



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUANA RAINIERI MASSUCATO

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Aspidosperma polyneuron*
MÜLL. ARG. (PEROBA – ROSA) EM POPULAÇÕES DO
ESTADO DO PARANÁ**

Londrina
2018

LUANA RAINIERI MASSUCATO

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Aspidosperma polyneuron*
MÜLL. ARG. (PEROBA – ROSA) EM POPULAÇÕES DO
ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Massucato, Luana Rainieri.

Variabilidade genética de *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. (Peroba-Rosa) em populações do estado do Paraná / Luana Rainieri Massucato. - Londrina, 2018.
73 f. : il.

Orientador: Paulo Maurício Ruas.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Genética de populações - Tese. 2. Florestas - Conservação - Tese. 3. Apocináceas - Tese. 4. Biodiversidade - Tese. I. Ruas, Paulo Maurício. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

LUANA RAINIERI MASSUCATO

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *ASPIDOSPERMA POLYNEURON*
MÜLL. ARG. (PEROBA – ROSA) EM POPULAÇÕES DO ESTADO DO
PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas
Faculdade de Apucarana – FAP

Prof. Dr. José Antonio Pimenta
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais Sonia e Adalberto e ao meu irmão André, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força e pela família que me deu. A minha família, pelo amor incondicional, por sempre me incentivar e apoiar. Em especial aos meus pais Sonia e Adalberto e ao meu irmão André. Agradeço também de forma especial a minha prima Camila, pelo carinho e amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas, por acreditar em mim desde o início, por sempre estar disposto a ajudar e a me ensinar, e pela sua paixão pelo ensino que sem dúvida me serviu como inspiração. O mesmo se estende ao meu coorientador, Leandro S. Azeredo Gonçalves. Agradeço também a Professora Dra. Claudete de Fátima Ruas por me acolher no laboratório e por tudo que me ensinou.

Ao Dr. Eduardo Augusto Ruas pela ajuda com a estatística do trabalho e resultados e por aceitar ser banca do mesmo. Ao Prof. Dr. José Antonio Pimenta por aceitar o convite para a banca e por suas correções.

Aos amigos do Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de plantas: Lucas, Rafaela, Alana, Jéssica, Gabriela, Renata, Gustavo e Felipe. Um agradecimento de forma especial à Daniele e à Bruna, por estarem presentes nas coletas, nas extrações de DNA e na minha vida pessoal, muito obrigada pela amizade de vocês. Também à Camila Chaves que, de forma tão prestativa, cedeu amostras de seu trabalho e ajudou sempre que precisei. Aprendi muito com todos e vou levá-los para sempre nas minhas melhores lembranças.

Tenho muita gratidão por cada pessoa que me auxiliou durante as coletas para este trabalho, todos os guardas florestais das reservas, funcionários das fazendas, funcionários dos órgãos públicos responsáveis. Em todos os locais encontrei pessoas dispostas a ajudar, sempre com muita paciência e conhecimento, sem elas este trabalho não seria o mesmo.

Por fim, agradeço a toda família que sempre me incentivou, ao Guilherme por ler pacientemente cada linha deste estudo e aos amigos que estiveram ao meu lado nesses dois anos.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá.

MASSUCATO, Luana Rainieri. **Variabilidade genética de *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. (peroba – rosa) em populações do estado do Paraná.** 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Aspidosperma polyneuron Müll. Arg. (Apocynaceae) é uma espécie arbórea, nativa da Mata Atlântica, que vem sofrendo os efeitos da fragmentação florestal causada pelo desmatamento intensificado nos últimos 80 anos. Sete locos de microssatélites foram utilizados, com o objetivo de avaliar os efeitos da fragmentação sobre variabilidade genética de *A. polyneuron* e para obter informações necessárias para propor estratégias de conservação da espécie. Foram coletadas 420 plantas, consistindo de 30 amostras de cada, indivíduos adultos e jovens de *A. polyneuron*, obtidos de sete remanescentes florestais localizados no estado do Paraná. Os sete locos analisados geraram nas populações adultas 177 alelos e 198 nas populações jovens, com uma média de 3,61 alelos por locos para populações adultas e 4,04 alelos por locos para populações jovens. O número médio de alelos efetivos variou de 2,03 para populações adultas a 2,27 para populações jovens. Comparativamente, a heterozigosidade observada (H_o) foi maior que a esperada (H_e) nas populações adultas ($H_o=0,49/H_e=0,43$), em relação as mais jovens ($H_o=0,47/H_e=0,49$). O coeficiente de endocruzamento (F_{is}) apresentou diferentes resultados para populações adultas, com valores variando de não significativos até positivos e negativos significativos. Todas populações jovens, com exceção de uma, mostraram F_{is} positivo e significativo. Estes resultados indicam efeito de gargalo genético atuando com mais intensidade nas populações mais jovens. O F_{st} foi alto, indicando alta estruturação entre populações, enquanto a variação entre os grupos (adultos e jovens) foi baixa. Os resultados indicam que, possivelmente, os efeitos da fragmentação estão se intensificando nas populações de *A. polyneuron*, e devem se mostrar ainda mais agressivos nas próximas gerações, embora esses efeitos não sejam imediatamente identificados, devido a longevidade da espécie. Medidas de conservação e manejo devem ser tomadas para evitar maiores consequências nas futuras populações.

Palavras– chave: Conservação. Diversidade genética. Fragmentação florestal. Marcadores SSR.

MASSUCATO, Luana Rainieri. **Genetic variability of *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. (peroba-rosa) populations in Paraná state.** 2018. 73 p. Dissertation (Master's degree in agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Aspidosperma polyneuron Müll. Arg. (Apocynaceae) is a tree species native to the Atlantic Rainforest, which has been under effects of forest fragmentation, caused by the deforestation, that was intensified in the last 80 years. Seven microsatellite loci were used in order to evaluate the effects of fragmentation on the genetic variability of *A. polyneuron* and to obtain useful information to guide strategies for the conservation of the species. We collected 420 plants, composed of 30 samples of each, adult and young individuals of *A. polyneuron*, obtained from seven forest remnants located in the Paraná state. The seven microsatellite loci generated 177 alleles in adult and 198 in the juvenile populations, with an average of 3.61 alleles per loci for adult and 4.04 alleles per loci for juvenile populations. The mean number of effective alleles ranged from 2.03 for adult to 2.27 for juvenile populations. The observed heterozygosity (H_o) was higher than in the adult population ($H_o = 0.49$ / $H_e = 0.43$) and the same pattern was observed in the younger populations ($H_o = 0.47$ / $H_e = 0.49$). The inbreeding coefficient (F_{is}) presented different results for adult populations, with values varying from non-significant to positive and negative significant F_{is} . All young populations, except one, showed positive and significant F_{is} . These results show evidence of genetic bottleneck effect with more intensity in the younger populations. F_{st} was high, evidencing a high genetic structure among populations, while the variation between the adult and juvenile groups was low. Our results indicate that the effects of fragmentation are intensifying in the populations of *A. polyneuron*, and should be even more aggressive in the next generations, although these effects are not immediately identified due to the longevity of the species. Conservation and management strategies could be taken to avoid further consequences for future populations.

Keywords: Conservation. Genetic diversity. Forest fragmentation. SSR Markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 2.1 | – Locais identificados de ocorrência natural de peroba-rosa (<i>Aspidosperma polyneuron</i>) no Brasil. | 14 |
| Figura 2.2 | – <i>Aspidosperma polyneuron</i> : A– Caule; B– Sementes; C– Folhas. | 16 |
| Figura 2.3 | – Área de Remanescentes Florestais da Mata Atlântica nos anos de 2015– 2016. | 20 |
| Figura 2.4 | – Remanescentes Florestais da Mata Atlântica no estado do Paraná entre os anos de 2015 e 2016. | 21 |
| Figura 2.5 | – Taxa anual de desflorestamento da Mata Atlântica em hectares | 22 |
| Figura 3.1 | – Coleta de Câmbio em árvores adultas de <i>A. polyneuron</i> : A– Caule com orifícios feitos para a retirada do câmbio. B– Câmbio. | 35 |
| Figura 3.2 | – Indivíduo jovem de <i>A. polyneuron</i> . A – Indivíduos em seu habitat natural, no momento da coleta. B– Folha, já seca, armazenada em saco de papel. | 36 |
| Figura 3.3 | – a. Dendrograma, conforme a distância genética de Nei (1978), utilizando o método de agrupamento UPGMA, de quatorze populações (sete adultas e sete jovens) de <i>A. polyneuron</i> localizadas em fragmentos da Mata Atlântica no estado do Paraná. b. Estrutura genética de sete populações adultas e sete populações jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> coletadas no estado do Paraná, inferido pela abordagem Bayesiana. | 53 |
| Figura 3.4 | – Análise de Correspondência fatorial de sete populações adultas e sete populações jovens de <i>A. polyneuron</i> coletadas em fragmentos da Mata Atlântica do estado do Paraná. | 54 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1 – Populações de <i>A. polyneuron</i> coletadas no Estado do Paraná | 36 |
| Tabela 3.2 – Nomes dos <i>primers</i> , sequências <i>forward</i> e <i>reverse</i> para cada <i>primer</i> , Temperatura de anelamento (Ta) e Tamanho dos fragmentos (pb)..... | 42 |
| Tabela 3.3 – Número de alelos encontrados em populações com indivíduos adultos de <i>Aspidosperma polyneuron</i> coletados em sete fragmentos distribuídos no estado do Paraná obtidos a partir de sete locos microssatélites..... | 45 |
| Tabela 3.4 – Número de alelos encontrados em populações com indivíduos jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> coletados em sete fragmentos distribuídos no estado do Paraná obtidos a partir de sete locos microssatélites..... | 45 |
| Tabela 3.5 – Medidas da diversidade genética de sete loci de microssatélites em populações adultas de <i>Aspidosperma polyneuron</i> coletadas em sete fragmentos distribuídos no estado do Paraná..... | 47 |
| Tabela 3.6 – Medidas da diversidade genética de sete loci de microssatélites em populações jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> coletadas em sete fragmentos distribuídos no estado do Paraná..... | 47 |
| Tabela 3.7 – Análise de variância Molecular (AMOVA) aplicada a marcadores microssatélite para as populações de <i>Aspidosperma polyneuron</i> no estado do Paraná | 48 |
| Tabela 3.8 – Análise de variância Molecular (AMOVA) aplicada a marcadores microssatélite entre os grupos de populações adultas e jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> no estado do Paraná | 48 |
| Tabela 3.9 – Teste do sinal para o excesso/deficiência de heterozigotos em sete populações adultas de <i>Aspidosperma polyneuron</i> distribuídas no estado do Paraná | 49 |

| | |
|--|----|
| Tabela 3.10 – Teste do sinal para o excesso/deficiência de heterozigotos em sete populações jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> distribuídas no estado do Paraná | 49 |
| Tabela 3.11 – Média da distribuição a posteriori da distribuição da proporção de indivíduos jovens e adultos não-migrantes e migrantes nas populações de <i>Aspidosperma polyneuron</i> baseada no método de atribuição Baeyiana de Wilson e Rannala (2003) | 50 |
| Tabela 3.12 – Valores de F_{st} par a par de sete populações adultas e sete populações jovens de <i>Aspidosperma polyneuron</i> no estado do Paraná, abaixo da diagonal. Distância geográfica, em Km, entre as populações estudadas, acima da diagonal | 51 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 2.1 | CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>ASPIDOSPERMA</i> | 12 |
| 2.1.1 | <i>Aspidosperma polyneuron</i> Müll. Arg. | 14 |
| 2.1.1.1 | Sistema reprodutivo da espécie..... | 17 |
| 2.2 | BIOMA MATA ATLÂNTICA | 19 |
| 2.3 | FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL..... | 22 |
| 2.3.1 | Efeito Genético da Fragmentação Florestal..... | 24 |
| 2.4 | MARCADORES MOLECULARES | 26 |
| 2.4.1 | Marcadores Microsatélite | 28 |
| 3 | ARTIGO A: VARIABILIDADE GENÉTICA EM ASPIDOSPERMA POLYNEURON MÜLL. ARG. (PEROBA – ROSA) EM POPULAÇÕES DO ESTADO DO PARANÁ | 30 |
| 3.1 | RESUMO | 31 |
| 3.2 | ABSTRACT | 32 |
| 3.3 | INTRODUÇÃO..... | 33 |
| 3.4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 34 |
| 3.4.1 | Coleta das Amostras..... | 34 |
| 3.4.1.1 | Regiões coletadas | 37 |
| 3.4.2 | Extração do DNA total..... | 40 |
| 3.4.2.1 | Extração do DNA total do câmbio | 40 |
| 3.4.2.2 | Extração do DNA das amostras foliares | 41 |
| 3.4.3 | Amplificação das Regiões Microsatélite | 41 |
| 3.4.4 | Análise Estatística..... | 43 |
| 3.5 | RESULTADOS | 44 |
| 3.6 | DISCUSSÃO..... | 55 |
| 3.7 | CONCLUSÃO | 61 |
| | REFERÊNCIAS | 63 |

1 INTRODUÇÃO

A preservação florestal é fundamental para manter o equilíbrio do ecossistema. Além de sua importância ambiental, as florestas também desempenham papel cultural e econômico, sendo fonte de energia, alimento, madeira, remédios, entre outros. Por isso, as florestas brasileiras vêm sendo exploradas cada vez mais, seja para fins de uso dos recursos naturais, para construções de estradas, ferrovias e cidades, ou para expansão dos campos agrícolas (SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016).

Grande parte da diversidade genética vem sendo destruída de modo irreversível, causando a redução no tamanho populacional, em função da fragmentação ou práticas predatórias de exploração. A diminuição da população pode reduzir a variabilidade genética e aumentar a suscetibilidade das espécies às mudanças ambientais, além de aumentar os riscos de ocorrência da depressão endogâmica (SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2004).

A variabilidade genética é fundamental para a sobrevivência das espécies, pois é fonte de matéria prima para a adaptação, evolução e sobrevivência às mudanças ambientais e ataques de pragas e doenças (LOWE et al., 2005; VINSON et al., 2015).

A fragmentação pode levar as populações à influência de fatores evolutivos, como a deriva genética e a endogamia. Esses fatores podem levar a fixação de alelos recessivos deletérios, colocando em risco de extinção determinadas populações e espécies (GUSSON, 2003). As populações arbóreas são as mais sensíveis aos efeitos genéticos da fragmentação por serem sésseis, pela sua longevidade e tempo de geração e pela alta variedade de sistemas reprodutivos (SILVA et al., 2014).

Dentre os biomas brasileiros, a Mata Atlântica possui uma das biodiversidades mais ricas, porém é uma das mais exploradas pelo homem. Os territórios de ocupação original deste bioma correspondem justamente às regiões mais povoadas do Brasil, onde estão localizadas as maiores cidades e os mais importantes polos industriais do país (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2010). Só no estado do Paraná, os índices de desmatamento da Mata Atlântica subiram para 3.545 ha entre 2015 e 2016 (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2016b).

Segundo Carvalho (2004), *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. é uma das espécie nativas da Floresta Estacional Semidecidual da Mata Atlântica. Esta espécie pode chegar até 30 m de altura, apresenta crescimento lento e fase reprodutiva tardia, sendo amplamente explorada pela utilização na indústria madeireira, devido à sua madeira sólida e ao seu caule ereto, características consideradas de interesse para esse setor.

Diante das perdas visíveis da diversidade existente nesses ecossistemas, o conhecimento da estrutura genética das populações ali existentes é importante para fornecer informações que permitam a formulação de estratégias para a conservação das espécies.

Os marcadores moleculares permitem estimar parâmetros genéticos úteis para descrever a variabilidade da população, possibilitando avaliar como esta variabilidade encontra-se distribuída dentro e entre as populações (SEBBEN, 2001). Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites (SSR) são marcadores codominantes, portanto apresentam alto grau de polimorfismo, podendo ser avaliado através de um diagnóstico das frequências alélicas e/ou genotípicas dos locos analisados (MELO, 2012).

Os marcadores microssatélite consistem em sequências curtas de nucleotídeos repetidas na mesma ordem, lado a lado (em *tandem*), detectando o nível de polimorfismo devido à variação no número de unidades de repetição em um determinado loco (SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016).

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da diversidade genética existente em populações de *A. polyneuron*, que ocorrem no estado do Paraná, através do uso de marcadores microssatélites, esperando-se assim obter dados populacionais suficientes para auxiliar na conservação dessa espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *ASPIDOSPERMA*

A família botânica Apocynaceae, pertencente à ordem Gentianales, é constituída por cerca de 300 gêneros e 2000 espécies (SIMÕES; KINOSHITA, 2002). As Apocynaceas são predominantemente encontradas nos trópicos e subtropicais e são caracterizadas pela presença de látex (PEREIRA et al., 2007).

Apocynaceae é considerada uma das maiores famílias de Angiospermas, sendo subdividida em cinco subfamílias: Rauvolfioideae, Apocynoideae, Periplocoideae, Secamonoideae e Asclepiadoideae (ENDRESS; BRUYNS, 2000). Das subfamílias que constituem as Apocynaceas, apenas três ocorrem no Brasil (Rauvolfioideae, Apocynoideae e Asclepiadoideae) (MOROKAWA et al., 2013).

Dentro da subfamília Rauvolfioideae (também conhecida como Plumerioideae) está o gênero *Aspidosperma*. As espécies pertencentes a esse gênero são consideradas as de maior importância, por apresentar alto valor econômico e medicinal (PEREIRA; SIMÕES; SANTOS, 2016). Podem ser encontradas apenas no Brasil, México e Argentina (PEREIRA et al., 2007) e contam com cerca de 43 espécies (GOMES; CAVALCANTE, 2001).

As *Aspidospermas* apresentam grande variabilidade, sendo constituídas por árvores a arbustos. É possível observar a presença de látex, o qual pode ser de coloração branca, vermelha ou incolor. O caule geralmente sulcado longitudinalmente e, em alguns casos, muito corticoso. As espécies apresentam folhas alternas, inflorescência em cimeira terminal, lateral ou subapical. As suas flores são actinomorfas, com características distintas entre as espécies, que permitem a classificação das mesmas (WANDERLEY et al., 2005; MAROKAWA et al., 2013).

As espécies do gênero são muito exploradas, especialmente por conta da qualidade de sua madeira. Um exemplo é a *A. subincanum*, conhecida como Guatambu ou Perobinha, que pode alcançar de 15 a 20 m de altura e possui madeira dura e resistente, sendo utilizada em construção civil. Essa espécie também é uma alternativa para recomposição de áreas degradadas (LORENZI, 2008).

Relatos ainda apontam a utilização da *A. subincanum* como tratamento para diabetes, hipercolesterolemia e para problemas associados ao aparelho digestivo (OLIVEIRA et al., 2015). Já Moglia, Gonzáles e Sánchez (2012) destacam três espécies de *Aspidosperma* como importantes no cenário econômico florestal: *A. polyneuron*, *A. triternarum* e *A. australe*.

