). Authors should refer to the International Plant Names Index (<http://www.ipni.org/index.html>) or Tropicos (<http://www.tropicos.org/>) for accepted authority names.

Conventions adopted by the scientific community must be used for genetic symbols and nomenclature.

Vouchers—At the time of submission, supporting genetic and voucher specimen information must be provided, preferably for each population sampled, as appropriate (see Appendices below). Plant vouchers are defined here as mounted herbarium specimens that are permanently housed in an accessible herbarium or museum and that are identified by unique accession numbers; vouchers may be requested for review by future investigators to verify the identity of the material used in the study (especially if taxonomic rearrangements occur in the future). In discussions of morphological character states, access to the data must be provided.

Manuscripts that report data from individual populations must include the GPS coordinates for each of the populations sampled. A waiver of this requirement may be granted for rare, threatened, or endangered species, as explained in the cover letter. Accuracy must be provided to the nearest second, or the fifth decimal place if using

decimal degrees. If vouchers or GPS coordinates are unavailable, an explanation must be provided in the cover letter, as well as within the article itself. Exceptions to the voucher requirement will be assessed by the editors.

Article Types

Protocol Notes—Protocols represent novel approaches that improve the accuracy, reproducibility, and/or efficiency of data collection or provide access to novel classes of information. In each manuscript (2500 words or less for the main text without the Abstract or Literature Cited), authors must concisely explain the rationale for the new protocol, provide a detailed description of the procedure(s) and demonstrate the efficacy of the method. Authors must also describe both the advantages and any disadvantages of the new technique.

Advantages and disadvantages might reflect differences in cost, in the speed and ease with which results are obtained, or the breadth of material for which the new techniques are applicable. The format and space requirements for accurate descriptions of novel protocols will vary, so authors should make an effort to provide succinct and adequate details of their methods and results. A protocol sheet consisting of a step-by-step description of the process must be provided in enough detail to enable another scientist to easily reproduce the method; this may be placed as an appendix along with a supply list. Submissions of protocols that improve investigations in any area of the plant sciences are welcome, including, but not limited to, methods on genetic, morphological, physiological, biochemical, anatomical, and ecological data collection.

[View the Protocol Notes template.](#)

Genomic Resources Notes—These articles (3000 words or less for the main text without the Abstract or Literature Cited) characterize the development and demonstrate the usefulness of newly developed genomic resources, including transcriptomes. Descriptions of plastid genomes must consist of more than a simple report; this can include comparisons to other genomes, analysis of genome organization, investigation of structural rearrangements, rates of sequence evolution, etc. Manuscripts that report the development of specific primers (such as microsatellites) that are based on large genomic databases should instead be submitted as a Primer Note. To clearly indicate the quality and utility of the reported data, authors must include the following information: (1) sequencing description, (2) method of contig assembly, (3) annotation and number of contigs, and (4) comparisons to other genomes, which can be shown graphically in terms of divergences with other taxa. Authors are encouraged to parse genes into function groups (i.e., transcriptome studies) or present results from gene ontology studies, especially if multiple tissues or environments were sampled. Genomic data must be deposited into an appropriate repository prior to submitting a manuscript to *APPS*. Manuscripts that lack the above information will be returned to the authors prior to review.

[View the Genomic Resources Notes template.](#)

Software Notes—Description of new software applications or substantial revisions of existing applications (3500 words or less for the main text without the Abstract and Literature Cited) must clearly define the goals, provide interpretations of output parameters or data, and list any assumptions or limitations of the method. Compatibility information for operating systems associated with stationary and portable computing devices must also be provided, as appropriate. In addition, submissions on applications for the analysis, filtering, or modification of data, or mining of large data sources are also welcome; these should provide clear descriptions and examples of appropriate types of input data and output formats. We encourage the authors of software packages to make source code available under the terms of a free software license, e.g., GNU General Public License, BSD License, or Apache License.

[View the Software Notes template.](#)

Application Articles—These articles (5000 words or less for the main text without the Abstract or Literature Cited) illustrate the extensive application of a new protocol, method, or software application in any area of the plant sciences within a large study. These articles differ from Protocol Notes and Software Notes in that the emphasis is on the use of the protocol or software program, not on the description of the new protocol or program (including its advantages and disadvantages).

[View the Application Article template.](#)

Review Articles—Reviews (6500 words or less for the main text without the Abstract or Literature Cited) will address current and proposed techniques and/or protocols within any area of the plant sciences, emphasizing the relative advantages and disadvantages of each method. Authors must describe and compare currently available techniques or protocols, as well as identify any potential new areas for the development of technological advancements. These articles will be primarily by invitation, although authors are also welcome to propose ideas for a review article to a member of the editorial board.

