

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES GENÉTICOS DE POPULAÇÕES
INVASORAS E NATURALIZADAS DE *SCHIZOLOBIUM PARAHYBA*
(CAESALPINIOIDEAE – FABACEAE) POR *RESTRICTION-SITE
ASSOCIATED DNA-SEQUENCING***

GILBERTO MAGALHÃES FILHO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Ciência Florestal.

BOTUCATU - SP
Novembro - 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES GENÉTICOS DE POPULAÇÕES
INVASORAS E NATURALIZADAS DE *SCHIZOLOBIUM PARAHYBA*
(CAESALPINIOIDEAE – FABACEAE) POR *RESTRICTION-SITE
ASSOCIATED DNA-SEQUENCING***

GILBERTO MAGALHÃES FILHO

Orientador: Prof. Dr. Edson Seizo Mori

Co-orientador: Prof. Dr. Danillo Pinhal

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Ciência Florestal.

BOTUCATU - SP
Novembro – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO DOS PADRÕES GENÉTICOS DE POPULAÇÕES
INVASORAS E NATURALIZADAS DE *Schizolobium parahyba*
(CAESALPINIOIDEAE - FABACEAE) POR *RESTRICTION-SITE
ASSOCIATED DNA SEQUENCING*"

ALUNO: GILBERTO MAGALHÃES FILHO

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON SEIZO MORI
COORIENTADOR: PROF. DR. DANILO PINHAL

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. EDSON SEIZO MORI



PROF. DR. GUARACY TADEU ROCHA



PROFA. DRA. ADRIANE PINTO WASKO

Data da Realização: 02 de dezembro de 2013.

AGRADECIMENTOS

À Deus,
Aos meus pais e minha família,
aos amigos,
à minha companheira,
ao professor e orientador prof. Dr. Edson Mori,
ao professor e co-orientador prof. Dr. Danillo Pinhal,
à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo,
ao pessoal do Instituto Florestal de Assis,
ao pessoal do Departamento de Ciências Florestais da UNESP de Botucatu,
ao pessoal do Departamento de Genética da UNESP de Botucatu,
ao pessoal do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da UNESP de Botucatu,
aos colegas de trabalho,
à todos que contribuíram para a construção deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1 Resumo.....	5
2 Summary.....	6
3 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 Aspectos gerais de <i>Schizolobium parahyba</i>	10
3.2 Estudos genético-moleculares em <i>S. parahyba</i>	12
3.3 Padrões genéticos da invasão biológica.....	15
3.4 <i>Genotyping by Sequencing</i> por <i>Restriction-Site Associated DNA-Sequencing</i>	16
3.6 Hipótese.....	17
3.7 Objetivos.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Obtenção do material biológico.....	20
4.2 Áreas de coleta.....	21
4.3 Extração de DNA.....	25
4.4 Quantificação e análise de pureza.....	25
4.5 <i>Genotyping by Sequencing</i> por <i>Restriction-Site Associated DNA-Sequencing</i>	26
4.6 Análise bioinformática.....	30
4.7 Análises dos dados.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 <i>Restriction-Site Associated DNA-Sequencing</i>	33
5.1 Análises dos parâmetros genéticos.....	33
6 CONCLUSÕES.....	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
8 APÊNDICE.....	56

1 RESUMO

Schizolobium parahyba é uma árvore nativa da Floresta Atlântica e é classificada como invasora da Floresta Estacional Semidecidual. A invasão biológica é considerada uma das maiores causas de perda de biodiversidade. As populações invasoras possuem diferentes padrões genéticos de estabelecimento, como as invasões repetitivas, crípticas, por introgressões e hibridizações. Neste contexto complexo, as misturas populacionais podem ser uma peça central no sucesso do estabelecimento de populações invasoras por favorecer a adaptabilidade local e diminuir a depressão endogâmica. Por meio do uso de uma nova técnica desenvolvida no presente trabalho de pesquisa baseada em *Next-Generation Sequencing*, a *Restriction-Site Associated DNA-Sequencing* com quatro restrições enzimáticas simultâneas, foram detectados parâmetros genéticos como relações de parentesco, subestrutura populacional e medidas variabilidade e diferenciação genética de populações invasoras e naturalizadas desta espécie. Com quase 5.000 locos polimórficos foi possível detectar processos de mistura populacional e das dinâmicas particulares de cada área estudada. Houveram casos de troca de material genético entre populações invasoras e naturalizadas e indícios de que a ação antrópica intensifica o processo de mistura populacional. As análises de subestrutura populacional sugeriram que a ação antrópica favoreceu a formação de subpopulações nas áreas estudadas. A utilização de marcadores moleculares com alta informatividade mostrou ser uma poderosa ferramenta para monitoramento de populações invasoras.

OCCURRENCE OF *SCHIZOLOBIUM PARAHYBA* IN SEAZONAL SEMIDECIDUOUS FOREST: MOLECULAR AND DENDROCHRONOLOGICAL APPROACH

Botucatu, 2013, 59p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Author: Gilberto Magalhães Filho

Adviser: prof. Dr. Edson Seizo Mori

Co-adviser: prof. Dr. Danillo Pinhal

SUMMARY

Schizolobium parahyba is a native tree of Atlantic Rain Forest and is classified as Seasonally Semideciduous Forest invader. Biological invasion is considered major ones cause of biodiversity loss. Invasive populations have different genetic patterns of establishment, as repetitive invasions , cryptic invasoin, introgression and hybridization. In this complex context, population mixtures can be a centerpiece in the successful establishment of invasive populations by favoring local adaptability and reducing inbreeding depression. Through the use of a new technique developed in this research based on Next- Generation Sequencing, Restriction - site Associated DNA Sequencing with four simultaneous enzymatic restriction , genetic parameters were detected, as relatedness, population substructure and variability and genetic differentiation measures of invasive and naturalized populations of this species . With nearly 5,000 polymorphic loci was possible to detect processes of population mixture and the particular dynamics of each studied area. There have been cases of exchange of genetic material between invasive and naturalized populations and evidence that human action intensifies the process of population mixture. Analyses of population substructure suggested that human action favored the formation of subpopulations in the study areas. The use of molecular markers with high informativeness proved to be a powerful tool for monitoring of invasive populations.

Keywords: Biological Invasion, RAD-seq, Molecular Ecology

3 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A invasão e naturalização de espécies são níveis distintos de um mesmo processo, invariavelmente antropogênico (Richardson e Pysek, 2006). A Figura 1 explica o estabelecimento de uma espécie naturalizada ou invasora. De acordo com Richardson e Pysek, (2006), uma planta é considerada naturalizada quando não é nativa e tem a capacidade de se reproduzir e dispersar em ambientes degradados. Pode ser considerada invasora quando passa a ocupar *habitats* naturais. Richardson (2011) defende que as espécies invasoras têm a capacidade de auto reposição por diversas gerações e de se dispersar à longas distâncias.

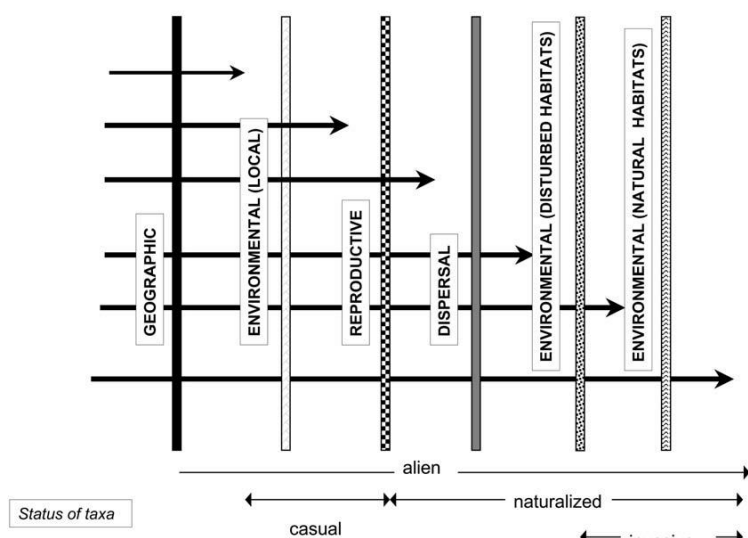


Figura 1. Barreiras ecológicas usadas para classificação dos naturalizados e invasores. Figura obtida de Richardson e Pysek, (2006).

Schizolobium parahyba é uma importante espécie brasileira, tanto pela utilização humana como pelas funções ecológicas. Alguns autores a classificam como invasora de uma importante formação florestal que está em constante degradação, a Floresta Estacional Semidecidual (ABREU, SANTOS E DURIGAN, 2013; DURIGAN, 2011; RAMOS et al., 2008).

Árvore nativa da Floresta Ombrófila Densa, tornou-se invasora de outras regiões ecológicas após sua introdução como planta ornamental e em programas de restauração ecológica, sendo constatada em nove municípios do interior do estado de São Paulo (DURIGAN, 2011). Ramos et al. (2008) classificam *S. parahyba* como invasora de Florestas Estacionais. Em um levantamento feito com 90% das espécies arbóreas de Maringá, estado do Paraná, *S. parahyba* foi caracterizada como espécie exótica não invasora e não ocorre de forma natural na Floresta Estacional Semidecidual do Paraná (BLUM, BORGIO e SAMPAIO, 2008). No estado de São Paulo, *Schizolobium parahyba* ocorre densamente distribuída na Mata Atlântica com alguns povoamentos de invasores na Floresta Estacional Semidecidual (Figura 2) (DURIGAN, 2011).

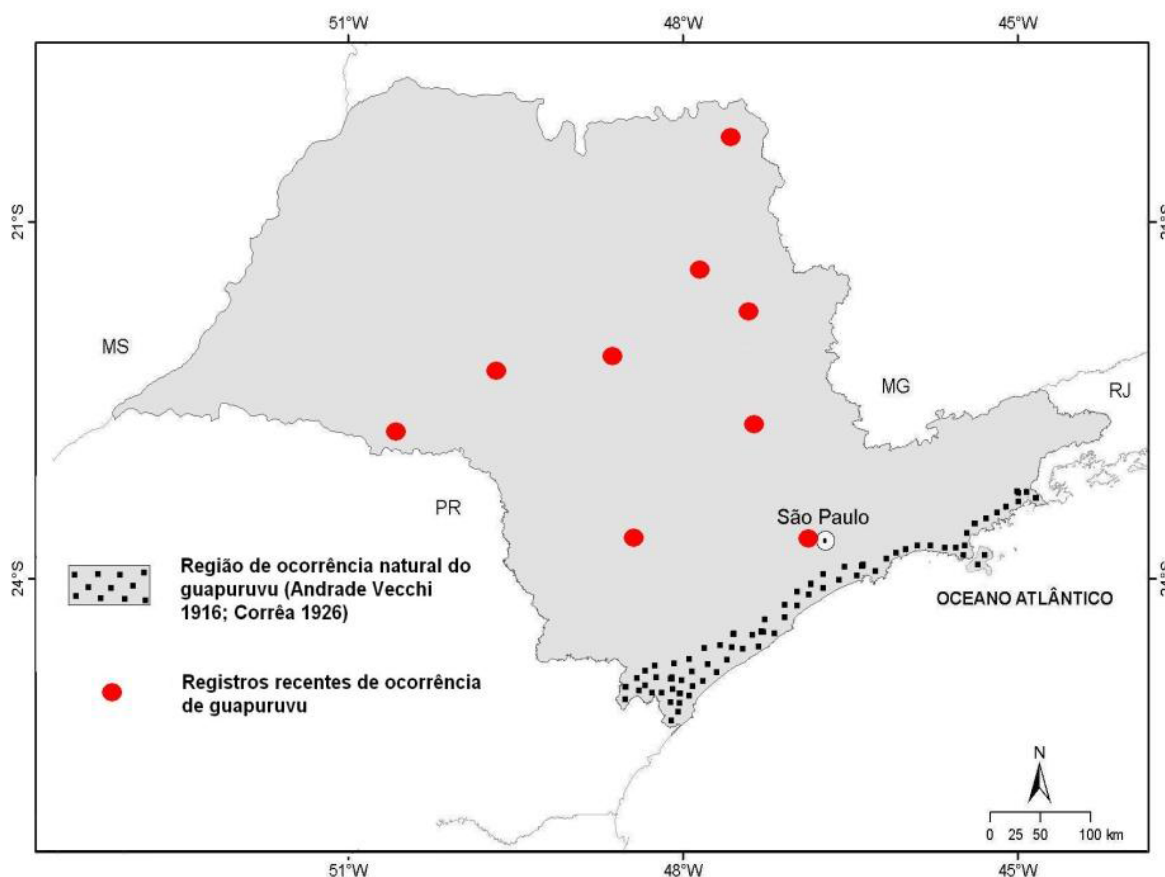


Figura 2. Distribuição de *S. parahyba* no Estado de São Paulo. Figura obtida de Durigan, (2011).

Abreu, Santos e Durigan (2013) estudaram os impactos de uma invasão de *S. parahyba* na comunidade vegetal de um fragmento florestal do município de Tarumã, Estado de São Paulo, e constataram que a presença de *S. parahyba* funciona como filtro biótico, promovendo o desenvolvimento de plântulas de algumas espécies, inclusive de si mesma, e inibindo outras. Os indivíduos têm alta competitividade pela água do solo, causando desequilíbrios na comunidade. Os autores concluíram que estes indivíduos devem ser totalmente extirpados.

Em Botucatu, *S. parahyba* foi introduzida como ornamental em diversos locais, como em canteiros de avenidas, praças, jardins, terrenos e propriedades rurais. Algumas destas árvores estão se dispersando e os novos indivíduos estão ocupando locais degradados formando cerca de dez povoamentos. Os indivíduos apresentam-se com alturas e diâmetros diversos e estão todos distribuídos próximos uns aos outros e em posições

irregulares formando pequenos agrupamentos, indicando que estão se proliferando nestas áreas (Observações Pessoais).

