



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

BRUNO DUARTE ZIROLDO

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Croton*  
*floribundus* SPRENG. DE DIFERENTES  
FRAGMENTOS DE MATA**

---

Londrina  
2007

**BRUNO DUARTE ZIROLDO**

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Croton*  
*floribundus* SPRENG. DE DIFERENTES  
FRAGMENTOS DE MATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação, em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela

Londrina  
2007

**BRUNO DUARTE ZIROLDO**

**ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Croton*  
*floribundus* SPRENG. DE DIFERENTES  
FRAGMENTOS DE MATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação, em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. André Luis Laforga Vanzela  
Universidade Estadual de Londrina

---

Profa. Dra. Maria de Fátima Pires da Silva  
Machado  
Universidade Estadual de Maringá

---

Profa. Dra. Silvia Helena Sofia  
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 09 de Março de 2007.

***A minha mãe e a minha irmã, dedico.***

***"Talvez eu seja o pior naquilo que melhor faço".  
Kurt Cobain***

ZIROLDO, Bruno Duarte. **Estrutura genética em diferentes populações de *Croton floribundus* Spreng. de diferentes fragmentos de mata.** 2007. 50f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## RESUMO

*Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) é uma espécie arbórea tropical com ampla distribuição pela Floresta Atlântica, um dos mais importantes e ameaçados biomas brasileiros. Conhecida popularmente como *capixingui*, é uma planta pioneira bastante comum em florestas secundárias. Apesar de seu grande potencial na recuperação de áreas degradadas, pouco é conhecido a respeito de sua diversidade genética. Marcadores moleculares baseados em *primers* aleatórios (RAPD) foram utilizados para avaliar a estrutura e a diversidade genética dessa espécie em três regiões de coleta, todas elas contendo fragmentos remanescentes da floresta estacional semidecidual da região Norte do estado do Paraná, Brasil. A avaliação da proporção de locos polimórficos foi obtida de 96 indivíduos, para os quais foram estimados os: índice de diversidade de Shannon, índice de fixação alélica, análise de variância molecular e índice de similaridade de Jaccard. Os resultados para as diferentes estimativas foram concordantes entre si, revelando um alto índice de diversidade genética e indicando que a maior parcela da variação genética se encontra dentro de regiões. Estes resultados concordam com outros estudos envolvendo biomas e plantas de comportamento semelhantes, sugerindo que fatores como a alta densidade populacional de *C. floribundus* nas regiões amostradas, bem como a curta distância entre as regiões de coleta, amenizam os efeitos da estrutura fragmentada da Floresta Semidecídua do Norte do Paraná sobre a espécie, entretanto, ainda são suficientes para estruturá-las geneticamente como populações distintas.

**Palavras-chave:** *Croton floribundus*. Fragmentação florestal. Restauração de ecossistemas. Diversidade genética. RAPD.

ZIROLDO, Bruno Duarte. **Estrutura genética em diferentes populações de *Croton floribundus* Spreng. de diferentes fragmentos de mata.** 2007. 50f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## ABSTRACT

*Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) it is a tropical tree specie with ample distribution for the Atlantic Forest, one of most important and endangered ecosystem in Brazil. Known popularly as capixingui, it is a pioneering specie very common in secondary forests. Although to present a great potential in the recovery of degraded areas, nothing is known about its genetic diversity. Molecular markers based on random primers (RAPD) had been used to evaluate the structure and genetic diversity of *C. floribundus* collected in three different regions of semideciduous estacional forest of the North Paraná state, Brazil. The evaluation of polymorphic loci percentage was gotten of 96 individuals, for which they had been estimated: Shannon diversity genetic index, analysis of molecular variance and Jaccard similarity index. The results for the different estimates had been concordant between itself, revealing a high genetic diversity index and indicating that the biggest parcel of the genetic variation is finds within region. These results agree to other studies involving similar ecosystems and plants behavior, suggesting that factors as the high population density of *C. floribundus* in the showed regions, as well as the short distance between the collected populations, brighten up the effect of the fragmented structure of the semideciduous estacional forest of Northern Paraná over the specie, however, it is still enough to structuralize genetically them as distincts populations.

**Keywords:** *Croton floribundus*. Tropical tree species. Forest fragmentation. Ecosystems restoration. Genetic diversity. RAPD.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – *Croton floribundus*. Estruturas reprodutivas: flor (A) e fruto (B) e exemplar adulto em visão geral (C) e ampliada (D)..... 14
- Figura 2** – Distribuição da vegetação no estado do Paraná: (A) ocupação original e (B) ocupação atual ..... 17

### ARTIGO

- Figura 1 – Localização dos fragmentos: Cemitério (o), Fazenda Novo Horizonte (•), Fazenda Doralice (A), Mata dos Godoy (A), Patrimônio Regina (■) e São Luís (□ ) dentro das diferentes regiões de coleta.
- Figure 1** – *Localization of the fragments Cemitério (o), Fazenda Novo Horizonte (m), Fazenda Doralice A), Mata dos Godoy A), Patrimônio Regina (m) e São Luís A) inside of the different collections' regions ..... 32*
- Figura 2 – Teste de repetibilidade para os indivíduos para 5 indivíduos escolhidos aleatoriamente e amplificados com os *primers* A - 6 (branco), A -14 (amarelo) e B - 6 (vermelho)
- Figure 2** – *Repeatability test with 5 individuals chosen randomly and amplified with primers A - 6 (white), A - 14 (yellow) and B - 6 (red)..... 33*
- Figura 3 – Padrão de amplificação de bandas para os 96 indivíduos de *C. floribundus* a partir do *primer* A -14.
- Figure 3** – *Amplification of 96 C. floribundus individuals by primer A -14 ..... 36*

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Tabela 1** – Cobertura vegetal original do estado do Paraná..... 16

### ARTIGO

Tabela 1 – Dados das coletas de *C. floribundus* realizadas no Norte do Paraná durante os meses de março e abril de 2005.

**Table 1** – *C. floribundus* from Northern Paraná collection's datas.....31

Tabela 2 – Valores de AMOVA para as populações de *C. floribundus* coletadas no Norte do Paraná.

**Table 2** – AMOVA values for *C. floribundus* from North Paraná state, Brazil .....37

Tabela 3 – Valores de similaridade genética de Jaccard para as plantas de *C. floribundus* amostradas em cada localidade estudada.

**Table 3** – Jaccard similarity values from *C. floribundus* in each studied region .....39

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
1.1.1 Considerações sobre <i>Croton floribundus</i> .....	12
1.1.2 Caracterização da vegetação do Paraná .....	14
1.1.3 O processo de fragmentação .....	18
1.1.4 Estratégias e ferramentas para conservação de ambientes degradados.....	19
1.1.5 Variabilidade genética e estrutura populacional .....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	24
2.1 OBJETIVO GERAL .....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>ARTIGO</b> .....	25
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	28
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>4 AGRADECIMENTOS</b> .....	40
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	40
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	44
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país de maior biodiversidade de todo o planeta, reunindo pelo menos 70% das espécies animais e vegetais do mesmo. Estudos de representatividade ecológica realizados nos biomas brasileiros definem a existência de 49 ecorregiões distribuídas ao longo dos biomas Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (IBAMA, 2007a).

A Mata Atlântica concentra, desde o início de nossa história, os principais pólos de urbanização e desenvolvimento econômico do país. Atualmente, vivem nessa região mais de cem milhões de brasileiros, cuja maioria não tem consciência da amplitude de distribuição, da riqueza em biodiversidade, da importância sócio-econômica e do estado de degradação que caracteriza tal estrutura florestal. Nesse contexto, as estratégias de conservação tanto para esse quanto para outros ecossistemas brasileiros se limitavam até bem pouco tempo apenas à conservação de determinadas áreas, muitas vezes reduzidas, na forma de parques ou outras Unidades de Conservação (LINO; BECHARA, 2002). Da cobertura vegetal original deste ecossistema, restam apenas 7,3%, das quais 0,69% estão sob áreas de proteção especial, o que coloca a Mata Atlântica como o bioma brasileiro mais ameaçado (IBAMA, 2007b).

Por conta de uma série de perturbações antrópicas ocorridas nos ecossistemas naturais, um dos maiores desafios da atualidade é a conservação da biodiversidade (VIANA; PINHEIRO, 1998). Dentre as principais consequências geradas por tais perturbações, destacamos o processo de fragmentação. Tal evento ocorre paralelamente à expansão antrópica e proporciona a formação de mosaicos de habitats, incluindo fragmentos dos mais diversos tamanhos, bem como áreas agrícolas e urbanas. De acordo com Santos (1995), estes mosaicos normalmente apresentam uma baixa probabilidade de estabelecimento e dispersão dos indivíduos adultos e juvenis de sua fauna. Isso acaba alterando a abundância de dispersores, polinizadores, predadores e de patógenos de espécies vegetais, o que, por sua vez pode prejudicar o recrutamento de plântulas.

Do ponto de vista genético, nos ambientes que exibem uma grande riqueza de espécies arbóreas, como é o caso das florestas tropicais, se torna praticamente impossível estudar conjunta ou separadamente todas as espécies e

populações. Assim, é fundamental escolher adequadamente as espécies a serem analisadas para que as informações colhidas possam servir para o desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação de outras espécies próximas (KAGEYAMA et al., 2003). De acordo com esse mesmo autor, o delineamento de uma boa estratégia de conservação e manejo passa por uma escolha ou definição adequadas do tamanho das reservas e das áreas degradadas a serem recuperadas, bem como das espécies e do plano de coleta de sementes a serem utilizadas na sua produção e plantio.

Uma estratégia adequada de conservação também exige uma melhor compreensão da diversidade genética presente nas populações naturais, bem como dos efeitos provocados pela fragmentação na estruturação das populações. Essa estruturação consiste na alteração das freqüências alélicas entre populações isoladas, o que pode levar à perda de diversidade e a divergência entre grupos de uma mesma espécie. A variabilidade genética é uma das condições necessárias para a mudança evolutiva sendo, portanto, um componente essencial no desenvolvimento dos planos de conservação dos ecossistemas. Quanto maior a variabilidade genética herdável em características adaptativas, maior a plasticidade fenotípica dos indivíduos (CARVALHO, 1993). Logo, a curto prazo, a sua perda poderá levar a uma redução no valor adaptativo das espécies, inviabilizando o remanescente populacional. A longo prazo, em função da diminuição da riqueza alélica, a capacidade de resposta às mudanças ocorridas por conta de forças seletivas também será alterada (ELLSTRAND; ELLAN, 1993). Uma vez que os polinizadores e dispersores são os maiores responsáveis pelo fluxo gênico entre as populações vegetais, temos que as populações remanescentes sofrem alterações no seu padrão de fluxo gênico, na variabilidade e na estrutura genética, bem como no aumento da endogamia (BALLAL et al., 1994; MURCIA, 1996). Daí a importância de estudar espécies com alta capacidade de recrutamento animal em áreas em início de restauração, como por exemplo, *Croton floribundus*, uma árvore cuja flor produz um mel saboroso, de aroma diferenciado e considerado de excelente qualidade, e por tal motivo são constantemente visitadas por espécies de abelhas que realizam sua polinização (LORENZI, 2002).

Com o crescente aumento das pesquisas neste campo, geneticistas desenvolveram diversos métodos para detectar e analisar a variabilidade genética. Hoje temos, além da eletroforese de isoenzimas, tecnologias que envolvem o uso de

marcadores moleculares baseados no DNA (RAPD, AFLP, RFLP, SSR e outros). Tais ferramentas possibilitam uma ampla cobertura genômica (ZUCCHI, 2002), refletindo em uma grande quantidade de informações fundamentais no estudo de populações.