[View the Review Article template.](#)

Primer Notes—The intent of these articles (1200 words or less for the main text without the Abstract or Literature Cited) is to demonstrate the usefulness of newly developed primers for subsequent, more detailed studies. Authors should report an adequate number of markers to assure successful completion of subsequent studies (e.g., at least 10 novel markers for microsatellites) with evidence of wide applicability (such as cross-amplification with related taxa) for species of scientific, economic, or horticultural importance. These include, but are not restricted to, microsatellite markers, SNPs, or other types of genetic markers. Markers developed

using novel techniques are especially welcome. Sampling distribution and numbers will depend on the life history characteristics of the organism under study, but sample sizes should be adequate to support the genetic parameters presented. For example, sample sizes are expected to be greater for abundant and widely distributed species than for rare species. Whenever possible, the use of data from multiple populations is encouraged to capture a wider range of potential variation. Although most primers are expected to exhibit polymorphism, monomorphic primers are also acceptable because they may be useful in other populations or related taxa. Given the limited sampling and biological characteristics of some species (small population sizes, recent colonization, admixture, clonality, etc.), tests of linkage disequilibrium and Hardy-Weinberg equilibrium are not explicitly required for primer notes but are encouraged when population sampling is appropriate for such tests. Authors are expected to develop and test primers for all suitable sequences that are developed as markers, and submit those sequences to an appropriate repository (such as GenBank) prior to submitting a manuscript to APPS. All submissions will be scrutinized closely to ensure that primers have not been previously published elsewhere. If other primers have previously been published for a species, authors must justify the development and usefulness of additional primers. Authors are required to cite papers reporting markers in the same species. In cases where large numbers of markers are identified (as in EST studies or next-generation sequence sets), authors should indicate how they chose which primer pairs to test and briefly what is planned for any additional sequences not analyzed. It is extremely unlikely that multiple primer papers based on the same original data set will be published by APPS. Authors submitting Primer Notes are required to provide references to studies involving primers of any kind (regardless of organism) published in the past 3 years by any coauthors of the current submission in the cover letter accompanying their submission. PDFs of these previous primer publications should be included with the submission in a single PDF file, using the Item Type "Additional Information."

[View the Primer Notes template.](#)

Manuscript Preparation

A cover letter, an [author agreement form](#), a manuscript file, and separate files for figures should be uploaded at <http://apps.edmgr.com>. Authors of Primer Notes submissions should also include a PDF of any primer studies (regardless of organism) published in the past 3 years by any coauthors of the current submission. This should be uploaded as a single PDF file using the Item Type "Additional Information."

The manuscript file includes in the following order:

- Short Title [running head: surname of the FIRST author (followed, as appropriate, with the surname of a sole co-author, or with et al. if there are three or more authors)+ 2 or 3 descriptive words]
- Title [up to 125 characters]
- Footnotes [authors' addresses, contact info for corresponding author, Manuscript received ____; revision accepted ____.
- Abstract [in structured format, no more than 150 words for Protocol, Genomic Resources, Software, or Primer Notes; 200 words for Review or Application Articles, see below for format]
- Key words [3-6]
- Text [See below for format]
- Literature Cited [limited to 15 references for Primer Notes, 25 references for Protocol Notes, 30 references for Software Notes and Genomic Resources Notes, 60 references for Application Articles, and 85 references for Review Articles]
- Tables, Appendices, and Figure legends

Double-space with 11-12 pt. font and left justify the margin of the entire manuscript, including Literature Cited, Tables, Appendices, and Figure Legend, using continuous pagination. Leave at least a 2.5-cm margin on all sides. Place a header with last name(s) of author(s) and page number in upper right corner. Manuscripts not following these basic requirements will be returned without review.

The figure and tables should be numbered in the order discussed in the text.

For manuscript files MS Word (.doc or .docx) or Rich Text Format (.rtf) format are preferred.

Manuscript Contents

Follow the appropriate Publication Template for preparing your manuscript (see below). Additional general information is provided below for all types of articles.

1. Title and Footnotes

Place a running head 2.5 cm below the top of page with the surname of the FIRST author (followed, as appropriate, with the surname of a sole co-author, or with et al. if there are three or more authors) + 2 or 3 descriptive words, e.g., "Ziziphus microsatellites".

Center boldfaced title of no more than 125 characters written with sentence-style capitalization; after a species name include the family name in parentheses. The title should be followed by superscript 1 (for footnote 1).

Include the following footnote:

1Manuscript received ____; revision accepted ____.

Below the title, list authors: each author's first name, middle initial, surname. On the next line, give affiliation and unabbreviated address. If authors have different affiliations and addresses, add a superscript number after each author's name to indicate the footnoted address. Include another footnote superscript number to indicate the author for correspondence.

Include the total word count for the main text of the manuscript (Abstract, Introduction, Methods and Results, Conclusions), e.g., "Number of words: 1000...."

In the submission process, please include an email for all authors in case we need to contact a co-author during the publication process; this is important due to the quick turnaround, especially at the e-Galley stage.

Place brief acknowledgments, if desired, as a separate paragraph of no more than 75 words, using the following style: "The author(s) thank(s)....". For brevity, use initials rather than first names (e.g., J. A. Smith). Include funding acknowledgments here.