Na região existe um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual em uma área de proteção ambiental com cerca de 500 ha nas dependências da Fazenda Experimental Edgárdia, administrada pela Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP. A presença das populações naturalizadas de *S. parahyba* em Botucatu podem causar invasões nesse ecossistema. Nesta perspectiva, esta dissertação é uma investigação e descrição dos padrões genéticos de populações invasoras e naturalizadas de *S. parahyba* pelo uso de uma nova abordagem de *Restriction-Associated DNA-Sequencing* (RAD-seq) baseada no uso de quatro enzimas de clivagem diferentes. O conhecimento da dinâmica dos padrões genéticos pode ser o ponto de partida para o monitoramento local de populações invasoras e naturalizadas.

3.1 Aspectos gerais de *Schizolobium parahyba*

Mais conhecida por guapuruvu e por mais de 30 nomes populares diferentes, *Schizolobium parahyba* VELLOSO S.F. BLAKE (1919), está incluída na família Fabaceae e na sub-família Caesalpinioideae. Possui crescimento rápido e quando adulta pode alcançar a altura de 10 a 40 m. Possui tronco cilíndrico e acinzentado, com cicatrizes foliares evidentes e lenticelas. A ramificação é cimosa e o diâmetro à altura do peito de 30 a 120 cm. A copa é ampla e umbeliforme, com folhas alternas espiraladas, compostas bipinadas de até um metro de comprimento. São hermafroditas com flores vistosas de coloração amarelo vivo. A semente é oblonga e achatada, com tegumento extremamente duro, medindo de 2 a 3 cm de comprimento e 1,5 a 2 cm de largura (CARVALHO, 2005).

É pioneira a secundária inicial, heliófita e higrófila seletiva (LORENZI, 1992). A polinização é realizada por oito espécies de himenópteros (CARVALHO, 2005). O fruto é seco deiscente do tipo criptossâmara e quando maduro libera uma única semente envolvida pelo endocarpo papiráceo, que funciona como ala para dispersão anemocórica (PIETROBOM e OLIVEIRA, 2004). Um estudo realizado em uma área do

Instituto de Botânica de São Paulo demonstrou que a densidade média encontrada para o *S. parahyba* foi de 45 indivíduos adultos por hectare (NASTRI et al. 1992).

Além de ornamental, suas utilizações são predominantemente silviculturais. Sua madeira de coloração branca, leve e macia é utilizada para a confecção de miolos de portas e painéis, brinquedos, aeromodelos e saltos para sapato (LORENZI, 1992). Com produtividade média de 600 m³ por hectare e densidade média de 0,32 g/cm³, (BORTOLETTO JÚNIOR e BELINI, 2002) é considerada excelente para produção de celulose e papel de fibra curta. Também é usada para a produção de lâminas, compensados, caixotaria leve e pesada, móveis e embalagens (BORTOLETTO JÚNIOR e BELINI, 2002). Tem potencial na produção de fármacos, o extrato aquoso de suas folhas é um potente neutralizante de venenos ofídicos (VALE et al., 2011) e sua casca possui propriedade terapêutica adstringente sendo utilizada na medicina popular (CARVALHO, 2005).

Graças ao rápido crescimento é indicada para reflorestamento de áreas degradadas (LORENZI, 2002) e para a restauração de matas ciliares que não inundam (SALVADOR E OLIVEIRA, 1989).

É vastamente utilizada como ornamental no Brasil, principalmente em vias públicas, sendo também encontrada no comércio internacional de plantas ornamentais (FISCHER et al., 2007).

Está naturalmente distribuída em quase toda a América do Sul e Central, no entanto, é utilizada como ornamental em todo o mundo (BARNEBY, 1996). A ocorrência natural foi constatada em Belize, Bolívia, Caribe, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru e Venezuela (<www.tropicos.org>, 2012). No Brasil, ocupa toda a faixa remanescente de Mata Atlântica com adensamentos na região Sul e Sudeste (CARVALHO, 2005).



Figura 3. Distribuição de *Schizolobium parahyba* em território brasileiro. Figura obtida de Carvalho (2005).

Poucos indivíduos são encontrados em restingas e em zonas ripárias e é ausente em vegetações de Cerrado (BARBOSA et al., 2003).

3.2 Estudos genético-moleculares em *S. parahyba*

Em um estudo populacional feito com *S. parahyba* em Belize (KAMAU, MAYES e BARRETT, 2003), foram desenvolvidos 16 pares de *primers* para amplificação de microssatélites para esta espécie, sendo que todos tiveram sucesso na amplificação, gerando um total 38 alelos.

Canchignia-Martínéz et al. (2007) realizaram um estudo com *Schizolobium parahyba* utilizando marcadores moleculares *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), microssatélites e *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). A maior taxa de bandas polimórficas foi obtida com a utilização de marcadores microssatélites.

Foram amostradas 15 populações geograficamente isoladas da América do Sul e Central, nove provenientes do Equador, uma da Bolívia, uma da Costa Rica, uma do Perú e três da Amazônia brasileira. A comparação topológica de dendrogramas feitos por *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic* indicou que os marcadores microssatélites separaram mais claramente os ecótipos comerciais dos nativos, e o limite de confiança para este marcador foi de 88%, frente aos 59% e 50% para AFLP e RAPD, respectivamente. Os marcadores microssatélites mostraram ser a técnica mais robusta para determinar o relacionamento genético entre indivíduos de *Schizolobium parahyba*. A análise da distância dos locos polimórficos demonstrou que ecótipos comerciais cultivados no leste do Equador são muito similares aos da Costa Rica, entretanto, os indivíduos nativos da mesma área são similares aos ecótipos do Brasil, Bolívia e Peru. A introdução de germoplasma da Costa Rica pode ter provocado intercruzamentos com as populações naturais do Equador, visto que houve certo grau de fluxo gênico entre os nativos e os naturalizados. Os ecótipos do Equador possuem 48,8% devido à introdução dos alelos da Costa Rica e compartilharam 23% dos alelos com os demais de sua região ecológica, enquanto que 28,2% pertencem aos ecótipos dos outros países.

Uma análise RAPD foi realizada em cinco populações da região litorânea e serrana do Rio de Janeiro, distribuídos em Ilha Grande, Paraty, Itaguaí, Miguel Pereira e da capital, totalizando 77 indivíduos amostrados e produziu 32 bandas, sendo 31 polimórficas. A análise da correlação de Spearman demonstrou que não houve correlação entre a distância geográfica e a genética (FREIRE et al., 2007).

Ainda não existe consenso a respeito da separação de *S. parahyba* de *Schizolobium amazonicum*, a outra variante do gênero, em duas espécies ou duas variantes. *Schizolobium* era descrito como um gênero que continha as duas espécies, *S. parahyba* (Velloso) Blake e *S. amazonicum* Huber ex. Ducke (DUCKE, 1949). A homogeneidade dos caracteres morfológicos das duas espécies e a distribuição geográfica disjunta não sustentaram esta hipótese e foram unidas na mesma espécie, *Schizolobium parahyba* var. *parahyba* e *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (BARNEBY, 1996).

Em um estudo sistemático e filogeográfico das duas variantes foram utilizados SNPs de seqüências nucleares e cloroplastídicas indicando o efeito vicariante entre as duas variedades, causado pelo isolamento geográfico, climático e reprodutivo do Cerrado brasileiro. Foi observada a possível presença de evolução reticulada explicada por introgressões, hibridizações e retenção de caracteres ancestrais (TURCHETTO-ZOLET, MARGIS e MARGIS-PINHEIRO, 2009), tornando ambígua a distinção entre duas espécies ou variantes.



Figura 4. Distribuição de *S. parahyba* nas américas. Figura obtida de Turchetto-Zolet, Margis e Margis-Pinheiro (2009).

Estudos com dois indivíduos do Sul do Brasil demonstraram que esta espécie possui 24 cromossomos por núcleo diplóide (BIONDO, MIOTTO E SCHIFINO-WITTMANN, 2005).

3.3 Padrões genéticos da invasão biológica

Em genética, a invasão pode ser explicada pelo efeito do fundador, o qual explica que populações podem ser originadas por uma pequena amostra de uma população original (MAYR, 1942; RIDLEY, 2006). Após sucessivas gerações e aumento populacional, as populações fundadas tendem à endogamia por excesso de endocruzamentos e/ou autofertilização devido ao isolamento, fenômeno denominado efeito do gargalo genético (NEI, MARUYAMA e CHAKRABORTY, 1975).

Na maioria dos casos de invasão, a variabilidade genética das populações nativas é maior que das populações invasoras (ZAYED, CONSTANTIN e PACKER, 2007) e se estabelecem com baixa variabilidade gênica, tolerando altos níveis de autofertilização e endocruzamentos, além da recombinação sexual mínima ou desnecessária para a manutenção da espécie (MACK e PYKE, 1983).

Em alguns casos a variabilidade genética pode aumentar durante a formação das populações invasoras. Novos alelos podem ser adicionados por invasão repetitiva, ou seja, pela introdução de novos indivíduos às populações originalmente descendentes apenas dos fundadores (KOLBE et al., 2004; THERRIault et al., 2005). Este incremento gradual de variabilidade genética por novas introduções pode aumentar significativamente a adaptabilidade das populações e criar um efeito positivo no processo invasivo (MALACRIDA et al., 2006).

Dentre os impactos na biodiversidade causados pelas invasões destacam-se as invasões crípticas, que consistem da introdução e fixação de alelos de não nativos em populações nativas (GELLER et al., 1997). Este evento, ao longo de várias gerações, pode suprimir ou extinguir as variações alélicas nativas (GELLER, 2001, SALTONSTALL, 2001). Invasores podem recombinar alelos no *pool* de populações nativas de espécies próximas filogeneticamente gerando hibridizações com ou sem introgressões e, dependendo do grau de heterose e adaptabilidade, o híbrido formado pode ter mais vantagem que a espécie nativa, ocasionando seu declínio, extinção (RHYMER e SIMBERLOFF, 1996) ou a possível origem de um novo táxon (ABBOTT, 1992). As invasões podem favorecer

hibridizações com introgressões (LACK et al., 2012) e existem indícios de que ocorram preferencialmente de nativos para invasores (CURRAT et al., 2008).

Os processos genéticos descritos podem ocorrer com diferentes combinações e, inclusive, em conjunto, resultando em uma rede complexa de interações entre os fatores que contribuem para sucesso da invasão.

O estabelecimento dos invasores depende principalmente do balanço entre os custos e benefícios de fatores decisivos no processo, sendo a adaptabilidade ao novo ambiente, susceptibilidade à depressão endogâmica e introdução de novas variantes (VERHOEVEN et al., 2010).

3.4 *Genotyping by Sequencing por Restriction-Site Associated DNA-Sequencing*

Após o advento do *Next Generation Sequencing* (NGS) foram desenvolvidas técnicas recentes de genotipagem pelo uso de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) em larga escala, que permitem analisar o genoma em sua forma resumida, diminuindo sua complexidade. Estas técnicas são em geral denominadas *Genotyping by Sequencing* (GBS) e dentre estas está incluída a *Restriction-Site Associated DNA-Sequencing* (RAD-seq) (DAVEY et al., 2011).

As técnicas de RAD-seq são virtualmente aplicáveis em qualquer espécie sem a necessidade de caracterização prévia dos SNPs. O número de SNPs gerados depende da enzima escolhida para a restrição e do tamanho e complexidade do genoma.

Baird et. al, (2008) propôs a primeira técnica que reduziu consideravelmente os custos para a genotipagem por RAD-seq. Os SNPs são identificados nas *Restriction-Site Associated DNA-tags* (RAD-tags) e podem gerar fragmentos suficientemente pequenos para serem sequenciados nas *reads* de NGS, tornando possível genotipar várias amostras em *multiplex* quando associadas a um sistema de adaptadores com *barcodes* durante a construção das bibliotecas. No trabalho supracitado, restrições com as enzimas *EcoRI* e *SbfI* totalizaram mais de 13.000 SNPs em duas espécies modelo de grupos filogenéticos consideravelmente distantes, um fungo e um peixe.

A metodologia desenvolvida por Elshire et al. (2011) emprega a digestão do DNA com enzimas de restrição que o cliva em fragmentos cujos sítios de restrição são complementares às extremidades dos adaptadores do sistemas de *barcodes*. São construídos dois grupos de adaptadores, um com os *barcodes* e sequências complementares aos *forward primers* de sequenciamento, que possibilitam sequenciar várias bibliotecas na mesma corrida e outro com sequências complementares aos *reverse primers* de sequenciamento. A técnica de Elshire et al. (2011) diminui drasticamente o custo e tempo de preparo por possuir menor número de etapas durante a construção das bibliotecas e por otimizar o uso dos *primers* e dos adaptadores.

Até o presente trabalho de pesquisa, a abordagem de dupla restrição enzimática (POLAND et al., 2012) era a mais atual e informativa abordagem de RAD-seq por se basear na identificação em alta densidade de SNPs e, dependendo da espécie, pode analisar de 10.000 a 100.000 SNPs. Na abordagem de Poland et al. (2012) são realizadas digestões simultâneas com duas enzimas. Uma das enzimas é usada para clivar o DNA em poucos sítios e gera uma extremidade complementar ao adaptador com *barcode*. A outra enzima cliva o DNA em muitos sítios e produz extremidades complementares aos adaptadores do *reverse primer*. Os fragmentos são gerados em grande quantidade e são escolhidos apenas os que tiverem uma das extremidades clivadas pela enzima de clivagens mais frequentes e outra pela enzima de clivagens menos frequentes. Os adaptadores são ligados nas respectivas extremidades dos fragmentos por uma T4 DNA ligase. Estas bibliotecas individuais são misturadas em *multiplex* e amplificadas na PCR de sequenciamento. As sequências que possuem os adaptadores com o mesmo *barcode* são identificadas como sendo do mesmo indivíduo.

3.5 Hipótese

Os indivíduos de diferentes populações mantêm algum nível de parentesco entre si causado por misturas populacionais.

Não existem relatos da presença de *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* nas áreas de estudo (TURCHETTO-ZOLET, MARGIS e MARGIS-PINHEIRO, 2009) e a ocorrência de introgressões ou hibridizações foram descartadas.

3.6 Objetivos

Geral

Investigar os padrões genéticos de populações invasoras, naturalizadas e regenerantes de *Schizolobium parahyba* pelo uso de RAD-seq.