Além da qualidade de suas madeiras, em certas regiões da Amazônia têm sido feitas infusões com a casca de espécies do gênero *Aspidosperma* (FERREIRA et al., 2004). Pereira et al. (2007) apontam o uso da infusão dessas cascas para tratamento de leishmaniose (*A. ramiflorum*), inflamações no útero e ovário, diabetes, problemas estomacais, alguns tipos de câncer, febre, reumatismo (*A. nitidum*) e para o tratamento da malária (*A. nitidum*, *A. album*, *A. discolor*, *A. excelsum* e *A. polyneuron*).

O trabalho feito por Dolabela et al. (2015), utilizando como pesquisa a espécie *A. parvifolium*, constatou que, no extrato de etanol com amostras do tronco dessa espécie, foi possível encontrar o composto uleína, que é o principal constituinte da fração de alcaloides, revelando uma boa atividade anti- malária in vitro.

Outra característica marcante no gênero *Aspidosperma* é a presença de estruturas alcaloídicas, especificamente de alcaloides indólicos (HENRIQUE; NUNOMURA; POHLIT, 2010). A maioria dos alcaloides encontrados apresentam propriedades tais como: hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente antitumoral, antiespasmódico e antimicrobiano (PEREIRA et al., 2007; PEDERSEN et al., 2005; HENRIQUE; NUNOMURA; POHLIT, 2010; KRENTKOWSKI; DUARTE, 2012).

Devido à vasta quantidade de alcaloides indólicos encontrados no gênero, é possível utilizar os mesmos como marcadores quimiotaxonômicos para classificação de espécies de *Aspidosperma* (PEREIRA et al., 2007).

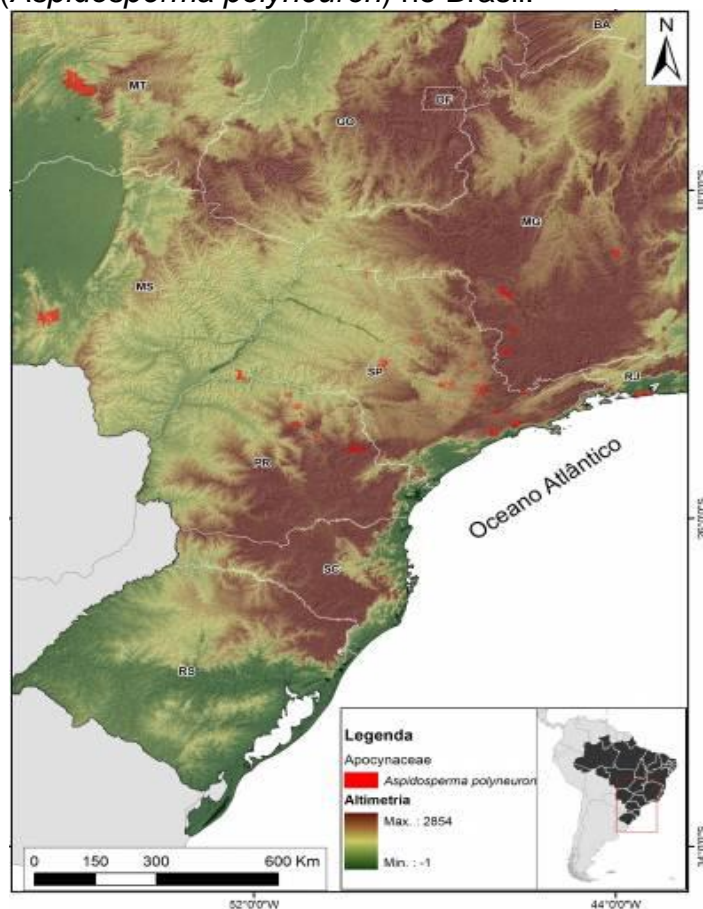
Além de suas propriedades medicinais, algumas espécies têm utilidade ornamental, como é o caso da *A. cylindrocarpon*, que possui características como rápido crescimento, tolerância à insolação direta, podendo até mesmo ser utilizada em reflorestamentos heterogêneos de áreas degradadas e de preservação permanente (SILVA et al., 2011).

2.1.1 *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg.

Aspidosperma polyneuron Müll. Arg. é uma espécie nativa da Floresta Estacional Semidecidual da Mata Atlântica. Essa espécie já foi encontrada no extremo nordeste da Argentina, no norte da Colômbia, no norte e no leste do Paraguai, no Peru, no noroeste e no norte da Venezuela e, especialmente, no Brasil. No Brasil já foram observados exemplares da espécie nos estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Espírito Santo e em algumas regiões da Bahia (Figura 2.1) (CARVALHO, 2004).

A área de ocorrência da Peroba-rosa no Brasil encontra-se drasticamente reduzida, em função da exploração intensa de madeira e da fragmentação da mata de origem da mesma. Atualmente a espécie é dificilmente encontrada em alguns estados, como Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Paraná (CNFlora, 2013).

Figura 2.1 – Locais identificados de ocorrência natural de Peroba- Rosa (*Aspidosperma polyneuron*) no Brasil.



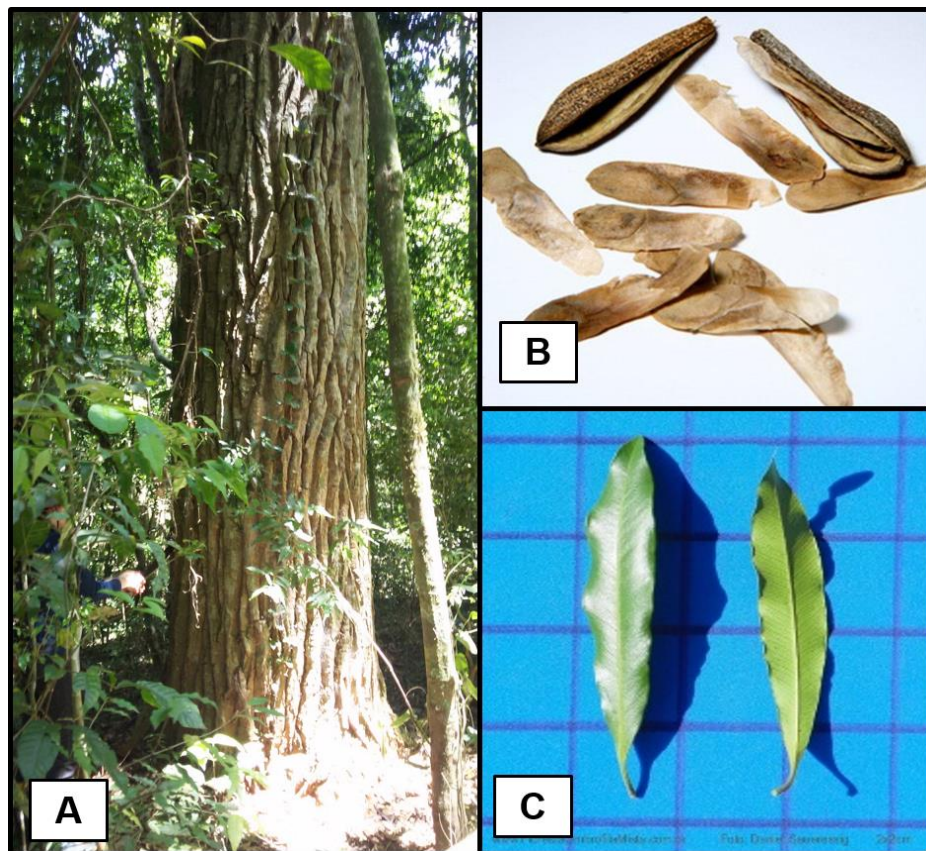
Fonte: CNCFlores, 2012.

Popularmente conhecida como "Peroba– Rosa" na região sul do Brasil, esta espécie também é conhecida em outras regiões como Perova, Peroba Amargosa, Peroba Rajada, Peroba– Açú, Peroba Comum, Peroba– do– rio, Peroba Paulista, Peroba Mirim e Peroba Miúda (INOUE; RODERJAN; KUNIYOSHI, 1984).

A Peroba– Rosa tem como característica tronco cilíndrico, reto ou levemente tortuoso, possuindo uma casca grossa, com coloração externa cinzenta e profundamente fissurada, que, ao ser raspada, é possível observar uma coloração rosa intensa em seu interior. Com uma copa alta e densa, esta espécie apresenta ramos trifurcados, característica que facilita a sua identificação no meio das demais árvores. As folhas são simples, alternas, com formato que pode variar de oblongas a obovado– elípticas, algumas vezes lustrosas na face superior, com ápice arredondado, apresentando nervuras secundárias muito apertadas e paralelas. Sua inflorescência tem coloração branco– amarelada, são pequenas e numerosas, em curtas panículas terminais de 1 a 4 cm de comprimento. As flores dessa espécie são hermafroditas (CARVALHO, 2004).

O fruto é um folículo deiscente, elipsóide, séssil, achatado, semilenhoso, com 2,5 a 6 cm de comprimento por 1 a 2 cm de largura. É possível observar lenticelas e uma crista levemente proeminente, que possui coloração pardo– escura. Cada fruto produz de 2 a 5 sementes, as sementes são de formato elíptico, com 2 a 4 cm de comprimento por 8 a 10 mm de largura e são providas de asas membranáceas. Não apresentam dormência e perdem a viabilidade em aproximadamente seis meses. Apenas 35 a 70% das sementes germinam, processo que tem início entre 14 e 60 dias após sementeadas (Figura 2.2) (CARVALHO, 2004; CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

Figura 2.2 – *Aspidosperma polyneuron*: A– Caule; B– Sementes; C– Folhas.



Fonte: A– Próprio autor ; B– ITAIPU, 2008; C– Saueressig, 2015.

A. polyneuron é considerada uma espécie secundária– tardia (DURIGAN et al., 1996), espécies classificadas como tal se desenvolvem em áreas sombreadas e geralmente são de grande porte e de ciclo de vida longo, no caso da Peroba– Rosa, a espécie pode chegar a aproximadamente 1200 anos (CARVALHO, 2004). As sementes dessas árvores são dispersas pelo vento, por gravidade ou por animais. Devido ao seu comportamento fisiológico e crescimento em locais com pouca luminosidade, espécies secundárias– tardia tendem, no momento inicial, a crescer verticalmente, buscando ocupar o dossel superior e, posteriormente, apresentam o crescimento horizontal de suas copas (ALMEIDA, 2016).

A exploração da madeira em grande escala é o principal motivo pelo qual a espécie se encontra ameaçada de extinção no Brasil (HATSCHBACH; ZILLER, 1995). A alta exploração ocorre devido à espécie fornecer uma madeira de excelente qualidade, muito usada na indústria de móveis, em construção civil, para confecção de caibros, ripas, forros, batentes de portas e janelas, tacos para assoalhos, portões, rodapés e também é utilizada para construção naval, para

confeção de carrocerias, cabos de ferramentas e carpintaria, dentre outros usos. A lenha é considerada de boa qualidade, tendo um poder calorífico de $4.750 \text{ Kcal kg}^{-1}$ (LORENZI, 1998; CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011)

Estudos da diversidade genética em *A. polyneuron* são importantes para a conservação e para trabalhos de reflorestamento. Contudo, são encontradas na literatura poucas informações a respeito da variabilidade genética dessa espécie. Estimativas da diversidade genética são necessárias para entender os fatores que afetam a organização genética de populações naturais de plantas. A manutenção da diversidade genética em populações é indispensável para a conservação de espécies. (GITZENDANNER; SOLTIS, 2000).

2.1.1.1 Sistema reprodutivo da espécie

A Peroba– Rosa apresenta inflorescências terminais, dicásio composto modificado, que podem variar de 1 a 4 cm de comprimento, compostas por flores tubulares, numerosas, com cerca de 3 mm e de coloração que varia de branco– amareladas a creme (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

A época de florescimento modifica conforme a região de ocorrência da espécie, sendo entre os meses de setembro e janeiro no estado de São Paulo, entre novembro e dezembro no Paraná e no mês de novembro em Minas Gerais (CARVALHO, 2003).

Os frutos são folíolos deiscentes, elipsoides, sésseis, geralmente achatados, semilenhosos, com 2,5 a 6 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura, de coloração pardo– escura, contendo de 2 a 5 sementes. As sementes são elípticas, aladas, possuem ala lateral basal e são providas de núcleo seminal basal, com 2 a 4 cm de comprimento por 8 a 10 mm de largura, são dispersas pelo vento e não possuem período de dormência (CARVALHO, 2004; CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

Como o florescimento sofre variação conforme a região de ocorrência da espécie, conseqüentemente o mesmo ocorre com a época de frutificação, iniciando entre os meses de junho e novembro em São Paulo, entre julho e outubro no Paraná e em maio em Minas Gerais (CARVALHO, 2003).

A espécie não costuma produzir frutos anualmente, apenas a cada dois a quatro anos, porém, quando o faz, produz uma grande quantidade de sementes (KAGEYAMA et al., 1991). A reprodução se inicia entre 20 a 30 anos, quando o diâmetro do caule à altura do peito (DAP) é maior ou igual a 0,1 m e a altura da árvore é maior que 8,6 m (CARVALHO, 2003).

A. polyneuron se reproduz tanto de forma sexuada, quando assexuada e, apesar de apresentar flores hermafroditas, esta espécie se reproduz predominantemente por meio de fecundação cruzada (alogamia) (RAMOS, 2012). O pólen pode ser disperso tanto pelo vento como por ajuda de insetos polinizadores, como mariposas e borboletas, que podem dispersar o pólen a longas distâncias (CARVALHO, 2003; TOREZAN et al., 2005).

A fecundação cruzada é importante para manter a variabilidade genética da espécie e assim permitir a adaptação, evolução e sobrevivência da mesma, principalmente em casos de mudanças ambientais e quando submetidas à doenças (RODRIGUES, 2015). Porém, a fragmentação do habitat pode afetar o sistema de reprodução de populações remanescentes, bem como o padrão de dispersão de pólen (YONG et al., 1996). A polinização é fundamental para a reprodução, pois determina o acasalamento, uma vez que estabelece a dispersão de pólen entre os indivíduos (BARRETT; HARDER, 1996).

No trabalho desenvolvido por Chaves et al. (2017), foi encontrada uma distância média de dispersão do pólen de 119 e 142 m para cada região analisada. Em estudos com dispersão de pólen em eucaliptos, Barbour et al. (2005) observaram que até 200 m da fonte de pólen, a taxa de polinização é considerada alta, sendo obtida uma queda considerável após essa distância.

A distância de dispersão de pólen em espécies arbóreas tropicais é influenciada pelos vetores de dispersão, pela densidade populacional, sincronismo no florescimento, assim como fatores como o clima, fragmentação florestal, e longevidade (DICK, et al., 2008; DEGEN; SEBBENN, 2014).

A Peroba– Rosa também pode se reproduzir assexuadamente, via apomixia. Apomixia é uma forma de propagação assexuada, através de sementes, onde o embrião é derivado somente a partir de células somáticas do óvulo, sem a ocorrência de fecundação, gerando clones maternos (KOLTUNOW, 1993).

A apomixia permite a propagação mesmo em situações onde o clima, ou determinadas barreiras, impedem o cruzamento satisfatório entre os

indivíduos. Essa forma de reprodução também contribui para o aumento populacional quando a população passa por uma redução significativa. A apomixia conserva a heterozigidade originada da reprodução sexuada e contraria os efeitos negativos da depressão endogâmica e da deriva genética (MURAWSKI, 1995). Por outro lado, espécies apomíticas estão sujeitas aos efeitos das mutações desfavoráveis, por não ocorrer recombinação e segregação, que são fatores que fornecem a adaptabilidade aos indivíduos (KOLTUNOW, 1993). Esse tipo de propagação também pode afetar a estrutura genética espacial intrapopulacional, que é a distribuição não aleatória dos genótipos dentro das populações, resultando em indivíduos próximos mais aparentados do que indivíduos localizados a longa distância. Esse padrão de estrutura genética é um fenômeno comum em muitas populações arbóreas, sendo principalmente determinado pela dispersão a curtas distâncias das sementes e pólen (VEKEMANS; HARDY, 2004).

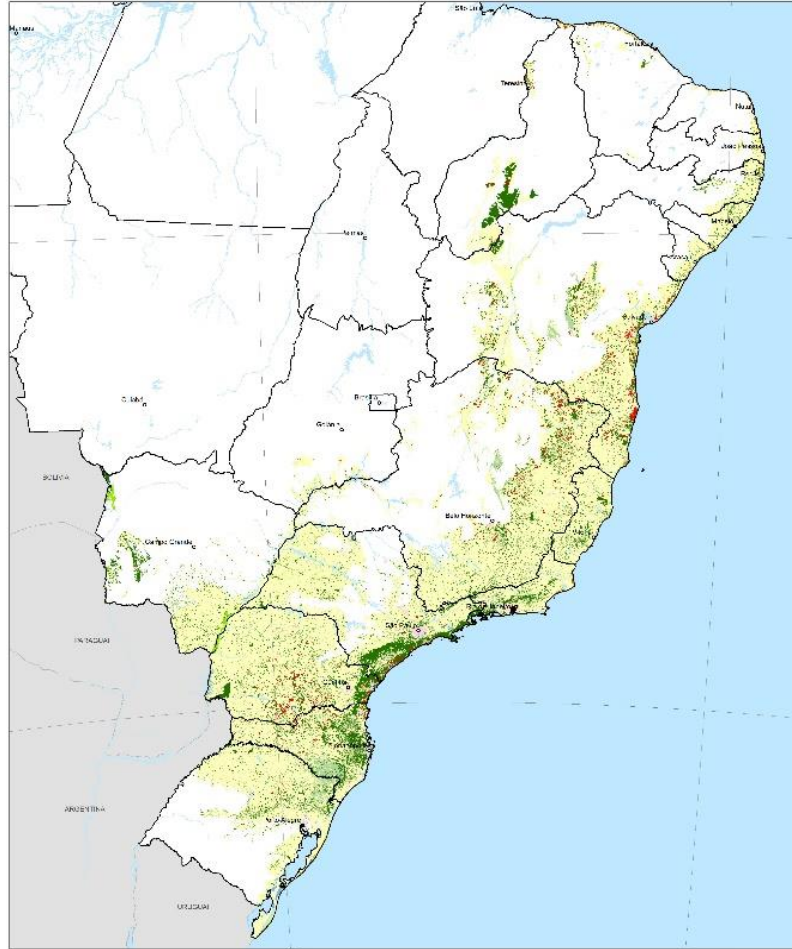
Resultados encontrados por Chaves et al. (2017), analisando indivíduos de *A. polyneuron* na Mata Estadual dos Godoy (Londrina – PR), confirmaram que essa espécie é uma apomítica facultativa, apresentando uma taxa de 28% de apomixia nos indivíduos analisados. Ramos (2012) encontrou valores próximos (22,8%) em uma pequena população de Peroba– Rosa. Esses trabalhos reforçam que o objetivo da apomixia nessa espécie é manter sua sobrevivência.

2.2 BIOMA MATA ATLÂNTICA

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano. Estende– se ao longo da costa brasileira até o leste do Paraguai e nordeste da Argentina. Originalmente estendia– se ao longo de 17 Estados brasileiros (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí). Segundo dados da Fundação SOS Mata Atlântica (2016a), este bioma abrangia uma área equivalente a 1.315.460 km², com 92% desta área no Brasil, hoje restam 8,5% de remanescentes florestais acima de 100 ha e, somados todos os fragmentos de floresta nativa acima de 3 ha, tem– se atualmente 12,5% do que tinha originalmente (Figura 2.3).