Other footnotes (e.g., e-mail for correspondence) are permitted: match footnote numbers with those on the title page.

2. Abstract

The abstract must consist of a maximum of 150 words for Protocol, Genomic Resources, Software, and Primer Notes, and up to 200 words for Application and Review Articles. For all article types except Review Articles, which should be unstructured, the abstract should be written in the following structured format:

- Premise of the study (why the work was done)
- Methods and Results (how the work was done and what were the results; for Protocol Notes, this must also include a comparison with other existing methods)
- Conclusions (what major points the reader should take from the article; in the case of Primer Notes, briefly mention other related species in which the markers also amplify)

For all article types, avoid references in the Abstract; if absolutely essential, cite parenthetically with journal name, volume number, pages, and year.

After all abstracts, provide a list of 3 to 6 "**Key words**" that will be used for indexing purposes. Capitalize proper nouns, place in alphabetical order, and separate by semicolons.

3. Text

Authors must follow the word limit established for the main text (which consists of all headings but excludes the Abstract or Literature Cited), as previously described above under "Types of Articles." To facilitate the publication process and a rapid turnaround, **authors must closely follow the templates provided for each type of article**, with emphasis on the formatting and maximum length of each section. The length limits may be adjusted at the discretion of the editors if novel or non-standard methods are being described. *The templates also contain additional information regarding content and required sectional headings.*

For Protocol, Genomic Resources, Software, and Primer Notes articles, the required headings consist of ABSTRACT, INTRODUCTION, METHODS AND RESULTS, CONCLUSIONS, and LITERATURE CITED. Further description of the information to be included in each section is provided in the appropriate template—see [Protocol Notes Template](#), [Genomic Resources Notes Template](#), [Software Notes Template](#), or [Primer Notes Template](#).

For Application Articles, headings should consist of ABSTRACT, INTRODUCTION, METHODS, RESULTS, DISCUSSION, and LITERATURE CITED. For Review Articles, the formatting is less restrictive than above but should include ABSTRACT, INTRODUCTION, and DISCUSSION sections with other customized headings as appropriate. If applicable, informative second-level headings are encouraged, especially for Review Articles. See [Application Article Template](#) or [Review Article Template](#) for further information.

All headings should be centered above each section and capitalized (e.g., INTRODUCTION, METHODS).

Second-level headings should be in boldfaced italics, followed by an em dash (e.g., ***Current protocols***—), and third-level headings should be presented in italics followed by an em dash (e.g., *Next-generation methods*—).

For any manufacturers and suppliers of reagents or software, authors must provide the name, city, spelled-out state (if in USA) or province, and country of origin.

Common Latin words (e.g., *in vivo*, *sensu lato*) are not italicized.

Footnotes are not used in the text.

4. Literature Cited

The number of literature citations is limited to 15 references for Primer Notes, 25 references for Protocol Notes, 30 references for Software and Genomic Resources Notes, 60 references for Application Articles, and 85 references for Review Articles. Verify all entries against original sources. Double check that all references in the manuscript text are in the Literature Cited and vice-versa and that they agree in spelling and year. For online references, provide URL and most recent access date for the website.

For formatting examples (note spacing, italics, etc.), go to http://www.botany.org/APPS/APPS_LitCited_Samples.pdf.

Literature citations in text—Cite references in chronological order (oldest first); within a given year, order them alphabetically (e.g., Smith and Flinstone, 1988, 2011; Asher et al., 2007; Brown, 2007; Jackson, 2008, 2012).

Single author: Smith (2009) or (Smith, 2009). Two authors: Smith and Brown (2005) or (Smith and Brown, 2009). More than two authors: Smith et al. (2011) or (Smith et al., 2011).

Manuscripts accepted for publication but not yet published: Smith (in press) or (Smith, in press). Include “In press” citations in LITERATURE CITED (see below).

Unpublished data and manuscripts (e.g., submitted, in prep.) and personal communication: (A. Xu, Institution, unpublished data [or unpublished manuscript or personal observation]). These are not included in LITERATURE CITED.

References listed in LITERATURE CITED—List citations in alphabetical order by author. Single-author titles precede multi-authored titles by the same senior author, regardless of date.

List works by the same author(s) chronologically, beginning with earliest date of publication. Spell out all author(s) names. Use “a”, “b” (determined alphabetically) for works with the same author(s) and year citation. For multi-authored works, list the first seven authors and then “et al.”—unless there are only eight authors and then list all eight.

Type author names in citations in upper and lower case or in large and small caps, not in all caps.

Examples:

Journal Article:

Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.

Mungall, C. J., C. Torniai, G. V. Gkoutos, S. E. Lewis, and M. A. Haendel. 2012. Uberon, an integrative multi-species anatomy ontology. *Genome Biology* 13: R5.

Pierre, P. M. O., S. M. Sousa, L. C. Davide, M. A. Machado, and L. F. Viccini. 2011. Karyotype analysis, DNA content and molecular screening in *Lippia alba* (Verbenaceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 83: 993–1006.