Específicos

- a) Aplicar procedimentos de genotipagem por RAD-seq como marcador populacional.
- b) Determinar a relação de parentesco entre indivíduos de populações invasoras e naturalizadas em regiões da Floresta Estacional Semidecidual e regenerantes em regiões de Floresta Ombrofila.
- c) Estudar a relação de mistura populacional de invasores e naturalizados.
- d) Estimar parâmetros genéticos para inferir sobre a subestrutura populacional de áreas de ocorrência de *S. parahyba*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material biológico

Foram obtidas amostras de foliólulos de indivíduos invasores e naturalizados em região de Floresta Estacional Semidecidual nos municípios de Tarumã e de Botucatu do Estado de São Paulo, e nativos sob regeneração em região de Floresta Ombrófila do litoral do Estado de São Paulo. Todos os indivíduos amostrados foram georreferenciados com um Sistema de Posicionamento Global (Apêndice Tabela 5). Os foliólulos foram acondicionados em sacos de papel e inseridos em recipientes com sílica gel para dessecação do tecido vegetal e preservação do DNA.

4.2 Áreas de coleta

Tabela 1. Procedências dos indivíduos amostrados de *S. parahyba*. N = número de indivíduos.

Área de coleta	População	N	Tipo de ocorrência
Botucatu	Jardim Chácara dos Pinheiros	6	Naturalizada a Invasora
	Parque Municipal	8	Naturalizada
	Fazenda Experimental Lageado	10	Naturalizada
	Boa Esperança	6	Naturalizada a Invasora
	Garagem Municipal	4	Naturalizada
Tarumã	Tarumã	29	Invasora
	Cândido Mota	7	Naturalizada
Litoral de São Paulo	Caraguatatuba	13	Regenerantes
	Cajati	7	Regenerantes
	Eldorado	7	Regenerantes

Tarumã e Cândido Mota

A população de Tarumã foi estudada no trabalho de Abreu, Santos e Durigan (2013) e forma um povoamento invasor com mais de 60 indivíduos em um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual. O fragmento é propriedade de uma usina de cana-de-açúcar instalada ao lado (Figura 5 B). Há cerca de quatro ou cinco décadas o proprietário da usina plantou uma linha de vários indivíduos de *S. parahyba* em um dos lados da floresta onde desde então ocorre a invasão do fragmento (Figura 5 A).

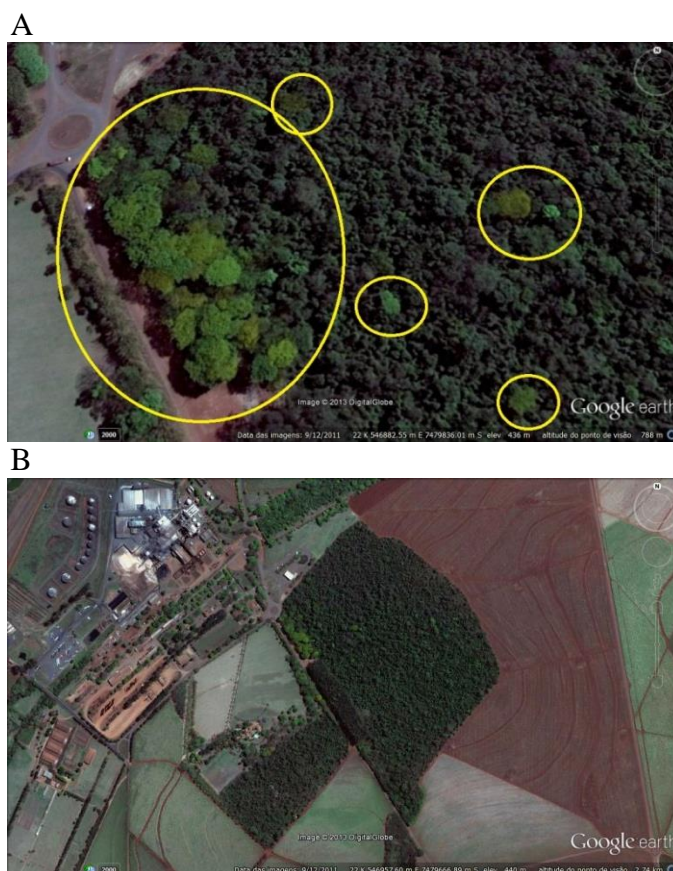


Figura 5. População invasora de Tarumã. Em A os indivíduos destacados pelas elipses. Em B o fragmento ao lado da usina de cana-de-açúcar.

A população de Cândido Mota é constituída de cerca de dez indivíduos presentes em uma fazenda onde ocorre um enriquecimento de espécies. A fazenda possui mais de 300 espécies e juntamente foram plantados alguns exemplares de *S. parahyba* que estão se proliferando, sendo caracterizados como naturalizados (Figura 6). A coleta de material e das informações dos históricos locais foi realizada com o apoio do pessoal do Instituto Florestal de Assis e da pesquisadora Dra. Giselda Durigan.



Figura 6. População de Cândido Mota.

Botucatu

A região de Botucatu é marcada pela presença de diversas populações de *S. parahyba*. As populações do Jardim Chácara dos Pinheiros e Fazenda Boa Esperança invadem zonas ripárias em preservação, que estão sob constante degradação e que estão isoladas em uma matriz urbana (Figura 7) e, por este motivo, são classificadas como naturalizadas a invasoras.



Figura 7. População do Jardim Chácara dos Pinheiros

Todas as populações de Botucatu foram classificadas com o *status* de naturalizadas por ocuparem áreas degradadas. As populações da Garagem Municipal, Fazenda Experimental Lageado (administrada pela Faculdade de Ciências Agrônomicas e vinculada à UNESP) e Parque Municipal são formadas por descendentes de indivíduos que foram plantados para fins de restauração ecológica e paisagismo. Durante as coletas de material foram levantadas informações a respeito do histórico dos locais e possíveis explicações para as ocorrências. As populações do Lageado e do Parque Municipal são, em maioria, descendentes de indivíduos plantados há mais de 30 anos para reflorestamento. Nas décadas seguintes estes indivíduos se proliferaram e se naturalizaram. A Garagem Municipal está situada ao lado de um antigo horto florestal de fornecimento de mudas e sementes. As informações foram obtidas com moradores locais e técnicos do Departamento de Ciência Florestal e do Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP.



Figura 8. Populações amostradas em Botucatu.

Litoral de São Paulo

Nas regiões de Taramã e Botucatu existe predomínio de Floresta Estacional Semidecidual, enquanto que no litoral de São Paulo as populações estão em região de Floresta Ombrófila. No litoral foram amostradas populações em locais de ocorrência natural que estivessem em processo de regeneração. As três populações foram coletadas em

áreas próximas à zona urbana, com características semelhantes às de Botucatu e Tarumã. Estão em áreas degradadas e sob regeneração natural com a fonte de sementes em matas próximas dos locais de ocorrência.

4.3 Extração de DNA

A extração de DNA total foi baseada no método descrito por Doyle e Doyle (1990) com algumas adaptações. Cerca de 10 a 30 mg dos foliólulos foram triturados em moinho com 700 µl de detergente catiônico *Cationic Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) e depositada em tubos de 1,5 ml. A solução foi incubada em banho-maria por uma hora a 60°C. Após a incubação, foi adicionado 500 de CIA 24:1 (24 volumes de clorofórmio e 1 volume de álcool iso-amílico) e foi agitado em vórtex para homogeneização. Em seguida, foi agitado por cinco minutos em mesa agitadora orbital e centrifugado a 13.200 rpm por dez minutos. Após a formação do *pellet*, foi adicionado cerca de 700 µl de isopropanol e os tubos foram invertidos manualmente por dez vezes, em seguida armazenados a -20 °C durante uma hora. Após a precipitação, a solução foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado com 500 µl de álcool 70% e agitado por cinco minutos. Foi novamente centrifugado a 13.200 rpm por um minuto e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi dissolvido em 600 µl de NaCl 1M e 400 µl de isopropanol, centrifugado a 5.000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante descartado. Duas novas lavagens foram feitas com 500 µl de álcool 70% e uma vez com álcool absoluto, agitado por cinco minutos e centrifugando a 13.200 rpm por um minuto em cada lavagem. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* secado. Foi realizado um tratamento do *pellet* com uma solução de 100 µl de TE (Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1 mM, ajustado no pH 8,0) e 0,1 µl de RNase (Ribonuclease-h bovina a 10 mg/ml). As amostras foram armazenadas a -20 °C.

4.4 Quantificação e análise de pureza

As quantidades de DNA genômico, proteínas e impurezas foram obtidas por espectrofotometria com as absorbâncias a 260, 280 e 230 nm respectivamente, no equipamento Nanodrop™. Foi observado que a quantificação executada pelo Nanodrop™

superestimou as concentrações de DNA e uma nova quantificação foi realizada no equipamento Qubit™. A pureza foi averiguada pelas concentrações de DNA que foram duas vezes superiores do que as de proteína e de impurezas.

4.5 *Genotyping by Sequencing por Restriction-Site Associated DNA-Sequencing*

Para a realização da GBS foi desenvolvido um novo protocolo de construção de bibliotecas para RAD-seq realizada pela empresa suíça Fasteris SA.

Construção das bibliotecas de *Restriction-Site Associated-DNA tags* (RAD-tags)

No presente trabalho foi desenvolvido uma nova abordagem de construção das bibliotecas de RAD-tags. É baseada na metodologia de Poland et al. (2012), no entanto foi empregado o uso de quatro enzimas de restrição simultâneas, três para o sítio de clivagem de baixa frequência e uma para o de alta frequência, A Figura 9 traz um esquema da construção das bibliotecas de RAD-tags. Os DNAs genômicos devidamente padronizados foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *MspI* (5'-C\CGG-3'). Esta foi utilizada para as clivagens frequentes, gerando fragmentos com extremidades de fita simples e complementares ao adaptador B. Os adaptadores B foram ligados com uma DNA ligase às extremidades dos fragmentos e o produto dessa digestão foi submetido à uma nova digestão com um *mix* com as enzimas de restrição *NheI* (5'-G\CTAGC-3'), *SpeI* (5'-A\CTAGT-3') e *XbaI* (5'-T\CTAGA-3'), que clivaram em sítios menos frequentes que a *MspI*. Esse mix foi utilizado para clivar no interior dos constructos dos fragmentos gerados pela *MspI* associados aos adaptadores B. O produto de digestão gerou fragmentos com uma das extremidades ligadas a adaptador B e a outra extremidade de fita simples livre gerada pelas clivagens das respectivas enzimas. Nestas extremidades livres foram ligados com DNA ligase os respectivos adaptadores A de cada enzima.

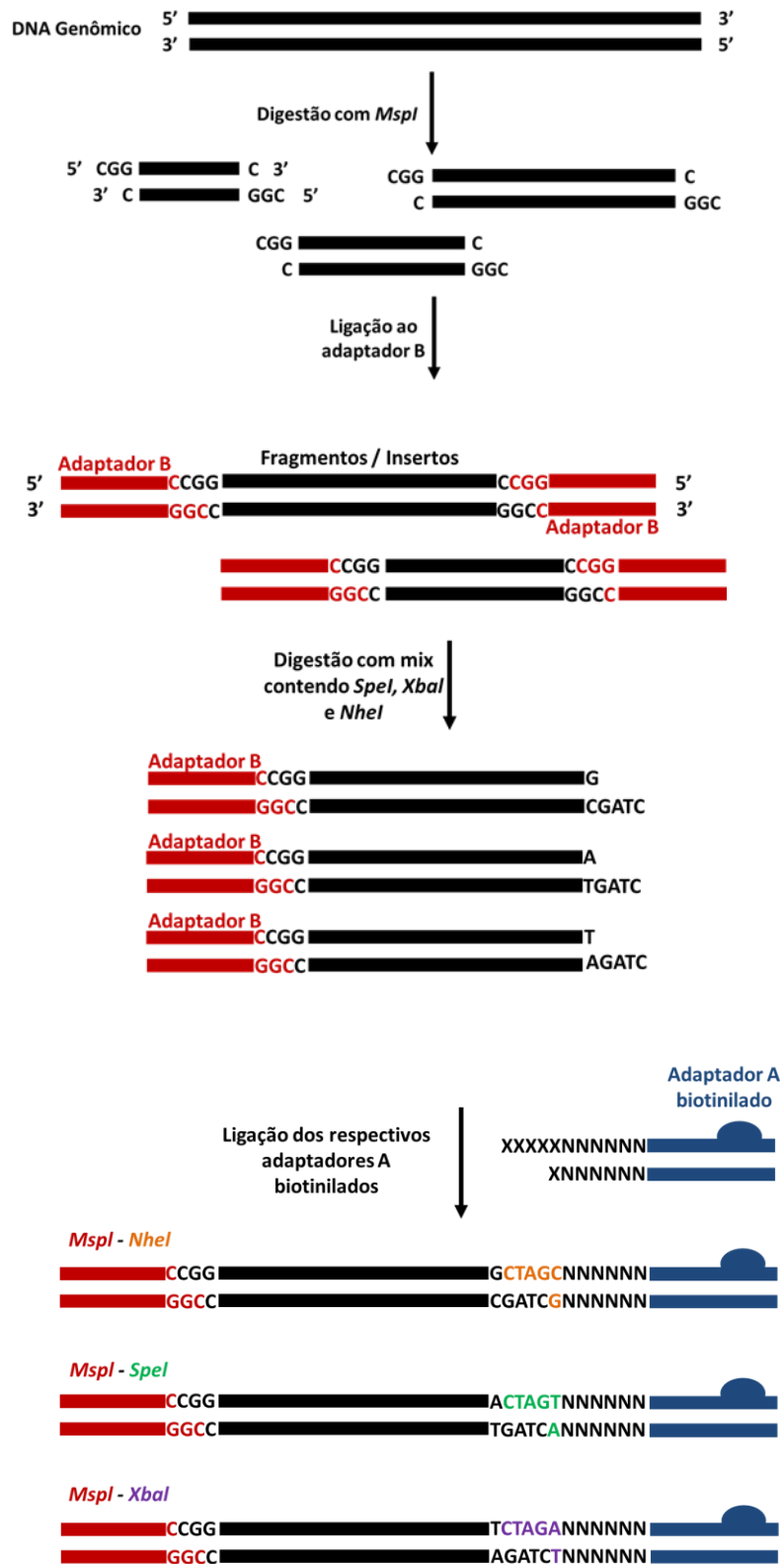


Figura 9. Esquema da construção das bibliotecas RAD-tags com a combinação de uma enzima comum e três variáveis.