Os territórios de ocupação original deste bioma correspondem justamente às regiões mais povoadas do Brasil, onde estão localizadas as maiores cidades e os mais importantes polos industriais do país (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2010).

Figura 2.3 – Área de Remanescentes Florestais da Mata Atlântica nos anos de 2015– 2016.

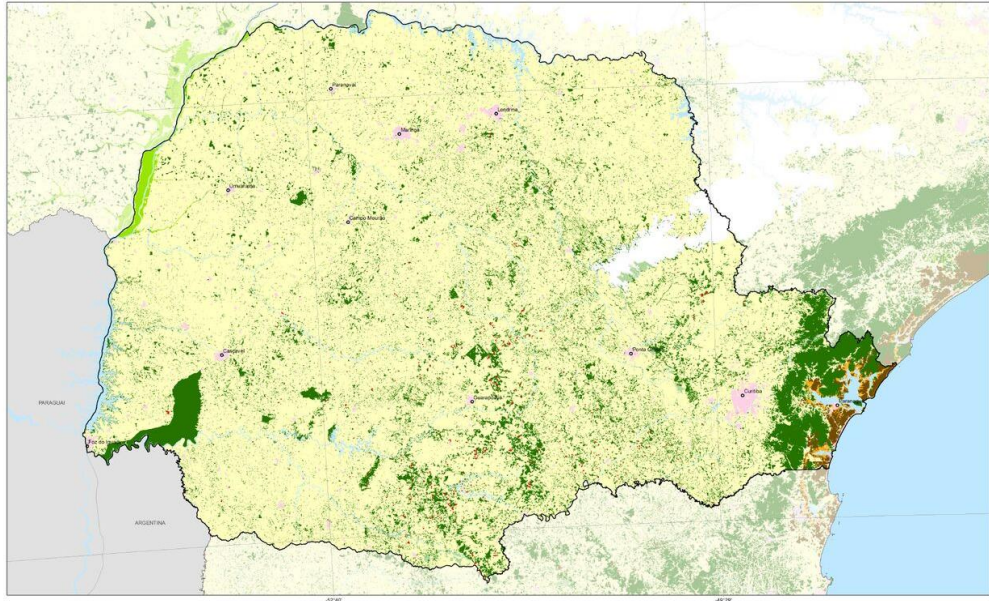


A área verde corresponde aos remanescentes florestais da Mata Atlântica distribuídos pelo Brasil nos anos de 2015– 2016.

Fonte: Fundação SOS Mata Atlântica (2016a).

No Paraná, até 2016, os índices de desmatamento subiam pelo segundo ano consecutivo, passando de 1.988 ha destruídos entre 2014 e 2015 para 3.545 ha entre 2015 e 2016, aumento de 74% (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2016b) (Figura 2.4).

Figura 2.4 – Remanescentes Florestais da Mata Atlântica no estado do Paraná entre os anos de 2015 e 2016.



A área verde corresponde aos remanescentes florestais da Mata Atlântica distribuídos pelo estado do Paraná.

Fonte: Fundação SOS Mata Atlântica(2016b).

A Mata Atlântica é considerada uma das áreas mais ricas em biodiversidade e mais ameaçadas do planeta, sendo um dos 25 *hotspots* mundiais de biodiversidade, ou seja, é uma das prioridades para a conservação da biodiversidade (ALMEIDA, 2016). Embora tenha sido em grande parte destruída, ela ainda se destaca por sua diversidade, abrigando mais de 20 mil espécies de plantas, das quais 50% são endêmicas (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2010).

A Mata Atlântica compreende vários ecossistemas com processos ecológicos interligados, sendo que suas formações incluem as florestas Ombrófila Densa, Ombrófila Mista (Mata de Araucárias), Estacional Semidecidual e Estacional Decidual, além de ecossistemas associados como manguezais, restingas, brejos interioranos, campos de altitude e ilhas costeiras e oceânicas (MELO, 2012).

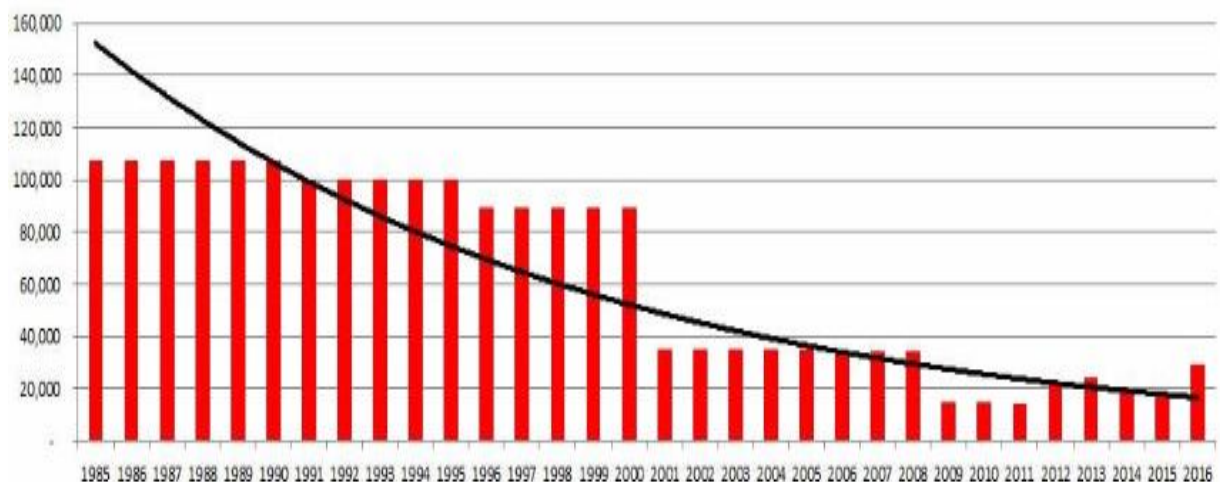
Aspidosperma polyneuron é uma espécie nativa da Floresta Estacional Semidecidual da Mata Atlântica (CARVALHO, 2004). Esta formação é condicionada por uma duplicidade climática, onde observa-se uma estação com chuvas intensas de verão, seguidas por um período de estiagem. É também caracterizada pela presença de indivíduos arbóreos que perdem as folhas (caducifólios) durante o inverno, ou estação seca. Esse fenômeno de queda foliar

tem sido atribuído a fatores como disponibilidade de água, baixa temperatura e disponibilidade de nutrientes (IBGE, 2012).

A intensidade de destruição na Mata Atlântica, acelerada ao longo das últimas três décadas, resultou em alterações severas nos ecossistemas que compõem o bioma, especialmente pela perda e fragmentação de habitats (TABARELLI; SILVA; GASCON, 2004). A taxa de desflorestamento neste bioma diminuiu consideravelmente comparada há algumas décadas, devido a maior conscientização da população. Porém, esse cenário sofreu uma alteração em 2012, quando foi aprovada a Lei nº 12.651/2012 que visava a reforma do Código Ambiental Brasileiro (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2016a).

Dentre as diversas mudanças propostas pela reforma do Código Ambiental, uma delas foi a concessão de anistia aos produtores que desmataram de forma ilegal a área de reserva legal e área de preservação permanente (APP) antes da data de 22 de julho de 2008. Outra mudança foi no artigo que limita o tamanho de APP, sendo medida em “módulos fiscais” de acordo com o tamanho da propriedade (BRASIL, 2012). Do ano de 2012, quando o novo Código entrou em vigor, até o ano de 2016, foi possível observar um aumento na taxa de desflorestamento (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2016a) (Figura 2.5).

Figura 2.5 – Taxa anual de desflorestamento da Mata Atlântica em hectares.



Fonte: Fundação SOS Mata Atlântica (2016a).

2.3 FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL

A exploração da biodiversidade pelo extrativismo descontrolado, desmatamento e queimadas tem sido responsáveis pela destruição e fragmentação

do habitat de inúmeras espécies. Uma vez que a Mata Atlântica apresenta um alto nível de endemismo, a fragmentação florestal pode levar à extinção de várias espécies (MORI; BOOM; FRANCE, 1991).

Serrote, Reiniger e Stefenon (2016) definem a fragmentação do habitat como um processo pelo qual uma área contínua, originalmente de grande extensão, é reduzida em dois ou mais fragmentos, desencadeando processos ecológicos e genéticos com consequências potencialmente desastrosas.

A fragmentação do ambiente causa alteração nos níveis de luz, temperatura, umidade e de vento. Essas alterações podem resultar na eliminação de muitas espécies vegetais e animais, as quais são, frequentemente, adaptadas de forma precisa a certas condições ambientais. Além disso, há uma relação íntima evolutiva entre espécies vegetais e animais, de modo que a fragmentação pode limitar o potencial de uma espécie para dispersão e colonização, visto que muitas espécies de pássaros, mamíferos e insetos não se movimentam de um fragmento para outro (PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

A redução no tamanho da população pode diminuir a densidade de árvores reprodutivas, limitando, assim, a disponibilidade de pólen. O isolamento das populações também pode alterar a atividade dos polinizadores pela redução na densidade de recursos alimentares potenciais e pelo aumento da distância entre esses recursos. Esses fatores limitam o potencial de dispersão e, conseqüentemente, provocam o aumento das taxas de cruzamento biparentais e de autofecundação (SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016)

As populações vegetais podem apresentar mais sensibilidade aos efeitos genéticos da fragmentação quando comparadas às demais populações. A sensibilidade se dá pelo fato das espécies vegetais serem sésseis, apresentarem diferenças interespecíficas de longevidade, de tempo de geração e de densidade populacional antes da fragmentação. Além disso, plantas costumam apresentar uma ampla variedade de sistemas reprodutivos, possibilitando o fluxo gênico via pólen e sementes, os quais são dispersos em grande parte através de animais, que, como já visto, também são afetados pela fragmentação florestal (SILVA et al., 2014).

A redução do tamanho do habitat original traz várias consequências genéticas à população presente, estas incluem a erosão da variabilidade genética e o aumento da divergência interpopulacional. A divergência interpopulacional é potencializada através do aumento da deriva genética, do aumento dos níveis de

endogamia intrapopulacional, da redução do fluxo gênico entre as populações e do aumento da probabilidade de extinção de fragmentos locais (YOUNG; CLARKE, 2000).

Segundo Melo (2012), em populações que sofrem redução em seu tamanho efetivo, mesmo indivíduos portadores de composição alélica favorável podem ser eliminados, e assim, os poucos indivíduos sobreviventes nos fragmentos remanescentes começam a acumular alelos idênticos por descendência, devido à elevação dos níveis de endogamia. Do ponto de vista conservacionista, o monitoramento dos parâmetros genéticos pode fornecer informações de extrema importância para a tomada de decisões nos programas de manejo de espécies ameaçadas.

2.3.1 Efeito Genético da Fragmentação Florestal

A variabilidade genética é fundamental para o sucesso evolutivo e para as chances de sobrevivência das espécies (JONES; GLIDDON; GOOD, 2001). A alta variabilidade proporciona capacidade de resposta às mudanças ambientais (SHARMA; CLEMENTS; JONES, 2000).

A fragmentação é provocada pela degradação da biodiversidade, dando origem a distância geográfica entre os fragmentos. A extensão geográfica está diretamente relacionada à quantidade de variação genética dentro de espécies, afinal a distância causa uma restrição no fluxo de genes entre as subpopulações, propiciando, assim, a endogamia e deriva genética. O fluxo gênico em populações naturais de plantas é fundamental na homogeneização das frequências alélicas entre populações pequenas, de modo que minimiza os efeitos da deriva genética (ZUCCHI, 2002).

O fluxo gênico corresponde à entrada ou saída de genes, capaz de alterar a composição gênica original em uma determinada população. Considerado o único fator evolutivo que diminui a estruturação da população, distribuindo os genes criados pela mutação e permitindo combinações alélicas em populações distantes, o fluxo gênico é um dos principais parâmetros populacionais estimados nos trabalhos que objetivam a conservação da variabilidade genética. Com o distanciamento geográfico dos fragmentos, o fluxo gênico é prejudicado, originando a perda da

variabilidade nas populações isoladas. Tal perda pode se dar por processos genético– evolutivos, como a deriva genética, a depressão endogâmica e o gargalo genético (SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016).

A variação do tamanho populacional pode variar no decorrer do tempo de forma aleatória, passando por um “gargalo genético”, no qual apenas uns poucos indivíduos sobrevivem e, mais tarde, ela se expande novamente quando o ambiente se encontra favorável (RIDLEY, 2006). A fragmentação florestal pode ser responsável pela ocorrência de gargalos genéticos devido ao isolamento reprodutivo de indivíduos que contém apenas uma pequena amostra do conjunto gênico da população original, o que resulta em contínua perda de alelos pela ação da deriva genética, caso a população remanescente permaneça isolada por várias gerações (SOUZA; KAGEYAMA; SEBBENN, 2004).

Populações pequenas estão mais sujeitas ao efeito da endogamia, que segundo Cruz et al. (2011), consiste no cruzamento entre indivíduos aparentados oriundos de um ancestral em comum, sendo assim, promove o aumento da homozigose nas descendências. Na depressão endogâmica os caracteres são afetados pelo aumento de genes raros em homozigose recessiva, muitos desses genes são portadores de anomalia (CHARLESWORTH; WILLIS, 2009).

A deriva genética é causada pela flutuação alélica através das gerações de uma população. Quanto menor o tamanho da amostra para formar uma nova população, maior será a variação nas frequências gênicas, resultando em modificações na constituição genética da população. A flutuação aleatória na frequência dos alelos, devido à redução do tamanho populacional, pode acarretar em fixação ou perda de alelos através das gerações (BEIGUELMAN, 2008; HELLBERG et al., 2002).

O surgimento de novos alelos em uma população tem como fonte primária a mutação, que pode ser frequente em função de outros fatores como a seleção e a deriva genética. Porém, apesar de trazer variabilidade, a mutação também é uma das fontes de alelos recessivos desfavoráveis (carga genética), resultando em uma redução do valor adaptativo da população (SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016).

Apesar da ação antrópica ser grande causadora da diminuição da variabilidade genética nas populações, muitos endemismos, por exemplo, podem ser

explicados por refúgios de glaciações ou outros processos naturais (FUTUYMA, 2013). Muitas espécies apresentam, naturalmente, baixa variabilidade genética ou populações reduzidas e com distribuição muito restrita, desde que as condições ambientais se mantenham constantes (COAETES; ATKINS, 2001).

Independente do padrão da diversidade genética, a presença da variabilidade fornece base para adaptação e resiliência de uma população em longo prazo. Desse modo, a perda de variabilidade genética em populações pequenas pode limitar a capacidade desta em dar resposta às mudanças ambientais em longo prazo (VINSON et al., 2015).

Assim, o estudo dos parâmetros genéticos de espécies florestais são ferramentas importantes para a medida da conservação das mesmas. Estes estudos fornecem dados que auxiliam no entendimento da importância da conservação da diversidade genética das espécies, e como os processos de fragmentação e isolamento de populações podem afetar a referida diversidade (CARVALHO, 2009).

2.4 MARCADORES MOLECULARES

O conhecimento sobre a estrutura e a diversidade genética de populações naturais são fundamentais para obtenção de parâmetros que possam melhorar as estratégias de manejo e conservação de espécies (HAO; HODGKIM, 2002). Diversas técnicas moleculares permitem determinar a variação presente em uma população. Entre essas técnicas, incluem-se aquelas destinadas à detecção de variação em sequências de DNA, conhecidas como marcadores moleculares (FERREIRA, 2001).

Através do uso de marcadores moleculares podemos obter um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, que podem ser encontrados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, além de identificar essas variações ao nível de DNA excluindo, portanto, influências do ambiente (FALEIRO, 2007).

A utilização dos marcadores moleculares tem as mais diversas finalidades, como por exemplo, a identificação de clones, de linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, estimativas de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, taxa de parentesco e na construção de mapas genéticos (BUSO et al., 2003).

Os marcadores de DNA mais utilizados em estudos genéticos de plantas são o *Random Fragment Polymorphic* (RAPD), o *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), o *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), *Simple Sequence Repeat* (SSR) ou microssatélites e os *Single nucleotide polymorphism* (SNPs) (SARTORETTO; FARIAS, 2010).

Existe um grande número de marcadores utilizados para fornecer informações úteis aos programas de conservação e uso de recursos gênicos. O uso de cada um deles depende do objetivo do estudo, da infra-estrutura disponível e da disponibilidade financeira. Em relação ao objetivo do estudo, a escolha do marcador correto é fundamental. Marcadores multilocos (RAPD, AFLP, SSR, entre outros), por exemplo, são mais apropriados para estudos de variabilidade. Marcadores baseados em comprimento de fragmentos de restrição, como os RFLPs, obtidos de mtDNA, cpDNA, rDNA, são mais apropriados para estudos de diversidade genética de espécies fortemente relacionadas. E, por fim, marcadores como PCR *sequencing*, que são baseados em análises de sequências, são mais indicados para análises de espécies com alto nível de divergência evolucionária (FALEIRO, 2007).

Os marcadores podem ser classificados quanto à sua dominância, em dominantes ou codominantes. Marcadores dominantes, como é o caso do RAPD, AFLP e ISSR, não são capazes de diferenciar genótipos homozigotos de heterozigotos, o que pode restringir a sua utilização em alguns casos. Já os marcadores codominantes conseguem diferenciar esses genótipos, portanto são considerados mais informativos, como é o caso do RFLP, SSR, microssatélites, entre outros (ZUCCHI et al., 2011).

Diversos trabalhos têm sido feitos visando o estudo da conservação da diversidade genética com o uso de marcadores moleculares. Silva et al. (2014) encontraram resultados satisfatórios utilizando marcadores microssatélite para avaliar parâmetros genéticos para auxiliar a conservação de *Hymenaea courbaril* L. na Amazônia. Já Aguiar et al. (2013), optaram por utilizar o marcador RAPD para o estudo da variabilidade genética em *Eugenia uniflora* L., e também obtiveram sucesso.

O desenvolvimento das ferramentas moleculares, é de grande importância no estudo da conservação gênica e tem sido utilizado para tal fim pois a sua descoberta possibilitou analisar com maiores detalhes a origem evolucionária dos genomas vegetais, assim como acessar o grau de variabilidade genética em espécies vegetais (SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016)

2.4.1 Marcadores Microsatélite

Sequências simples repetidas, também denominado de “microsatélites”, consistem de pequenas sequências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas na mesma ordem, lado a lado (em *tandem*) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Essas sequências repetitivas são flanqueadas por sequências específicas. As sequências de DNA que flanqueiam os microsatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de *primers* ou iniciadores específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Os *primers* utilizados para PCR são constituídos de 18 a 24 nucleotídeos, em número suficientemente grande para que este *primer* não encontre outra sequência complementar que não seja a do microsatélite (FALEIRO, 2007).