Timme, R. E., B. B. Simpson, and C. R. Linder. 2007. High-resolution phylogeny for *Helianthus* (Asteraceae) using the 18S-26S ribosomal DNA external transcribed spacer. *American Journal of Botany* 94: 1837–1852.

Book:

Lynch, M., and B. Walsh. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

Richards, A. J. 1986. Plant breeding systems. George Allen and Unwin, London, United Kingdom.

Book Chapter:

Galán, J. M. G., and C. Prada. 2011. Pteridophyte spores viability. In H. Fernández, A. Kumar, and M. A. Revilla [eds.], Working with ferns—Issues and applications, 193–206. Springer, New York, New York, USA.

Hill, R. S. 1994. The history of selected Australian taxa. In R. S. Hill [ed.], History of the Australian vegetation: Cretaceous to recent, 390–420. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Computer Program:

Peakall, R., and P. E. Smouse. 2006. GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288–295.

R Foundation for Statistical Computing, 2011. Version 2.13.0 (2011-04-13). The R Foundation for Statistical Computing, Vienna Austria. Website <http://www.r-project.org/> [accessed 13 July 2012].

Websites (no print version):

Joint Genome Institute. 2012. JGI Plant Genomics Program—Home [online]. Website <http://genome.jgi.doe.gov/genome-projects/> [accessed 30 April 2012].

O’Leary, M. A., and S. G. Kaufmann. 2012. MorphoBank 3.0: Web application for morphological phylogenetics and taxonomy. Available at website <http://www.morphobank.org>.

Technical Report:

Hocking, D. 1971. Preparation and use of a nutrient solution for culturing seedlings of lodgepole pine and white spruce with selected bibliography. Northern Forestry Research Centre Information Report Nor-XI. Canadian Forest Service, Edmonton, Alberta, Canada.

5. Tables—include in manuscript file

Tables may be included, as appropriate, in Protocol Notes, Genomic Resources Notes, Software Notes, Review Articles, and Application Articles.

For Primer Notes papers, two tables should be presented. One should contain the names of the forward and reverse primers, their DNA sequences, fragment size range, annealing temperatures, and GenBank ID. Based on the marker type, additional information may be required, such as repeat motifs for microsatellite markers or polymorphism information for SNPs (e.g., A/T). Any fluorescent dye used to tag any primer should also be indicated here. The second table should report the number of alleles and observed heterozygosity in each population surveyed (for microsatellite or SNP markers) or nucleotide diversity estimates (for sequence-based markers). In species expected to be primarily outcrossing and if sampling has been extensive enough in one or

more natural populations, results of tests for departures from single-locus Hardy-Weinberg expectations and for departures from gametic equilibrium may be included. Voucher accession numbers for each population may be provided with the table, in the text, or in an appendix. Include the name of the herbarium in the table caption. If the paper reports SSRs developed from ESTs, Table 1 should include (a) information on the protein and function most closely matching the EST from a database search, (b) the organism from which the match was obtained, and (c) the *E*-value associated with the match. An additional table may be included to present cross-amplification results, as appropriate.

Formatting Instructions: Tables should be numbered with Arabic numerals followed by a period. The table title must be concise and fully informative independent of the main text of the manuscript, with all abbreviations explained as footnotes. Capitalize the first word of the title; all others, except proper nouns, are lowercase; spell out names of genera and abbreviations on first mention; place a period at end. Include the study organism (species or group) and geographic location in each caption when appropriate. Place explanatory notes and define all abbreviations below the table after the heading "Note:". Place footnotes after the Notes.

Tables need to be formatted using the Table feature in Word (preferred) or in a spreadsheet such as Excel. Every column must have an appropriately placed heading (especially the first at left—the stub head), with appropriate subheadings. In the body of the table, capitalize the first word of each entry (and proper nouns); indicate footnotes by lowercase superscript letters.

6. Appendices—include in manuscript file

Herbarium vouchers (preferably one per population sampled) and, if appropriate, gene accession information supporting the study should be listed in an appendix, if it cannot be easily added within the main narrative. (If vouchers are unavailable, an explanation must be provided in the cover letter, as well as within the article itself.) Provide an appendix title and a sentence-style row of headings for the data. For each taxon sampled, include specimen voucher information and/or gene accession numbers, separated by commas. To save space, the taxa can be listed consecutively in a paragraph. Alternately, the data can be set in table format. See <http://www.amjbot.org/content/99/10/e411.full> for an example.

For Protocol Notes, a protocol sheet consisting of a step-by-step description of the process should also be placed as an Appendix along with a supply list.

Please see "Supplemental Materials" (below) for a description of appendices that should be submitted as Supplemental Materials.