Os adaptadores A foram previamente biotinilados e a mistura resultante foi purificada por ligação em *beads* magnéticas de streptavidina para recuperação dos constructos “adaptador A - fragmento - adaptador B”, antes da amplificação por PCR de sequenciamento. Os adaptadores A e B contêm as seqüências *Illumina*TM de anelamento dos *primers* de sequenciamento.

Os constructos formados podem ter três possíveis combinações de adaptadores de acordo com as respectivas clivagens (Figura 10). Os adaptadores A foram construídos com um *barcode* específico para cada amostra a fim de sequenciar todas em um único *multiplex*. Inicialmente os protocolos experimentais foram aplicados somente em duas amostras piloto para então serem aplicadas nas outras amostras.

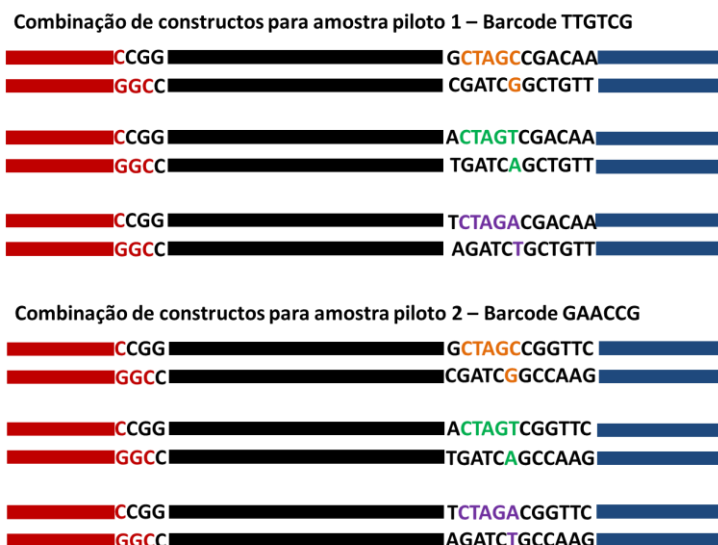


Figura 10. Esquema dos constructos formados com os *barcodes* para as duas amostras piloto.

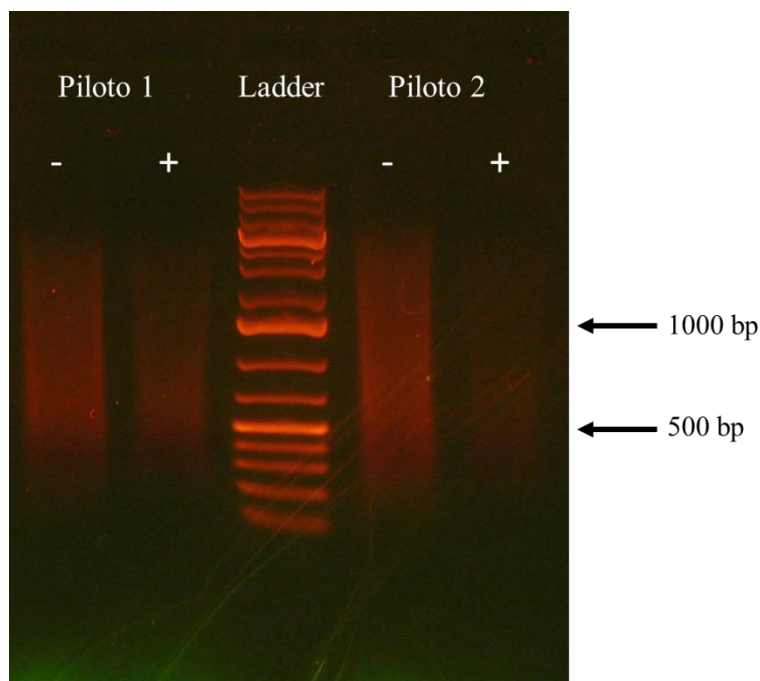


Figura 11. Digestão das amostras piloto de DNA total de *S. parahyba* pela enzima *MspI* e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%. Sinais positivos indicam as amostras clivadas pela enzima e negativos indicam ausência de clivagem.

O sequenciamento das bibliotecas das amostras piloto foi realizado por *single-read* de 100 bp com *Phred Score* acima de 38, fornecendo as seguintes quantidades de *tags*:

Tabela 2. *Tags* produzidas por amostra piloto e por clivagem enzimática.

<i>Tag</i>	Piloto 1	Piloto 2
<i>SpeI</i> - CTAGT	105.547	130.305
<i>XbaI</i> - CTAGA	96.816	129.851
<i>NheI</i> - CTAGC	81.325	121.245
Total	309.022	415.954

Após os testes piloto, foram construídas as bibliotecas para o restante das amostras, que foram sequenciadas todas em *multiplex* na plataforma *HiSeq2000*TM usando

single-read de 50 bp. O sequenciamento de alto desempenho começou a partir do primer complementar ao adaptador A, construído para se ligar nos sítios de clivagem das enzimas *NheI*, *SpeI* e *XbaI*.

4.6 Análise bioinformática

Todas as análises bioinformáticas e computacionais foram realizadas no Laboratório de Bioinformática e Biofísica Computacional do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu da UNESP.

Os arquivos fastq de cada amostra foram fornecidos pela FASTERIS SA com as sequências devidamente processadas, submetidas ao *trimming* e identificadas cada uma por seu *barcode* específico.

Os arquivos foram analisados pelo pacote de programas computacionais *Stacks* (Catchen et al., 2011). *Stacks* foi desenvolvido para realizar diversas análises de dados provenientes de RAD-seq. O *software* analisa desde os dados crus até o fornecimento de dados para construção de mapas genéticos, genômica populacional e filogeográfica. Tem capacidade de processamento de RAD-tags gerados por múltiplas restrições enzimáticas simultâneas e utiliza o modelo estatístico de máxima verossimilhança para identificação dos SNPs e exclusão dos erros de sequenciamento. A função *Process_Radtags* desfaz o *multiplex* e promove o controle de qualidade. Foi escolhido o parâmetro para presença de três ou mais sequências idênticas para constituir uma RAD-tag. As *tags* são reconhecidas pelas sequências presentes no início de cada fragmento. Até o momento presente não existem programas que analisem dados de RAD-seq provenientes de mais de duas restrições enzimáticas simultâneas, inclusive o *Stacks*, dessa forma, as *tags* de duas das enzimas variáveis foram substituídas computacionalmente por apenas uma para reconhecimento pelo *Process_Radtags*. Em seguida foi usado o *Ustacks*, que constrói os locos, fornecendo os SNPs, alelos e *tags* presentes em cada amostra de um sequenciamento *de novo*. O *Cstacks* fez a montagem do catálogo de locos provenientes dos SNPs e o *Sstacks*

realizou a comparação de cada amostra contra o catálogo. Por último foi utilizada a função *populations*, que forneceu as matrizes de genótipos e os parâmetros populacionais.

Por meio do *populations* foram obtidas as heterozigosidades observadas e esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada população e as medidas de diferenciação populacional, que foram determinadas pelo coeficiente de diferenciação populacional:

$$F_{st} = \frac{\sigma^2}{\bar{p}(1 - \bar{p})}$$

Onde σ^2 é a variância e \bar{p} a frequência média do alelo A na população.

4.7 Análises dos dados

Os parentescos entre os indivíduos foram estimados pelo coeficiente de parentesco em Ritland (2000):

$$\Pr(A_i A_j, A_k A_l) = p_i p_j (2 - \delta_{ij})(2 - \delta_{kl}) \left[\Delta_9 p_k p_l + \frac{\Delta_8 ((\delta_{ik} + \delta_{jk}) p_l + (\delta_{il} + \delta_{jl}) p_k)}{4} + \Delta_7 (\delta_{ik} \delta_{jl} + \delta_{il} \delta_{jk}) / 2 \right],$$

onde $A_i A_j$ e $A_k A_l$ são os genótipos de dois indivíduos analisados, Δ_7 , Δ_8 e Δ_9 são respectivamente as probabilidades de identidade por descendência dos dois pares de alelos, de apenas um par e de nenhum entre os dois indivíduos. Para gêmeos idênticos $\Delta_7 = 1$, $\Delta_8 = 0$ e $\Delta_9 = 0$, para parentais e filhos $\Delta_7 = 0$, $\Delta_8 = 1$ e $\Delta_9 = 0$, para irmãos completos $\Delta_7 = 1/4$, $\Delta_8 = 1/2$ e $\Delta_9 = 1/4$, para meio irmãos $\Delta_7 = 0$, $\Delta_8 = 1/2$ e $\Delta_9 = 1/2$ e para primos ou parentes distantes $\Delta_7 = 0$, $\Delta_8 = 1/4$ e $\Delta_9 = 3/4$. O δ representa as frequências genotípicas para cada genótipo representado por seu devido índice. Para o cálculo dos parentescos foi utilizado o programa *Mark* (Kermit Ritland, British Columbia University) com a função *pairwise relationship*. Esta função fornece cada relação de parentesco distribuída em suas probabilidades de serem de parental filho, irmãos completos, meio irmãos, primos ou parentes distantes. Estas relações somadas determinam o parentesco total entre dois indivíduos.

As relações de parentesco entre os indivíduos e de mistura entre as populações foi averiguada pela construção de dendrogramas usando as estimativas de parentesco como medidas de similaridade. Os dendrogramas foram obtidos pelo programa XLSTAT™ (ADDINSOFT™) pelo método de agrupamento de “lincagem” completa por similaridade geral.

Para determinar os padrões genéticos de diferenciação e subestruturação populacional foi utilizado o programa *Structure* (Falush, Stephen e Prichard, 2007). O programa é baseado na realização de simulações para estimar os parâmetros genéticos de diferenciação populacional utilizando o número verdadeiro de *clusters* (K). O número de K *clusters* inferidos são utilizados para identificar a subestruturação populacional pelo programa.

As simulações foram realizadas com os parâmetros de 10.000 para *burning*, 50.000 para MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*), modelo de mistura populacional e frequências alélicas independentes. Foram utilizados dois métodos para determinar a simulação que fornece os dados que mais se aproximam ao do número real de K. Foram realizadas 20 repetições (*runs*) para cada conjunto de simulações para cada número de K inferido. Foi realizado um conjunto de simulações para cada região estudada, uma para Botucatu, uma para o litoral de São Paulo e uma para Tarumã. Em cada repetição, o programa fornece um valor de $\ln P(D)$, que consiste em uma medida da verossimilhança entre cada simulação. O método de Rosenberg et al. (2001) é baseado no comportamento dos valores de $L(K)$, que correspondem às médias dos $\ln P(D)$ de cada conjunto de simulações para cada número de K inferido. O número K de *clusters* mais próximo do real é identificado pelo platô e estabilização da curva do $L(K)$ em função de K. Em seguida foi utilizado o método de Evanno et al. (2005). O método de Evanno é uma versão atualizada do método de Rosenberg e é baseado no ΔK , obtido por $\Delta K = [L''(K)]/\sigma_{L(K)}$, onde $L''(K) = L'(K)_n - L'(K)_{n-1}$ e $L'(K) = L(K)_n - L(K)_{n-1}$, $L(K)$ = média do $\ln P(D)$ das 20 simulações para cada K e $\sigma_{L(K)}$ = desvio padrão de $L(K)$. Neste caso, o número de K *clusters* mais próximo do real é identificado por um pico na curva do ΔK em função de K, indicando uma mudança de segunda ordem nas taxas de verossimilhança. O número de K inferidos por simulação foi de um até o número de populações coletadas por área de estudo acrescido de mais três.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Restriction-Site Associated DNA-Sequencing*

Todas as amostras foram sequenciadas com *Phred Score* igual ou superior a 33 com média de 38. Para cada amostra, foram obtidas em média 2.227.500 sequências e após passar pelo controle de qualidade foram detectadas em média 5.442 sequências com *tags* geradas pela *XbaI*, 5.541 com *NheI* e 6.877 *SpeI*, com uma média total de 17.860 *tags* para cada indivíduo. Foi gerado um total de 5.468 SNPs e 12.305 alelos distribuídos em 4.954 locos polimórficos.

5.2 Análises dos parâmetros genéticos

O agrupamento formado no dendrograma baseado no coeficiente de parentesco formou grupos visivelmente distintos entre si. Os indivíduos de Cândido Mota agrupados no superior do dendrograma (Figura 12) formam um grupo quase isolado que mantém relações de parentesco com o indivíduo 24 de Tarumã (Figura 13).

Dendrograma de parentescos - Cândido Mota e Tarumã

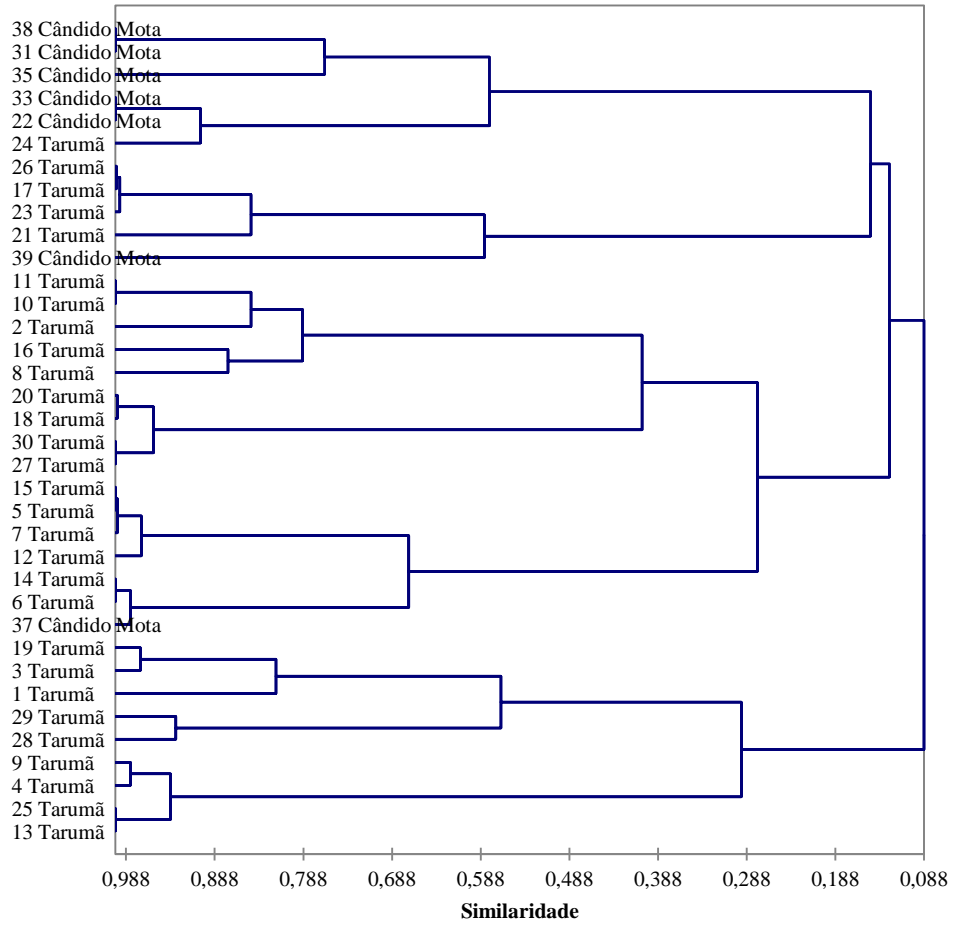


Figura 12. Dendrograma de parentescos entre Tarumã e Cândido Mota.