O presente estudo visa utilizar a técnica de marcadores RAPD para avaliar a estrutura populacional de *Croton floribundus* (Euphorbiaceae) e a diversidade genética dessa espécie em três localidades da região Norte do estado do Paraná, todas elas contendo fragmentos remanescentes de floresta. A sua escolha é justificada por ela fazer parte de um *pool* de aproximadamente 40 espécies utilizadas no programa de reflorestamento que o Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas (LABRE) da Universidade Estadual de Londrina desenvolve na região Norte do Paraná. Os resultados obtidos a partir dessas análises genéticas poderão servir para a elaboração de estratégias de conservação, bem como de modelos para outras espécies de ocorrência em habitats semelhantes e que apresentem o mesmo tipo de comportamento, dispersão e polinização.

## **1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1.1 Considerações sobre *Croton floribundus***

*Croton floribundus* Spreng. (Figura 1), pertence a família Euphorbiaceae, que se destaca como uma das principais famílias da flora brasileira e uma das mais complexas do ponto de vista taxonômico. Seus representantes distribuem-se ao longo do território nacional, podendo ser encontrados cerca de 1.000 espécies de 70 gêneros. Dentre eles estão ervas, arbustos, árvores ou lianas, que geralmente apresentam látex, folhas alternas, flores não vistosas e unissexuadas, bem como fruto geralmente capsulado. Muitas apresentam importância econômica, como a seringueira utilizada no ciclo da borracha, a mandioca na alimentação e a mamona, da qual o óleo de suas sementes tem uma ampla aplicação. Outras se destacam por serem ornamentais, como o bico-de-

papagaio e a coroa-de-cristo, ou por possuírem látex ou sementes tóxicas ao homem (SOUZA; LORENZI, 2005).

Os estudos mais importantes em torno desta família se devem ao fato que seus representantes estão entre os mais comuns nas formações vegetais brasileiras. O gênero *Croton* recebe destaque especial por ser particularmente comum em quase todos os ecossistemas (SOUZA; LORENZI, 2005). *Croton floribundus*, popularmente conhecida como capixingui, é de ocorrência em florestas latifoliadas semidecíduais e em regiões de altitude elevada nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Sua altura varia de 6 a 10 metros e o diâmetro do caule a altura do peito é de 20 a 30 centímetros. É uma planta pioneira tolerante a áreas abertas, ocorrendo geralmente nas bordas ou no interior de matas que sofreram ação do homem em processos de extração de madeira. Sua madeira não é de grande valor econômico, sendo indicada apenas para caixotaria leve. Possui dispersão de frutos do tipo autocórica e a síndrome de polinização é a melitofilia. Floresce no período de outubro a dezembro e sofre maturação de seus frutos em janeiro e fevereiro (LORENZI, 2002).

Em um estudo que elegeu as espécies indispensáveis para a restauração de ambientes degradados a partir de parâmetros ecológicos, *C. floribundus*, se destacou quanto aos índices densidade de indivíduos (DI), regeneração natural total (RNT), posição sociológica relativa (PSR) e valor de importância (VI), sendo considerada uma espécie essencial para recuperação de áreas fragmentadas (RONDON NETO et al., 2000).



**Figura 1** – *Croton floribundus*. Estruturas reprodutivas: flor (A) e fruto (B) e exemplar adulto em visão geral (C) e ampliada (D).

Fonte: [www.cria.org.br/eventos/tdbi/flora/presentations/PaulBerry/crotonFB](http://www.cria.org.br/eventos/tdbi/flora/presentations/PaulBerry/crotonFB)

### 1.1.2 Caracterização da vegetação do Paraná

Em 1500, quando os portugueses chegaram ao Brasil, o estado do Paraná tinha 100% de seu solo coberto por diferentes tipos de vegetação. Entretanto, referências a essa cobertura original são escassas, se restringindo apenas a relatos de viajantes. Apenas depois de 1930, quando o processo de desmatamento já se encontrava bastante avançado, é que trabalhos mais completos passaram a surgir (MEDRI; SOARES, 2002).

Os estudos de Maack (1981) e Roderjan et al. (2002) indicam que de toda a extensão territorial do estado do Paraná, 83% de sua superfície era coberta por florestas, sendo que os 17% restantes eram classificados como formações não-florestais, como por exemplo, os campos, presentes nas regiões de Guarapuava e

Ponta Grossa, e os cerrados, encontrados em parcelas fragmentadas na região de Jaguariaíva. Nessa última parcela também estava incluída a vegetação pioneira de influência marinha (restingas), flúvio-lacustre (várzeas) e flúvio-marinha (mangues), bem como a vegetação herbácea do alto das montanhas (campos de altitude e vegetação rupestre) (Tabela 1). Atualmente, sabemos que por conta da intensificação de ações executadas pelos seres humanos a partir do século XIX, temos uma paisagem formada de mosaicos resultantes da fragmentação. Isto implicou em uma redução significativa dessa cobertura florestal (Figura 2), onde apenas 9% do montante original se encontra em bom estado de conservação, com o agravante de apenas 2% destes estar localizado em áreas protegidas pelo estado.

As florestas do estado do Paraná representam hoje apenas cerca de 2,5% de toda a cobertura florestal do território nacional. Porém, esse estado detém a maioria das unidades fitogeográficas ocorrentes no País. Tais florestas, reconhecidas como componentes do Bioma da Mata Atlântica (MAACK, 1981), podem ser classificadas em três principais tipos (Figura 2):

- **Floresta Estacional Semidecidual**, ocorrentes no Oeste e no Norte do estado;
- **Floresta Ombrófila Mista ou Floresta de Araucária**, localizada nas regiões Leste e Sul da Região Planaltina;
- **Floresta Ombrófila Densa**, distribuída ao longo do litoral e Serra do Mar.

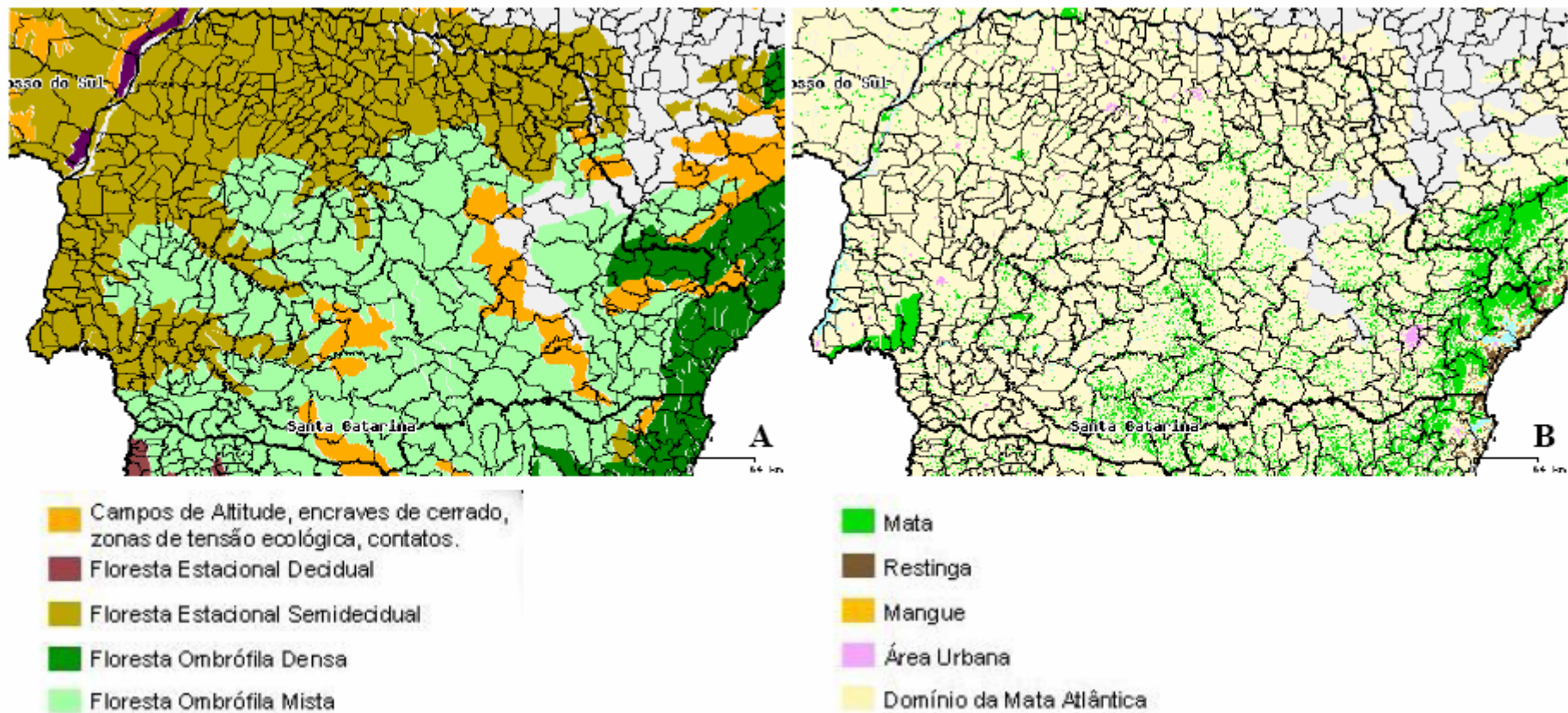
Este trabalho se concentrou na Região Norte do estado, mais especificamente na bacia do baixo rio Tibagi, onde a altitude não ultrapassa 800 metros. A vegetação dominante é a floresta estacional semidecidual, que após sofrer um processo intenso de fragmentação, hoje é constituída de uma rede de mosaicos florestais que em sua totalidade representam apenas 2-4% da área originalmente ocupada (IPARDES, 1993).

Ainda em relação à floresta estacional semidecidual do Norte do Paraná, segundo Torezan et al. (2005), este é um dos ecossistemas mais ameaçados no Brasil. Isso pelo fato dela ser formada em sua totalidade por fragmentos isolados. Muitos desses fragmentos exibem alterações estruturais devido à redução de populações e o efeito de borda. O efeito de borda compreende o conjunto de alterações físicas e biológicas que se observa na faixa de mata em contato com outro tipo de ambiente (geralmente pastagens ou áreas abertas).

**Tabela 1** – Cobertura vegetal original do estado do Paraná

Tipo de vegetação	Área em km <sup>2</sup>
Mata pluvial subtropical-tropical	94044
Mata de araucária nos planaltos e na região da mata subtropical acima de 500m	73780
Campos limpos e campos cerrados (estepes de gramínea baixa)	30532
Vegetação das várzeas e pântanos	17610
Vegetação das praias ilhas, restingas e vegetação das regiões altas da serra	529
Área das baías com faixa de mangue	557
<b>Total</b>	<b>201203</b>

**Fonte:** Modificado de Maack (1981).



**Figura 2** – Distribuição da vegetação no estado do Paraná: (A) ocupação original e (B) ocupação atual. Fonte: Modificado de [http://www.rbma.org.br/rbma/images/mapa\\_area\\_reserva.gif](http://www.rbma.org.br/rbma/images/mapa_area_reserva.gif)

### 1.1.3 O processo de Fragmentação

A fragmentação dos ecossistemas, que surge em decorrência de processos que envolvem a expansão das fronteiras e o desenvolvimento humano, traz uma série de prejuízos (VIANA, 1990), tais como o isolamento de populações e alterações nos padrões de fluxo gênico (YOUNG et al., 1996; NASON et al., 1998). Esse processo é hoje tido como o grande pivô da crise global de biodiversidade (OLIVEIRA, 2000). E, a exploração madeireira indiscriminada é uma prática que tem contribuído muito para a perda de biodiversidade. Estudos como os realizados por Vidal et al., em 1998, utilizando técnicas de exploração de madeira planejada e não planejada na Amazônia demonstraram que ambos os tipos de ações produzem um impacto negativo sobre a diversidade e a estrutura das populações de plantas. A exploração planejada reduz em cerca de 4% o número de espécies, enquanto que a não planejada chega a 7,4%.