Os alelos polimórficos, resultantes de altas taxas mutacionais, ocorrem sempre que em um genoma esteja faltando a sequência repetida ou naqueles que tem uma deleção ou uma inserção que modifique a distância entre as repetições, permitindo a comparação do material genético de indivíduos diferentes (ZUCCHI, 2002; BORÉM; CAIXETA, 2006).

A dificuldade da utilização dos marcadores SSR está justamente na construção desses *primers* responsáveis por flanquear as sequências. Para fazê-los é necessário a construção de bibliotecas genômicas, para que se faça a seleção de clones que, quando selecionados, são sequenciados. Todo o processo demanda mão-de-obra especializada e custos elevados. Porém, uma vez que os *primers* estão estabelecidos, os ensaios laboratoriais são rápidos e os custos são reduzidos (BUSO et al., 2003).

Os marcadores microsatélites têm sido utilizados nos estudos de populações naturais, pois são altamente polimórficos quando comparados com outras classes de marcadores, além de que, a partir do momento em que os *primers* estão estabelecidos, o processo se torna de fácil execução e fácil repetibilidade. Pelas suas propriedades, são ferramentas para responder a diversas questões sobre a genética de populações, o fluxo gênico e análises de

paternidade, entre outros aspectos (COLLEVATTI; BRONDANI; GRATTAPAGLIA, 1999; DANQUAH et al., 2002; LOPES et al., 2002; FALEIRO, 2007).

**3 ARTIGO A: VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Aspidosperma polyneuron* MÜLL.
ARG. (PEROBA – ROSA) EM POPULAÇÕES DO ESTADO DO PARANÁ**

3.1 RESUMO

Apidosperma polyneuron Müll. Arg. (Apocynaceae) é uma espécie arbórea, nativa da Mata Atlântica, que vem sofrendo os efeitos da fragmentação florestal causada pelo desmatamento intensificado nos últimos 80 anos. Sete locos de microssatélites foram utilizados, com o objetivo de avaliar os efeitos da fragmentação sobre variabilidade genética de *A. polyneuron* e para obter informações necessárias para propor estratégias de conservação da espécie. Foram coletadas 420 plantas, consistindo de 30 amostras de cada, indivíduos adultos e jovens de *A. polyneuron*, obtidos de sete remanescentes florestais localizados no estado do Paraná. Os sete locos analisados geraram nas populações adultas 177 alelos e 198 nas populações jovens, com uma média de 3,61 alelos por locos para populações adultas e 4,04 alelos por locos para populações jovens. O número médio de alelos efetivos variou de 2,03 para populações adultas a 2,27 para populações jovens. Comparativamente, a heterozigosidade observada (H_o) foi maior que a esperada (H_e) nas populações adultas ($H_o=0,49/H_e=0,43$), em relação as mais jovens ($H_o=0,47/H_e=0,49$). O coeficiente de endocruzamento (F_{is}) apresentou diferentes resultados para populações adultas, com valores variando de não significativos até positivos e negativos significativos. Todas populações jovens, com exceção de uma, mostraram F_{is} positivo e significativo. Estes resultados indicam efeito de gargalo genético atuando com mais intensidade nas populações mais jovens. O F_{st} foi alto, indicando alta estruturação entre populações, enquanto a variação entre os grupos (adultos e jovens) foi baixa. Os resultados indicam que, possivelmente, os efeitos da fragmentação estão se intensificando nas populações de *A. polyneuron*, e devem se mostrar ainda mais agressivos nas próximas gerações, embora esses efeitos não sejam imediatamente identificados, devido a longevidade da espécie. Medidas de conservação e manejo devem ser tomadas para evitar maiores consequências nas futuras populações.

Palavras– chave: Conservação. Diversidade genética. Fragmentação Florestal. Marcadores SSR.

3.2 ABSTRACT

Apidosperma polyneuron Müll. Arg. (Apocynaceae) is a tree species native to the Atlantic Rainforest, which has been under effects of forest fragmentation, caused by the deforestation, that was intensified in the last 80 years. Seven microsatellite loci were used in order to evaluate the effects of fragmentation on the genetic variability of *A. polyneuron* and to obtain useful information to guide strategies for the conservation of the species. We collected 420 plants, composed of 30 samples of each, adult and young individuals of *A. polyneuron*, obtained from seven forest remnants located in the Paraná state. The seven microsatellite loci generated 177 alleles in adult and 198 in the juvenile populations, with an average of 3.61 alleles per loci for adult and 4.04 alleles per loci for juvenile populations. The mean number of effective alleles ranged from 2.03 for adult to 2.27 for juvenile populations. The observed heterozygosity (H_o) was higher than in the adult population ($H_o = 0.49$ / $H_e = 0.43$) and the same pattern was observed in the younger populations ($H_o = 0.47$ / $H_e = 0.49$). The inbreeding coefficient (F_{is}) presented different results for adult populations, with values varying from non-significant to positive and negative significant F_{is} . All young populations, except one, showed positive and significant F_{is} . These results show evidence of genetic bottleneck effect with more intensity in the younger populations. F_{st} was high, evidencing a high genetic structure among populations, while the variation between the adult and juvenile groups was low. Our results indicate that the effects of fragmentation are intensifying in the populations of *A. polyneuron*, and should be even more aggressive in the next generations, although these effects are not immediately identified due to the longevity of the species. Conservation and management strategies could be taken to avoid further consequences for future populations.

Keywords: Conservation. Genetic diversity. Forest fragmentation. SSR Markers.

3.3 INTRODUÇÃO

O desmatamento tem sido um dos maiores problemas ambientais enfrentados pelo Brasil na atualidade. A exploração de organismos que compõem os ecossistemas é responsável pela destruição e fragmentação das florestas, desencadeando uma série de processos ecológicos e genéticos pelo isolamento das populações. Dentre as consequências do isolamento populacional, estão a queda dos níveis de variabilidade genética das espécies e o aumento da frequência de genes deletérios, os quais afetam a produtividade e adaptabilidade genética dos indivíduos (MELO, 2012).

A Mata Atlântica, considerada um dos biomas brasileiros de maior importância devido sua biodiversidade, também apresenta uma das maiores taxas de desflorestamento (FUNDAÇÃO S.O.S. MATA ATLÂNTICA, 2016a). Muitas espécies pertencentes à este bioma, estão caminhando para extinção, como é o caso da Peroba– Rosa.

Aspidosperma polyneuron Müll. Arg (Peroba– Rosa) pertence à família Apocinaceae e à ordem Gentianales. É uma espécie arbórea, nativa da América do Sul, encontrada nas Florestas Estacionais Semidecíduais da Mata Atlântica (CARVALHO, 2003). Ainda não se qualifica como espécie em risco de extinção, porém, segundo a “Lista Vermelha” desenvolvida pela CNFlora (2012), a espécie se encontra próxima desta definição.

Possui grande porte, ciclo de vida longo, vivendo em torno de 1200 anos e se desenvolve em áreas sombreadas (DURIGAN et al., 1996; CARVALHO, 2003). Se reproduz preferencialmente através de fecundação cruzada (alogamia) e também, com uma taxa menor, por apomixia facultativa (CHAVES et al., 2017). A polinização da espécie é feita pelo vento ou por insetos polinizadores, como mariposas e borboletas (CARVALHO, 2003; TOREZAN et al., 2005). As sementes são dispersas pelo vento (CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011) e são produzidas apenas a cada dois anos, o que pode dificultar sua propagação (KAGEYAMA et al., 1991). A Peroba– Rosa tem sido alvo de exploração principalmente devido à qualidade de sua madeira, sendo este um dos motivos principais para a redução de sua população.

Entender os efeitos do isolamento genético e o fluxo gênico é crucial

para obter recomendações para a conservação de espécies, para isso as ferramentas moleculares desempenham um papel fundamental. O surgimento dos marcadores moleculares favoreceu o avanço dos estudos genéticos, tornando possível observar diferenças no genótipo em nível de DNA, o que contribuiu para a análise da variabilidade genética (FALEIRO, 2007).

Dentre os marcadores moleculares, os marcadores microssatélites são amplamente utilizados nos estudos em espécies vegetais. São considerados marcadores codominantes, portanto apresentam alto grau de polimorfismo, podendo ser avaliado através de um diagnóstico das frequências alélicas e/ou genotípicas dos locos analisados (MELO, 2012).

A Peroba– Rosa foi alvo de poucos estudos, até hoje, sobre sua variabilidade genética. Chaves et al. (2017), Ramos et al. (2011) e Zimback et al. (2011) são alguns dos autores que buscaram explorar esse assunto, porém compararam poucos indivíduos jovens e adultos com o objetivo de verificar os efeitos sobre a variabilidade genética antes e após a fragmentação.

Os estudos sobre *A. polyneuron* ainda são escassos, assim como as informações sobre seus aspectos genéticos. Portanto, esperando– se obter dados populacionais suficientes para auxiliar na conservação de populações de *A. polyneuron*, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da diversidade genética existente em populações de Peroba– Rosa, pertencentes à fragmentos florestais de Mata Atlântica, no estado do Paraná.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

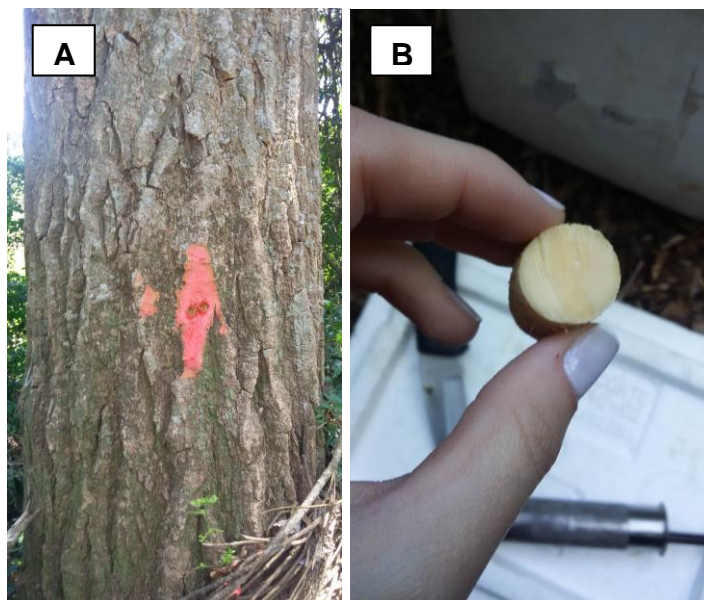
3.4.1 Coleta das Amostras

Foram feitas as coletas dos indivíduos de *A. polyneuron* em sete fragmentos florestais do estado do Paraná (Tabela 3.1), pertencentes à Floresta Estacional Semidecidual do bioma Mata Atlântica, onde ocorre a espécie de estudo. Em cada local foram coletadas amostras de 30 plantas adultas e de 30 plantas regenerantes (jovens), respeitando uma distância média de no mínimo 15 m entre os indivíduos amostrados. São consideradas plantas adultas aquelas com diâmetro do caule a altura do peito maior que 0,1 m e altura superior a 8,6 m (CARVALHO, 2003).

Para a coleta das plantas adultas foi utilizado extrator de ferro (projetado especialmente para a extração de câmbio de espécies arbóreas), sendo introduzido até 5 cm no tronco da árvore adulta, onde foi retirada uma pequena amostra do câmbio da árvore (Figura 3.1). Após a retirada do câmbio, as árvores foram pulverizadas com 100 ml m^{-2} do fungicida Difeconazole (Forth) na área coletada, para impedir possíveis infecções fúngicas e, o orifício aberto foi coberto por massa utilizada para vedar vidraçaria.

Coletou-se duas amostras de câmbio de cada indivíduo. Com o auxílio de canivete esterilizado com álcool 100%, o câmbio foi retirado da amostra e armazenado em microtubos de 2 mL com 500 μl de CTAB 2% (cetyltrimethylammonium bromide), o mesmo utilizado para a extração do DNA total das amostras. As amostras foram armazenadas em ambiente refrigerado a 10°C até o momento da extração do DNA total.

Figura 3.1 Coleta de câmbio em árvores adultas de *A. polyneuron*: A– Caule com orifícios feitos para a retirada do câmbio. B– Câmbio.



Fonte: Próprio autor

Para os indivíduos regenerantes, foram coletadas amostras foliares (cerca de cinco folhas por indivíduo), optando pelas folhas mais jovens. Em seguida foram armazenadas em sacos de papel com sílica-gel para absorção da umidade, até o momento da extração do DNA total (Figura 3.2).

Figura 3.2 Indivíduo jovem de *A. polyneuron*. A – Indivíduos em seu habitat natural, no momento da coleta. B– Folha, já seca, armazenada em saco de papel.



Fonte: Próprio autor

Tabela 3.1– Populações de *A. polyneuron* coletadas no estado do Paraná.

| CÓDIGO | RESERVA | LOCALIZAÇÃO | COORDENADAS GEOGRÁFICAS | TAMANHO DA ÁREA (ha) |
|------------|------------------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|
| BMC | Bosque Municipal de Cianorte | Cianorte | 23°39'19" S e 52°36'13" O | 3,24 |
| FDL | Fazenda Doralice | Ibiporã | 23°16' S e 51°03' O | 170 |
| FDB | Fazenda Duas Barras | Planaltina do Paraná | 23°0'2" S e 52°54'50" O | 318,6 |
| PMG | Parque Estadual Mata dos Godoy | Londrina | 23°26'24" S e 51°14'24" O | 690,2 |
| MSF | Parque Estadual Mata São Francisco | Cornélio Procópio | 23°09'55" S e 50°33'93" O | 832 |
| PNI | Parque Nacional do Iguaçu | Céu Azul | 25°08'49" S e 53°50'56" O | 185.265,5 |
| PPR | Reserva Biológica das Perobas | Tuneiras do Oeste | 23°51'16" S e 52°45'2" O | 8.716 |

3.4.1.1 Regiões coletadas

a. Bosque Municipal de Cianorte “Bosque da Matriz”

Foi regulamentado em 16 de outubro de 1990, pelo prefeito Edno Guimarães (PREFEITURA MUNICIPAL DE CIANORTE, 2013). Compreende uma área total de 3,24 ha, média pluviométrica anual de 1797 mm e temperatura média 20,4°C (COCAMAR, 2018). O Bosque se localiza no centro da cidade de Cianorte e fica disponível para visitas durante todo o dia. Segundo a Secretaria do Meio Ambiente do município, o manejo da área é feito regularmente, o que foi possível observar durante a coleta. Porém, também foi constatada uma alta taxa de mortalidade de indivíduos adultos de *A. polyneuron*. Houve dificuldade em encontrar indivíduos jovens, sendo que, para esta área, não foi possível coletar 30 indivíduos regenerantes como nas demais, e sim 26 indivíduos.

b. Fazenda Doralice

A Fazenda Doralice conta com uma reserva florestal de aproximadamente 170 ha, onde foram feitas as coletas. A média pluviométrica anual na área é de 1531mm e temperatura média de 21°C (PRREFEITURA MUNICIPAL DE IBIPORÃ, 2011). A fazenda conta com plantações de soja e milho e faz margem com o rio Tibaji. A reserva é conservada, o número de indivíduos necessários para o estudo foi facilmente atingido, tanto para adultos quando para regenerantes.

c. Fazenda Duas Barras

A Reserva está localizada na Fazenda Duas Barras, no município de Paranavaí, conta com uma área total de 318,6 ha, pluviosidade média anual de 1539 mm e temperatura média de 20,7°C (IAPAR, 2017). A Fazenda cultiva cana-de-açúcar e tem criação de gado de corte. Na reserva observou-se um demasiado efeito antrópico, sendo visível a exploração não só dessa espécie como de diversas outras. O número de indivíduos necessários foi encontrado, porém houve uma grande dificuldade para encontrá-los, devido à visível exploração dessa espécie para o uso de sua madeira.

d. Parque Estadual Mata dos Godoy

O Parque Estadual Mata dos Godoy está localizada na Fazenda Santa Helena – Distrito de Espírito Santo, a 15 Km do centro de Londrina. Possui 675,70 ha de floresta subtropical, onde se encontram aproximadamente 200 espécies de árvores. Considerada um das principais áreas de preservação ambiental do Estado e uma das mais ricas reservas genéticas do Sul do País, abriga espécies raras como Peroba– Rosa (*Aspidosperma polyneuron*), Angico (*Anadenanthera macrocarpa*), Cedro (*Cedrela fissilis*), Figueira (*Ficus carica*), Pau– Marfim (*Balfourodendron riedelianum*), além de 180 espécies de aves silvestres, entre outros importantes representantes de nossa fauna. Tem 10% da área aberta ao público para visitação e os outros 90% são destinados à pesquisa ambiental. A área conta com um clima Subtropical Úmido Mesotérmico (Cfa), com verões quentes, geadas pouco frequentes e chuvas concentradas principalmente nos meses de verão. A temperatura média é de 21° C, com média anual máxima de 27,3° C e a média anual mínima de 16°C. A média anual de umidade relativa do ar é de 70,4%. A faixa de precipitação no ano é de 1.400 a 1.600 mm (IAP, 2002).

e. Parque Estadual Mata São Francisco

Criado em 1994, o Parque Estadual Mata São Francisco, entre Cornélio Procópio e Santa Mariana, preserva uma das poucas áreas remanescentes de Floresta Atlântica da região e está inserido dentro das áreas prioritárias de conservação ambiental. Com cerca de 814 ha, o local possui um lago artificial e uma trilha de 1.650 m de extensão que passa dentro da mata e por dois córregos. A região conta com uma precipitação média anual de 1.200 a 1.400 mm. Devido à fertilidade do solo há uma diversidade no estrato superior desta vegetação, ocorrendo as seguintes espécies: a Peroba– Rosa (*Aspidosperma polyneuron*), Pau D'alho (*Gallesia sp*), Figueira Branca (*Ficus sp.*), Palmito Jussara (*Euterpe edulis*), entre outras. Tem um total de 237 espécies, pertencentes a 54 famílias e 21 ordens. Além de 7 espécies de anfíbios, 28 espécies de mamíferos de médio e grande porte e, 2 espécies de primata: Macaco– prego (*Cebus nigritus*) e Bugio (*Alouatta clamitans*) (IAP, 2016).

f. Parque Nacional do Iguaçu

O Parque Nacional do Iguaçu está localizado na região Extremo Oeste Paranaense, possui uma área total de 169.695,88 ha, e é administrado pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). No Brasil, o Parque Natural confina com 10 municípios: de Foz do Iguaçu, Medianeira, Matelândia, Céu Azul, São Miguel do Iguaçu, Santa Terezinha de Itaipu, Santa Tereza do Oeste, Capitão Leônidas Marques, Capanema e Serranópolis do Iguaçu. O Parque Nacional do Iguaçu foi efetivamente criado em 10 de janeiro de 1939, através do Decreto– Lei nº 1.035 do então Presidente da República, Getúlio Vargas. Em 17 de novembro de 1986, recebeu a distinção, concedida pela UNESCO, de Patrimônio Natural da Humanidade. O parque teve seu primeiro Plano de Manejo elaborado em 1981, tendo sido revisado somente no ano de 1999 (ICMBio)

g. Reserva Biológica das Perobas

A Reserva das Perobas está localizada no município de Tuneiras d'Oeste (próximo à Cianorte– PR) e conta com uma área de cerca de 8,7 ha. É considerada “Reserva Biológica” porque está incluída no grupo das unidades de conservação de proteção integral, onde é permitido apenas o uso indireto dos atributos naturais. A visitação pública é permitida apenas com a finalidade educacional e não para fins de turismo e recreação. A Reserva foi criada no dia 20 de março de 2006 e passou a ter proteção do Poder Público e, desde então, é administrada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), órgão do Ministério do Meio Ambiente. Assim como toda unidade de conservação, a Reserva Biológica das Perobas tem um plano de manejo, que conta com a ajuda do ICMBio e com Unidades de Pesquisa de Universidades próximas, fazendo levantamentos de dados ambientais, socioeconômicos e planejando opções para o gerenciamento dos mesmos. A Reserva também é dividida em setores, onde existem áreas abertas à visitação e à pesquisa. Com mais de 300 espécies de plantas já encontradas, a Reserva abriga a segunda maior área de Floresta Estacional Semidecidual do Paraná, ficando atrás apenas do Parque Nacional do Iguaçu (MAGALHÃES JÚNIOR; ORTÊNCIO FILHO e DELARIVA, 2014).