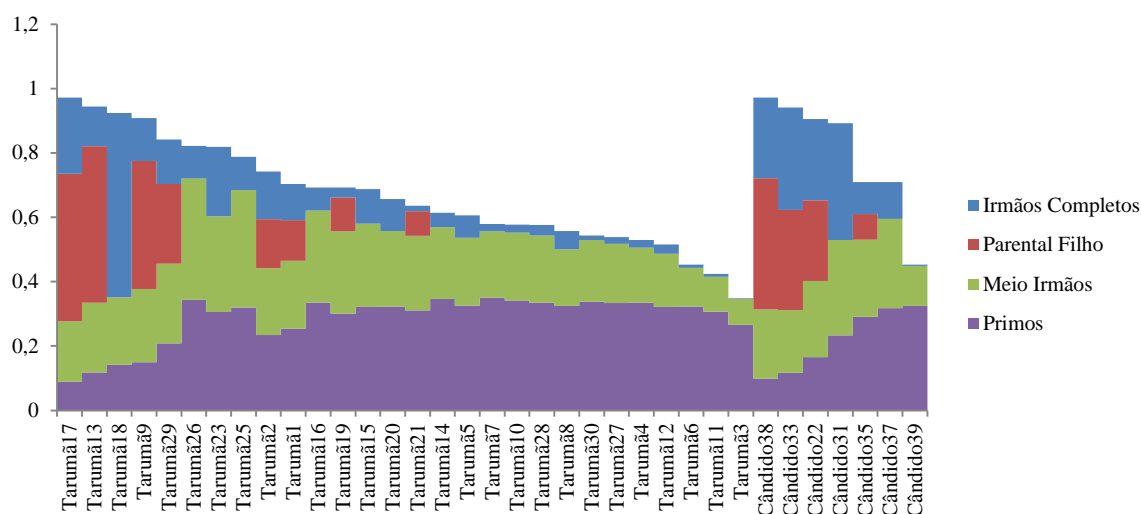


Figura 13. Gráfico da distribuição das probabilidades de parentesco entre os indivíduos de Cândido Mota e Tarumã e o indivíduo 24 de Tarumã.

As probabilidades de parentesco apresentadas no gráfico (Figura 13) mostram que o indivíduo 24 de Tarumã tem alto coeficiente de parentesco com os indivíduos 17, 13, 18 e 9 de Tarumã e 38, 33, 22 e 31 de Cândido Mota. Os tipos de parentescos não permitem detectar a direção da introdução, entretanto, o coeficiente de parentesco é alto entre os indivíduos das duas populações, indicando que existe fluxo de sementes entre as populações. O indivíduo 24 mantém consideráveis probabilidades de ser parental ou irmão completo de indivíduos das duas populações. As observações de parentesco do indivíduo 24 com os demais permitem afirmar que as duas populações possuem um histórico de formação em comum.

Outra alocação por mistura populacional observado no dendrograma (Figura 12) condiz ao indivíduo 37 de Cândido Mota (Figura 14), agrupado na população de Tarumã. Este indivíduo possui relativamente menos parentesco com sua população de origem do que com Tarumã, sendo que as maiores relações de parentesco são de irmãos completos.

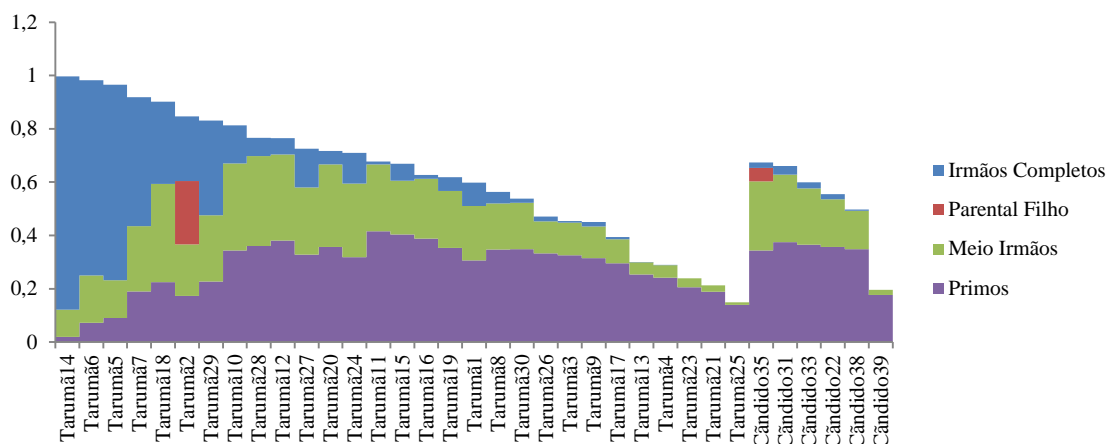


Figura 14. Gráfico da distribuição das probabilidades de parentesco entre os indivíduos de Cândia Mota e Tarumã e o indivíduo 37 de Cândia Mota.

Neste caso é possível verificar que o indivíduo 37 de Cândia Mota é mais aparentado com a população de Tarumã e possui relação de irmão completo com os indivíduos 14, 6, 5, 7, 18, 2 e 29, em contraste das fracas relações de meio irmão com os indivíduos de Cândia Mota. Esta observação sugere que o indivíduo 37 teve sua formação associada à população de Tarumã e, em algum momento, foi inserido em Cândia Mota.

A alocação do indivíduo 39 de Cândia Mota com os indivíduos 26, 17, 23 e 21 de Tarumã (Figura 15) é explicada por uma alta relação de parental filho com 23 e meio irmão a primo com os outros indivíduos, sugerindo que se originou em Tarumã e foi transferido para Cândia Mota, analogamente ao indivíduo 37.

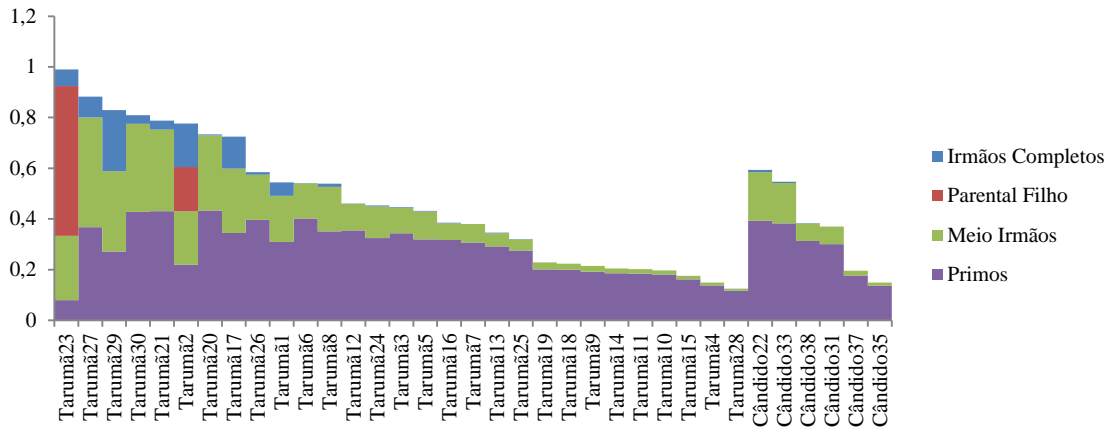


Figura 15. Gráfico da distribuição das probabilidades de parentesco entre os indivíduos de Cândia Mota e Tarumã e o indivíduo 39 de Cândia Mota.

Dendrograma de Parentescos - Litoral de São Paulo

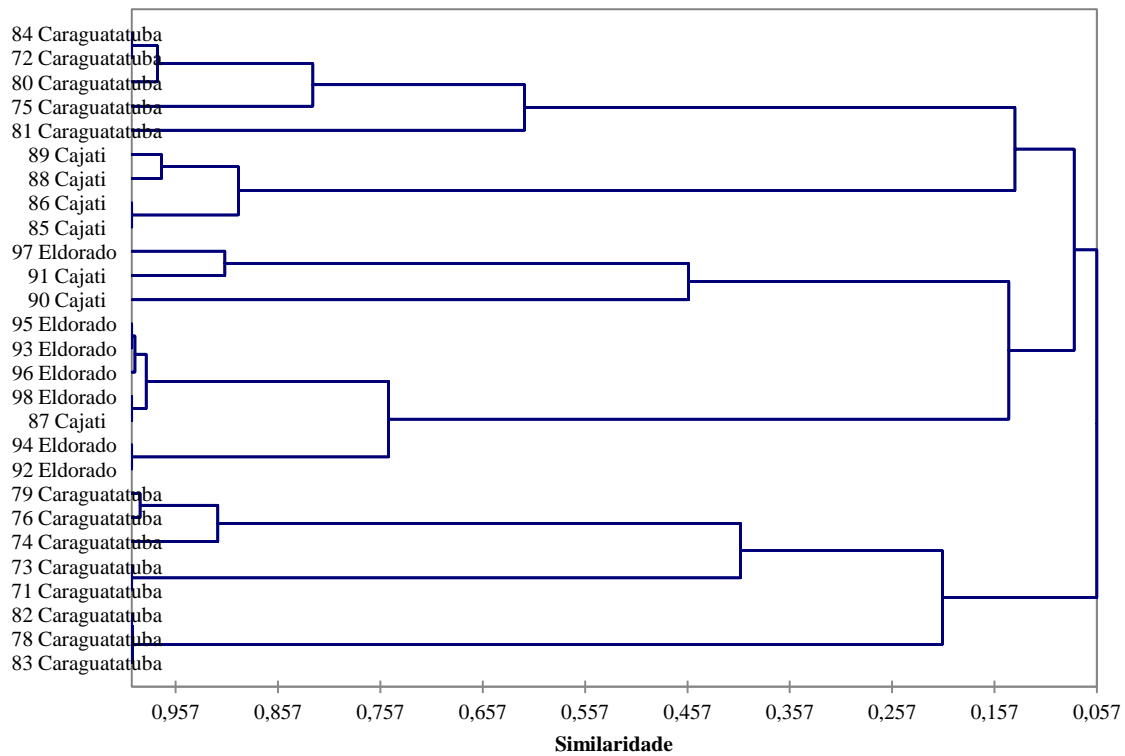


Figura 16. Dendrograma de parentesco entre os indivíduos do litoral de São Paulo.

O dendrograma obtido para as três populações do litoral de São Paulo (Figura16) formou grupos relativamente isolados, um indivíduo de Cajati foi agrupado em Eldorado e outro de Eldorado foi agrupado em Cajati. No gráfico de distribuição dos parentescos entre o indivíduo 97 e os presentes nas outras populações do litoral de São Pulo (Figura 17) é possível observar que este possui alto nível de parentesco com ambas as populações. Este fato demonstra que as populações de Eldorado e Cajati estão dentro do mesmo contexto de formação. O mesmo foi observado para o indivíduo 87 de Cajati (Figura 18) que, entretanto, possui mais parentesco com indivíduos de Eldorado com altas relações de irmão completo e entre parental filho.

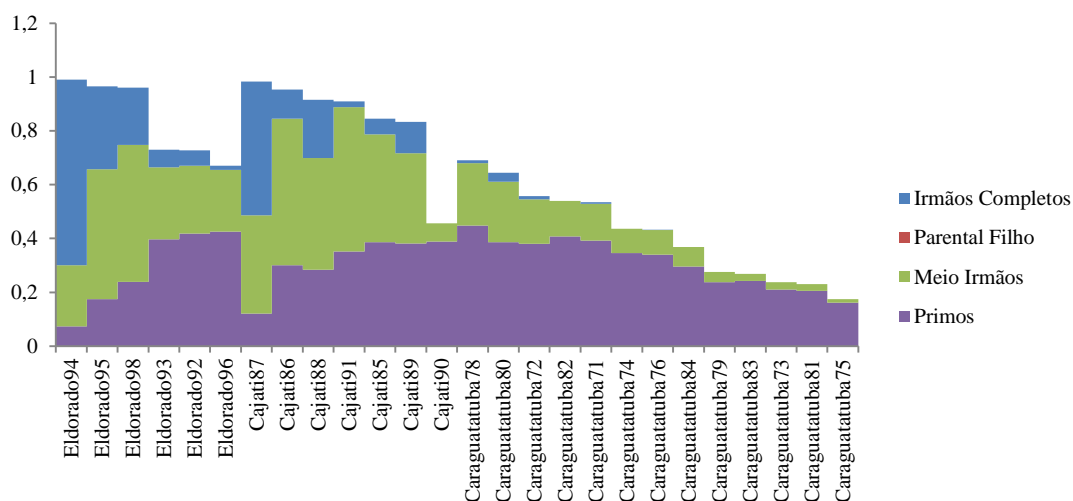


Figura 17. Gráfico da distribuição das probabilidades de parentesco entre os indivíduos do litoral de São Paulo e o indivíduo 97 de Eldorado.