Colli et al. (2003) realizaram um grande estudo relacionado à fragmentação dos ecossistemas brasileiros e seus efeitos sobre a biodiversidade. Tais efeitos são colocados a seguir:

a) **Efeitos de borda e do tipo de matriz:** fragmentos de ecossistemas considerados abertos, como é o caso de florestas estacionais e cerrados estão menos sujeitos aos efeitos de borda, quando comparados com os fragmentos fechados, como as florestas úmidas. Vale ainda ressaltar que a complexidade estrutural, o tipo e intensidade do uso da área e a presença de ambientes sucessionais em torno dos fragmentos podem auxiliar na manutenção pelo menos das espécies menos exigentes.

b) **Efeitos da qualidade e estrutura dos fragmentos:** as diferentes formas de utilização de um fragmento podem levar à alterações significativas em sua estrutura. A exploração seletiva de madeira, a redução na densidade de famílias vegetais bem como de espécies dependentes das mesmas (as aves e mamíferos frugívoros, por exemplo), a redução do banco de sementes por queimadas e pelo emprego de agrotóxicos, além de fatores internos dos fragmentos como o número de populações e espécies, podem afetar diretamente a manutenção de espécies mais exigentes.

c) **Efeitos do isolamento dos fragmentos:** a probabilidade de migração de indivíduos entre fragmentos vizinhos leva em consideração a distância a ser percorrida bem como a estrutura dos próprios fragmentos. Isso aparece bem claramente quando comparamos a similaridade faunística entre fragmentos de Floresta Atlântica. O mesmo pode ser observado na Floresta Estacional Decidual, onde os fragmentos maiores e mais próximos tendem a ter similaridade florística. Nas situações onde há corredores ecológicos, a similaridade tende a ser ainda maior, tanto para a flora quanto para fauna.

d) **Efeitos do tempo de isolamento dos fragmentos:** em fragmentação recente, a avaliação dos prejuízos é bastante limitada, pelo próprio desconhecimento da dinâmica da área antes da fragmentação. Com o passar do tempo os efeitos danosos ficam mais claros. Um bom exemplo foi o da Floresta Atlântica da região de Viçosa - MG. Neste local foi comprovado que após cerca de 70 anos de isolamento, 31% das espécies de aves frugívoras foram extintas e outras 77% estão ameaçadas.

e) **Efeitos do tamanho dos fragmentos:** fragmentos de tamanho reduzido têm diminuição no número de habitats e microhabitats (muitas vezes necessários à persistência das populações) e no número de indivíduos por população. Na região do Cerrado brasileiro, verificou-se que os fragmentos com tamanho superiores a faixa de 1.300 ha podem abrigar uma quantidade até 25% maior que os fragmentos menores que 700 ha. De outro modo, fragmentos maiores tendem a ser mais eficientes, decorrente da riqueza de espécies e da manutenção dos diferentes habitats.

#### **1.1.4 Estratégias e ferramentas para conservação de ambientes degradados**

A necessidade de uma maior rapidez e efetividade no processo de restauração ambiental trouxe consigo a implantação dos chamados critérios sucessionais (KAGEYAMA, 1994). Esses critérios englobam a dinâmica de recomposição de tais ambientes, o processo de colonização de um ambiente natural e o tempo e o sucesso no restabelecimento destas populações. Esse processo de colonização é freqüentemente subdividido em 3 estágios sucessionais: (i)

colonização por espécies pioneiras, com ciclo de vida curto, elevado número de sementes e elevado fluxo gênico de curta distância (SLATKIN, 1985; SLATKIN, 1987), (ii) sucessão por espécies secundárias, com ciclo de vida maior, uma menor densidade populacional e um fluxo gênico e uma dispersão de sementes a distâncias intermediárias, e (iii) chegada das espécies climáticas que, dentre as espécies de todos os estágios de sucessão, são as que possuem a menor densidade populacional e os maiores ciclos de vida, distância de dispersão de sementes e fluxo gênico, com elevada taxa de cruzamento (KAGEYAMA et al., 2003).

A elaboração de uma boa estratégia de manejo e conservação envolve diversos parâmetros e varia muito de acordo com o tipo de ambiente a ser recuperado. Dentre esses parâmetros, destacamos a época de floração e frutificação, agentes polinizadores, agentes dispersores, estrato ocupado e o tipo de microhabitat (CAVALHEIRO; TORREZAN, 2002).

Os aspectos mais críticos sobre a fragmentação envolvem o sucesso reprodutivo das espécies vegetais (MURCIA, 1996), pois muitas dependem de polinizadores e de dispersores. Esse autor cita que a fragmentação pode trazer conseqüências como a redução de tamanho e a endogamia, por exemplo, e/ou ainda ter sua chance de sobrevivência ameaçada pela falta de recursos vegetais. Assim, o sucesso reprodutivo dos vegetais depende dos polinizadores e dispersores e estes, por sua vez, dos recursos oferecidos pelas plantas.

Uma alternativa para a restauração ambiental é investir na produção e no plantio de mudas de espécies arbóreas nativas (VIANA, 1994). Juntamente com o emprego de ferramentas que possam auxiliar na elaboração de estratégias de restauração.

O crescente desenvolvimento na área da biologia molecular levou ao surgimento de diversas técnicas para detecção de polimorfismo genético de DNA. Dentre elas se destaca a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLINS; FALOONA, 1987). Variações dessa ferramenta (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) têm sido utilizadas tanto em estudos básicos quanto aplicados. Tais abordagens podem ser capazes de fornecer informações seguras sobre o *status* das populações, bem como sugerir práticas de manejo e conservação da biodiversidade. Nesse aspecto, o monitoramento da variabilidade genética tem se destacado como uma das principais ferramentas de apoio. Quando comparados aos marcadores

morfológicos, os moleculares apresentam uma série de vantagens, dentre elas: a produção de uma grande quantidade de dados; um baixo custo relativo, se levado em conta o montante de informações produzidas em um curto espaço de tempo; além de não ser necessária a destruição do material biológico estudado (CIAMPI, 2001). Uma das variações da técnica de PCR mais utilizada é o RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990; WELSH; Mc LELLAND, 1990) que a partir de pequenos *primers* aleatórios amplifica segmentos de DNA genômico. Normalmente, esses fragmentos são produzidos em grande quantidade devido ao reduzido tamanho do *primer* (10 a 15 nucleotídeos) e a baixa temperatura de anelamento dos mesmos.

Cabe ressaltar que esta técnica apresenta duas limitações importantes. A primeira está relacionada com a sua reprodutibilidade dentro e entre laboratórios (PENNER, 1996). E, a segunda, quanto ao fato deles serem marcadores de caráter dominante, o que compromete a estimativa das freqüências alélicas dos locos estudados, caso as populações analisadas não estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (ALI et al., 2004; LIU; CORDES, 2004; LOWE et al., 2004 apud PAULA, 2005).

Entretanto, marcadores RAPD fornecem um alto nível de polimorfismo, decorrente de um número ilimitado de locos produzidos pela utilização de diversos *primers*, bem como pela amplificação de fragmentos de regiões do DNA de cópia única ou repetitiva (LOWE et al., 2004 apud PAULA, 2005). Além disso, quando comparados a outros marcadores, eles apresentam também como vantagem: uma varredura do genoma de modo aleatório decorrente do uso de *primers* não específicos (MARQUES, 2002); obtenção de um grande número de marcadores sem a necessidade de um conhecimento prévio de alguma seqüência genética do organismo de interesse; necessidade de pequenas quantidades de DNA para a reação de PCR; baixo custo, simplicidade e rapidez na obtenção de dados, além de uma grande acessibilidade aos mesmos. Isso faz com que essa técnica seja amplamente utilizada em pesquisas por todo o mundo (FRITSCH; REISEBERG, 1996; PENNER, 1996; TORRES et al., 2004).

Aliada a essas vantagens está também o fato que tal metodologia não é invasiva, o que significa que para sua aplicação é necessária apenas pequenas quantidades de tecido do organismo estudado, tornando a técnica uma excelente opção no estudo de espécies ameaçadas (LOWE et al., 2004 apud

PAULA, 2005). Ela também se presta à análise de populações naturais para a determinação do impacto das práticas de manejo florestal, quer sejam de regeneração natural ou artificial, auxiliando assim no desenvolvimento de metodologias de reflorestamento geneticamente monitorado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Além disso, segundo Lu et al. (1996) os estudos de variabilidade genética inter e intrapopulacionais são melhores acessados quando os marcadores moleculares são aplicados aleatoriamente, perfazendo assim uma maior cobertura do genoma.

### **1.1.5 Variabilidade Genética e Estrutura Populacional**

De acordo com Lowe et al. (2004), citado por Paula (2005), a variabilidade genética presente nas espécies, pode ser desmembrada em três elementos principais: a) diversidade genética, que se refere a quantidade de variação genética presente em uma espécie ou em grupos de indivíduos; b) diferenciação genética, que determina como a variação genética é distribuída entre as populações; e c) distância genética, relacionada com a quantidade de variação genética existente entre pares de populações. Quando a variabilidade genética está presente em características adaptativas, essa irá fornecer aos organismos uma maior flexibilidade fenotípica, diminuindo assim a susceptibilidade das populações as novas mudanças ocorridas em seu ambiente e, conseqüentemente, auxiliando na manutenção da espécie a longo prazo.

Uma população que por um motivo qualquer sofra uma diminuição de seu tamanho efetivo (efeito *bottleneck* ou gargalo de garrafa), ou que colonize um novo território com um baixo número de indivíduos (efeito do fundador), estará mais susceptível ao processo de deriva genética. Esse por sua vez terá um papel crucial na alteração das freqüências bem como no perfil genético das gerações subseqüentes (HARTL; CLARK, 1997).

O entendimento de como a diversidade genética está distribuída nas populações vem se tornando um ponto-chave na elaboração de estratégias de manejo e restauração de áreas degradadas (LOWE et al., 2004 apud PAULA, 2005). Isso porque o conhecimento da estruturação genética de uma população permite ao

pesquisador realizar inferências a respeito, por exemplo, de sua diversidade genética, de sua taxa de endogamia, da ação da deriva genética e da seleção natural que levam à diferenciação entre os espécimes, etc. Essas e outras informações podem auxiliar a montagem de um perfil genético dessa população e têm um papel fundamental na confecção de um plano de manejo mais eficiente (PERES-SWEENEY et al., 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é, por meio de marcadores RAPD, analisar a estrutura genética de plantas adultas de *Croton floribundus* amostradas em três localidades na região Norte do estado do Paraná.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e caracterizar a diversidade genética da espécie *Croton floribundus* de três localidades no Norte do Paraná;
- Avaliar se existe diferenciação genética desta espécie nas três localidades estudadas;
- Determinar a similaridade genética das plantas amostradas a fim de orientar o procedimento de coleta, permuta e repasse de sementes e mudas, visando garantir um elevado grau de diversidade genética nos ambientes restaurados.