3.4.2 Extração do DNA total

A extração de DNA total, realizada a partir de tecidos foliares e do câmbio, seguiu o protocolo desenvolvido por Doyle e Doyle (1987), com modificações. O DNA extraído foi quantificado em gel de agarose 1% e, após a eletroforese, o gel foi visualizado em transluminador de luz UV, pela utilização de Brometo de Etídeo.

3.4.2.1 Extração do DNA total do câmbio

Para a extração de DNA, as amostras de câmbio, que estavam imersas em tampão CTAB 2% desde a sua coleta, tiveram o tampão descartado. Os câmbios foram depositados em cadinhos de porcelana, onde foi adicionado nitrogênio líquido para maceração dos mesmos. Após maceração, adicionou-se 1,5 ml de tampão CTAB 2% + 2% de β -mercaptoethanol por amostra, que foram realocadas para tubos de 2 ml. Os tubos foram aquecidos em banho-maria por 30 minutos a uma temperatura de 65°C.

Em seguida, as amostras foram deixadas para resfriar em temperatura ambiente, posteriormente foram adicionados 600 μ l de clorofórmio isoamílico (24:1) e levemente agitadas por volta de 5 minutos, até formar uma mistura homogênea e centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo, no qual foi acrescentado 400 μ l de isopropanol (a - 20°C) e encubados a - 20°C por 30 minutos.

As amostras passaram por uma nova centrifugação a 7500 rpm por 15 minutos e posteriormente o sobrenadante foi descartado, foi adicionado ao pellet 1 ml de álcool 70% e então, as amostras foram centrifugadas novamente a 7500 rpm por 3 minutos. Foi adicionado novamente álcool 70% e, depois de agitar as amostras, o álcool foi descartado e o DNA foi deixado para secar. Por fim, o mesmo foi diluído em 30 μ l de TE e 2 μ l de RNase e incubado a 37°C por 45 a 60 minutos. Após a incubação, as amostras foram armazenadas em ambiente refrigerado.

3.4.2.2 Extração do DNA das amostras foliares

As folhas coletadas foram armazenadas em sílica em gel. Uma amostra de 1cm² de folha foi transferida para um cadinho de porcelana, onde foram maceradas e acrescentou-se 600 µl de tampão de extração CTAB 2%. Posteriormente, o tubo foi aquecido em banho-maria por 30 minutos a 65° C. Após a retirada do banho-maria, as amostras foram deixadas para resfriar em temperatura ambiente e, em seguida, foram adicionados às amostras 600 µl de clorofórmio e elas foram levemente agitadas até formar uma mistura homogênea.

Em sequência, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido 500 µl para um novo tubo, ao qual foi adicionado um volume de, aproximadamente, 400 µl de isopropanol (- 20°C). O tubo foi invertido repetidamente, de modo suave e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com álcool 70% (1 ml). Posteriormente, foi feita uma nova centrifugação a 7500 rpm por 3 minutos. A adição de álcool 70% foi repetida mais uma vez, o mesmo foi descartado e o DNA foi deixado para secar. Por fim, o pellet foi diluído em 30 µl de TE e 2µl de RNase. As amostras foram incubadas a 37°C por 45 a 60 minutos e então, mantidas em ambiente refrigerado.

3.4.3 Amplificação das Regiões Microssatélite

As amostras de DNA foram quantificadas no aparelho Nanodrop para a verificação da concentração e pureza das mesmas. Um total de sete loci microssatélite foram amplificados (Apn18, Apn21, Apn 22, Apn23, Apn24, Apn26 e Apn 27), desenvolvidos por Ramos et al. (2011) (Tabela 3.2).

Para a genotipagem foi utilizada a marcação indireta por fluoróforos, conforme descrito em Schuelke (2000). Neste método, uma cauda de sequência M13 (TGTAACGACGGCCAGT) foi adicionada na extremidade 5' do *primer*. As reações de amplificação consistiram em 4 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0,2 µL de *primer forward* (5 pM), 0,4 µL de *primer reverse* (5 pM), e 0,4 µL de *primer M13* (5 pM), marcado com um fluoróforo (Ned ou

Fam) (5 pM), 1 µL de DNA (25 ng) e 4 µL de água livre de nucleases para ajustar o volume final para 10 µL.

As reações de PCR foram feitas utilizando termociclador PTC 200 (*MJ Research, California, EUA*). Os ciclos de PCR consistiram de: 1 ciclo de 94°C por 4 minutos, seguido de 12 ciclos de 94°C por 30 segundos, 30 segundos de uma temperatura de anelamento para cada *primer* (Tabela 3.2), extensão de 72°C por 30 s; seguindo 30 ciclos adicionais de 94°C por 30 segundos, repetiu-se a temperatura de anelamento específica para cada *primer* por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; um ciclo de 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; com uma extensão final de 60°C por 40 minutos. O produto final da amplificação foi submetido à eletroforese capilar no sequenciador automático 3500xL (*Applied Biosystems, Califórnia, EUA*).

Tabela 3.2– Nomes dos *primers*, sequências *forward* e *reverse* para cada *primer*, Temperatura de anelamento (Ta) e Tamanho dos fragmentos (pb).

| Loci | Sequência dos <i>primers</i> (5'– 3') | Ta (°C) | Tamanho (pb) |
|-------|---------------------------------------|---------|--------------|
| Apn18 | F: GGGAAAACCTGAACATTCCGG | 54 | 258 – 273 |
| | R: CTTTGATTTTGGCTCATTGC | | |
| Apn21 | F: TTTGCAAGAATCTCTTCACC | 51 | 130 – 170 |
| | R: TACCTGCAGTCGAGAGAGAG | | |
| Apn22 | F: GTACTTCTCCCGCCACAC | 50 | 137 – 155 |
| | R: TTGTAAAATTCGTAGTTCAGC | | |
| Apn23 | F: CAAAAGGAGCCCAATTGG | 54 | 196 – 206 |
| | R: GACTCATTGCACACCAGCC | | |
| Apn24 | F: AAGATAGCCGTCATTGTTGG | 54 | 141 – 171 |
| | R: CAAAAGCTTGATGATGAATGC | | |
| Apn26 | F: CAAATATTGGATGTAAATCTGG | 51 | 124 – 150 |
| | R: AATCTGTAGCTGTGGCTCC | | |
| Apn27 | F: TCATCATCGTGGTTCTTGC | 52 | 222 – 238 |
| | R: AATAACACCCAAATTCCAGAC | | |

Fonte: Ramos et al. (2011).

3.4.4 Análise Estatística

Para a estimativa do número de alelos por loco (A), número de alelos efetivos (A_e), porcentagem de locos polimórficos, heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e) foi utilizado o programa Popgene v. 1.31 (YEH; YANG; BOYLE, 1999). Para a presença de alelos nulos (N_a), realizada pelo método de Dempster, Laird e Rubin (1977), foi utilizado o programa FreeNa (CHAPUIS; ESTOUP, 2007). Os alelos nulos podem levar as populações a um excesso de homozigotos e aumentar o F_{is} , o que ocorre porque alguns alelos não são amplificados durante a análise de microssatélites, devido à uma mutação nos sítios de anelamento dos *primers* (CHYBICKI; BURCZYK, 2009; DEWOODY; NASON; HIPKINS, 2006). Para evitar a presença de alelos nulos neste estudo somente as amostras de DNA e *primers* de microssatélites com alto nível de amplificação foram analisados, com o objetivo de eliminar desvios causados por alelos nulos.

O programa Arlequin v 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005) foi utilizado para calcular o teste de desequilíbrio de ligação, a estimativa da variação genética entre e dentro de populações, que foi calculada através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) e para o cálculo do F_{st} global e F_{st} par a par. Os coeficientes de endogamia dentro de populações (F_{is} – WRIGHT, 1965) foram obtidos a partir do programa FSTAT v. 2.9.3 (GOUDET, 2001). As estimativas de taxa de migração foram calculadas utilizando o programa BeyesAss 1.3 (SILSON; RANNALA, 2003).

O programa Bottleneck 2.1.02 (CORNUET; LUIKART, 1996; PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999) com o teste de sinal de Wilcoxon, foi utilizado para constatar se as populações tinham passado por uma redução recente de seu tamanho efetivo. Existem três modelos evolutivos que permitem avaliar a relação H_d/H_e : *Infinite Alleles Model* (IAM), *Stepwise Mutation Model* (SMM) e *Two-Phase Model* (TPM). O Modelo dos alelos infinitos (IAM) assume que cada mutação é responsável pela criação de um novo alelo (MARTINS, 2011), já o modelo SMM considera que a mutação ocorre em ambas as direções, excluindo ou adicionando uma unidade de repetição e considerando os alelos de tamanhos similares mais proximamente relacionados (KIMURA; OHTA, 1978). O terceiro modelo, o TPM, sugere que a mutação resulta, em grande parte, de alterações em uma única

unidade no número de repetições, contudo, outras mutações podem ocorrer implicando a alteração em mais do que uma unidade. Sendo assim, TPM é uma modificação dos modelos anteriores onde é possível assumir porcentagens de cada modelo (FIGUEIREDO, 2008; MARTINS, 2011).

O programa Structure v 2.3.3 (HUBISZ et al., 2009) foi utilizado para identificar o número (K) de grupos de populações geneticamente similares, para isso utilizou-se o modelo de não mistura, com o número de burn-in e MCMC (Markov Chain Monte Carlo) de 50.000 interações com 10 replicatas para cada k, e com o k variando de 1 a 16 (número de populações + 2). O número de agrupamentos foi determinado utilizando o website Structure Harvester (EARL; vonHOLDT, 2012) conforme proposto por Evanno et al., 2005.

O dendrograma foi construído a partir da distância genética de Nei (1978), empregando o método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages), através do programa MEGA v. 7.0 (KUMAR; STACHER; TAMURA, 2016). A análise de Correspondência Fatorial foi estimada para obter os agrupamentos das populações, utilizando o programa GENETIX v. 4.0 (BELKHIR et al., 2004).

3.5 RESULTADOS

Para os sete locos aplicados em sete populações adultas de *Aspidosperma polyneuron*, verificou-se um total de 177 alelos em 208 indivíduos analisados, com o número de alelos variando de 14 para o loco Apn18 a 46 para o loco Apn 26, apresentando uma média total de 25,28 alelos por loco (Tabela 3.3). Já para as sete populações de indivíduos jovens, foram encontrados um total de 198 alelos em 200 indivíduos, variando entre 13 alelos no loco Apn27 e 43 alelos no loco Apn26, com uma média total de 28,28 alelos por loco (Tabela 3.4).

Foi observada uma média de 3,61 alelos por loco para população adulta e 4,04 alelos por loco por população de jovens onde, para o grupo dos adultos, as populações do Parque das Perobas e do Parque Nacional do Iguaçu apresentaram as menores médias de alelos por locos (3,00) e, a população da Mata São Francisco foi a que apresentou a maior média de alelos por locos (4,71) (Tabela 3.3). Para o grupo de jovens, a população da reserva florestal da Fazenda Duas Barras foi a que apresentou a menor média de alelos por locos (2,57) e na

população do Bosque Municipal de Cianorte foi observada a maior média de alelos por locos (5,42) (Tabela 3.4).

Tabela 3.3 – Número de alelos encontrados em populações com indivíduos adultos de *Aspidosperma polyneuron* coletados em sete fragmentos distribuídos no estado do Paraná obtidos a partir de sete locos microssatélites.

| LOCOS | FDL | MSF | FDB | PPR | BMC | PNI | PMG | TOTAL | MÉDIA |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| Apn 18 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 14 | 2.00 |
| Apn 21 | 3 | 4 | 6 | 2 | 9 | 5 | 3 | 32 | 4.57 |
| Apn 22 | 5 | 6 | 5 | 2 | 2 | 2 | 2 | 24 | 3.42 |
| Apn 23 | 3 | 7 | 3 | 2 | 4 | 4 | 6 | 29 | 4.14 |
| Apn 24 | 3 | 2 | 2 | 1 | 4 | 2 | 3 | 17 | 2.43 |
| Apn 26 | 6 | 8 | 4 | 10 | 5 | 5 | 8 | 46 | 6.57 |
| Apn 27 | 3 | 4 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 15 | 2.14 |
| MÉDIA | 3.42 | 4.71 | 3.57 | 3.00 | 4.00 | 3.00 | 3.57 | 25.28 | 3.61 |

Tabela 3.4 – Número de alelos encontrados em populações com indivíduos jovens de *Aspidosperma polyneuron* coletados em sete fragmentos distribuídos no estado do Paraná obtidos a partir de sete locos microssatélites.

| LOCOS | FDL | MSF | FDB | PPR | BMC | PNI | PMG | TOTAL | MÉDIA |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| Apn 18 | 4 | 4 | 2 | 4 | 4 | 3 | 2 | 23 | 3.28 |
| Apn 21 | 3 | 5 | 4 | 3 | 9 | 8 | 4 | 36 | 5.14 |
| Apn 22 | 5 | 5 | 2 | 4 | 4 | 2 | 3 | 25 | 3.57 |
| Apn 23 | 5 | 8 | 3 | 5 | 10 | 3 | 4 | 38 | 5.43 |
| Apn 24 | 5 | 2 | 2 | 5 | 2 | 2 | 2 | 20 | 2.85 |
| Apn 26 | 7 | 9 | 3 | 8 | 6 | 4 | 6 | 43 | 6.14 |
| Apn 27 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 13 | 1.85 |
| MÉDIA | 4.42 | 5.00 | 2.57 | 4.42 | 5.42 | 3.28 | 3.14 | 28.28 | 4.04 |

O número de alelos efetivos variou nas populações adultas de 1,87 para população coletada no Parque Nacional do Iguaçu e 2,39 para população da Mata São Francisco, com uma média de 2,03 (Tabela 3.5). Já nas populações jovens, o número de alelos efetivos por loco variou de 1,60 para população do Parque Estadual Mata do Godoy a 2,94 para população coletada no Bosque Municipal de Cianorte, apresentando valor médio de 2,27 (Tabela 3.6).

A proporção de locos polimórficos apresentou valores altos em todas as populações, variando entre 85,71 e 100%, tanto nas adultas quanto nas jovens. A média nas populações adultas foi de 89,80% (Tabela 3.5) e, para as populações jovens, foi de 95,91% de locos polimórficos (Tabela 3.6).

Foi detectada a presença de alelos nulos em quase todas as populações, exceto na população adulta coletada no Parque das Perobas (Tabela 3.5) e na população jovem coletada na Fazenda Duas Barras (Tabela 3.6).

A heterozigosidade esperada (H_e) variou nas populações de indivíduos adultos de 0,36 (Parque Estadual Mata dos Godoy) a 0,55 (Mata São Francisco) (Tabela 3.5) e, entre 0,33 (Mata dos Godoy) a 0,61 (Mata São Francisco e Bosque Municipal de Cianorte) para as populações jovens (Tabela 3.6), gerando uma H_e média de 0,43 para as populações adultas e 0,49 para as jovens. Os valores médios obtidos pela heterozigosidade observada (H_o) foram de 0,49 para as populações adultas e 0,47 para as jovens, variando entre 0,28 (Bosque Municipal de Cianorte e Parque Estadual Mata dos Godoy) e 0,83 (Parque das Perobas) para as populações adultas (Tabela 3.5) e, entre as populações jovens, variou de 0,31 (Parque Nacional do Iguaçu) a 0,86 (Fazenda Duas Barras) (Tabela 3.6). Nas populações adultas, foi possível observar que o valor médio de H_o foi maior que o valor médio de H_e , o que não ocorreu em populações de indivíduos jovens.

O Fis dentro das populações foi significativo para quase todas as populações, exceto para as populações adultas coletadas na Fazenda Duas Barras e na Mata São Francisco, apresentando valores entre $-0,809$ (Parque das Perobas) e $0,232$ (Parque Estadual Mata dos Godoy) para as populações adultas (Tabela 3.5) e, entre $-0,826$ (Fazenda Duas Barras) e $0,246$ (Bosque Municipal de Cianorte) para as populações jovens (Tabela 3.6).

O desequilíbrio de ligação (D), estima a associação não aleatória dos alelos em diferentes locos na população. Para as populações adultas (Tabela 3.5) gerou uma média ($11,00$) maior do que a média das populações jovens ($6,71$) (Tabela 3.6), o que indica que as populações adultas apresentaram maior número de alelos em desequilíbrio de ligação quando comparados à população jovem.

Tabela 3.5 – Medidas da diversidade genética de sete loci de microssatélites em populações adultas de *Aspidosperma polyneuron* coletadas em sete fragmentos distribuídos no estado do Paraná.

| População | A | Ae | Na | % loci polimórficos | Ho | He | plld | Fis |
|-----------|-------|-------|-------|------------------------|------|-------|------|---------|
| FDL | 3.42 | 1.92 | 0.07 | 85.71 | 0.43 | 0.41 | 11 | - 0.033 |
| MSF | 4.71 | 2.39 | 0.06 | 100 | 0.53 | 0.55 | 16 | 0.024 |
| FDB | 3.57 | 2.26 | 0.02 | 100 | 0.82 | 0.52 | 17 | - |
| PPR | 3.00 | 2.06 | 0.00 | 85.71 | 0.83 | 0.47 | 15 | - |
| BMC | 4.00 | 1.97 | 0.04 | 85.71 | 0.28 | 0.39 | 8 | 0.039* |
| PNI | 3.00 | 1.87 | 0.08 | 85.71 | 0.30 | 0.35 | 5 | 0.142* |
| PMG | 3.57 | 1.79 | 0.07 | 85.71 | 0.28 | 0.36 | 5 | 0.232* |
| Total | 25.28 | 14.26 | ----- | ----- | ---- | ----- | --- | ----- |
| | | | | | ---- | --- | --- | --- |
| | | | | | | | --- | |
| Média | 3.61 | 2.03 | ----- | 89.80% | 0.49 | 0.43 | 11 | - 0.144 |

A: número de alelos; Ae: número de alelos efetivos; Na: alelos nulos; Ho: heterozigiosidade observada; He: heterozigiosidade esperadas; plld: (Pairwise loci in linkage disequilibrium) locos em desequilíbrio de ligação; Fis: coeficiente de endogamia segundo Wright (1965).