7. Figure/Illustration—upload as separate files (do not include in the manuscript file)

Authors are encouraged to submit figures in color, if doing so enhances the presentation of the scientific information. There is no charge for online publication of color figures. Figures may be especially appropriate for Protocol and Genomic Resources Notes. For details, see

http://www.botany.org/APPS/APPS_Digital_Art_Guidelines.pdf. A figure checklist is also available at http://www.botany.org/APPS/APPS_Figure_Checklist.pdf. TIFF or EPS formats are preferred for color and black-and-white photographs, drawings, and graphs. Prepare figure at the final size desired: 1 column (8.9 cm [3.5 in]), 1.5 column (12.7–15.24 cm [5–6 in]), or 2 columns (18.4 cm [7.5 in]) wide and less than the length of the page (23 cm [9 in]).

Use consistent style, font, and font size (between 6 and 10 pt.) for all figures. Use of standard fonts (Times New Roman, Helvetica) gives better results.

For figures with multiple elements (photos, drawings, or graphs), group elements in a rectangle or square and label the top left corner of each element with a capital letter (e.g., A, B). Keep elements close together for best use of space. Photographs in a composite plate should each be numbered and separated by a thin line or blank space.

Label axes; include Standard International (SI) Units of measure in parentheses; capitalize only the first letter of the first word (e.g., "Observed heterozygosity (H_o)"). Axis label should be c. 0.2 cm from units on axis, but no more than 0.5 cm; x- and y-axis labels should be equidistant from axes.

Use abbreviations consistently in the text and figures.

Figure Manipulations—Certain types of electronic manipulations of micrographs and other digital images may not be ethically acceptable. Images that will be compared with each other must be acquired and processed under the same conditions. Manipulations such as background subtraction or white-balancing should be explained in the Methods section. Note that a selected area within an image may not be altered or enhanced; the entire image must be treated the same. Linear adjustments to contrast, brightness, or color must be applied to an entire image or plate equally (or explained). Detail nonlinear adjustments in the legend. Always keep original raw data files for documentation upon request.

8. Figure Legend—include in manuscript file and place immediately after the Appendices (or after the tables if there are no appendices)

Each figure legend must be complete and informative so that reference to the text is not necessary to understand the content of the figure. Abbreviations should be defined unless they are standard convention. Place legends as separate paragraphs following the appendices. For figures with multiple lettered panels, a general title for the

figure should be followed by a description of each panel (e.g., “Fig. 5. Relationship between... (A) All fruits. (B) Fruits <0.5 mm.”). When applicable, include study organism (species or group) or geographic location, and define scale bar (e.g., Bar = 0.1 μ m). For micrographs, include pertinent information such as magnification and type of section, stain, optics, or special techniques. Any nonlinear adjustment to photographs must be detailed. Define all symbols and abbreviations either in a key within the figure or in the legend; if defined in an earlier legend, the appropriate figure or table may be cited.

9. Multimedia Content—upload as a separate file (do not include in the manuscript file)

Authors may elect to include certain types of multimedia files as appropriate in the manuscript. For example, Protocol Notes may include short videos or animations detailing a complex idea or critical but difficult step. Submissions must include a reference (e.g., Video 1) to the multimedia within the text of the manuscript and file(s) must be uploaded separately. The preferred file format is .mpg files, but .swf, .avi, and .mov files are also accepted. Multimedia files may also be uploaded to BSA’s YouTube channel by the APPS editorial office for greater accessibility with multiple platforms, especially on handheld electronic devices. Authors should contact the Editorial Office if they have additional questions regarding formats or the submission process for multimedia.

10. Supplemental Materials—upload as a separate file (do not include in the manuscript file)

Supplemental materials are differentiated from Tables, Appendices, and Figures as described here:

Tables/Figures should contain information/data that is directly relevant to the questions/aims of the study and directly supports the main conclusions of the study.

Appendices contain information that may be too lengthy for a normal figure or table (i.e., a protocol) or is slightly extraneous (long list of voucher specimens) but is still considered essential and needs to be easily accessible to the reader to understand the methods or results of the study.

Supplemental Materials may be of interest to a subset of readers who would like access to more details regarding sampling, methods, etc. This information includes large data sets and information that is provided in file types that cannot be incorporated into the Word file; it will likely be more extensive than data provided as Tables or Figures within the manuscript. These materials should be submitted as separate files (using the File Type “Supplemental Materials”) and will be published with the full-text article with the Editor’s approval.

Large data sets should be uploaded to a publicly available data repository (see above under Editorial Procedure and Policy, Data Access); alternately, they may be uploaded as Supplemental Materials with the initial manuscript submission.

Include a header on each file using this format: Smith et al.—Applications in Plant Sciences 2013 2(#): ###-###.—Data Supplement S1—Page 1”. Supplementary materials should be referred to as Appendix S1, S2, etc., regardless of whether they are tables, figures, text, other media, or a combination thereof. They should be numbered in the order in which they are cited in the text, separately from the non-supplemental appendices.

Manuscript Submission

Authors should submit their manuscript via the online submission and review system, Editorial Manager, at <http://apps.edmgr.com>. First-time users need to register for an account at this URL using their active e-mail addresses. The same Username and Password are used to log in as an author or as a reviewer. Authors who have been a reviewer or author for the *American Journal of Botany* can use their *AJB* Editorial Manager Username and Password on the APPS Editorial Manager site. All reviews, revisions, and proofs are handled electronically.