**ARTIGO A SER ENVIADO AO PERIÓDICO**  
**JOURNAL OF BRAZILIAN FOREST SCIENCE**  
**(REVISTA ÁRVORE)**

**EFEITO DA FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL SOBRE A ESTRUTURA GENÉTICA**  
**DE *Croton Floribundus* SPRENG (EUPHORBIACEAE)**

Bruno Duarte Zioldo, André Luís Laforga Vanzela, José Marcelo Domingues Torezan,  
Thiago Santos Sabino, Rogério Fernandes de Souza \*

Laboratório de Biodiversidade e Restauração de Ecossistemas, Centro de Ciências Biológicas,  
Universidade Estadual de Londrina.

Endereço: Rodovia Celso Garcia Cid – PR 445 – Km 380 – Campus Universitário

Cx. Postal – 6001 CEP – 86051-990

Londrina – PR – BRASIL

Telefax: 55-43-3371-4509

\* Autor Correspondente: E-mail: [rogfs@uel.br](mailto:rogfs@uel.br)

**RESUMO** – *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) é uma espécie arbórea tropical com ampla distribuição pela Floresta Atlântica, um dos mais importantes e ameaçados biomas brasileiros. Conhecida popularmente como *capixingui*, é uma planta pioneira bastante comum em florestas secundárias. Apesar de seu grande potencial na recuperação de áreas degradadas, nada é conhecido a respeito de sua diversidade genética. Marcadores moleculares baseados em *primers* aleatórios (RAPD) foram utilizados para avaliar a estrutura e a diversidade genética dessa espécie em três regiões de coleta, todas elas contendo fragmentos remanescentes da floresta estacional semidecidual da região Norte do estado do Paraná, Brasil. A avaliação da proporção de locos polimórficos foi obtida de 96 indivíduos, para os quais foram estimados os: índice de diversidade de Shannon, índice de fixação alélica, análise de variância molecular e índice de similaridade de Jaccard. Os resultados para as diferentes estimativas foram concordantes entre si, revelando um alto índice de diversidade genética e indicando que a maior parcela da variação genética se encontra dentro de região. Esses resultados concordam com outros estudos envolvendo biomas e plantas de comportamento semelhantes, sugerindo que fatores como a alta densidade populacional de *C. floribundus* nas regiões amostradas, bem como a curta distância entre as regiões de coleta, amenizam os efeitos da estrutura fragmentada da Floresta Semidecídua do Norte do Paraná sobre a espécie, entretanto, ainda são suficientes para estruturá-las geneticamente como populações distintas.

Palavras-chave: *Croton floribundus*. Fragmentação florestal. Restauração de ecossistemas. Diversidade genética. RAPD.

**ABSTRACT** - *Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae) it is a tropical tree specie with ample distribution for the Atlantic Forest, one of most important and endangered ecosystem in Brazil. Known popularly as capixingui, it is a pioneering specie very common in secondary forests. Although to present a great potential in the recovery of degraded areas, nothing is known about its genetic diversity. Molecular markers based on random primers (RAPD) had been used to evaluate the structure and genetic diversity of *C. floribundus* collected in three different regions of semideciduous estacional forest of the North Paraná state, Brazil. The evaluation of polymorphic loci percentage was gotten of 96 individuals, for which they had been estimated: Shannon diversity genetic index, analysis of molecular variance and Jaccard similarity index. The results for the different estimates had been concordant between itself, revealing a high genetic diversity index and indicating that the biggest parcel of the genetic variation is finds within region. These results agree to other studies involving similar ecosystems and plants behavior, suggesting that factors as the high population density of *C. floribundus* in the showed regions, as well as the short distance between the collected populations, brighten up the effect of the fragmented structure of the semideciduous estacional forest of Northern Paraná over the specie, however, it is still enough to structuralize genetically them as distincts populations.

**Keywords:** *Croton floribundus*. Tropical tree species. Forest fragmentation. Ecosystems restoration. Genetic diversity. RAPD.

## 1. INTRODUÇÃO

A Floresta Estacional Semidecidual predominante no Norte do Paraná sofreu nas últimas décadas um processo intenso de fragmentação. Atualmente, essa região é constituída de uma rede de mosaicos florestais que em sua totalidade representam apenas 2-4% da área originalmente coberta (IPARDES, 1993). De acordo com Torezan et al. (2005), a paisagem atual do Norte do Paraná com fragmentos isolados sofre intensas alterações estruturais provocadas pela redução de populações e pelo efeito de borda, o que torna este um dos ecossistemas mais ameaçados do Brasil. Esta perturbação antrópica expressiva tem estimulado os estudos sobre a conservação da biodiversidade e a dinâmica da regeneração ambiental (induzida ou natural), baseados em ferramentas capazes de acessar a variabilidade e a estrutura genética das populações. De acordo com Santos (1995), dentre os principais prejuízos provocados pela ação humana está o processo de fragmentação dos ambientes florestais, o que leva a modificações na abundância de dispersores, polinizadores, predadores e patógenos de espécies vegetais. As conseqüências desses eventos sobre as populações vegetais remanescentes são as alterações no padrão de fluxo gênico, na variabilidade e na estrutura genética, bem como o aumento do risco de ocorrência de endogamia (BALLAL et al., 1994; MURCIA, 1996).

Estudos que procuram compreender a dinâmica do processo de fragmentação sobre os níveis de diversidade genética, entre e dentro de populações, têm fornecido instrumentos úteis para a elaboração de estratégias que auxiliam nos processos de conservação e de restauração de áreas degradadas (LOWE et al., 2004 apud PAULA, 2005). As estimativas da estruturação genética de populações de espécies arbóreas nativas podem ser melhor acessadas utilizando marcadores moleculares que se ligam aleatoriamente ao genoma, e que permitem uma maior amostragem ou cobertura do mesmo (LU et al., 1996). Uma vez que os marcadores do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) apresentam tal característica, eles são considerados uma ferramenta útil em estudos de biodiversidade.

Esses marcadores têm sido utilizados no estudo de diferentes espécies tropicais, como por exemplo, em *Cedrela fissilis* - Meliaceae (ASSUNÇÃO et al., 2004), no qual os autores evidenciaram uma elevada distância genética interindividual e uma alta divergência genética intrapopulacional em um fragmento florestal situado no Sul de Minas Gerais. Em um outro estudo, Pinto et al. (2003), encontraram que para *Copaifera langsdorffii* (Caesalpinaceae), o processo de fragmentação teve uma influência diferenciada sobre a estrutura genética quando compararam quatro populações da região Norte do estado de São Paulo. Nesse caso, uma das populações foi mais divergente em termos genéticos, o que permitiu identifica-la como

prioritária na aplicação de estratégias de conservação *in situ*. Estes dois exemplos são bastante ilustrativos no que diz respeito às aplicações das ferramentas da genética molecular para os estudos de biodiversidade, conservação e fragmentação florestal.

*Croton floribundus* Spreng. (Euphorbiaceae), conhecido na cultura popular como *capixingui*, é uma espécie arbórea encontrada nas florestas latifoliadas semidecíduais e em regiões de altitude elevada nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Paraná (SOUZA & LORENZI, 2005). Sua polinização se dá por abelhas - melitofilia (LORENZI, 2002). Seu fruto é seco e capsular, com coloração castanha e superfície rugosa, medindo por volta de 9 mm de largura por 8 mm de altura. A dispersão de sementes é do tipo autocórica, onde os frutos são lançados por deiscência explosiva elástica ao chão e se dividem em 3 cocos uniloculadas, contendo uma semente ovada, de cor preta, com cerca de 4,4 mm de largura por 4,7 mm de altura por loco (PAOLI et al., 1995). O tempo para a germinação das sementes oscila em torno de 5 a 10 dias, sendo que a viabilidade das mesmas normalmente não ultrapassa 4 meses (LORENZI, 2002). É uma espécie pioneira, tolerante a áreas abertas, ocorrendo geralmente nas bordas ou no interior de fragmentos florestais que sofreram algum tipo de ação do antrópica e segundo estudo realizado por Rondon Neto et al. (2000), amparada por altos valores em índices ecológicos, esta é considerada indispensável em programas de restauração de áreas degradadas. Por essas características, *C. floribundus* vem sendo extensamente utilizada nos programas de reflorestamento do norte do Paraná.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi determinar a estrutura e a diversidade genética dessa espécie, utilizando marcadores RAPD, em três localidades de coleta, todas elas contendo fragmentos remanescentes da floresta estacional semidecidual no Norte do Paraná, afim de auxiliar na elaboração de estratégias de conservação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de folhas de 96 indivíduos adultos de *C. floribundus* foram coletadas durante o período de março e abril de 2005 em 3 diferentes localidades no Norte do Paraná. Sendo elas Bela Vista do Paraíso (51° 11' 40''W e 23° 00' 15''S), na qual foram amostrados dois fragmentos distintos; Ibioporã (51° 03' 00''W e 26° 16' 59''S), onde as coletas se restringiram a um único fragmento; e Londrina (51° 10' 14''W e 23° 18' 05''S), onde foram amostrados três diferentes fragmentos. (Tabela 1, Figura 1). As folhas jovens foram coletadas no campo e

diretamente acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados em um isopor com gelo. No laboratório, as folhas foram utilizadas para a extração do DNA, ou então armazenadas em um freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso. Para a extração do DNA foi utilizado o método do CTAB (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998) adaptado para *C. floribundus*. A fim de melhorar a limpeza do DNA extraído, essas amostras foram submetidas a um tratamento com NaCl 5M (45  $\mu\text{L}$  para cada 100  $\mu\text{L}$  de DNA em solução) e RNase 1 mg/mL (1  $\mu\text{L}$  para cada 100  $\mu\text{L}$  de DNA em solução). A quantificação do DNA foi estimada a partir de um fluorímetro Dyna Quant 200 (Hoefer) com um padrão de 100 ng, e em seguida, o DNA foi diluído para 5 ng/ $\mu\text{L}$  para ser utilizado nas reações de PCR.

As reações de RAPD foram realizadas em um termociclador PT-100 (BIO RAD), utilizando 15 diferentes *primers* [A2 (5'-GTCCTCGTGT-3'); A3 (5'-ACGGTTCCAC-3'), A6 (5'-GGCGCGTTAG-3'), A7 (5'-GACGAGCAGG-3'), A8 (5'-GGCTGCCAGT-3'), A12 (5'-TGACCAGGCA-3'), A14 (5'-TCGCAGCGTT-3'), A15 (5'-CTGCAATGGG-3'), A17 (5'-AGTTCCGCGA-3'), B2 (5'-CAGCCGAGAA-3'), B3 (5'-GAAGGAGGCA-3'), B4 (5'-TTGCGGCTGA-3'), B5 (5'-CCCGATCAGA-3'), B6 (5'-CCGCAGTCTG-3') e A16 (5'-AACCTTCCC-3')], selecionados de 20 *primers*, todos da Invitrogen. As reações foram montadas para um volume final de 15  $\mu\text{L}$  por microtubo, com as seguintes quantidades de reagentes: 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão de reação de amplificação (10 X), 1,5  $\mu\text{L}$  de mistura de dNTPs (10 mM), 1,5  $\mu\text{L}$  de *primer* (10 mM), 1,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0,2  $\mu\text{L}$  de DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ), todos adquiridos da Invitrogen e 2  $\mu\text{L}$  DNA (5 ng/ $\mu\text{L}$ ). As reações foram realizadas seguindo o programa:  $92^{\circ}\text{C}$  por 4 minutos, seguida de 40 ciclos, cada um com as seguintes etapas: 40 segundos a  $92^{\circ}\text{C}$ , 1 minuto e 30 segundos a  $40^{\circ}\text{C}$  e 2 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ , seguidos por uma extensão final de 5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Ao final do último ciclo, as amostras permaneceram por pelo menos 5 minutos a  $10^{\circ}\text{C}$ , antes de serem submetidas à eletroforese em agarose 1,4% em tampão TEB 1X (Tris 0,045 M, EDTA 0,5 mM e Ácido Bórico 0,045 M, pH 8,3). O gel foi corado com brometo de etídio (5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), e registrado utilizando um transiluminador com luz ultravioleta e um sistema de fotodocumentação digital AlphaDigiDoc – RT. Com a finalidade de se observar o poder de repetibilidade das bandas de RAPD, foram realizadas duas reações de PCR idênticas, em duas datas diferentes, mas obedecendo as mesmas condições gerais estabelecidas para este protocolo de extração e amplificação do DNA.