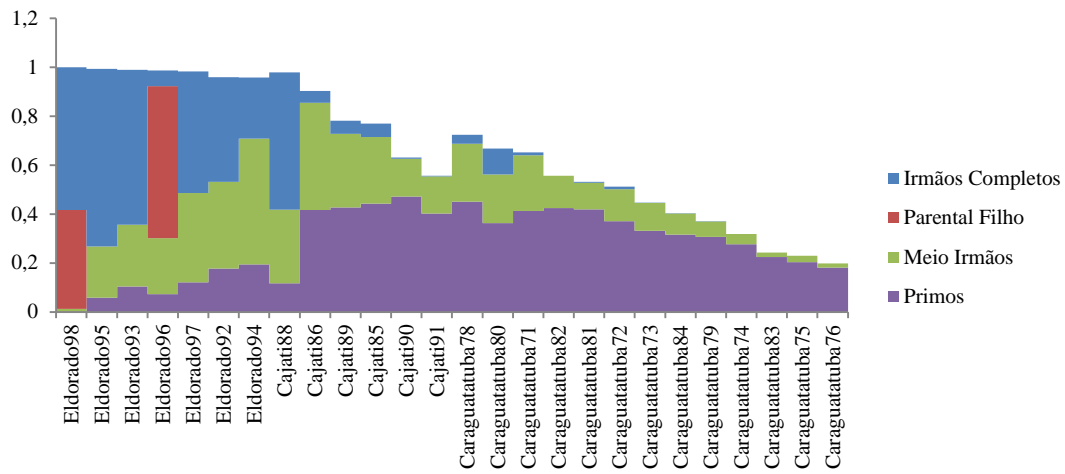


Figura 18. Gráfico da distribuição das probabilidades de parentesco entre os indivíduos do litoral de São Paulo e o indivíduo 87 de Cajati.

Dendrograma de Parentescos - Botucatu

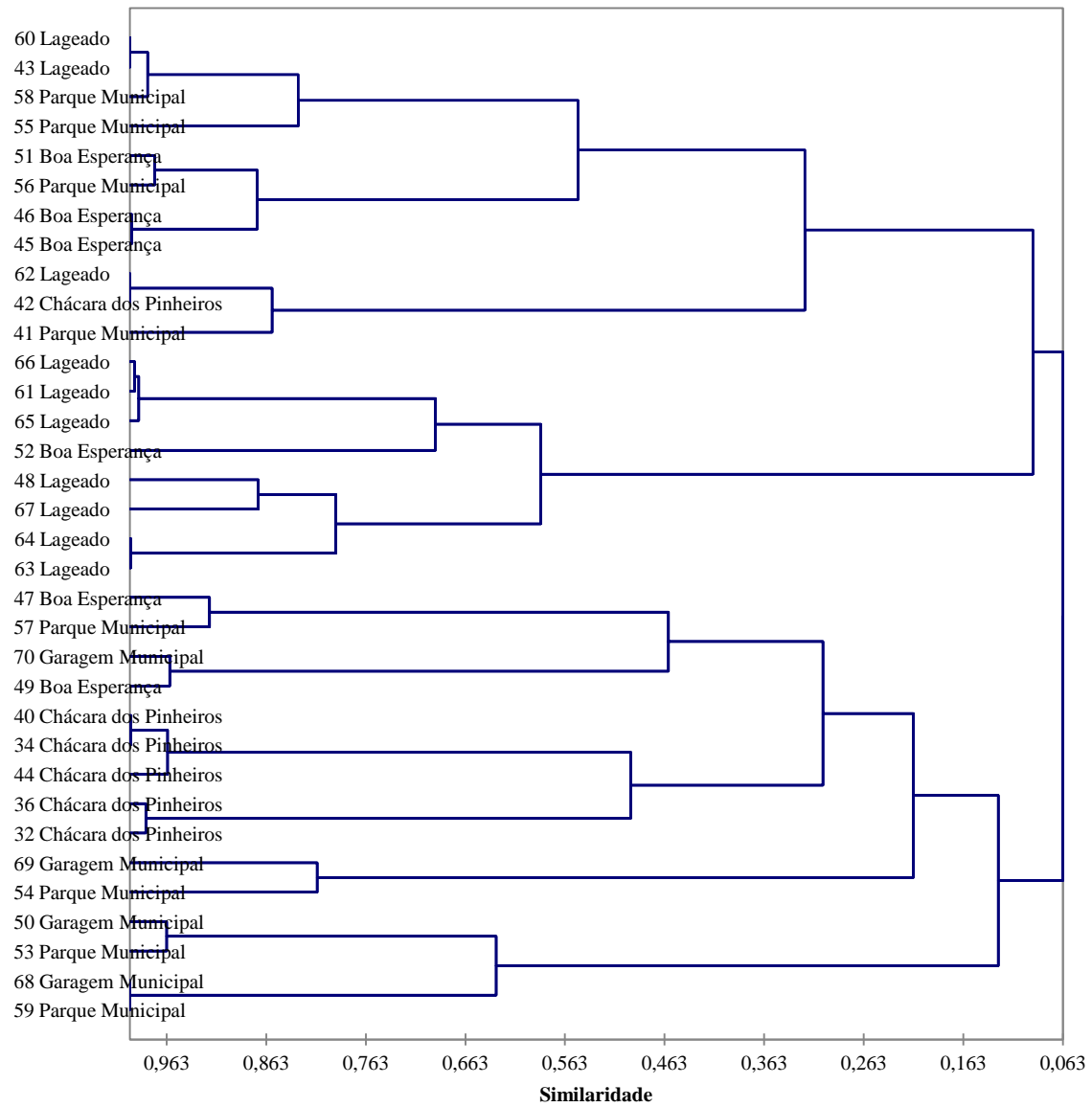


Figura 19. Dendrograma de parentesco entre os indivíduos de Botucatu.

O dendrograma da área de estudo de Botucatu (Figura 19) apresentou translocações de indivíduos entre quase todas as populações e com alto nível de mistura entre as populações.

As populações do Parque Municipal, Garagem Municipal e da Fazenda Experimental Lageado estão dispersas ao longo de todos os grupos formados no dendrograma e com alto parentesco entre si, indicando que possuem uma formação em comum.

Todos os indivíduos amostrados na Garagem Municipal possuem mais parentesco com outras populações que com a sua própria. A Garagem Municipal está situada ao lado de um antigo horto florestal para fornecimento de mudas e sementes. Uma possível explicação para a disseminação do material genético dessa população em Botucatu se dá pelo uso das sementes de árvores próximas ao horto para a produção e venda das mudas. Um dos locais que possuem indivíduos supostamente provenientes deste horto é a fazenda Boa Esperança, cuja população é naturalizada a invasora de uma zona ripária. *S. parahyba* é considerada ótima para reflorestamentos matas ciliares (SALVADOR E OLIVEIRA, 1989) e possivelmente foi utilizada para restauração ecológica destes locais invadidos. De forma análoga, os indivíduos presentes na fazenda Boa Esperança possuem alto parentesco com indivíduos do Parque Municipal e fazenda Experimental Lageado.

Os altos parentescos observados entre indivíduos de diferentes populações em Botucatu podem ter relação com a coleta de sementes da própria região para a produção de mudas e uso para fins ornamentais ou para arborização urbana, esta pode ser outra explicação plausível para o início da ocupação e consequentes naturalizações e invasões.

A população considerada naturalizada a invasora no Jardim Chácara dos Pinheiros forma um único agrupamento, indicando ser constituída por um único evento de fundação, entretanto, o indivíduo 42 possui alto grau de parentesco com indivíduos amostrados em todas as populações de Botucatu (Figura 20).

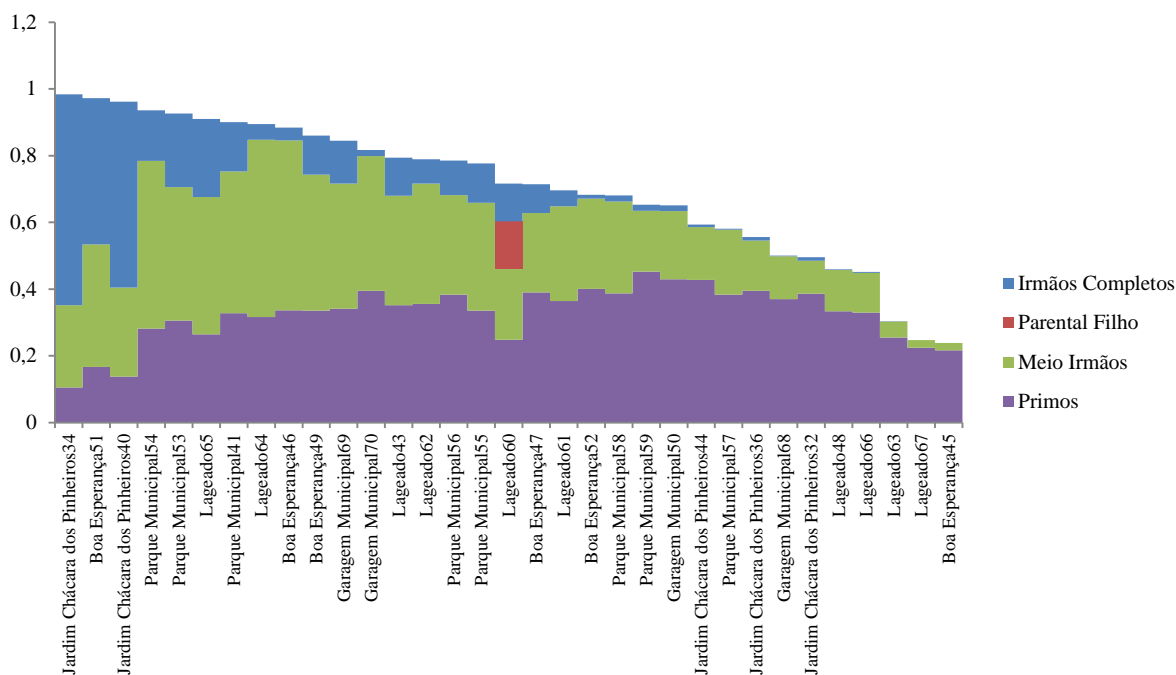
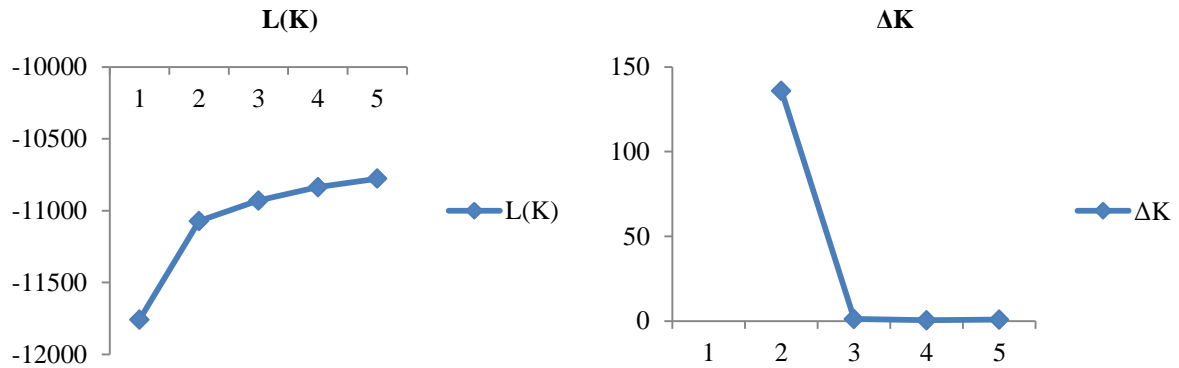


Figura 20. Gráfico da distribuição das probabilidades de parentesco entre todos os indivíduos de Botucatu e o indivíduo 42 do Jardim Chácara dos Pinheiros.

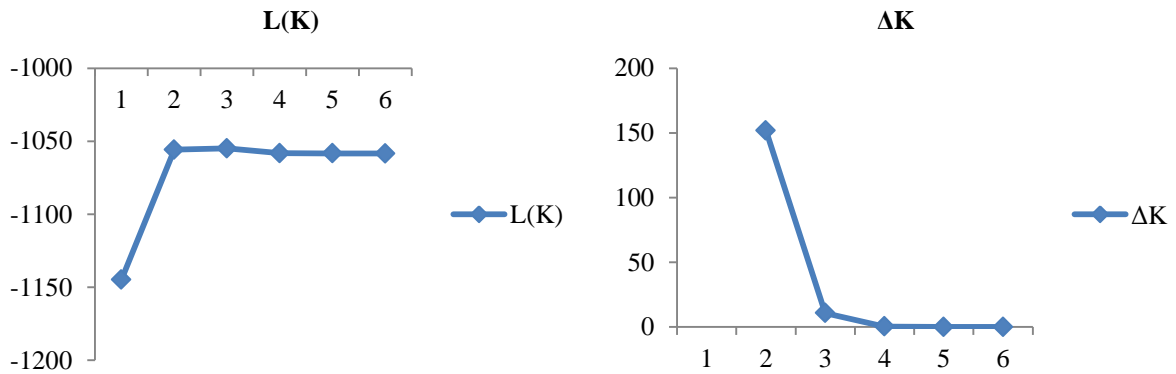
As probabilidades de parentesco entre o indivíduo 42 e 62 são de 0,073 para irmãos completos, 0 para parental filho, 0,36 para meios irmãos e 0,356 para primos. Estes dados são um exemplo de como estes indivíduos são parentes distantes, mas com forte relação de parentesco, estimada em 0,789. De forma análoga, os indivíduos invasores presentes na Fazenda Boa Esperança possuem parentesco com indivíduos do Parque Municipal e do grupo formado por indivíduos do Lageado.

O gráfico do indivíduo 42 mostra um exemplo do intenso processo de mistura populacional em Botucatu. As estimativas acima de 0,8 estão entre os indivíduos de todas as populações amostradas com relações de irmãos completos e meios irmãos. Esta observação permite inferir que houve cruzamento de material genético entre a maioria dos indivíduos das populações amostradas em Botucatu.