Cover/Response Letter

A cover letter should accompany the manuscript and should include a statement that this is the authors’ own work and that all co-authors have contributed to the work. Any potential conflicts of interest or declarations of competing interests must be mentioned. List any papers on related topics by any of the authors that have been published within the past year or that are in review or in press. Authors submitting Primer Notes are required to provide references to studies involving primers of any kind (regardless of organism) published in the past 3 years by any coauthors of the current submission. For a revision, include a letter detailing your response to all the review comments. The cover letter is an essential part of the submission process and must contain a succinct and convincing argument for why the work reported in the manuscript should be published in *APPS*.

Additional Documentation

Authors of Primer Notes submissions are required to include a PDF of any primer studies (regardless of organism) published in the past 3 years by any coauthors of the current submission. This should be uploaded as a single PDF using the Item Type “Additional Information”; its inclusion with the submission materials should be noted in the cover letter.

Author Agreement Form

Upon initial submission of a manuscript, the corresponding author must fill out an author agreement form and either upload an electronic version at the online submission site or mail or fax a hard copy to the Editorial Office in St. Louis, Missouri (see contact information below). The author agreement form is available online at

http://www.botany.org/APPS/APPS_Author_Agreement_Form.docx; on the Editorial Manager website at the “Attach Files” screen; and from the Editorial Office.

Questions? Contact the Editorial Office

Applications in Plant Sciences

Beth Parada, Managing Editor

Editorial Office

P.O. Box 299

St. Louis, MO 63166-0299

phone: 314-577-9486; fax: 314-577-9515

E-mail: apps@botany.org

[Last updated 10 June 2013]

11.2. Conservation Biology

Author Guidelines

Instructions for Authors

Conservation Biology welcomes submissions that address the science and practice of conserving Earth's biological diversity. Papers published in *Conservation Biology* emphasize issues germane to any of Earth's ecosystems or geographic regions and that apply diverse approaches to analyses and problem solving. Manuscripts with relevance to conservation that transcend the particular ecosystem, species, or situation described are prioritized for publication.

Before you submit your manuscript read the [Style Guide for Authors](#).

Word count includes all text from the first word of the Abstract through the last word in Literature Cited. It does not include legends for tables and figures or the body of tables. Manuscripts that substantially exceed the word limits specified below will not be sent for review.

Article Categories and Word Limits

1. Contributed Papers (3000–6000 words): papers that report on original theoretical, empirical, or synthetic research in the natural or social sciences or methodological papers of special relevance to conservation.
2. Research Notes (3000 words): similar to Contributed Papers, but results and inferences may be more focused or preliminary.
3. Reviews (7500 words): comprehensive reviews of a given topic.
4. Essays (6000 words): comparatively speculative yet well-argued, -grounded in evidence, and -documented papers on novel, debated, and thought-provoking conservation topics that may offer personal perspectives, raise awareness, or stimulate dialogue to advance conservation thinking.
5. Conservation Practice and Policy (5000 words): papers on applications of conservation science to specific goals for management, policy, or education; on topics important to decision making, planning, and implementation of conservation; and on applications or outcomes that provide opportunities for learning.
6. Comments (2000 words): papers that respond to material previously published in *Conservation Biology*.
7. Diversity (2000 words): short opinion pieces on conservation concepts, methods, or applications or on current and immediate regional or global conservation problems.
8. Letters (1000 words): communications regarding topics of immediate interest to readers, including observations on controversial subjects or papers previously published in *Conservation Biology*.
9. Book Reviews are by invitation only. All books for possible review should be sent directly to Douglas Clark (d.clark@usask.ca).

We encourage authors who are uncertain whether their manuscript is appropriate for *Conservation Biology* to send a title and abstract to the editor in chief for preliminary evaluation.

Manuscript Submission

All manuscripts must be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/conbio>. If you do not have web access, please contact Frith Jarrad (fjarrad@conbio.org). You are required to provide the names of six potential reviewers. These reviewers must not have close professional or personal relationships with the authors.

Conservation Biology uses double-blind peer review. In the submitted manuscript, there should be no content, except for self-citations, through which authors or their institutions could be identified. Submit a separate cover page with specified information (see Cover Page below).

The identity of reviewers is kept confidential unless reviewers choose to waive confidentiality.

Files to Upload

Your manuscript must be in Word format. You may place figures at the end of the manuscript document or go through the step in the submission process to upload figures separately. At submission, no particular format for figures is required. Tables must be in the manuscript, follow Literature Cited, and precede figure legends. Name

each file with the surname of the first author followed by the general content of the document (e.g., SmithManuscript, SmithFig1, SmithAppendixS1).

Manuscript Specifications

The *Conservation Biology* [Style Guide for Authors](#) contains detailed information on how to format a manuscript for *Conservation Biology*. Manuscripts must be in English. Double-space all text and number all lines (except in figures and tables). Do not use footnotes. Metric measurements must be used. All pages except figures must be numbered. Use U.S. rather than British spelling. We strongly recommend that authors whose first language is not English ask a colleague who is a native English speaker to proofread the manuscript before submission.