Após a análise do perfil eletroforético, os dados foram transferidos para planilha eletrônica, sendo, em seguida, submetidos às análises estatísticas. A proporção de locos

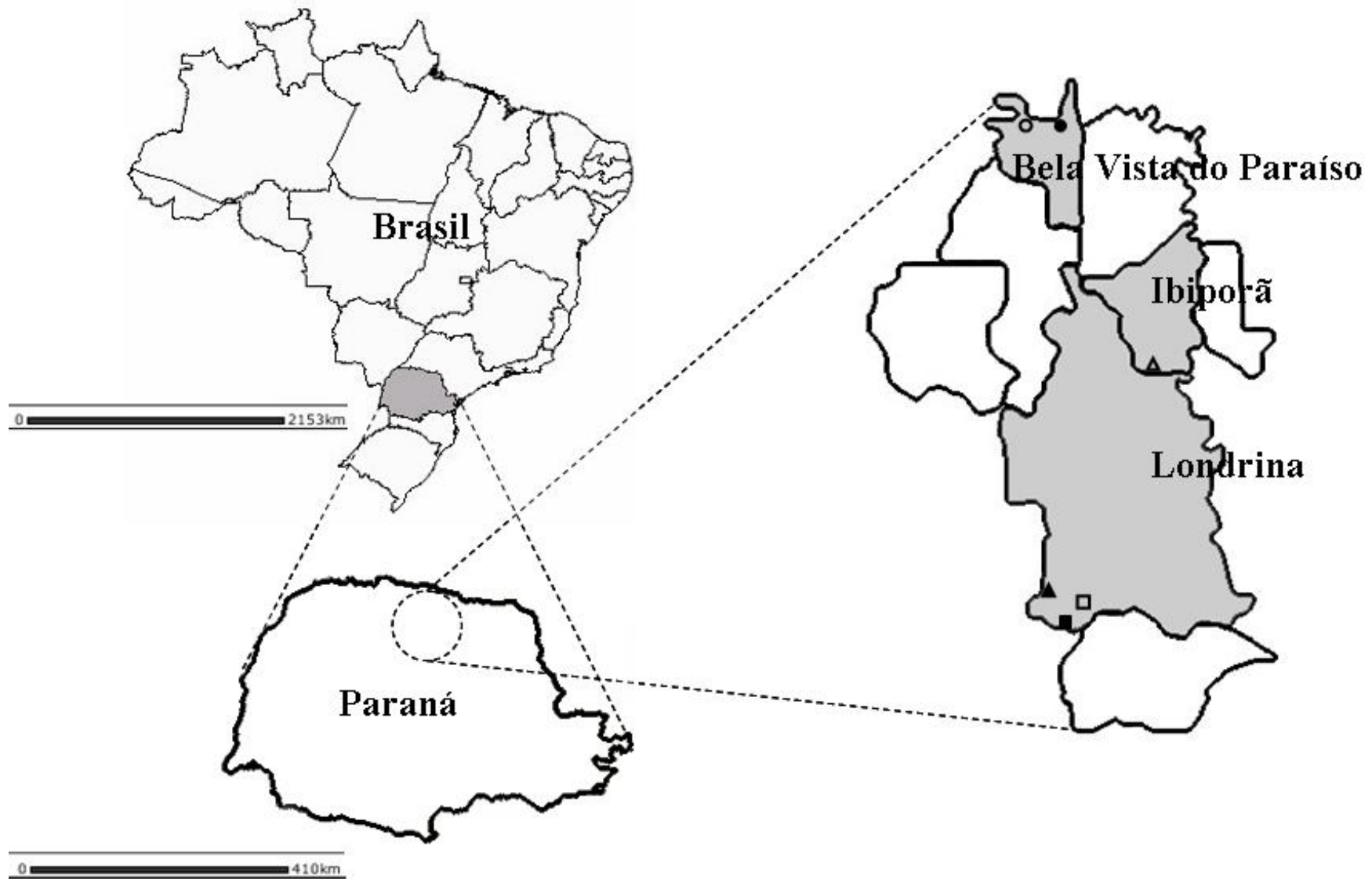
polimórficos ( $P$ ), utilizando o critério de 95%, foi estimada com o *software* TFPGA 1.3 (MILLER, 1997), considerando a correção de Lynch & Milligan (1994) para locos dominantes. A análise de variância molecular (AMOVA), utilizada para determinar o grau de estruturação genética foi feita de acordo com EXCOFFIER et al. (1992). O índice de fixação ( $\Phi_{ST}$ ) (REYNOLDS et al., 1983; SLATKIN, 1995 cf. EXCOFFIER et al., 2005) foi estimado com *software* ARLEQUIN versão 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005). Para estimar a diversidade genética dentro de cada população foi utilizado o índice de diversidade de Shannon -  $H'$  (LEWONTIN, 1972), utilizando o *software* Popgen 1:31 (YEH et al., 1999). As inferências relacionadas com a similaridade genética de Jaccard ( $J$ ) foram realizadas com os *softwares* NTSYS-PC (ROHLF 2002) e SAS (THE SAS INSTITUTE, 1989-1996). Por fim, para determinar o coeficiente de variação (CV) para o total de marcadores utilizados nas estimativas de similaridade genética de Jaccard, foi empregado o *software* DBOOT (COELHO, 2000).

**Tabela 1:** Dados das coletas de *C. floribundus* realizadas no Norte do Paraná durante os meses de março e abril de 2005.

**Table 1:** *C. floribundus* collection's datas.

Regiões de coleta	Fragmentos visitados	GPS*	Data de coleta	Número de amostras
Bela Vista do Paraíso	Cemitério	0480349 7459765	28/03/2005	15
	Fazenda Novo Horizonte	0479782 7420558	11/04/2005	17
Ibiporã	Fazenda Doralice	0511236 7334540	04/04/2005	13
			07/04/2005	11
Londrina	Parque Estadual Mata dos Godoy	0473695 7407566	14/04/2005	7
			21/03/2005	19
	São Luís	0476582 7398402	23/03/2005	4
	Patrimônio Regina	0477346 7412352	23/03/2005	10
-----	-----	-----	-----	<b>96</b>

\* *Global Positioning System*

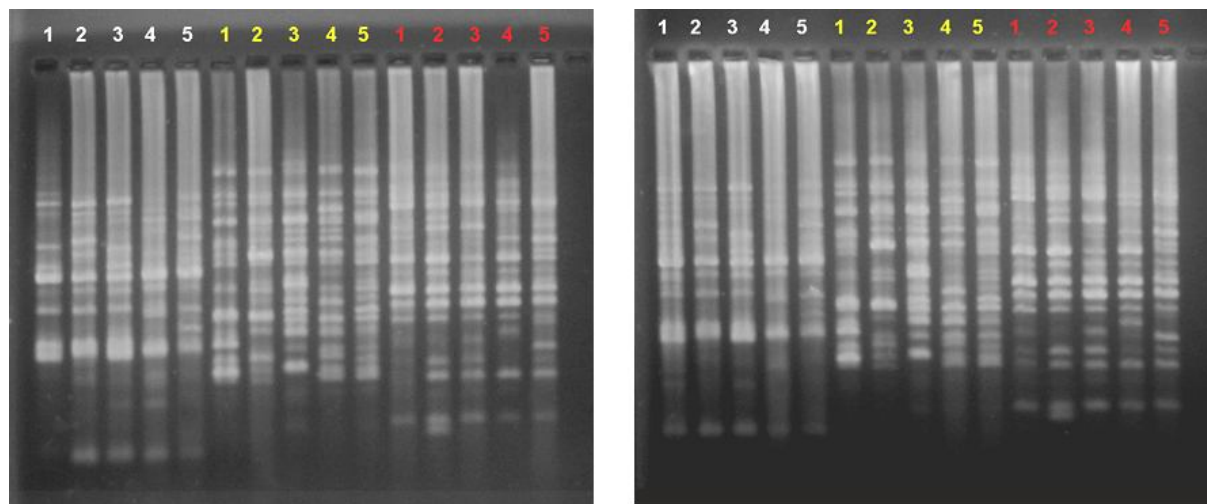


**Figura 1:** Localização dos fragmentos: Cemitério (○), Fazenda Novo Horizonte (●), Fazenda Doralice (▲), Mata dos Godoy (▲), Patrimônio Regina (□) e São Luís (■) dentro das diferentes regiões de coleta.

**Figure 1:** Localization of the fragments Cemitério (○), Fazenda Novo Horizonte (●), Fazenda Doralice (▲), Mata dos Godoy (▲), Patrimônio Regina (□) e São Luís (■) inside of the different collections' regions.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 15 *primers* empregados nas reações de RAPD geraram um número total de 157 bandas, sendo que o número de bandas produzidas por *primer* variou de 8 (A-12 e A-15) a 14 (A-14). A Figura 2 mostra o teste de repetibilidade para as reações de RAPD com 5 indivíduos escolhidos aleatoriamente e amplificados com os *primers* A-6, A-14 e B-6. Os perfis de bandas obtidos nas reações de RAPD estão exemplificados na Figura 3.



**Figura 2:** Teste de repetibilidade para os indivíduos para 5 indivíduos escolhidos aleatoriamente e amplificados com os *primers* A – 6 (branco), A – 14 (amarelo) e B – 6 (vermelho)

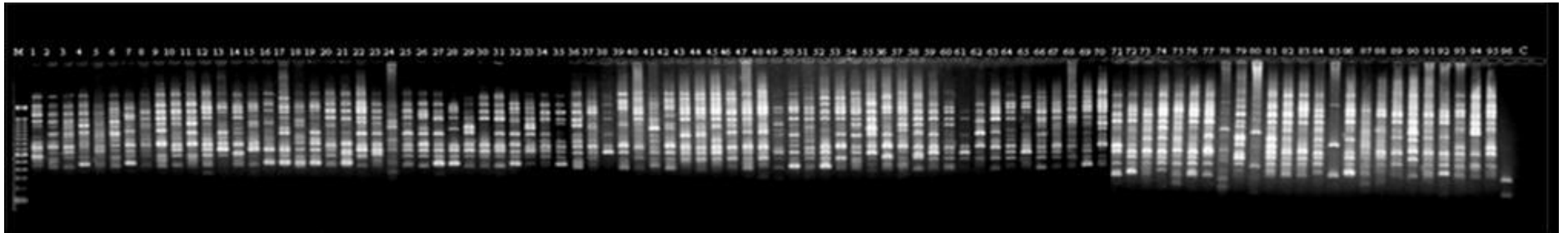
**Figure 2:** Repeatability test with 5 individuals chosen randomly and amplified with *primers* A – 6 (white), A – 14 (yellow) and B – 6 (red).