Tarumã e Cândido Mota



Litoral



Botucatu

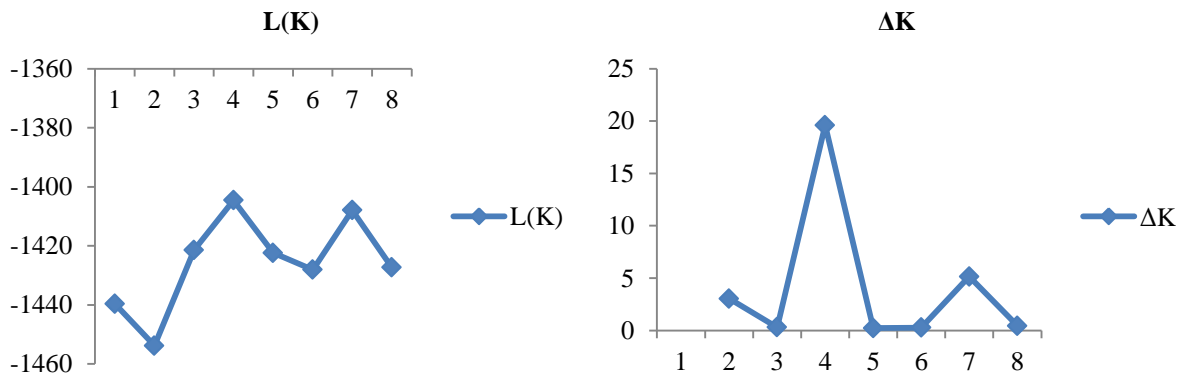


Figura 21. Dispersão dos valores de $L(K)$ e ΔK em função do número de *clusters* “K” simulados no programa *Structure* para as três áreas estudadas.

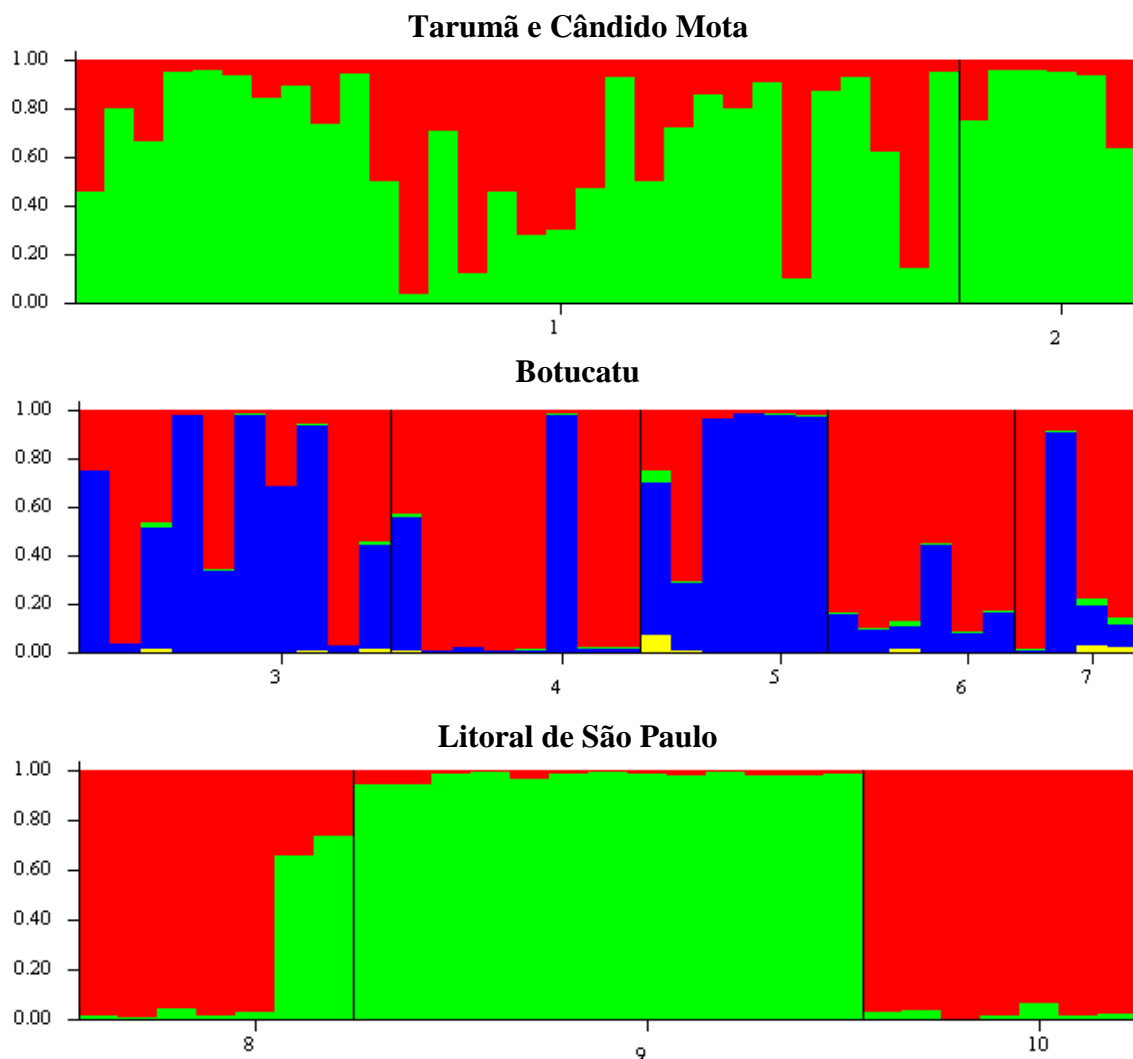


Figura 22. Distribuição da subestrutura populacional para cada área de estudo. 1=Tarumã, 2=Cândido Mota, 3=Jardim Chácara dos Pinheiros, 4=Parque Municipal, 5=Fazenda Experimental Lageado, 6=Boa Esperança, 7=Garagem Municipal, 8=Cajati, 9=Caraguatatuba, 10=Eldorado.

Os gráficos de $L(K)$ e ΔK (Figura 21) demonstram que as populações de Tarumã e Cândido Mota possuem subestruturação populacional e compartilham de dois *clusters*. A distribuição dos *clusters* entre as populações (Figura 22) indica que apesar de terem diferenciação na subestrutura populacional, estas compartilham dos dois *clusters* de forma relativamente equilibrada. As misturas populacionais observadas nos dendrograma de parentesco podem ser as explicações para este compartilhamento. De forma análoga à região de Tarumã, a região do litoral de São Paulo possui subestruturação populacional e

compartilha de dois *clusters*. A distribuição dos *clusters* corrobora com as observações no dendrograma de parentesco. As populações de Cajati e de Eldorado compartilham quase que exclusivamente do mesmo *cluster* (em vermelho). Pode-se destacar que a população de Caraguatatuba possui um *cluster* quase exclusivo (em verde), exceto pelo fato de compartilhar em grande parte este *cluster* com dois indivíduos de Cajati. Na região de Botucatu, a dispersão dos valores de L(K) teve um comportamento anômalo, porém foi observada subestruturação populacional em quatro *clusters* distintos na dispersão dos valores de ΔK . A distribuição da subestrutura nas cinco populações estudadas é altamente heterogênea e os quatro *clusters* estão presentes em todas as populações. Esta distribuição pode ser explicada pelo alto nível de mistura populacional observado no dendrograma de parentesco.

Tabela 3. Número de sítios analisados, porcentagem de polimorfismo e heterozigidade observada (H_e obs) e esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e esp) para os locos polimórficos. Foram incluídos os resultados dos testes piloto.

População	Sítios	% Polimorfismo	Locos polimórficos	
			H_e obs	H_e esp
Tarumã	379609	0.4341	0,8139	0,4488
Cândido Mota	11564	0.1470	0,2460	0,1425
Jardim Chácara dos Pinheiros	8036	0.1368	0,1328	0,1409
Parque Municipal	8634	0.1737	0,2478	0,1603
Fazenda Experimental Lageado	8592	0.1629	0,1620	0,1332
Boa Esperança	7290	0.2194	0,2138	0,1554
Garagem Municipal	6894	0.1305	0,1238	0,1043
Caraguatatuba	8681	0.1958	0,1629	0,1049
Cajati	6346	0.2048	0,1761	0,1459
Eldorado	6446	0.1551	0,1635	0,1146

Com relação à variabilidade genética, na população de Tarumã foi observada a maior variabilidade (Heterozigidade esperada, Tabela 3), que contradiz as afirmações de que as populações invasoras possuem baixa variabilidade genética (ZAYED, CONSTANTIN e PACKER, 2007; MACK e PYKE, 1983). A possível explicação pela alta Heterozigidade esperada se dá pela seleção local como pressão seletiva por heterozigotos. De acordo com o levantamento do histórico das populações de Botucatu, houve no passado

translocação de material genético entre várias populações e este pode ter sido o fator que mantém a diversidade genética em níveis próximos aos do litoral de São Paulo. No litoral, as populações foram amostradas em condições semelhantes à Botucatu, distribuídas em locais próximos da zona urbana, entretanto, estas populações estão em fluxo gênico com populações nativas e possivelmente os valores de heterozigosidade esperada seja explicada pela localização geográfica.

Tabela 4. Diferenciação populacional (F_{st}) obtida entre as populações com o programa *populations* do pacote *Stacks*. Tar=Tarumã, CM= Cândido Mota, JCP=Jardim Chácara dos Pinheiros, PM=Parque Municipal, FEL=Fazenda Experimental Lageado, BE=Boa Esperança, GM=Garagem Municipal, Car=Caraguatatuba, Caj=Cajati, Eld=Eldorado.

	CM	JCP	PM	FEL	BE	GM	Car	Caj	Eld
Tar	0,0872	0,1849	0,0250	0,1250	0,1772	0,3249	0,0871	0,0674	0,0762
CM		0,0936	0,0675	0,1225	0,0904	0,3342	0,0349	0,0899	0,1287
JCP			0,0545	0,0413	0,0647	0,0614	0,1854	0,0859	0,1532
PM				0,0510	0,0522	0,0452	0,1075	0,0721	0,1443
FEL					0,0601	0,0727	0,0718	0,0769	0,1147
BE						0,0856	0,2073	0,1185	0,1470
GM							0,3259	0,0641	0,1281
Car								0,0619	0,0953
Caj									0,0409

Em confluência com a subestruturação populacional e o alto valor para a variabilidade genética observada em Tarumã, a diferenciação populacional entre a mesma e Cândido Mota é baixa (Tabela 4), fato corroborado pelos compartilhamentos de *clusters* e translocações de indivíduos no dendrograma de parentesco.

O modelo conceitual de invasão proposto por Richardson e Pysek (2006) considera a transposição de barreiras ecológicas para incluir espécies no *status* de invasoras, naturalizadas ou simplesmente não nativas. A capacidade de transpor estas barreiras está diretamente ligada ao conceito de invasividade, ou seja, o potencial invasor de uma espécie. Durante o presente estudo foi constatado que *S. parahyba* têm a capacidade de

transpor todas as barreiras e pode ser considerada uma espécie invasora de Florestas Estacionais Semidecíduais.

As misturas populacionais podem beneficiar as populações invasoras e o processo invasivo aumentando a adaptabilidade local por incremento de variabilidade genética. Estes incrementos diminuem a depressão endogâmica causada pelo isolamento (VERHOEVEN et al., 2010). Os incrementos de genes nas populações invasoras pode determinar o sucesso da invasão. Interações epistáticas e a ação de poucos genes podem ser causas determinantes de processos invasivos (LEE, 2002).

O monitoramento genético, sobretudo associado à NGS, pode identificar rotas de dispersão entre espécies invasoras e estabelecer planos de contenção de invasões. A identificação do horto florestal como a provável fonte dos invasores e naturalizados de Botucatu é um exemplo de rastreamento de fontes de introdução de espécies, que pode ser aplicado em outros modelos biológicos. Os resultados demonstraram que o intenso processo de mistura populacional em Botucatu se deu pela ação antrópica.

O presente trabalho de pesquisa demonstrou que os novos métodos de genotipagem por RAD-seq podem ser ferramentas poderosas para estudos de invasão biológica. A nova abordagem apresentada de RAD-seq com quatro restrições enzimáticas simultâneas pode ser aplicada em qualquer espécie, tornando o monitoramento genético de espécies invasoras aplicável em qualquer circunstância. A técnica mais informativa para análise genético populacional é o sequenciamento de genomas individuais inteiros. A principal vantagem do uso de RAD-seq como marcador molecular populacional se dá pelo baixo custo de implementação em relação ao sequenciamento de genomas inteiros. A RAD-seq pode ser considerada uma forma de diminuir a complexidade de genomas, fornecendo uma representação dos genomas individuais.

6 CONCLUSÕES

- Em Botucatu e em Cândido Mota as populações naturalizadas e invasoras de *Schizolobium parahyba* estão em processo de mistura populacional.
- O processo de mistura está ocorrendo entre populações invasoras e naturalizadas.
- O uso de RAD-seq como marcador genético populacional pode ser utilizado como uma poderosa ferramenta para detecção dos padrões genéticos e monitoramento de populações invasoras e naturalizadas.

O presente projeto de pesquisa foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo com a concessão de uma bolsa acadêmica de mestrado identificada pelo processo n° 2011/16044-1, e um auxílio pesquisa regular identificado pelo processo n° 2012/20629-8.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, R. J. Plant invasions, interspecific hybridization and the evolution of new plant taxa. **Tree**, v. 7, n. 12, p. 401-405, 1992.

ADDINSOFT. XLSTAT: statistical analysis software. Versão 2010. 2010.

Baird, N. A.; Etter, P. D.; Atwood, T. S.; Currey, M. C.; Shiver, A. L.; Lewis, Z. A.; Selker, E. U.; Cresko, W. A.; Johnson, E. A. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. **Public Library of Science Online**, v. 3, n. 10, 2008.

Barbosa, L. M.; Barbosa, J. M. K. C.; Potomati, A.; Martins, S. E. L. M.; Asperti, A. C.; Galvão de Melo, P. G.; Carrasco, S. dos A.; Castanheira, J. M.; Piliackas, W. A.; Contieri, D. S.; Mattioli, D. C.; Guedes, N. S.; Junior, P. M.; Siqueira e Silva, A. P. Recuperação florestal com espécies nativas no estado de são paulo: pesquisas apontam mudanças necessárias. **Florestar Estatístico**, v. 6, n. 14, 2003.