Cover Page

Submit your cover page as a **separate document**. It should not be part of the manuscript itself. The cover page must include the title of the paper; a running head (short title of 40 or fewer characters); a list of five to eight keywords; word count (all text from the first word of the Abstract through the last word of the Literature Cited but not including table or figure legends or the body of tables); authors' complete mailing addresses (including postal code) at the time the work was conducted and present addresses if different; name and complete address (including email) of the person to whom correspondence should be sent; and text of your acknowledgments section.

Abstract

At the top of the abstract page provide the title of the paper. Manuscripts in all categories except Comments, Diversity, and Letters must contain an abstract that does not exceed 300 words. The abstract should state concisely the aims, methods, principal results, and major inferences of the work (i.e., it should be a miniversion of the paper). Do not include incomplete or uninformative descriptions (e.g., "A new method of analysis is described." or "We discuss how our approach could be used as a tool for more sustainable management of forest systems."). Do not include acronyms in the abstract. Do not provide a Spanish translation of the abstract.

Citations

Use the following format for literature citations in the text: (Buckley & Buckley 2000b; Pacey 2004). Arrange strings of citations in chronological order (oldest first). Do not cite work that has not been published as either unpublished or data not shown. A submitted manuscript is not published. Examples of citations and suggestions on how to handle unpublished materials are provided in the [Style Guide for Authors](#).

Tables and Figures

Include no more than one supporting element (i.e., table or figure) for every four pages of text (from the Abstract through the Literature Cited). If a table or figure has only a few data points, incorporate the data into the text. Tables must be double-spaced, without vertical rules, and must not duplicate material in the text or figures. Table legends should be one sentence. Additional explanations should be placed in footnotes. Tables should not contain colors, gray-scale shading, or other graphical elements.

Figure legends must be double-spaced and grouped together on a separate page immediately following the tables. Figures must be of sufficient quality and resolution to remain clear at 60% reduction. Before publication, you will be required to supply figures in tif, eps, or pdf format.

Online Supporting Information

Online appendices are allowed. They can be in any format. They should be named, cited, and described in text as specified in the [Style Guide for Authors](#). These materials are not copyedited or proofread. After provisional acceptance, your paper will be edited and sent back to you for a response. When you submit your response to editing, you may upload a translation of the manuscript as an online appendix (i.e., supporting information). The translation should match the version of the manuscript you submitted in response to editing (all track changes accepted). List the translation in the Supporting Information paragraph (see [Style Guide for Authors](#)).

Required Permission

If you have a figure or table in your manuscript that was published previously, after provisional acceptance you must obtain permission from the copyright holder to reprint it.

Review Process

If the editor in chief determines the manuscript topic is appropriate for the journal and meets standards of content and presentation, then a regional editor examines the submission and decides to recommend rejection, nominate reviewers, or assign the manuscript to a handling editor with expertise in the manuscript's topic. If the handling editor deems the manuscript is of sufficient quality and novelty, she or he will request reviews. Once reviews have been received, the handling editor or regional editor summarizes reviewer points, provides an assessment, and makes a recommendation (acceptance, some degree of revision, or rejection) to the editor in chief. Revisions are usually sent to the regional or handling editor for assessment, who may then initiate another round of review.

Policy on Duplicate Publication of Research Results

Submission of a manuscript to *Conservation Biology* implies it has not been published previously and is not being considered for publication elsewhere (see also, "Preprint Policy" below). At the time of submission, describe in the cover letter any data, figures, or text in the manuscript that have been published or that are in

press, submitted, or soon to be submitted elsewhere. If any of the data in the manuscript have been included in other published or unpublished manuscripts, the legend of each table or figure reporting such data must cite those manuscripts. All authors are expected to conform to the Society for Conservation Biology's Code of Ethics, available under the Instructions and Forms tab at <http://mc.manuscriptcentral.com/conbio>.

Page and Color-Printing Charges

Conservation Biology is published on behalf of the Society for Conservation Biology, a nonprofit organization. Payment of page charges allows the society to support more effectively conservation science, management, policy, and education worldwide. Charges are US\$150 per page for those with grant or institutional support for publication costs and \$50 per page for those without support who are able to pay at this rate. Page charges will be waived for authors who affirm that they do not have institutional support or another means to pay page charges. An author's ability to pay will not influence whether the manuscript is accepted for publication or any aspect of the review process. The fee for printing color figures, US\$700 per page, cannot be waived. We discourage the use of color because in some countries download speeds are slow and gray-scale photocopies of articles are common.

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors who wish to make their article available for free or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee of US\$3000 to ensure the article is made available to nonsubscribers upon publication via Wiley Online Library and is deposited in the funding agency's preferred archive. The fee for OnlineOpen cannot be reduced or waived.

In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published pdf of their article on a website, institutional repository, or other free public server immediately on publication. More information on OnlineOpen is available at https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp.