*P≤0.05 valor significativo

Tabela 3.6 – Medidas da diversidade genética de sete loci de microssatélites em populações jovens de *Aspidosperma polyneuron* coletadas em sete fragmentos distribuídos no estado do Paraná.

| População | A | Ae | Na | %loci polimórficos | Ho | He | plld | Fis |
|-----------|-------|-------|-------|-----------------------|------|-------|------|----------|
| FDL | 4.42 | 2.36 | 0.11 | 100 | 0.45 | 0.52 | 11 | 0.145* |
| MSF | 5.00 | 2.93 | 0.09 | 100 | 0.49 | 0.61 | 6 | 0.195* |
| FDB | 2.57 | 1.98 | 0.00 | 100 | 0.86 | 0.48 | 15 | - 0.826* |
| PPR | 4.42 | 2.26 | 0.12 | 100 | 0.43 | 0.51 | 5 | 0.150* |
| BMC | 5.42 | 2.94 | 0.12 | 100 | 0.46 | 0.61 | 4 | 0.246* |
| PNI | 3.28 | 1.86 | 0.07 | 85.71 | 0.31 | 0.40 | 3 | 0.228* |
| PMG | 3.14 | 1.60 | 0.04 | 85.71 | 0.28 | 0.33 | 3 | 0.156* |
| Total | 28.25 | 15.93 | ----- | ----- | ---- | ----- | --- | ----- |
| | | | | | ---- | --- | --- | --- |
| | | | | | | | --- | |
| Média | 4.04 | 2.27 | ----- | 95.91% | 0.47 | 0.49 | 6.71 | 0.042 |

A: número de alelos; Ae: número de alelos efetivos; Na: alelos nulos; Ho: heterozigiosidade observada; He: heterozigiosidade esperadas; plld: (Pairwise loci in linkage disequilibrium) locos em desequilíbrio de ligação; Fis: coeficiente de endogamia segundo Wright (1965).

*P≤0.05 valor significativo

O valor obtido do Índice de Fixação (FST) através da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as 14 populações (7 adultas e 7 jovens), foi de 0.35204 (Tabela 3.7), valor este considerado alto, o que indica uma grande diferenciação entre as populações. Também foi possível observar, através da porcentagem de variação, que os valores encontrados foram maiores dentro de populações do que entre populações (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) aplicada a marcadores microssatélite para as populações jovens e adultas de *Aspidosperma polyneuron* distribuídas no estado do Paraná.

| Fontes de Variação | g.l | SQ | CV | % Variação |
|-------------------------|---------|----------|---------|------------|
| Entre populações | 13 | 684.831 | 0.87635 | 35.20* |
| Dentro de populações | 802 | 1293.614 | 1.61298 | 64.80 |
| Total | 815 | 1978.445 | 2.48934 | |
| Índice de fixação (FST) | 0.35204 | | | |

g.l = Graus liberdade; $p < 0,05$ (teste de significância para 1023 permutações); SQ = Soma dos Quadrados; CV = Componente de Variância

Uma segunda AMOVA foi gerada a fim de analisar a variância molecular entre os grupos (Tabela 3.8), onde foi possível observar que a variação entre populações adultas e jovens foi de apenas 2,22%. A variação entre populações dentro do grupo foi de 33,65% e dentro das populações, o valor foi de 64,13%.

Tabela 3.8 – Análise de Variância Molecular (AMOVA) aplicada a marcadores microssatélite entre os grupos de populações adultas e jovens de *Aspidosperma polyneuron* distribuídas no estado do Paraná.

| Fontes de Variação | g.l. | SQ | CV | % Variação |
|------------------------------------|---------------|----------|---------|------------|
| Entre grupos | 1 | 73.842 | 0.05585 | 2.22 |
| Entre populações dentro dos grupos | 12 | 610.989 | 0.84628 | 33.65* |
| Dentro de populações | 802 | 1293.614 | 1.61298 | 64.13 |
| Total | 815 | 1978.445 | 2.51512 | |
| Índices de Fixação | FST: 0.35868; | | | |

g.l = Graus liberdade; $p < 0,05$ (teste de significância para 1023 permutações); SQ = Soma dos Quadrados; CV = Componente de Variância

O Teste de sinal para o excesso/deficiência de heterozigotos nas populações adultas indicou o índice de $He > Hd$ significativos em todas as populações para o teste de IAM, para o teste TPM as populações coletadas na Fazenda Doralice, Parque das Perobas, Parque Nacional do Iguaçu e Parque Estadual Mata dos Godoy e, para o teste SMM as populações coletadas na Mata São Francisco, no Bosque Municipal de Cianorte e no Parque Estadual Mata dos Godoy (Tabela 3.9).

Na análise das populações jovens, para o teste IAM todas as populações apresentaram significância, exceto a população do Bosque Municipal de Cianorte. Para o teste de TPM, as populações da Fazenda Doralice, Fazenda Duas Barras, Parque das Perobas e Parque Estadual Mata dos Godoy apresentaram valores significativos para o excesso de heterozigotos. No teste SMM, todas as populações, exceto a pertencente à Fazenda Duas Barras, apresentaram valores significativos (Tabela 3.10).

Tabela 3.9 – Teste do sinal para o excesso/deficiência de heterozigotos em sete populações adultas de *Aspidosperma polyneuron* distribuídas no estado do Paraná.

| Populações | Nº de indivíduos por população | IAM ^a | | TPM ^b | | SMM ^c | |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|--------------------------------|-------|--------------------------------|-------|
| | | H _d /H _e | P | H _d /H _e | P | H _d /H _e | P |
| FDL | 30 | 1/5 | 0.16* | 2/4 | 0.49* | 5/1 | 0.04 |
| MSF | 30 | 2/5 | 0.29* | 4/3 | 0.38 | 5/2 | 0.13* |
| FDB | 30 | 1/6 | 0.07* | 1/6 | 0.09 | 4/3 | 0.35 |
| PPR | 28 | 1/5 | 0.07* | 1/5 | 0.08* | 1/5 | 0.09 |
| BMC | 30 | 3/3 | 0.57* | 5/1 | 0.06 | 5/1 | 0.05* |
| PNI | 30 | 3/3 | 0.64* | 3/3 | 0.59* | 4/2 | 0.27 |
| PMG | 30 | 3/3 | 0.63* | 4/2 | 0.27* | 4/2 | 0.24* |

^a Infinite allele model; ^b Two– phase mutation model; ^c Stepwise mutation model. H_d/H_e representa a relação entre o número de locos com deficiência de heterozigotos em relação aos locos com excesso de heterozigotos. A razão de H_d/H_e deve ser próxima de 1:1 para populações que não sofreram gargalo genético. Quando H_e é maior que H_d presume– se que a população sofreu efeito de gargalo genético recente (LUIKART e CORNUET, 1998).

*P≤0.05 excesso significativa de heterozigotos

Tabela 3.10 – Teste do sinal para o excesso/deficiência de heterozigotos em sete populações jovens de *Aspidosperma polyneuron* distribuída no estado do Paraná

| Populações | Nº de indivíduos por população | IAM ^a | | TPM ^b | | SMM ^c | |
|------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|--------------------------------|-------|--------------------------------|-------|
| | | H _d /H _e | P | H _d /H _e | P | H _d /H _e | P |
| FDL | 30 | 3/4 | 0.62* | 3/4 | 0.64* | 4/3 | 0.33 |
| MSF | 28 | 1/6 | 0.09* | 1/6 | 0.10 | 2/5 | 0.34* |
| FDB | 28 | 1/6 | 0.04* | 1/6 | 0.06* | 2/5 | 0.26* |
| PPR | 30 | 3/4 | 0.60* | 3/4 | 0.64* | 4/3 | 0.32* |
| BMC | 24 | 1/6 | 0.11 | 2/5 | 0.36 | 4/3 | 0.33* |
| PNI | 30 | 2/4 | 0.36* | 4/2 | 0.26 | 4/2 | 0.24* |
| PMG | 30 | 2/4 | 0.35 | 3/3 | 0.56* | 5/1 | 0.07* |

^a Infinite allele model; ^b Two– phase mutation model; ^c Stepwise mutation model. H_d/H_e representa a relação entre o número de locos com deficiência de heterozigotos em relação aos locos com excesso de heterozigotos. A razão de H_d/H_e deve ser próxima de 1:1 para populações que não sofreram gargalo genético. Quando H_e é maior que H_d presume– se que a população sofreu efeito de gargalo genético recente (LUIKART e CORNUET, 1998).

*P≤ 0.05 excesso significativa de heterozigotos

A distribuição de não- migrantes e migrantes pode ser observada na Tabela 3.11, onde as populações jovens da Fazenda Doralice, Fazenda Duas Barras, Parque Nacional do Iguaçu e Parque Estadual Mata dos Godoy, e a população adulta coletada na Mata São Francisco, apresentaram alguma taxa de migração entre seus indivíduos.

A população jovem do remanescente florestal pertencente a Fazenda Doralice obteve uma taxa de 28% de migração proveniente da Mata São Francisco. A troca de migrantes foi recíproca para a população adulta da Mata São Francisco, apresentando 8% de migrantes provenientes da Fazenda Doralice. A população adulta coletada na reserva legal pertencente à Fazenda Duas Barras apresentou uma taxa de 28% de migrantes provenientes da população adulta coletada no Parque das Perobas. As populações jovens coletadas tanto no Parque Nacional do Iguaçu, quanto na Mata dos Godoy contem taxas de migrantes provenientes de sua própria população adulta, ambos com 28% de migrantes da população adulta para a jovem.

Tabela 3.11 – Média da distribuição a posteriori da distribuição da proporção de indivíduos jovens e adultos não- migrantes e migrantes nas populações de *Aspidosperma polyneuron* baseada no método de atribuição Baeynsiana de Wilson e Rannala (2003).

| Populações | Não- migrantes (IC _{95%}) | Migrantes (IC _{95%}) |
|------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| FDL_A | 0.989 (0.960, 1.000) | N/A |
| FDL_J | 0.677 (0.667, 0.706) | MSF_J 0.285 (0.229, 0.323) |
| MSF_A | 0.878 (0.814, 0,952) | FDL_A 0.087 (0.020, 0.155) |
| MSF_J | 0.989 (0.962, 1.000) | N/A |
| FDB_A | 0.981 (0.946, 0.998) | N/A |
| FDB_J | 0.678 (0.667,0,710) | PPR_A 0.283 (0.223, 0.323) |
| PPR_A | 0.988 (0.957, 1.000) | N/A |
| PPR_J | 0.988 (0.957, 1.000) | N/A |
| BMC_A | 0.962 (0.890, 1.000) | N/A |
| BMC_J | 0.986 (0.951, 1.000) | N/A |
| PNI_A | 0.988 (0.961, 1.000) | N/A |
| PNI_J | 0.677 (0.667, 0.704) | PNI_A 0.285 (0.228, 0.324) |
| PMG_A | 0.989 (0.963, 1.000) | N/A |
| PMG_J | 0.677 (0.667, 0.710) | PMG_A 0.284 (0.224, 0.324) |

Migrantes são identificados pela população fonte e taxas de migração (N/A = não migrantes).

A diferenciação genética interpopulacional (F_{st}) entre as sete populações adultas e as sete populações jovens, e suas respectivas distâncias geográficas, podem ser observadas na Tabela 3.12. Os valores apresentados de distância genética são considerados, na maioria, altos. Entre a população jovem do

Parque Estadual das Perobas e a população jovem da Fazenda Doralice, foi observada a menor distância genética. Já as populações jovem do Parque Estadual Mata dos Godoy e adulta do Parque Nacional do Iguaçu, apresentaram a maior distância genética entre elas. Não foi possível verificar correlação entre as distâncias genéticas (F_{st} par a par) e a distância geográfica entre as populações.

Tabela 3.12 –Valores de F_{st} par a par de sete populações adultas e sete populações jovens de *Aspidosperma polyneuron* no estado do Paraná, abaixo da diagonal. Distância geográfica, em Km, entre as populações estudadas, acima da diagonal.

| | FDL A | FDL J | MSF A | MSF J | FDB A | FDB J | PPR A | PPR J | BMC A | BMC J | PNI A | PNI J | PMG A | PMG J |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------|----------|
| FDL_A | * | * | 50,5 | 50,5 | 244 | 244 | 241 | 241 | 191 | 191 | 431 | 431 | 15,4 | 15,4 |
| FDL_J | 0,24 | * | 50,5 | 50,5 | 244 | 244 | 241 | 241 | 191 | 191 | 431 | 431 | 15,4 | 15,4 |
| MSF_A | 0,25 | 0,26 | * | * | 296 | 296 | 293 | 293 | 243 | 243 | 482 | 482 | 66 | 66 |
| MSF_J | 0,22 | 0,15 | 0,15 | * | 296 | 296 | 293 | 293 | 243 | 243 | 482 | 482 | 66 | 66 |
| FDB_A | 0,36 | 0,38 | 0,35 | 0,31 | * | * | 128 | 128 | 114 | 114 | 314 | 314 | 240 | 240 |
| FDB_J | 0,46 | 0,33 | 0,41 | 0,31 | 0,13 | * | 128 | 128 | 114 | 114 | 314 | 314 | 240 | 240 |
| PPR_A | 0,49 | 0,35 | 0,43 | 0,33 | 0,20 | 0,11 | * | * | 52 | 52 | 224 | 224 | 243 | 243 |
| PPR_J | 0,29 | 0,03 | 0,30 | 0,18 | 0,40 | 0,35 | 0,33 | * | 52 | 52 | 224 | 224 | 243 | 243 |
| BMC_A | 0,29 | 0,40 | 0,33 | 0,31 | 0,32 | 0,46 | 0,44 | 0,39 | * | * | 267 | 267 | 179 | 179 |
| BMC_J | 0,26 | 0,19 | 0,19 | 0,05 | 0,32 | 0,33 | 0,30 | 0,16 | 0,26 | * | 267 | 267 | 179 | 179 |
| PNI_A | 0,40 | 0,46 | 0,37 | 0,34 | 0,30 | 0,46 | 0,42 | 0,45 | 0,16 | 0,31 | * | * | 417 | 417 |
| PNI_J | 0,41 | 0,36 | 0,35 | 0,20 | 0,37 | 0,40 | 0,36 | 0,34 | 0,30 | 0,14 | 0,31 | * | 417 | 417 |
| PMG_A | 0,24 | 0,31 | 0,41 | 0,33 | 0,45 | 0,50 | 0,52 | 0,36 | 0,49 | 0,37 | 0,56 | 0,51 | * | * |
| PMG_J | 0,27 | 0,34 | 0,43 | 0,36 | 0,47 | 0,52 | 0,55 | 0,39 | 0,51 | 0,40 | 0,57 | 0,53 | 0 ^{NS} | * |

Todos os valores de F_{st} foram significativos, exceto por um, o qual foi identificado com “NS” (Não significativo) ($P > 0,05$, com 1023 permutações).

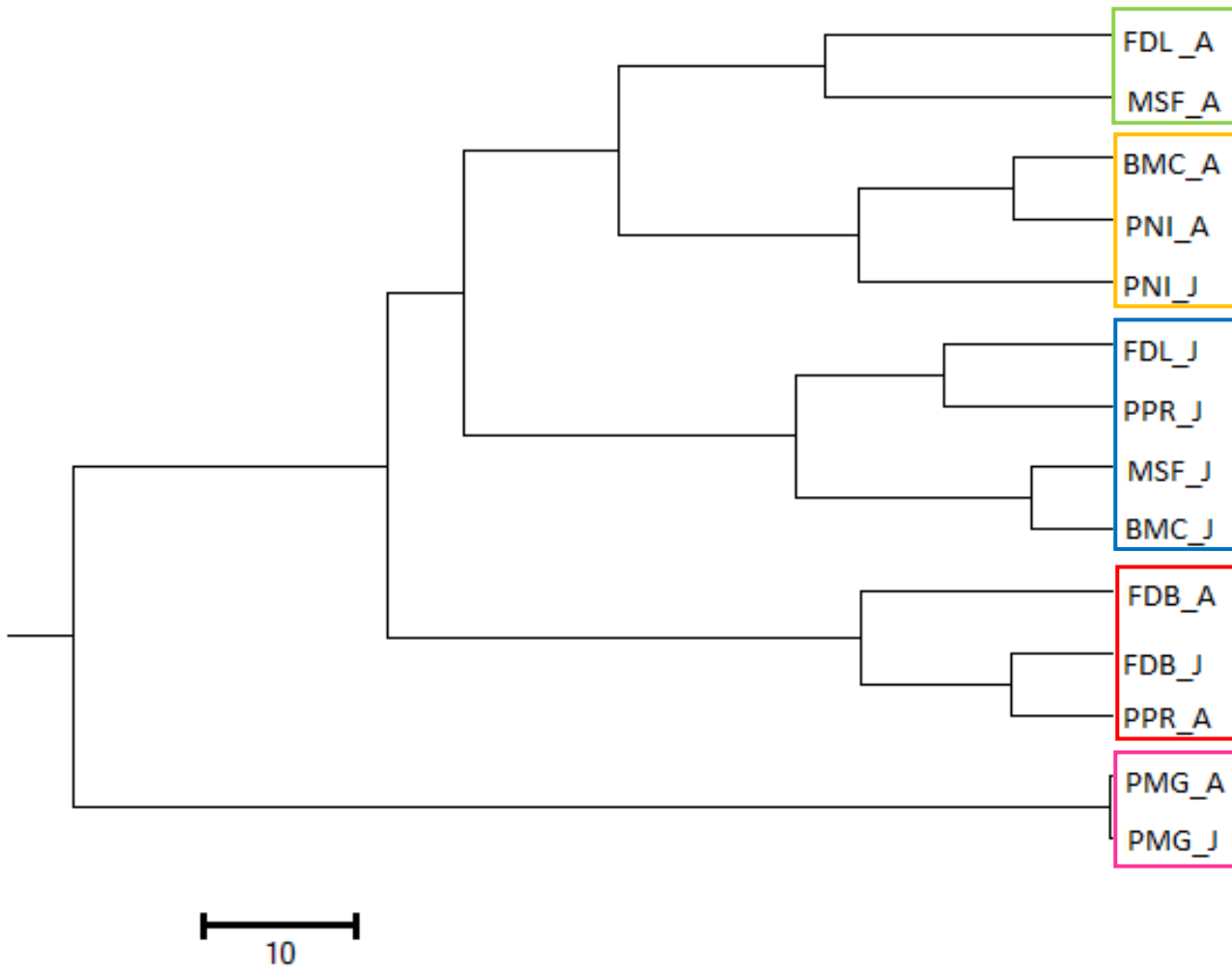
O Dendrograma constituído a partir da distância genética de Nei (1978) mostrou a formação de cinco grupos principais (Figura 3.3). Sendo o primeiro composto por duas populações adultas (Fazenda Doralice e Mata São Francisco). O segundo contou com duas populações adultas (Bosque Municipal de Cianorte e Parque Nacional do Iguaçu) e apenas uma jovem (Parque Nacional do Iguaçu). O terceiro grupo foi constituído apenas por populações de indivíduos jovens (Fazenda Doralice, Parque das Perobas, Mata São Francisco e Bosque Municipal de Cianorte). O quarto grupo contém duas populações adultas (Fazenda Duas Barras e Parque das Perobas) e uma jovem (Parque das Perobas). O quinto grupo é composto por duas populações, uma adulta e uma jovem, ambas provenientes do mesmo local de coleta (Parque Estadual Mata dos Godoy).