Barneby, R. C. Neotropical Fabales at NY: Asides and oversides. **Brittonia**, n.48, p.174-187, 1996.

Biondo, E.; . Miotto, S. T. S.; Schifino-Wittmann, M. T. Números cromossômicos e implicações sistemáticas em espécies da subfamília Caesalpinioideae (Leguminosae) ocorrentes na região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.4, p.797-808, 2005.

Blum, C. T.; Borgo, M.; Sampaio, A. C. F. Espécies exóticas invasoras na arborização de vias públicas de Maringá-SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, Piracicaba, v.3, n.2, p.78-97, 2008.

Bortoletto Júnior, G.; Belini, U. L. Produção de lâminas e manufatura de compensados a partir da madeira de guapuruvu (*Schizolobium parahyba*) proveniente de um plantio misto de espécies nativas. **Cerne**, v.8, n.2, p.001-016, 2002.

Canchignia-Martínez, H. F.; Hernández-Delgado, S.; Gonzáles-Paz, M.; Motte, E.; Mayek-Péres, N. Genetic relationships among *Schizolobium parahybum* (Vell.) Blake (Leguminosae) ecotypes from ecuador and other countries. **Silvae Genetica**, 2007.

Carvalho, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. **EMBRAPA Florestas Informação Tecnológica**, Colombo, v. 1-2, 2005.

Catchen, J., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., Postlethwait. Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. **G3: Genes, genomes, genetics**, v. 1, p.171-182, 2011.

Currat, M.; Ruedi, M.; Petit, R. J.; Excoffier, L. The Hidden Side of Invasions: Massive Introgression by Local Genes. **Evolution**, n. 62(8), p. 1908-1920, 2008.

Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., Blaxter, M. L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. **Nature Reviews – Genetics**, v. 12, p. 499-510, 2011.

Doyle, J.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 1990.

Ducke, A. Notas sobre a flora neotrópica: As leguminosas da Amazônia brasileira, Belém, 1949.

Durigan, G. Diagnóstico y control de plantas invasoras en las áreas protegidas del Estado de Sao Paulo, Brasil. **Boletín de la Red Latinoamericana Para el Estudio de Plantas Invasoras**, v. 1, n. 1, p. 11-16, 2011.

Elshire, R. J.; Glaubitz, J. C.; Sun, Q.; Poland, J. A.; Kawamoto, K.; Buckler, E. S.; Mitchell, S. E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **Public Library of Science Online**, v. 6, n. 5, 2011.

Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v 14, p.2611-2620, 2005.

Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, v.7,p.574–578, 2007.

Fischer, S. Z.; Stumpf, E. R. T.; Heiden, G.; Barbieri, R. L.; Wasum, R. A. Plantas da flora brasileira no mercado internacional de floricultura. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 510-512, 2007.

Freire J. M.; Piña-Rodrigues, F. C.; de Lima, M. E. R.; Sodré S. R. C.; Corrêa R. X.Estrutura genética de popula es de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvu) por meio de marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, n. 74, p. 27-35, 2007.

Geller, J. B. Decline of a Native Mussel Masked by Sibling Species Invasion. **Conservation Biology**, v.13 , n.3 , p 661-664. 1999.

Geller, J. B., Walton, E. D., Grosholz, E. D., Ruiz, G. M. Decline of a Native Mussel Masked by Sibling Species Invasion. **Molecular Ecology**, v.6, p. 901 – 906, 1997.

Kamau, E. M.; Mayes, S.; Barrett, J. A. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Schizolobium parahyba* (Leguminosae). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 469–470, 2003.

Kolbe, J. J.; Glor, R. E.; Schettino, L. R.; Lara, A. C.; Larson, A.; Losos, J. B. Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. **Nature**, v. 431, p.177-181, 2004.

Lack, J. B.; Greene, D. U.; Conroy, C. J.; Hamilton, M. J.; Braun, J. K.; Mares, M. A.; Bussche, V. D. Invasion facilitates hybridization with introgression in the *Rattus rattus* species complex. **Molecular Ecology**. n. 21, p. 3545-3561, 2012.

Lee, C. E. Evolutionary genetics of invasive species. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, p.386-391, 2002.

Lorenzi, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 1ª edição. Nova Odessa: Plantarum, 1992, 352 p. v. 1.

Lynch, M.; Ritland, K. Estimation of Pairwise Relatedness With Molecular Markers. **Genetics**, n. 152, p. 1753–1766, 1999.

Mack, R. N.; Pyke, D. A. The demography of *Bromus tectorum*: variation in time and space. **Ecology**, v.71, p. 69-93, 1983.

Malacrida, A. R.; Gomulski, L. M.; Bonizzoni, M.; Bertin, S.; Gasperi, G.; Guglielmino, C. R. Globalization and fruitfly invasion and expansion: the medfly paradigm. **Genetica**, n. 131, p 1–9, 2007.

Mayr, E. Systematics and origin of species from a pointview of a zoologist. 1942.

Nastri, V. D. F.; Catharino, E. L. M.; Rossi, L.; Barbosa, L. M.; Pirré, È.; Bedinelli, C.; Aasperti, L. M.; Dorta, R. de O.; Costa, M. P. da. Estudos fitossociológicos em uma área do Instituto de Botânica de São Paulo utilizados em programas de educação ambiental. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 4, pt. 1, p. 219-225, 1992.

Nei, M.; Maruyama, T.; Chakraborty, R. The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. **Evolution**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 1975.

Página da Tropicos.org. Saint Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden, 2013. Disponível em <<http://www.tropicos.org/Name/13006414>>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2013.

Pietrobon, R. de C. V.; Oliveira, D. M. T. Morfoanatomia e ontogênese do pericarpo de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.4, p.767-779, 2004.

Poland, J. A.; Brown, P. J.; Sorrells, M. E.; Jannink, J. L. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by- sequencing approach. **Public Library of Science Online**, v. 7, n. 2, 2012.

Ramos, V. S.; Durigan, G.; Franco, G. A. D. C.; Siqueira, M. F. de; Rodrigues, R. R. **Árvores da floresta estacional semidecidual: guia de identificação de Espécies**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 2008. 320 p.

Rhymer, J. M.; Simberloff, D. Extinction by Hybridization and Introgression. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, n. 27, p. 83-109, 1996.

Richardson, D. M.; Pyšek, P. Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invisibility. **Progress in Physical Geography**, v. 30, n. 3 p. 409–431, 2006.

Ridley, M. **Evolução**. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed. 2006.

Ritland, K. Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. **Molecular Ecology**, V. 9, p.1195-1204, 2000.

Rosenberg, N. A., Burke, T., Elo, K. Empirical evaluation of genetic clustering method using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. **Genetics**, n. 159, p.699-713, 2001.

Saltonstall, K. Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America. **Proceedings of the National Academy of Science**, St. Louis, v. 99, n. 4, p. 2445-2449, 2001.

Salvador, J. L. G.; Oliveira, S. B. **Reflorestamento ciliar de açudes**. São Paulo, 14 p., 1989.

Therriault, T. W.; Orlova, M. I.; Docker, M. F.; MacIsaac, H. J.; Heath, D. D. Invasion genetics of a freshwater mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*) in eastern Europe: high gene flow and multiple introductions. **Heredity**, n. 95, p. 16–23, 2005.

Turchetto-Zolet, A. C., Cruz, F., Vendramin, G. G., Simon, M. F., Salgueiro, F., Margis-Pinheiro, M., Margis, R. Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, n. 1, p 174-182, , outubro de 2012.

Turchetto-Zolet, A. C.; Margis, R.; Margis-Pinheiro, M. **Filogeografia e Sistemática Molecular de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Guapuruvu) através do seqüenciamento de regiões cloroplásticas e nucleares**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

Vale, L. H. F.; Mendes, M. M.; Fernandes, R. S.; Costa, T. R.; Hage-Melim, L. I. S.; Sousa, M. A.; Hamaguchi, A.; Homsí-Brandeburgo, M.I.; Franca, S. C.; Silva, C. H. T. P.; Pereira, P. S.; Soares, A. M.; Rodrigues, V. M. Protective Effect of *Schizolobium parahyba* Flavonoids Against Snake Venoms and Isolated Toxins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v. 11, n. 20, p. 2566-2577, 2011.

Verhoeven, K. J. F.; Macel, M.; Wolfe, L. M.; Biere, A. Population admixture, biological invasions and the balance between local adaptation and inbreeding depression. **Proceedings of the Royal Society**, 2010.

Weir, B. S., Cockerham, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Populations Structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, 0.1358-1370, 1984.

Zayed, A.; Constantin, S. A.; Packer, L. Successful biological invasion despite a Severe Genetic Load. **Public Library of Science Online**, Ontario, v. 8, p.6, 2007.

APÊNDICE

Tabela 5. Distribuição das Coordenadas em Universal Transversa de Mercator (Datum GWS84).

Indivíduo	População	Coordenadas em UTM	
1	Tarumã	22K546767	UTM7479825
2	Tarumã	22K546768	UTM7479826
3	Tarumã	22K546769	UTM7479827
4	Tarumã	22K546770	UTM7479828
5	Tarumã	22K546771	UTM7479829
6	Tarumã	22K546772	UTM7479830
7	Tarumã	22K546773	UTM7479831
8	Tarumã	22K546774	UTM7479832
9	Tarumã	22K546775	UTM7479833
10	Tarumã	22K546776	UTM7479834
11	Tarumã	22K546777	UTM7479835
12	Tarumã	22K546778	UTM7479836
13	Tarumã	22K546779	UTM7479837
14	Tarumã	22K546780	UTM7479838
15	Tarumã	22K546781	UTM7479839
16	Tarumã	22K546782	UTM7479840
17	Tarumã	22K546783	UTM7479841
18	Tarumã	22K546784	UTM7479842
19	Tarumã	22K546785	UTM7479843
20	Tarumã	22K546786	UTM7479844
21	Tarumã	22K546787	UTM7479845
22	Cândido Mota	22K554658	UTM7479622
23	Tarumã	22K546787	UTM7479845
24	Tarumã	22K546788	UTM7479846
25	Tarumã	22K546789	UTM7479847
26	Tarumã	22K546790	UTM7479848
27	Tarumã	22K546791	UTM7479849
28	Tarumã	22K546792	UTM7479850
29	Tarumã	22K546793	UTM7479851
30	Tarumã	22K546794	UTM7479852
31	Cândido Mota	22K554658	UTM7479622
32	Jardim Chácara dos Pinheiros	22K0761137	UTM7469722
33	Cândido Mota	22K554658	UTM7479622
34	Jardim Chácara dos Pinheiros	22K0761123	UTM7469726
35	Cândido Mota	22K554658	UTM7479622

36	Jardim Chácara dos Pinheiros	22K0761129	UTM7469813
37	Cândido Mota	22K554658	UTM7479622
38	Cândido Mota	22K554659	UTM7479622
39	Cândido Mota	22K554660	UTM7479622
40	Jardim Chácara dos Pinheiros	22K0761131	UTM7469651
41	Parque Municipal	22K0762939	UTM7469759
42	Jardim Chácara dos Pinheiros	22K0761141	UTM7469618
43	Lageado	22K0764411	UTM7471032
44	Jardim Chácara dos Pinheiros	22K0761162	UTM7469590
45	Boa Esperança	22K0759118	UTM7469585
46	Boa Esperança	22K0758385	UTM7472545
47	Boa Esperança	22K0758295	UTM7472506
48	Lageado	22K0764011	UTM7471527
49	Boa Esperança	22K0758165	UTM7472659
50	Garagem Municipal	22K0762169	UTM7464263
51	Boa Esperança	22K0758110	UTM7472598
52	Boa Esperança	22K0758112	UTM7472625
53	Parque Municipal	22K0762933	UTM7469742
54	Parque Municipal	22K0762966	UTM7469733
55	Parque Municipal	22K0762970	UTM7469753
56	Parque Municipal	22K0762967	UTM7469757
57	Parque Municipal	22K0762986	UTM7469768
58	Parque Municipal	22K0762999	UTM7469757
59	Parque Municipal	22K0762995	UTM7469760
60	Lageado	22K0764404	UTM7471028
61	Lageado	22K0764394	UTM7471011
62	Lageado	22K0764326	UTM7470927
63	Lageado	22K0763970	UTM7471518
64	Lageado	22K0764275	UTM7471270
65	Lageado	22K0764248	UTM7471236
66	Lageado	22K0764264	UTM7471248
67	Lageado	22K0764275	UTM7471273
68	Garagem Municipal	22K0762100	UTM7464087
69	Garagem Municipal	22K0762090	UTM7464076
70	Garagem Municipal	22K0763819	UTM7464078
71	Caraguatatuba	23K0459596	UTM7390835
72	Caraguatatuba	23K0459582	UTM7390828
73	Caraguatatuba	23K0459581	UTM7390851
74	Caraguatatuba	23K0459135	UTM7390645
75	Caraguatatuba	23K0459608	UTM7390824
76	Caraguatatuba	23K0459603	UTM7390830
78	Caraguatatuba	23K0459508	UTM7390727

79	Caraguatatuba	23K0459619	UTM7390814
80	Caraguatatuba	23K0459577	UTM7390818
81	Caraguatatuba	23K0459606	UTM7390824
82	Caraguatatuba	23K0459598	UTM7390808
83	Caraguatatuba	23K0459585	UTM7390827
84	Caraguatatuba	23K0459605	UTM7390820
85	Cajati	22J0794427	UTM7257619
86	Cajati	22J0794361	UTM7257601
87	Cajati	22J0794430	UTM7256727
88	Cajati	22J0794427	UTM7256722
89	Cajati	22J0794429	UTM7256764
90	Cajati	22J0793686	UTM7261902
91	Cajati	22J0792948	UTM7262106
92	Eldorado	22J0783501	UTM7278014
93	Eldorado	22J0783492	UTM7278020
94	Eldorado	22J0783515	UTM7277997
95	Eldorado	22J0783511	UTM7277978
96	Eldorado	22J0783507	UTM7278017
97	Eldorado	22J0783514	UTM7277978
98	Eldorado	22J0783511	UTM7277985