A proporção de locos polimórficos ( $P$ ) foi de 84,1% para a região de Ibiporã e 89,2% para as regiões de Bela Vista do Paraíso e Londrina. Como esses resultados não foram discrepantes, e para fins de comparação com outros estudos, foi utilizado o valor total da proporção de locos polimórficos, 94,9%, estimado a partir de uma análise conjunta dos 96 indivíduos sem a diferenciação em localidades. O valor encontrado para *C. floribundus* é próximo ao observado por ZIMBACK et al. (2004) em *Trichilia pallida* – Meliaceae, com 92,6%. Contudo, esse pode ser considerado elevado, se comparamos com os obtidos em outras espécies arbóreas tropicais, tais como  $P = 70,8\%$  em *Plathymenia reticulata* - Mimosoideae (LACERDA et al., 2001) e  $P = 78,5\%$  em *Aspidosperma polyneuron* - Apocynaceae (TOREZAN et al., 2005). O que chama a atenção nesse caso, é que o valor dos locos polimórficos encontrado em *C. floribundus*, uma espécie pioneira com dispersão de sementes de curta distância, é similar ao de *Trichilia pallida*, uma espécie do sub-bosque de florestas maduras, cujas sementes são dispersas pela avefauna. Entretanto, tal acontecimento

pode ser explicado pelo fato que em ambos os estudos não foi verificado um grande isolamento geográfico entre as regiões de coleta, o que pode permitir uma maior taxa de fluxo gênico e uma diminuição na perda de diversidade. De outro modo, o fato do valor médio dos locos polimórficos de *C. floribundus* ser bastante discrepante de *Plathymenia reticulata* e *Aspidosperma polyneuron* parece não ser notável, já que no primeiro caso, se trata de uma espécie típica do Cerrado e das transições com as florestas semidecíduais, e no segundo de uma espécie exclusiva do interior de florestas semidecíduais. Segundo Kageyama et al. (2003), algumas espécies arbóreas pioneiras, como é o caso de *C. floribundus*, possuem como característica uma dispersão de sementes a curta distância, o que confere as mesmas uma ocorrência agregada e, frequentemente, uma alta densidade populacional, algo que foi observado nesse estudo. Assim sendo, nossos resultados permitem sugerir que o elevado número de indivíduos por população, bem como a possibilidade de fluxo gênico entre os fragmentos, pode contrabalançar os possíveis efeitos do processo de fragmentação florestal, pelo menos nas regiões amostradas, já que não houve perda significativa da diversidade genética. Como a perda de diversidade genética em uma espécie está intimamente ligada ao processo de deriva genética, quanto maior a população, menor a suscetibilidade a esse fator evolutivo (HARTL & CLARK, 1997).

Os índices de diversidade de Shannon ( $I$ ) foram de 0,5206 para a população de Bela Vista do Paraíso, 0,4893 para Ibiporã e 0,5173 para Londrina. Assim como para a proporção de locos polimórficos, a comparação entre o índice de Shannon obtido para *C. floribundus* e outras espécies se baseou no valor de 0,5311, estimado para os indivíduos agrupados em um único conjunto. O valor de  $I$  obtido no presente estudo está próximo ao descrito para *Eremanthus erythropappus* – Asteraceae, com  $I = 0,38$  a  $0,48$  (FREITAS, 2001) e  $I = 0,58$  (ESTOPA et al., 2006), uma espécie pioneira também estudada com marcadores RAPD. No entanto, esta aproximação também apareceu entre *C. floribundus* e *Swietenia macrophylla* – Meliaceae, com  $I = 0,45$  (GILLIES et al., 1999), uma espécie típica de florestas maduras. Este evento deve-se provavelmente ao fato de *S. macrophylla* apesar de apresentar uma baixa densidade de indivíduos por hectare, possui características imprescindíveis para a manutenção da diversidade genética, como por exemplo, fecundação cruzada, uma elevada produção de sementes viáveis, distribuição ampla e uma taxa de crescimento rápido. A mesma explicação pode ser adotada para a aproximação entre *C. floribundus* e *Aspidosperma polyneuron*, com  $I = 0,446$  (TOREZAN et al., 2005), outra espécie de floresta madura com uma produção elevada de sementes viáveis, distribuição ampla e que apesar de contar com um sistema de reprodução de tipo misto, predomina a alogamia (MALTEZ, 1997). Contudo, vale a pena

ressaltar que Torezan et al. (2005) encontraram uma diminuição da diversidade genética em *A. polyneuron* entre plantas mãe e as progênies. Mas como esta espécie atinge a fase reprodutiva com 50 a 60 anos, somente em um prazo mais logo os efeitos da fragmentação sobre as populações serão mais claramente detectados.



**Figura 3:** Padrão de amplificação de bandas para os 96 indivíduos de *C. floribundus* a partir do *primer* A -14.  
**Figure 3:** Amplification of 96 *C. floribundus* individuals by *primer* A – 14.

A análise de variância molecular (AMOVA) em *C. floribundus* revelou que 97,41% da variação genética se encontram dentro de localidades, e que apenas 2,59% se devem a diferenças genéticas entre localidades (Tabela 2).

**Tabela 2:** Valores da AMOVA para *C. floribundus* coletadas no Norte do Paraná.

**Table 2:** AMOVA values for *C. floribundus* from Northern Paraná state, Brazil.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre localidades	2	61,849	0,44466	2,59*
Dentro de localidades	93	1553,109	16,70010	97,41*
Total	95	1614,958	17,14476	

\* =  $P < 0,001$

A variação inter-regiões observada neste estudo foi superior apenas aos valores estimados em *Trema micrantha* – Ulmaceae (KAGEYAMA et al., 2003), com 0,7%. Os resultados observados para outras espécies foram superiores ou ligeiramente superiores, como por exemplo, em *Esenbeckia leiocarpa* – Rutaceae, com 4,9% (KAGEYAMA et al., 2003). *T. micrantha* é uma espécie pioneira, típica de formações secundárias e de áreas abandonadas e com uma produção massiva de sementes viáveis (KAGEYAMA et al., 2003). Já, *E. leiocarpa*, apesar de ser uma espécie típica de formações florestais maduras, assim como *C. floribundus*, apresenta distribuição espacial agregada, é polinizada por insetos (moscas) e conta com uma dispersão de sementes a curta distância ocasionadas por deiscência explosiva dos frutos (KAGEYAMA et al., 2003).

Ainda com base nos dados da AMOVA, as variações genéticas interpopulacionais obtidas para *C. floribundus* podem ser consideradas baixas quando comparadas as observadas em *Maytenus aquifolia* – Celastraceae, com 14,7% (KAGEYAMA et al., 2003), *Aspidosperma polyneuron*, com 21% (TOREZAN et al. 2005) e *Eugenia dysenterica* – Myrtaceae, com 27% (ZUCCHI, 2002). Todavia, este fato é aceitável, uma vez que *M. aquifolia* é uma espécie florestal climática, típica de ambientes úmidos e, para Kageyama et al. (2003), tais valores podem ser explicados pelo fato de que em seu estudo foi amostrado um grande número de populações, isoladas parcialmente e sob efeito da deriva genética. As divergências entre os dados obtidos para *A. polyneuron* e *C. floribundus* já era esperada por esta primeira ser uma espécie climática e apresentar uma baixa densidade populacional. O

simples fato de que ambos os estudos se concentraram na mesma região geográfica poderia contribuir para uma maior semelhança entre seus resultados, todavia, devemos destacar a ocorrência de diferenças metodológicas de coleta (representada pelo número total de indivíduos analisados e dos fragmentos visitados) e a intensa exploração de *A. polyneuron* desde o início da colonização do Norte do Paraná. Sendo assim, é possível que ela tenha sofrido mais intensamente com o processo de fragmentação e isolamento genético.

De acordo com Hamrick e Loveless (1989), em se tratando de espécies arbóreas tropicais, a parcela da variabilidade genética presente entre populações tende a ser sempre menor que a encontrada dentro de populações. Oliveira (2000) sugeriu que quando os fragmentos não estão sofrendo os efeitos da deriva genética, a variação entre populações raramente ultrapassa 5%, concentrando-se na maioria dos casos, na faixa de 3%. Hamrick e Godt (1989) inferiram que um dos maiores determinantes da estruturação genética entre populações vegetais está na sua biologia reprodutiva. Espécies que realizam autofecundação podem apresentar até 50% de sua variabilidade genética distribuída entre suas populações, enquanto que, em espécies de fecundação cruzada, esses valores raramente ultrapassam a casa dos 20%. Considerando que essa última estratégia é a mais utilizada pelas espécies tropicais (BAWA, 1990; ALDRICH & HAMRICK, 1998; NASON et al., 1998), inclusive *C. floribundus*, temos que as inferências acima dão credibilidade aos resultados encontrados neste estudo, os quais por sua vez estão dentro do esperado para populações naturais e não apresentam efeitos que possam ser atribuídos à fragmentação florestal.

O significado, bem como a importância de se averiguar como a variabilidade genética de uma espécie está distribuída se deve ao fato que, de acordo com Wright (1978), o índice de fixação, ou  $F_{ST}$  (a parcela da variabilidade genética contida entre as populações) pode ser interpretado de modo qualitativo em termos de diferenciação genética entre as populações estudadas. Valores entre 0 e 0,05 representam uma baixa diferenciação, entre 0,05 e 0,15 uma diferenciação moderada, entre 0,15 e 0,25 uma diferenciação alta e acima de 0,25 uma diferenciação genética muito alta. O valor de  $\Phi_{ST}$  (análogo ao  $F_{ST}$ ) encontrado neste estudo foi de 0,0259, indicando uma baixa diferenciação entre as regiões amostradas. Embora baixa, essa diferenciação foi estatisticamente significativa, indicando que existe estruturação genética nas três localidades estudadas.

A distância média entre aos fragmentos visitados em Bela Vista do Paraíso e Ibiporã foi de 27431,97 m, entre Bela Vista do Paraíso e Londrina, de 28542,28 m e entre Ibiporã e Londrina, de 21459,18 m. As estimativas de  $\Phi_{ST}$  para cada um desses grupos de localidades mostraram que as maiores diferenças na estimativa de  $\Phi_{ST}$  foi para a combinação Bela Vista

do Paraíso e Ibiporã ( $\Phi_{ST} = 0,033$ ), seguido de Bela Vista do Paraíso e Londrina ( $\Phi_{ST} = 0,0247$ ), Ibiporã e Londrina ( $\Phi_{ST} = 0,0135$ ). Embora a distância entre essas localidades não seja muito divergente, os valores de  $\Phi_{ST}$  foram maiores para aquelas mais distantes entre si. Essa baixa estruturação pode ser devido ao fato que ainda exista fluxo gênico entre as localidades, o que amenizaria os efeitos da seleção natural e da deriva genética, por exemplo. Por outro lado, ela também pode ser um indicativo que o processo de isolamento dessas plantas pode estar mostrando os seus primeiros efeitos. Somente estudos a longo prazo poderão responder a essa questão.

O coeficiente de variação para o total de bandas de RAPD utilizados na estimativa do coeficiente de similaridade de Jaccard foi 7,64%. Sendo assim, essas estimativas de similaridade podem ser consideradas consistentes. Os resultados demonstrados na Tabela 3 indicam que Londrina foi a localidade onde se encontrou a menor amplitude de variação para a similaridade entre as plantas amostradas (0,2612), bem como a maior similaridade média entre elas ( $0,6325 \pm 0,0486$ ). Por sua vez, Ibiporã foi a localidade com a maior amplitude de variação (0,4031) para a similaridade entre as plantas estudadas. Vale ressaltar que nessa localidade foram amostradas plantas de um único fragmento de mata. Entretanto, que apresentou uma maior área de mata contínua que possuía o melhor estado de conservação.