Copyright Information

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting her or him to log in to Author Services, where, via the Wiley Author Licensing Service (WALS), this person will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

If the OnlineOpen option is not selected, the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs at CTA Terms and Conditions: http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp.

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following: Creative Commons License Open Access Agreements (OAA), Creative Commons Attribution License OAA, Creative Commons Attribution Non - Commercial License OAA, or Creative Commons Attribution Non - Commercial - NoDerivs License OAA. To preview the terms and conditions of these open-access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services (http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit [http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright -- License.html](http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html).

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK), you will be given the opportunity to publish your article under a CC - BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the journal's compliant self-archiving policy please visit <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Preprint Policy

Conservation Biology does not consider for publication articles that have been published in substantial part or in full in a scientific journal, book, or similar entity. Organizational working papers and manuscripts that appear on the author's personal website or in an institutional repository, however, are not viewed as prior publication and such articles can therefore be submitted. The journal will also consider for publication manuscripts that have been posted in a recognized preprint archive (such as arXiv and PeerJ PrePrints), providing that upon acceptance of their article for publication the author is still able to grant the journal an exclusive license to publish the article or agree to the terms of an OnlineOpen agreement and pay the associated fee.

It is the responsibility of authors to inform the journal at the time of submission if and where their article has been posted previously. If the manuscript is accepted for publication in *Conservation Biology*, authors are required to provide a link to the final manuscript alongside the original preprint version.

Archive Policy

Authors may self-archive the peer-reviewed (but not final) version of their paper on their own personal website, in their company or institutional repository or archives, and in not-for-profit subject-based repositories. Self-archiving cannot occur until 12 months after online publication, regardless of funding source or institution. Self-archived papers should link to Wiley's standard terms of use for self-archived articles and not use any form of Creative Commons license (<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>). The deposited

version must link to the final article on Wiley Online Library. It should not be updated or replaced by the final article.

11.2. Landscape Ecology

Instructions for authors

Manuscript Submission

All manuscripts must be submitted using the journal's online manuscript submission system

(<https://www.editorialmanager.com/land/>).

Landscape Ecology is committed to a rapid editorial review process and will inform authors of the status of their manuscript as quickly as possible. Springer is pleased to provide authors, editors and reviewers of Landscape Ecology with the fully web-enabled online manuscript submission and review system. The online system offers authors the option to track in real time the progress of the review process of their manuscripts.

Landscape Ecology's Online manuscript and review system offers easy and straightforward log-in and submission procedures. It supports a wide range of submission file formats, including: Word, WordPerfect, RTF, TXT, TIFF, GIF, JPEG, EPS, Postscript, PICT. PDF is not an acceptable file format. Authors are requested to download the Consent to Publish and Transfer of Copyrights form from this website.

Please send a completed and duly signed form either by mail or fax to the Landscape Ecology's Editorial Office.

Authors should still follow the regular instructions for authors when preparing their manuscripts (see below).

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also in printout + disk.

In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript on line, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the tool bar.

On supplementary material submitted to Landscape Ecology

- All supplementary material must be reviewed and accepted together with the manuscript;
- Author should note that supplementary materials will not be edited, typeset or proofread and should therefore be ready for insertion on the web;
- All supplementary material must be clearly indicated as such on the Manuscript Transmittal form;
- The files must be clearly labeled as supplementary material files for the typesetter.

Submission Letter

Authors must supply a letter of submission to accompany a manuscript. This letter should be entered in the Author's Comments Section on the submission website. The letter should state that the work submitted to Landscape Ecology is original unpublished work, and is not being considered for publication elsewhere. Note how, in what form, and to what extent any data used in the manuscript have been or will be included in an article published or submitted elsewhere. Reproduction of a previously published figure, either of the author's or that of another requires a permission letter from the original publisher. These must be provided by the author before final acceptance. Authors should also note in this letter the willingness to cover costs of reproduction for any color figures submitted with the manuscript, if the paper is accepted for publication. See details on color figures and costs below. Authors are welcome to suggest 3 potential appropriate reviewers as well as 1 or 2 current members of the Editorial Board to handle the manuscript. Any such suggested individuals should have no potential conflict of interest with the authors.

- www.editorialmanager.com/land/

Manuscript Preparation

Manuscript Form

Assemble the manuscript with pages numbered consecutively beginning with the title page, and including tables, figures, and appendices. The manuscript should be assembled in the following order, with each of these components beginning on a new page:

- Title page
- Second page with bold-face headings Abstract followed by Keywords
- Text body, with bold-faced headings for sections including Introduction, Methods, Results, Discussion/Conclusion, Acknowledgments
- Tables, one per page, with captions
- Figure Captions
- Figures, one per page
- References section
- Numbered Appendices, if any (if the manuscript exceeds the length limit, appendices should be submitted as Supplementary Material.)

The title page should contain the following

- Title
- Author(s)
- Authors and affiliations with the full mailing address (for the corresponding author, please provide the email address and phone and fax nu