A análise bayesiana pelo software Structure foi realizada para identificar a estrutura genética das populações, a qual sugeriu que o número mais provável de agrupamentos foi $k=5$, conforme sugerido por Evanno et al. (2005) (Figura 3.3). Os cinco grupos gerados foram os mesmos observados pelo dendrograma.

O Gráfico de análise de correspondência fatorial (Figura 3.4) agrupou as populações em quatro principais grupos. A distribuição desses grupos foi correspondente às distribuições nos agrupamentos gerados pelo dendrograma e pela análise bayesiana (Figura 3.3), exceto pelas populações adultas da Fazenda Doralice e da Mata São Francisco que, nas demais análises, formaram um grupo e, na análise do gráfico de correspondência fatorial, as mesmas foram agrupadas separadamente. As populações presentes no grupo 2 mostraram seus indivíduos mais espalhados no gráfico em relação aos demais grupos, sendo este composto em sua maioria por populações de indivíduos jovens.

Figura 3.3 – a. Dendrograma, conforme a distância genética de Nei (1978), utilizando o método de agrupamento UPGMA, de quatorze populações (sete adultas e sete jovens) de *A. polyneuron* localizadas em fragmentos da Mata Atlântica no estado do Paraná. b. Estrutura genética de sete populações adultas e sete populações jovens de *Aspidosperma polyneuron* coletadas no estado do Paraná, inferido pela abordagem Bayesiana.

a.



b.

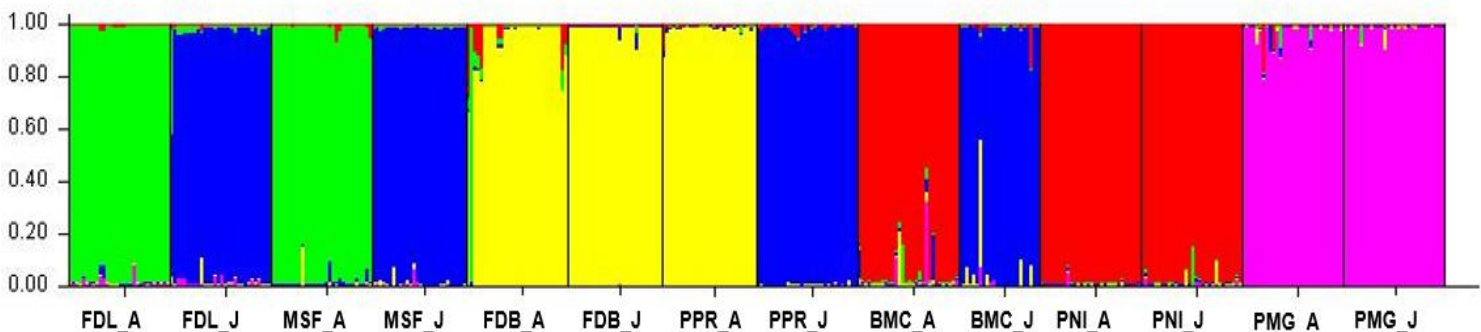
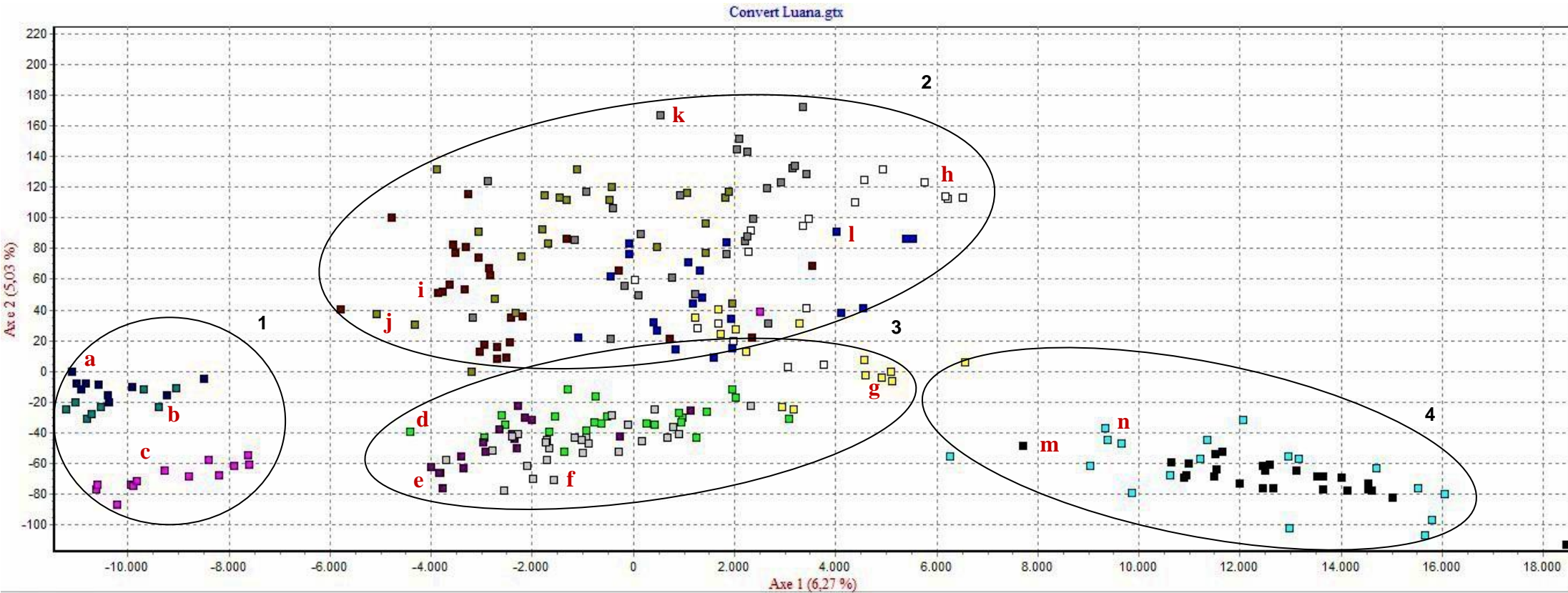


Figura 3.4 – Análise de correspondência fatorial de sete populações adultas e sete populações jovens de *A. polyneuron* coletadas em fragmentos da Mata Atlântica do estado do Paraná.



a = Parque das Perobas – adulto; b = Fazenda Duas Barras – jovem; c = Fazenda Duas Barras – adulto; d = Bosque Municipal de Cianorte – adulto; e = Parque Nacional do Iguaçu – adulto; f = Parque Nacional do Iguaçu – jovem; g = Fazenda Doralice – adulto; h = Mata São Francisco – adulto; i = Parque das Perobas – jovem; j = Bosque Municipal de Cianorte – jovem; k = Mata São Francisco – jovem; l = Fazenda Doralice – jovem; m = Parque Estadual Mata dos Godoy – jovem; n = Parque Estadual Mata dos Godoy – adulto.

3.6 DISCUSSÃO

Verificou-se em quase todas as populações analisadas de *Aspidosperma polyneuron*, tanto jovens como adultas a presença de alelos nulos, exceto duas delas (População adulta do Parque das Perobas e população jovem coletada na Fazenda Duas Barras). A utilização de *primers* microssatélites com alto nível de amplificação evitou que as populações pudessem gerar um excesso de homozigotos.

Aspidosperma polyneuron, apresentou uma diversidade genética alta, principalmente em sua população jovem (28,28 alelos por loco) (Tabela 3.4). Chaves et al. (2017), no estudo de populações do Parque Estadual Mata dos Godoy, utilizando os mesmos loci de microssatélites que os utilizados neste trabalho, verificou 11,7 alelos por locos. Esta diferença no número de alelos por locos entre o trabalho de Chaves et al. (2017) e este estudo deve-se ao fato de Chaves et al. (2017) ter estudado somente indivíduos do Parque Estadual Mata dos Godoy, enquanto neste trabalho analisamos a diversidade genética de sete fragmentos do estado do Paraná. Outras espécies pertencentes ao mesmo bioma também apresentaram valores inferiores, como é o caso da *Metrodorea nigra* (14,85) (MORAES FILHO, 2014) e *Chrysophyllum gonocarpum* (16,12) (RODRIGUES, 2014).

Com uma média de 3,61 para população adulta (Tabela 3.5) e 4,04 alelos por loco por população de jovens (Tabela 3.6), os indivíduos de *A. polyneuron* das quatorze populações analisadas, apresentam valores semelhantes ao encontrado por Zimback et al. (2011) estudando populações de *A. polyneuron* ($A=3,9$). Ramos et al. (2011), utilizando 16 locos (no qual os sete utilizados neste trabalho estão inclusos), obteve uma média de 7,06 alelos por loco. Análises mais detalhada das Tabelas 3.5 e 3.6 mostram que as populações adultas e jovens apresentaram ligeiras diferenças no número de alelos e número de alelos efetivos com exceção da população da Fazenda de Duas Barras. Em todas as outras seis populações verificou-se valores ligeiramente superior quanto a estes dois parâmetros da medida da variabilidade genética. Isto significa que, embora *A. polyneuron* tenha passado por um intenso processo de redução da sua área de distribuição e corte seletivo nos últimos 80 anos, a variabilidade genética medida pelo número de alelos e número de alelos efetivos não foi afetada até o momento.

Porém, como já salientado, a população FDB (Fazenda Duas Barras) sofreu uma diminuição nestes dois parâmetros genéticos de uma geração para a outra. Este resultado pode ser decorrente do corte seletivo de Peroba adultas que ocorreu, e ainda ocorre, neste fragmento.

Resultados semelhantes foram encontrados para porcentagem de locos polimórficos. Valores médios da porcentagem de locos polimórficos foram de 89,80% para populações adultas e de 95,91% para as populações jovens, sendo que as populações FDL, PPR e BCM apresentaram valores maiores de polimorfismo nas populações jovens. De acordo com Young et al. (1996) e Lowe et al. (2005) os decréscimos de número de alelos, alelos efetivos e porcentagem de locos polimórficos (P) estão fortemente associadas com fragmentação de habitats.

Na população adulta, a heterozigosidade média esperada ($H_e=0,43$) foi menor que a heterozigosidade média observada ($H_o=0,49$), gerando valores de Fis (coeficiente de endogamia) negativos ($-0,144$) e sugerindo excesso de heterozigotos em relação ao Equilíbrio de Hardy–Weinberg. Valores de H_o maiores que H_e também foram observados por Zimback et al. (2011) em seus estudos com *A. polyneuron* e Alzate–Marin et al. (2011), analisando populações de *Cariniana estrellensis* (Jatobá–branco).

Já nas populações jovens, a heterozigosidade média esperada ($H_e=0,49$) apresentou valores superiores em relação à heterozigosidade média observada ($H_o=0,47$), sugerindo baixa heterozigosidade, o que pode ser evidenciado pelo valor positivo do Fis (0,042). Valores semelhantes foram encontrados por outros autores (CHAVES et al., 2017; CARVALHO; MACHADO, 2004).

Análises dos Fis mostraram resultados diferentes entre as populações adultas e jovens (Tabelas 3.5 e 3.6). Nas populações adultas da Fazenda Doralice (FDL) e Parque Estadual Mata São Francisco (PMG), não foi observado efeito do endocruzamento sobre a sua variabilidade genética. As populações adultas Bosque de Cianorte (BCM), Parque Nacional do Iguaçu (PNI) e Parque Estadual Mata dos Godoy (PMG) como também as populações jovens, com exceção da população Fazenda Duas Barras, apresentaram Fis positivos e significativos. Estes valores de Fis são responsáveis pelo fato de obtermos nas Tabelas 3.5 e 3.6 valores da heterozigosidade observada menores que a esperada.

As populações adulta e jovem da Fazenda Duas Barras (FDB) e a população adulta da Reserva Biológica das Perobas (PPR) mostraram valores de Fis negativo e significativo. De acordo com Alberto et al. (2005) e Ruggiero et al. (2005) Fis negativo e significativo é resultado de reprodução assexual, a qual mantém a taxa de heterozigosidade e até pode aumentá-la de uma geração a outra (Tabelas 3.5 e 3.6). Segundo Chaves (2017) *A. polyneuron* apresenta tanto reprodução assexual (apomixia facultativa) como sexual (alogamia). Ramos (2012) encontrou uma taxa de apomixia de 22,8% e Chaves (2017) de 28%. De acordo com Stoeckel et al. (2006) Fis negativo e desequilíbrio de ligação entre alguns locos (Tabela 3.5 e 3.6) são assinaturas de reprodução assexual, a qual preserva a associação alélica através das gerações (HALKETT et al., 2005).

A apomixia conserva a heterozigosidade originada da reprodução sexuada e contraria os efeitos negativos da depressão endogâmica e da deriva genética (MURAWSKI, 1995). Essa forma de reprodução permite a propagação mesmo em situações onde o clima ou determinadas barreiras, impedem o cruzamento satisfatório entre os indivíduos e também contribui para o aumento populacional quando a população passa por uma redução significativa.

O alto polimorfismo e a alta diversidade genética observados nas populações podem ser explicados pela dispersão do pólen e semente dessa espécie, que é polinizada principalmente por mariposas (MARTINS; BATALHA, 2006). Segundo Chaves et al. (2017), a distância média de dispersão do pólen em *A. polyneuron* pode chegar até a 142 m e as sementes podem ser dispersas a uma distância média de 62 m. Essa distância pode ser influenciada pelos insetos polinizadores, pela densidade populacional, pelo sincronismo no florescimento e fatores como clima, fragmentação florestal, e longevidade (DICK et al., 2008; DEGEN; SEBBENN, 2014).

Sementes que são dispersas pelo vento em árvores de grande porte, como é o caso da Peroba-Rosa, favorecem a dispersão a longas distâncias. Entretanto, a alta densidade evidenciada em florestas tropicais, pode se tornar uma barreira para a dispersão pelo vento (CHAVES et al., 2017). A distância de polinização e a dispersão de sementes não é o suficiente para que os fragmentos troquem material genético entre si, porém, dentro da própria população, a dispersão é considerada o suficiente para manter a variabilidade da mesma.

A análise de Variância molecular (AMOVA), gerada com a finalidade de analisar a variância molecular entre os grupos, possibilitou observar que a variação entre populações dentro do grupo (33,65%) foi menor que a variância dentro das populações (64,13%), o que leva a classificar que o modelo reprodutivo da espécie como misto, isto é, reproduz-se por alogamia mas pode apresentar, como citado acima, taxas de apomixia facultativa (CHAVES et al. 2017).

Ainda foi possível observar que a variação entre populações adultas e jovens foi de apenas 2,22%. Essa variação baixa entre os grupos pode ter ocorrido devido a longevidade da espécie, que, por ser uma espécie de ciclo longo (podendo chegar a mais de 1000 anos de idade) e produzir sementes com uma frequência baixa, pode não ter tido tempo para diferenciação das populações pós-fragmentação, sendo que a fragmentação de suas populações ocorreu a menos de 80 anos.

Entretanto, o índice de fixação (F_{st}) foi de 0.35204 (Tabela 3.7), valor este considerado alto, o que indica uma grande diferenciação entre as populações, causado pelo baixo fluxo gênico entre elas (Tabela 3.11). Esta alta diferenciação pode ser explicada pelo fato desta espécie, como citado acima, além de apresentar fecundação cruzada, mostra uma taxa alta de apomixia facultativa (22,8 – 28%). Ambos, o sistema de dispersão do pólen e sementes, como a apomixia facultativa, explicam a alta diversidade genética (F_{st}) encontrada entre as populações. Valores altos de diferenciação também foram observados por Alzate-Marin et al. (2011) em estudos de populações adultas de *A. polyneuron* ($F_{st}=0.30$) e para populações de *Cariniana estrellensis* (Jatobá-branco) ($F_{st}=0.29$), também conhecida como uma espécie Secundária tardia, assim como a Peroba-rosa.

Os testes do sinal para o excesso ou deficiência de heterozigotos tem como objetivo comprovar se uma determinada população está iniciando um processo de gargalo genético. Segundo Luikart e Cornuet (1998) populações que não sofreram com a ação do gargalo genético tendem a obter valores de H_d (diversidade gênica em equilíbrio) iguais à H_e (diversidade gênica). No entanto, se uma população tem sofrido um gargalo genético recentemente, a H_e vai exceder a H_d , indicando um excesso de heterozigosidade.

Todas as populações adultas e jovens apresentaram efeitos de deriva genética recente para pelo menos um dos modelos testados. Estas

populações mostraram excesso de heterozigosidade devido ao seu F_{is} negativo, o qual, por sua vez, teve como causa a alta taxa de apomixia facultativa que ocorre em *A. polyneuron*. A apomixia facultativa suplanta a deriva genética, pois mantém nas populações, de uma geração para outra, aqueles genótipos mais adaptados e também levar ao aumento da densidade populacional (CHAVES et al., 2017).

Na relação, ainda foi possível observar que o desequilíbrio foi significativo para as populações jovens ocorreu, para grande parte das populações, nos três modelos, o que indica que essas populações estão começando a sofrer os primeiros efeitos do gargalo genético. No início do processo de gargalo genético, a população pode apresentar heterozigosidade em excesso devido ao fato de que alelos raros, que são geralmente perdidos com maior rapidez, tem um efeito menor sobre o índice de heterozigosidade, assim muitos alelos podem ser perdidos sem que haja redução da heterozigosidade (LUIKART; CORNUET, 1998).

Em relação à distribuição de não- migrantes e migrantes (Tabela 3.11), as populações jovens da Fazenda Doralice, Fazenda Duas Barras, Parque Nacional do Iguaçu e Parque Estadual Mata dos Godoy, e a população adulta coletada na Mata São Francisco, apresentaram alguma taxa de migração entre seus indivíduos. A população jovem do remanescente florestal pertencente a Fazenda Doralice obteve uma taxa de 28% de migração proveniente da Mata São Francisco. Essas duas populações apresentam localização geográfica próxima, estando separadas por aproximadamente 60 km. A Fazenda Duas Barras, que está localizada no município de Paranavaí, e o Parque das Perobas, localizado em Tuneiras d'Oeste, estão a uma distância aproximada de 147 km.

Os resultados obtidos através da análise do F_{st} par a par (Tabela 3.12) indicaram uma distância genética alta entre as populações. As maiores distâncias genéticas foram observadas nas populações jovem e adulta do Parque Estadual Mata dos Godoy, sendo a maior distância entre a população jovem desta região e a população jovem do Parque Nacional do Iguaçu. Já as menores distâncias foram observadas entre as populações jovens do Parque das Perobas e da Fazenda Doralice. Não foi possível observar correlação entre as distâncias genéticas e geográficas. Isto deve-se pela baixa taxa de fluxo gênico entre as populações com também pela taxa de reprodução assexuada (apomixia) fator que leva a diferenciação entre as populações.