**Tabela 3:** Valores de similaridade genética de Jaccard para as plantas de *C. floribundus* amostradas em cada localidade estudada.

**Table 3:** Jaccard similarity values from *C. floribundus* in each studied region.

	N	Similaridade Mínima	Similaridade Máxima	Variação	Similaridade Média	CV%
Londrina	378	0,4927	0,7539	0,2612	$0,6325 \pm 0,0486$	7,6764
Ibiporã	465	0,4553	0,8584	0,4031	$0,6155 \pm 0,0514$	8,3540
B.V. do Paraíso	465	0,4138	0,7563	0,3425	$0,5957 \pm 0,0590$	9,9066

No que diz respeito aos estudos envolvendo *Croton floribundus*, todos se resumem ao campo da ecologia, assim, dados referentes à sua diversidade genética são de extrema importância não só por ampliar o banco de informações disponíveis para espécies tropicais, mas também por auxiliar o entendimento da eficiência das estratégias reprodutivas para a perpetuação da espécie e ainda colaborar efetivamente na confecção de planos de manejo e restauração de ambientes degradados envolvendo *C. floribundus*, bem como na preservação de sua diversidade.

Nossos resultados sugerem que embora a maior parte da diversidade genética se

encontre dentro de cada localidade, existe um nível baixo, mais significativo, de estruturação genética entre elas. É possível que a alta densidade de indivíduos de *C. floribundus* por fragmento, juntamente com a elevada produção de sementes viáveis (apesar da dispersão ser autocórica), a polinização por abelhas (NOGUEIRA – NETO, 2002) e a alogamia, além da semelhança na estrutura ecológica das regiões de coleta e a distância relativamente reduzida entre as mesmas, justifiquem a baixa diferenciação genética encontrada neste trabalho. Contudo, os resultados permitem propor que as amostras de *C. floribundus* analisadas sejam geneticamente estruturadas como populações distintas. Estas informações trazem uma contribuição prática imediata, pois sugerem que a coleta de sementes desta espécie, visando a restauração ambiental, se beneficiaria da amostragem em mais de uma, ou pelo menos, naquelas que apresentam um maior grau de diferenciação genética entre as plantas amostradas.

#### 4. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências SEMA-IAP, Fundação Araucária e CNPq pelo apoio financeiro; e a Rosângela Moreira P. de Carvalho e Josué Maldonado pelas análises estatísticas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRICH, P. R.; HAMRICK J. L. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. **Science**, v. 281: p. 103-105. 1998.
- ASSUNÇÃO, N. S. **Divergência genética em uma população natural de *Cedrela fissilis* Vell. obtida por marcadores RAPD**. 2004. 29p. Monografia (Bacharel em Engenharia Florestal) – UFLA, Lavras, MG. 2004.
- BALLAL, S. R.; FORÉ, S. A.; GUITTMEN, S. I. Apparent gene flow and genetics structure of *Acer saccharum* subpopulations in forest fragments. **Canadian journal of botany**, v.72: p.1311-1315. 1994.
- BAWA K. S. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 21: p. 399-422. 1990.
- COELHO, A. S. G. **dBoot: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores**. Goiânia: Laboratório de Genética Vegetal, Instituto de Ciências biológicas/UFG. CD. 2000.

COLLEVATI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v.10, p.349-356, 2001.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M. de; MOURA, M. C de. O.; BOTREL, M. C.; CARVALHO, D.; MENDONÇA, E. G. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish).. **Scientia Forestalis**, Piracicaba-SP, v. 70: p. 97-106. 2006.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, A.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1: p. 47-50. 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131: p. 479-491. 1992.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN. P. 37-52, 1998.

FREITAS, V. L. O. **Variabilidade genética em *Vanillosmopsis erythropappa* Schlutz Bip. (Asteraceae) em áreas de candeial e de mata**. 2001. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre), UFMG, Belo Horizonte, MG. 2001.

GILLIES, A. C. M.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J.; NEWTON, A. C.; HERNÁNDEZ, M.; WILSON, J.; CORNELIUS, J. P. Genetic diversity in meso-American populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. **Heredity**, v. 83: p. 722-732. 1999.

HAMRICK, J. L., GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROW H. D.; CLEGG M. T.; KAHLER A. L.; WEIR B. S.; eds. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc., p. 43–63. 1989.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The genetic structure of tropical tree populations: association with reproductive biology. In: **The evolutionary ecology of plants** (J.H. Bock & Y.B. Linhart, eds.). Westview Press, Boulder, p.129-146. 1989.

HARTL, D. L.; CLARCK, A. G. **Principles of population genetics**. 3ª ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 542 p. 1997.

IPARDES – Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Cobertura florestal e consumo de madeira, lenha e carvão nas regiões de Londrina, Maringá e Paranavaí: Subsídio para uma política florestal no estado do Paraná**. IPARDES, Curitiba. 1993.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F.; PERECIN, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v. 64: p. 93-107. 2003.

LACERDA, D. R.; ACEDO M. D. P.; LEMOS FILHO J. P.; LOVATO M. B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymentia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, v. 10: p. 1143–1152. 2001.

LEWONTIN, R. The apportionment of human diversity. In: DOBZHANSKY T.; HECHT, M. K.; STEERE, W. C.; editors. **Evolutionary Biology**. New York: Appleton-Century-Crofts. v. 6: p. 381-398. 1972.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4ª ed. São Paulo: Nova Odessa: Plantarum, vol. 1, 384 p. 2002.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. Ecological genetics. Densing, analysis and application. 2004. In: PAULA de, F. M. **Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do complexo Canoas – Rio Paranapanema**. 2005. 125 p. Dissertação (Mestrado em Genética). UEL, Londrina, PR. 2005.

LU, Z. X.; REIGHARD, G. L.; BAIRD, W. V. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 1: p. 127-129, 1996.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 3: p. 91-99. 1994.

MALTEZ, H. M. **Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Müell. Arg – Apicynaceae (peroba rosa) em uma floresta estacional semidecidual no Estado de São Paulo**. 1997. 132p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de Campinas/Instituto de Biologia, Campinas, SP. 1997.

MILLER, M. P. **Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3**: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. 1997.

MURCIA, C. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. In: SCHELHAS, J.; GREENBERG, R. (Eds.). **Forest Patches in Tropical Landscapes**. Washington, D.C.: Island Press. p. 149-186. 1996.

NASON J. D., HERRE E. A., HAMRICK J. L. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. **Nature**, v. 391: p. 685-687. 1998.

NOGUEIRA-NETO, P. Management of plants to maintain and study pollinating bee species, and also to project vertebrate frugivorous fauna. In: Kevan, P.; Imperatriz-Fonseca, V.L. (Org.). **Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente & Bárbara Bela Editora Gráfica, v. 1: p. 21-28, 2002.

OLIVEIRA, A. F. **Estrutura genética de populações naturais de *Copaifera langsdorffii* Desf. a partir de isoenzimas**. 2000. 115 p. Dissertação (Mestrado). UFLA, Lavras, MG, 2000.

- PAOLI, A. A. S. ; FREITAS, L. ; BARBOSA, J. M. . Caracterizacão Morfológica de Frutos, Sementes e Plantulas de *Croton Floribundus* Spreng. e *Croton Urucurana* Baill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, n. 1, p. 57-68, 1995.
- PINTO, S. I. do C.; ESTOPA, R. A.; CARVALHO de, D.; SOUZA de, A. M. Avaliação da diversidade genética de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinaceae) utilizando marcador molecular RAPD. In: **XVI CICESAL – UFLA**, Lavras, MG. 2003.
- REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of the co-ancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. **Genetics**, v. 105: p. 767–779. 1983.
- ROHLF, F. J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy system, v. 2.1. **Exeter Publishing Ltd.**: Setauket, NY. 2002.
- SANTOS, P. S. Fragmentação de habitats: implicações para a conservação *in situ*. In: ESTEVES, F. A., ed. **Ecologia brasiliensis**. Local: Editora, 616p. 1995.
- SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOVSKY, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia Florestalis**, v. 58: p. 127-143. 2000.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, segundo A.P.G.II**. 1ª ed. São Paulo: Nova Odessa: Plantarum, v. 1. 640 p. 2005.
- The SAS Institute. The SAS System for Windows (Statistical Analysis System). Version 6.12. Cary, NC; 1989-1996
- TOREZAN, J. M. D.; SOUZA, R. F. de; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; CAMARGO, E. H.; VANZELA, A. L. L. Genetic variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2: p. 171-180. 2005.
- WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations. **University of Chicago Press**, v. 4. 1978.
- YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. POPGENE version 1.31: **Microsoft Windows based freeware for populations genetic analysis**. University of Alberta Center for International Forestry Research. 1999.
- ZIMBACK, L.; MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VEIGA, R. F. A.; MELLO JUNIOR, J. R. S. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* por marcadores RAPD. **Scientia forestalis**, v. 65: p. 114-119. 2004.
- ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC. utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP. 2002.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As análises realizadas para *Croton floribundus* a partir de diferentes parâmetros genéticos forneceram dados que concordam entre si;
- Fatores como a alogamia, elevada produção de sementes viáveis, crescimento e reprodução rápidas e uma alta densidade populacional podem justificar os elevados valores de diversidade genética encontrados para *Croton floribundus* no Norte do Paraná;
- A polinização por abelhas e a distância relativamente reduzida entre os fragmentos podem estar mantendo um nível razoável de fluxo gênico entre os mesmos, o que juntamente com a semelhança ecológica entre as localidades de estudo poderiam explicar a baixa estruturação genética entre as localidades analisadas. Por outro lado, embora baixa, a estruturação observada entre as localidades foi significativa, o que pode ser um indicativo que o processo de fragmentação que vem se intensificando nas últimas décadas pode estar contribuindo para o isolamento entre as plantas de *C. floribundus* de diferentes fragmentos;
- As análises da distribuição da variabilidade genética fornecem informações práticas para a elaboração de planos de manejo e conservação, uma vez que a partir dos resultados observados pode-se propor que a coleta de sementes se beneficiaria da amostragem de mais de uma localidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRICH, P. R.; HAMRICK J. L. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. **Science**, v. 281: p. 103-105. 1998.

ALI, B. A.; HUANG, T.; QIN.; WANG, X. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. **Reviews in Fish Biology and Fishery**. V. 14: p. 443-453. 2004.

ASSUNÇÃO, N. S. **Divergência genética em uma população natural de *Cedrela fissilis* Vell. obtida por marcadores RAPD**. 2004. 29p. Monografia (Bacharel em Engenharia Florestal) – UFLA, Lavras, MG. 2004.

BALLAL, S. R.; FORÉ, S. A.; GUITTMEN, S. I. Apparent gene flow and genetics structure of *Acer saccharum* subpopulations in forest fragments. **Canadian journal of botany**, v.72: p.1311-1315. 1994.

BAWA K. S. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 21: p. 399-422. 1990.

CARVALHO, G. R. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. **Journal of Fish Biology**, v. 43: p. 53-73. 1993.

CAVALHEIRO, A. L.; TOREZAN, J.M.D. Recuperação de áreas degradadas: procurando por diversidade e funcionamento dos ecossistemas. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA. O. A.; PIMENTA, J. A. **A bacia do rio Tibagi**. 1ª ed. Londrina: Edição dos editores, 596 p. 2002.

CIAMPI, A.Y. Uso de marcadores moleculares no estudo de genética de populações de espécies florestais. In: **Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe**, 3., 2001, Londrina. Anais... Londrina: IAPAR, p. 19 – 22. 2001.

COELHO, A. S. G. **dBoot: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores**. Goiânia: Laboratório de Genética Vegetal, Instituto de Ciências biológicas/UFG. CD. 2000.

COLLEVATI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v.10, p.349-356, 2001.

COLLI, G. R.; ACCACIO, G. M.; ANTONINI, Y.; CONSTANTINO, R.; FRANCESCHINELLI, E. V.; LAPS, R. R.; SCARIOT, A. O.; VIEIRA, M. V.; WIEDERHECKER, H. C. A fragmentação dos ecossistemas e a biodiversidade brasileira: uma síntese. In: Denise Marçal Rambaldi; Daniela América Suarez de Oliveira. (Org.). **Fragmentação de Ecossistemas**. 1 ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, v. 1: p. 317-324. 2003.

ELLSTRAND, N. C.; ELLAN, D. R. Population genetic consequences of small population sizes: implication for plant conservation. **Annual review on ecological systematics**, v. 24: p. 217-242. 1993.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M. de; MOURA, M. C de. O.; BOTREL, M. C.; CARVALHO, D.; MENDONÇA, E. G. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish).. **Scientia Forestalis**, Piracicaba-SP, v. 70: p. 97-106. 2006.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131: p. 479-491. 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, A.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1: p. 47-50. 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN. P. 37-52, 1998.  
FREITAS, V. L. O. **Variabilidade genética em *Vanillosmopsis erythropappa* Schlutz Bip. (Asteraceae) em áreas de candeial e de mata**. 2001. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre), UFMG, Belo Horizonte, MG. 2001.

FREITAS, V. L. O. **Variabilidade genética em *Vanillosmopsis erythropappa* Schlutz Bip. (Asteraceae) em áreas de candeial e de mata**. 2001. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre), UFMG, Belo Horizonte, MG. 2001.

FRITSCH, P.; RIESEBERG, L. I. I. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics In: SMITH, T. B.; WAYNE, R. K. **Molecular Genetic Approaches in Conservation**, Oxford University Press, New York, p. 54-73. 1996.  
GILLIES, A. C. M.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J.; NEWTON, A. C.; HERNÁNDEZ, M.; WILSON, J.; CORNELIUS, J. P. Genetic diversity in meso-American populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. **Heredity**, v. 83: p. 722-732. 1999.

HAMRICK, J. L., GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: BROW H. D.; CLEGG M. T.; KAHLER A. L.; WEIR B. S.; eds. **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc., p. 43–63. 1989.

HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The genetic structure of tropical tree populations: association with reproductive biology. In: **The evolutionary ecology of plants** (J.H. Bock & Y.B. Linhart, eds.). Westview Press, Boulder, p.129-146. 1989.

HARTL, D. L.; CLARCK, A. G. **Principles of population genetics**. 3<sup>a</sup> ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 542 p. 1997.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis, 2007. **Estudos de representatividade ecológica nos biomas brasileiros**. <http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/estudos.htm>. Acesso em: 1 fev. 2007a.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis, 2007. **Ecosistemas brasileiros: Mata Atlântica**. [http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata\\_atlantica.htm](http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/mata_atlantica.htm) . Acesso em: 1 fev. 2007b.

IPARDES – Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Cobertura florestal e consumo de madeira, lenha e carvão nas regiões de Londrina, Maringá e Paranavaí: Subsídio para uma política florestal no estado do Paraná**. IPARDES, Curitiba. 1993.

KAGEYAMA, P. Y. Revegetação de Áreas Degradadas: Modelos com Alta Diversidade.. In: **Simpósio Sul-Americano de Recuperação de Áreas Degradadas**, Foz do Iguaçu, p. 569-576. 1994.

KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M.; RIBAS, L. A.; GANDARA, F.; PERECIN, M. B.; VENCOVSKY, R. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v. 64: p. 93-107. 2003.

LACERDA, D. R.; ACEDO M. D. P.; LEMOS FILHO J. P.; LOVATO M. B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, v. 10: p. 1143–1152. 2001.

LEWONTIN, R. The apportionment of human diversity. In: DOBZHANSKY T.; HECHT, M. K.; STEERE, W. C.; editors. **Evolutionary Biology**. New York: Appleton-Century-Crofts. v. 6: p. 381-398. 1972.

LINO, C. F.; BECHARA E. Considerações iniciais (parte 1). In: LINO, C. F. & BECHARA E. **Estratégias e instrumentos para a conservação, recuperação e desenvolvimento sustentável da Mata Atlântica** (Caderno nº. 21, série Políticas Públicas). São Paulo: Conselho Nacional de Reserva da Biosfera da Mata Atlântica; Fundação SOS Mata Atlântica, 2002. 84 p.

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA markers technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**. V. 238: p. 1-37. 2004.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4ª ed. São Paulo: Nova Odessa: Plantarum, vol. 1, 384 p. 2002.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. Ecological genetics. Densing, analysis and application. In: PAULA de, F. M. **Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do complexo Canoas – Rio Paranapanema**. 2005. 125 p. Dissertação (Mestrado em Genética). UEL, Londrina, PR. 2005.

LU, Z. X.; REIGHARD, G. L.; BAIRD, W. V. Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers. **HortScience**, Alexandria, v. 31, n. 1: p. 127-129, 1996.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B. G. Analysis of population structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 3: p. 91-99. 1994.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. 2a. ed. Rio de Janeiro: José Olympio. 450p. 1981.

MALTEZ, H. M. **Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Müell. Arg – Apicynaceae (peroba rosa) em uma floresta estacional semidecidual no Estado de São Paulo**. 1997. 132p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de Campinas/Instituto de Biologia, Campinas, SP. 1997.

MARQUES, D. K. S. **Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Corumbá: Embrapa Pantanal (Documentos, 36), 22 p. 2002.

MEDRI, M. E.; SOARES, F. S. Alguns aspectos da colonização da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A.; PIMENTA, J. A. **A bacia do rio Tibagi**. 1ª ed. Londrina: Edição dos Editores, 596 p. 2002.

MILLER, M. P. **Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3**: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. 1997.

MULLINS, K.; FALOONA, F. Specifics synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. **Methyl Enzymology**, v. 55: p. 335-350. 1987.

MURCIA, C. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. In: SCHELHAS, J.; GREENBERG, R. (Eds.). **Forest Patches in Tropical Landscapes**. Washington, D.C.: Island Press. p. 149-186. 1996.

NASON J. D., HERRE E. A., HAMRICK J. L. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. **Nature**, v. 391: p. 685-687. 1998.

NOGUEIRA-NETO, P. Management of plants to maintain and study pollinating bee species, and also to project vertebrate frugivorous fauna. In: Kevan, P.; Imperatriz-Fonseca, V.L. (Org.). **Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente & Bárbara Bela Editora Gráfica, v. 1: p. 21-28, 2002.

OLIVEIRA, A. F. **Estrutura genética de populações naturais de *Copaifera langsdorffii* Desf. a partir de isoenzimas**. 2000. 115 p. Dissertação (Mestrado). UFLA, Lavras, MG, 2000.

PAOLI, A. A. S. ; FREITAS, L. ; BARBOSA, J. M. . Caracterizacao Morfológica de Frutos, Sementes e Plantulas de *Croton Floribundus* Spreng. e *Croton Urucurana* Baill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 17, n. 1, p. 57-68, 1995.

PENNER, G. A. RAPD analysis of plants genomes. In: **Method of Genome Analysis in Plants** (ed. Jauhar PP), CRC Press, Boca Raton, p. 252-268. 1996.

PERES-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: CULLEN, L. J.; VALADARES-PADUA, C.; RUDRAN, R. (Orgs.) **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida Silvestre**. Ed. UFPR, p. 343-380. 2003.

PINTO, S. I. do C.; ESTOPA, R. A.; CARVALHO de, D.; SOUZA de, A. M. Avaliação da diversidade genética de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinaceae) utilizando marcador molecular RAPD. In: **XVI CICESAL** – UFLA, Lavras, MG. 2003.

REYNOLDS, J.; WEIR B. S.; COCKERHAM C. C. Estimation of the co-ancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. **Genetics**, v. 105: p. 767–779. 1983.

RODERJAN, C. V.; GALVÃO, F.; KUNIYOSHI Y. S.; HATSCHBACH, G. G. As unidades fitogeográficas do Estado do Paraná, Brasil. **Ciência&Ambiente**, Santa Maria, v. 24: p. 78-118. 2002.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy system, v. 2.1. **Exeter Publishing Ltd.**: Setauket, NY. 2002.

RONDON NETO, R. M.; BOTELHO, S. A.; FONTES, M. A. L.; DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R. Estrutura e composição florística da comunidade arbustivo-arbórea de uma clareira de origem antrópica, em uma Floresta Estacional Semidecídua Montana Lavras – MG, Brasil. **Cerne**, Lavras, v. 6, n. 2: p. 79-94. 2000.

SANTOS, P. S. Fragmentação de habitats: implicações para a conservação *in situ*. In: ESTEVES, F. A., ed. **Ecologia brasiliensis**. Local: Editora, 616p. 1995.

SEBBENN, A. M.; SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VENCOSKY, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia Florestalis**, v. 58: p. 127-143. 2000.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual review of ecology and systematics**, v.16: p. 393-430. 1985.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236: p. 787-792. 1987.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, segundo A.P.G.II**. 1ª ed. São Paulo: Nova Odessa: Plantarum, v. 1. 640 p. 2005.

The SAS Institute. The SAS System for Windows (Statistical Analysis System). Version 6.12. **Cary, NC**; 1989-1996

TOREZAN, J. M. D.; SOUZA, R. F. de; RUAS, P. M.; RUAS, C. F.; CAMARGO, E. H.; VANZELA, A. L. L. Genetic variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2: p. 171-180. 2005.

TORRES, R. A.; MATOSO, D. A.; ARTONI, R. F. Genética de peixes neotropicais. *Biologia molecular de peixes neotropicais*. **Biologia e Saúde**. V 10: p. 27-37. 2004.

VIANA, V. M. Biologia e manejo de fragmentos de florestas naturais. p. 113–118, *in*: **VI Congresso Florestal Brasileiro. SBS/SBEF**, Campos do Jordão, Brasil, 1990.

VIANA, V. M. Fragmentos florestais e restauração da biodiversidade em áreas degradadas. **Informativo PCNAT**, v. 3: p. 1. 1994.

VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. **Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais**. Série Técnica IPEF 12(32): p. 25-42. 1998.

VIDAL, E.; VIANA, V.; BATISTA, J. L. F. Efeitos da exploração madeireira predatória e planejada sobre a diversidade de espécies na Amazônia Oriental. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 22, n. 4: p. 503-520. 1998.

WELSH, J.; Mc LELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, v. 18: p. 7213-7218. 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. **Nucleic Acid Research**, v. 18: p. 6531-6535. 1990.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations. **University of Chicago Press**, v. 4. 1978.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. POPGENE version 1.31: **Microsoft Windows based freeware for populations genetic analysis**. University of Alberta Center for International Forestry Research. 1999.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**. V. 11: p. 413-418. 1996

ZIMBACK, L.; MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; VEIGA, R. F. A.; MELLO JUNIOR, J. R. S. Estrutura genética de populações de *Trichilia pallida* por marcadores RAPD. **Scientia forestalis**, v. 65: p. 114-119. 2004.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC. utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP. 2002.