A análise das distâncias genéticas observadas na análise do F_{st} par a par, foram comprovadas pelo dendrograma (Figura 3.3) constituído a partir da distância genética de Nei (1978). As populações foram agrupadas em cinco grupos, os quais também foram confirmados através da análise de agrupamento bayesiana (Figura 3.3).

A partir dos dados gerados pelo gráfico de análise de correspondência (Figura 3.4), observou-se a formação de quatro principais grupos, os quais obtiveram quase a mesma distribuição encontrada nas análises de agrupamento do dendrograma e bayesiana. Apenas as populações adultas da Fazenda Doralice e da Mata São Francisco, agrupadas nas análises anteriores, foram agrupadas separadamente.

Era esperado que populações adultas agrupassem com suas respectivas populações jovens, porém, como visto nas análises de agrupamento, essa situação não ocorreu para todas as populações. Além disso, a distância geográfica entre as populações não teve relação com suas distâncias genéticas. Tais resultados podem se explicar pela fragmentação florestal ocorrida nas regiões de coleta.

A dispersão de pólen e sementes dessa espécie não é capaz de alcançar uma distância suficiente para que tivesse ocorrido um fluxo gênico entre os fragmentos. Outro fator é a fragmentação, onde a maioria das plantas mães (adultas) foram cortadas, portanto os indivíduos jovens não apresentam uma composição gênica semelhante aos indivíduos adultos restantes na população, o que se torna um fator para o não agrupamento de jovens com adultos da mesma população.

A. polyneiron é uma espécie com uma alta longevidade, portanto os efeitos da fragmentação ainda não tiveram tempo suficiente para serem expostos. A fragmentação florestal começou a intensificar nos últimos 80 anos, árvores como a Peroba-Rosa podem chegar até a 1200 anos de idade (CARVALHO, 2004), para que gerações pós-fragmentação mostrem uma perda significativa de sua diversidade genética ou efeitos claros de depressão endogâmica, são necessárias várias gerações, talvez até algumas centenas de anos (KRAMER et al., 2007).

O entendimento da existência de grande estruturação genética das populações, auxilia no estabelecimento de medidas que auxiliam na conservação genética da espécie (TARAZI, 2009). O distanciamento entre essas populações é

um indicativo de que o fluxo gênico entre as mesmas está sendo dificultado, por isso é necessário que se mantenha a alta variabilidade dentro de cada um dos fragmentos.

Algumas medidas poderiam ser tomadas para manter a variabilidade das populações e garantir um maior fluxo gênico entre as mesmas. Uma solução a curto prazo seria o transplante de mudas. A longo prazo, os corredores ecológicos seriam uma medida que permitiria a dispersão de pólen entre fragmentos o que, conseqüentemente, aumentaria o fluxo gênico entre espécies (TOREZAN et al., 2005).

3.7 CONCLUSÃO

- As populações jovens e adultas de *Aspidosperma polyneuron*, pertencentes aos remanescentes florestais do estado do Paraná, apresentaram características típicas de espécies de reprodução mista, sexuada (alogamia) e assexuada (apomixia), com grande diversidade genética, altos valores de polimorfismo.
- Não foram observadas diferenças significativas entre o número de alelos e alelos efetivos entre as populações jovens e adultas, com exceção da população da Fazenda Duas Barras, possivelmente devido ao corte seletivo que ocorreu nesta área.
- Através da análise da variância molecular, foi possível observar alta diferenciação entre as populações e uma maior porcentagem de variabilidade dentro das mesmas do que entre elas. O alto de F_{st} entre as populações decorre, provavelmente, devido à reprodução por apomixia facultativa, que diferenciou geneticamente as populações.
- Os testes para excesso ou deficiência de heterozigotos indicou excesso de heterozigotos para a maioria das populações e, ainda foi possível observar que esta relação foi mais acentuada entre os indivíduos jovens, sendo este um indicativo de gargalo genético recente, devido a fragmentação.
- Entre as populações adultas e jovens, a variação foi baixa, o que pode ser explicado pela longevidade da espécie.

- Apesar das populações ainda estarem mantendo a variabilidade, a diminuição do fluxo gênico entre populações pode ser prejudicial à mesma, levando as populações à depressão endogâmica. Isto pode ser verificado nas populações jovens que mostraram uma alta taxa de endocruzamento e desequilíbrio de ligação. Portanto, medidas de conservação e manejo das áreas são necessárias para evitar que esta espécie entre em risco de extinção.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R.V.; CANSIAN, R.L.; KUBIAK, G.B.; SLAVIERO, L.B.; BUDKE, J.C.; MOSSI, A.J. Variabilidade genética de *Eugenia uniflora* L. em remanescentes florestais em diferentes estádios sucessionais. **Revista Ceres**, Viçosa, v.60, n.2, p.226– 233, 2013.
- ALBERTO, F.; GOUVEIA, L.; ARNAUD-HAOND, S.; PÉREZ-LLORÉNS, J. L.; DUARTE, C. M.; SERRAO, E. A. Within-population spatial genetic structure, neighbourhood size and clonal subrange in the seagrass *Cymodocea nodosa*. **Molecular Ecology**, 14(9), 2669– 2681, 2005.
- ALMEIDA, D. S. **Recuperação ambiental da mata atlântica**. 3rd ed. rev. and enl. Ilhéus, BA: Editus, 2016. Disponível em: SciELO Books < <http://books.scielo.org/> > Acesso em: 10 de ago. 2017.
- ALZATE– MARIN, A. L.; FERREIRA– RAMOS, R.; GUIDUGLI, M.; MARTINEZ, C. A.; MESTRINER, M. A. Genetic diversity assessed in individuals of *Aspidosperma polyneuron* and *Cariniana estrellensis* used as seed donors in a forest gene bank. In **BMC proceedings**, Vol. 5, No. 7, p. p8. BioMed Central, 2011.
- BARBOUR, R. C.; POTTS, B. M.; VAILLANCOURT, R. E. Pollen dispersal from exotic eucalypt plantations. **Conservation Genetics**, Arlington, v. 6, n. 2, p. 253– 257, 2005.
- BARRETT, S. C.; HARDER, L. D. Ecology and evolution of plant mating. **Trends in Ecology and Evolution**, 11(2), 73– 79, 1996.
- BARROSO, G. B. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, v.3, 326p, 1991.
- BEIGUELMAN, B. **Genética de Populações Humanas**. Ribeirão Preto: SBG, 2008. 235p. Disponível em: < <https://pt.scribd.com/document/356550833/genetica-de-populacoes-humanas-pdf> > Acesso em: 31 de ago. 2017.
- BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOMME, F. **GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations**. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France), 1996– 2004.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374p.
- BRASIL. Código Florestal. **LEI Nº 12.651, DE 25 DE MAIO DE 2012**. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa. Câmara dos Deputados. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12651.htm> Acesso em 27 de janeiro de 2018.
- BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores Microssatélites em espécies vegetais. **Biotecnologia, Ciencia e Desenvolvimento**, 30:46 – 50, 2003.

CARVALHO, P. E. R. **Peroba– rosa – *Aspidosperma polyneuron***. Colombo: EMBRAPA– CNPF, 12p (EMBRAPA– CNPF. Circular técnica, 96), 2004.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

CARVALHO, S. V. A. **Parâmetros genéticos populacionais como indicadores de sustentabilidade em populações naturais de pimenta rosa – *Schinus terebinthifolius* RADDI. (Anacardiaceae), no Baixo São Francisco – SE/AL**. 2009. 47f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão. 2009.

CARVALHO, V. M. D.; MACHADO, M. D. F. P. D. Esterase polymorphism in remanant populations of *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. (Apocynaceae) **Revista Árvore**, 28(5), 625– 631, 2004.

CENTRO NACIONAL DE CONSERVAÇÃO DA FLORA (CNCFlora). **Livro Vermelho – *Aspidosperma polyneuron* Müll Arg**. 2012. Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Aspidosperma%20polyneuron>> Acesso em: 10 de janeiro de 2018.

CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, 24(3): 621– 631, 2007

CHARLESWORTH, D.; WILLIS, J. H. The Genetics of inbreeding depression. **Nature Reviews Genetics**. v.10, p.783– 796. Nov. 2009.

CHAVES, C. L.; SEBBENN, A. M.; BARANOSKI, A.; GOEZ, B. D.; GAINO, A. P. S. C.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M. Gene dispersal via seeds and pollen and their effects on genetic structure in the facultative– apomictic Neotropical tree *Aspidosperma polyneuron*. **Silvae Genetica**, 65(2), 46– 57, 2016.

CHYBICKI, I. J.; BURCZYK, J. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. **Journal of Heredity**, 100(1), 106– 113, 2008.

COATES, D. J.; ATKINS, K. A. Priority setting and the conservation of Western Australia’s diverse and highly endemic flora. **Biological Conservation**, 97: 251– 253, 2001.

COCAMAR. **Relatório do Controle da precipitação anual das unidades– Ano de referência: 2017**. Publicado em: Fevereiro de 2018. Disponível em: <sunweb.cocamar.com.br/cgi-bin/wspd-cgi.sh/wservice=wsprod01/cpp/wccp011re.htm> Acesso em: 08 de fevereiro de 2018.

COLLEVATTI, R. G.; BRONDANI, R. V.; GRATTAPAGLIA, D. **Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense***. *Heredity*, v.83, n.6, p.748– 756, 1999.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da Floresta Brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 934p, 2011.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Rockville Pike, v. 144, n. 4, p. 2001– 2014, dez. 1996.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética. 1ed, **Ed. Suprema**, 2011.

DANQUAH, E. Y.; HANLEY, S. J.; BROOKES, R. C.; ADAM, C.; KARP, A. Isolation and characterization of microsatellites in *Echinochloa* (L.) Beauv. spp. **Molecular Ecology Notes**, v.2, n.1, p.51– 56, 2002.

DEGEN, B.; SEBBENN, A.M. Genetic and tropical forest. In: Pancel L, Kölh M (eds). **Tropical Forestry Handbook**, 2nd ed. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, Germany, 2014.

DEMPSTER, A. P.; LAIRD, N. M.; RUBIN, D. B. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society**. Series B 39:1– 38, 1977.

DEWOOD, J.; NASON, J. D.; HIPKINS, V. D. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.951– 957, 2006.

DICK, C. W.; HARDY, O. J.; JONES, F. A.; PETIT, R. J. Spatial scales of pollen and seed– mediated gene flow in tropical rain forest trees. **Tropical Plant Biology**, 1(1), 20– 33, 2008.

DOLABELA, M. F.; PÓVOA, M. M.; BRANDÃO, G. C.; ROCHA, F. D.; SOARES, L. F.; PAULA, R. C. E OLIVEIRA, A. B. *Aspidosperma* species as sources of anti-malarials: uleine is the major anti-malarial indole alkaloid from *Aspidosperma parvifolium* (Apocynaceae). **Malaria Jornal**, 14:498, 2015.

DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13– 15, 1987

DURIGAN, G.; FRANCO, G.A.D.C.; SAITO, M.; KAWABATA, M.; BAITELLO, J.B. Classificação sucessional de quatro espécies arbóreas com base na estrutura populacional em floresta primária (Gália, SP). In: **Congresso Nacional De Botânica**, 47., 1996, Nova Friburgo. Resumos. Rio de Janeiro: Sociedade Botânica do Brasil, 1996. p.202.

EARL, D. A.; von HOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources** v.4, p.359– 361. 2011.

EARL, D. A.; von HOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**. v.4, p.359– 361. 2011.

ENDRESS, M.E.; BRUYNS, P.V. A revised classification of the Apocynaceae s.l. **The Botanical Review**, 66.1:1– 56, 2000.

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.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**. v.14, p2611– 2620.2005.

EXCOFFIER, L. G.; LAVAL, A. S.; SCHNEIDER. Arlequin ver. 3.0: Na integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics Online**. 2005. V.1, p.47– 50, 2005.

FALEIRO, F.G. **Marcadores Genético– Moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina– DF: Embrapa Cerrados,99p, 2007.

FERREIRA, I. C. P., LONARDONI, M. V. C., MACHADO, G., LEON, L. L., GOBBI FILHO, L., PINTO, L. H. B., & OLIVEIRA, A. J. B. D. Anti– leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99(3), 325– 327, 2004.

FERREIRA, M. E. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In: GARRAY, I.; DIAS, B. F. S. **Conservação da Biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento**. Petrópolis: Vozes, 2001. V.1, p. 223– 267.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA– CENARGEN, 1998, 220 p.

FIGUEIREDO, M. G. **Caracterização genética de duas populações de jaguatirica, *Leopardus pardalis* (Felidae, Carnivora) do corredor de fluxo de biodiversidade do rio**. Dissertação apresentada ao Curso de Pós– Graduação em Genética para obtenção do título de Mestre. Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, 2008. 51 f.

FONSECA, M. G.; MARTINI, A. M; DOS SANTOS, F. A. Spatial structure of *Aspidosperma polyneuron* in two semideciduous forests in Southeast Brazil. **Journal of Vegetation Science**, v.15, p.41– 48, 2004.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas da Mata Atlântica**. 2016. Disponível em: < <https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/>> Acesso em: 10 de ago. de 2017a

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Paraná, pare de desmatar a Mata Atlântica!** 2016. Disponível em: < <https://www.sosma.org.br/artigo/parana-pare-de-desmatar-mata-atlantica>>. Acesso em: 20 de ago. de 2017b.

FUTUYMA, D, J. **Evolution**. 3 ed. Sinauer, 656p.2013.

GITZENDANNER, M. A.; SOLTIS, P. S. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. **American Journal of Botany**, v.87, p.783– 792, 2000.

GOUDET, J. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversity and fixation indices**, version 2.9.3.2, 2001. Disponível em:

<<https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>> Acesso em: 02 de fev 2018.

GUSSON, E. **Uso e diversidade genética em populações naturais de biriba (*Eschweilera ovata*[Cambess.] Meiers): subsídios ao manejo e conservação das espécies**. 2003. 91f. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ). Piracicaba, 2003.

HALKETT, F.; SIMON, J. C.; BALLOUX, F. Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. **Trends in Ecology & Evolution**, 20, 194–201, 2005.

HAO, R. V.; HODGKIM, T. Genetic diversity and conservation and utilization of genetic resources. **Plant Cell**, Waterbury, v. 68, n. 1, p. 1 – 19, 2002.

HATSCHBACH, G. G.; ZILLER, S. R. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado de Paraná**. Curitiba: SEMA/GTZ, 1995. 139 p.

HELLBERG, M.; BURTON, R. S.; NEIGEL, J. E.; PALUMBI, S. R. Genetic assessment of connectivity among marine populations. **Bulletin of Marine Science**, v.70, n.1, p.273– 290, 2002.

HENRIQUE, M. C.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. M. Alcaloides Indólicos de cascas de *Aspidosperma Vargasii* e *A. desmanthum*. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 2, 284– 287, 2010

HUBISZ, J. M.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Mol Ecol Resour**, v.9, p.1322– 1332.2009.

HUBISZ, J.M.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p.1322_1332, 2009.

ICMBio. **Plano de Manejo do Parque Nacional do Iguaçu**. Disponível em: <http://www.cataratasdoiguacu.com.br/manejo/siuc/planos_de_manejo/pni/html/index.htm> Acesso em: 15 de janeiro de 2018.

INOUE, M.T.; RODERJAN, C.V.; KUNIYOSHI, S.Y. **Projeto madeira do Paraná**. Curitiba: FUPEF, 260p.1984.

INSTITUTO AGRONOMO DO PARANÁ – IAPAR. **Agrometeorologia – Dados Diários de Paranavaí**. Publicado em: 31 de dezembro de 2017. Disponível em: <www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=2351>. Acesso em: 20 de janeiro de 2018.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ – IAP. **Parque Estadual Mata São Francisco terá conselho consultivo**. Publicado em: 05 de outubro de 2016. Disponível em: <www.iap.pr.gov.br/2016/10/1024/Parque-Estadual-Mata-Sao-Francisco-tera-conselho-consultivo.html> Acesso em: 20 de janeiro de 2018.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ – IAP. **Plano de Manejo do Parque Estadual Mata Dos Godoy**. Curitiba/PR. dezembro/2002. Disponível em: <<http://www.iap.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1218>> Acesso em: 15 de janeiro de 2018.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Manuais técnicos em geociências, n. 1. 2 ed. Rio de Janeiro. 92 p. 2012. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv63011.pdf>>. Acesso em: 17 de ago. de 2017.

ITAIPU. Técnicos da ITAIPU ajudam a salvar espécie de árvore ameaçada de extinção. **Jornal de ITAIPU eletrônico**. 2008. Disponível em: <<http://jie.itaipu.gov.br/node/37087>> Acesso em: 10 de ago. de 2017.

JONES, B.; GLIDDON, C.; GOOD, J.E.G. The conservation of variation in geographically peripheral populations: *Lloydia serotina* (Liliaceae) in Britan. **Biological Conservation**, 101:147– 156, 2001.

KAGEYAMA, P. Y.; BIELLA, L. C.; PALERMO JR, A. Plantações mistas com espécies nativas com fins de proteção a reservatórios. In: **Congresso Florestal Brasileiro**, VI, 1990.

KIMURA, M.; OTHA, T. Stepwise mutation model and the distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, p. 2868– 2872, 1978.

KOLTUNOW, A. M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. **The Plant Cell**, 5(10), 1425, 1993.

KRAMER, A. T.; ISON, J. L.; ASHLEY, M. V.; HOWE, H. F. The paradox of forest fragmentation genetics. **Conservation Biology**, 22(4), 878– 885, 2008.

KRENTKOWSKI, F. L., & DUARTE, M. D. R. Morpho– anatomical analysis of *Aspidosperma olivaceum* and *A. polyneuron*, Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 22(5), 937– 945, 2012.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. **Molecular Biology and Evolution**, 33 (7), 1870– 1874, 2016.

LOPES, M. S.; SEFC, K. M.; LAIMER, M; MACHADO, da C. A. Identification of microsatellite loci in apricot. **Molecular Ecology Notes**, V.2, n.1, p.24– 26, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantanarum, 1998. 352p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 1. 5ed. Nova Odessa: Plantarum, 384p, 2008.

LOWE, A. J.; BOSHIER, D.; WARD, M.; BACLES, C.F.; NAVARRO, C. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. **Heredity**, v.95, n. 4, p. 225– 273, 2005.

LUIKART, G.; CORNUET, J. M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation biology**, 12(1), 228– 237, 1998.

MAGALHÃES JÚNIOR, C. A. O.; ORTÊNCIO FILHO, H.; DELARIVA, R. L. **Reserva Biológica das Perobas: Uma ilha de biodiversidade no Noroeste do Paraná**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Dep. de Transportes, 73p., 2014.

MARTINS, A. F. A. **Estrutura populacional de *Anopheles Darlingi* em diferentes localidades de Rondônia ao longo do Rio Madeira através da genotipagem de microssatélites**. Tese apresentada ao Curso de Pós- graduação em Ciências Biológicas para obtenção do título de Doutor. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2011. 103f.

MARTINS, F.Q.; BATALHA, M.A. Pollination systems and floral traits in cerrado woody species of the upper Taquari Region (Central Brazil). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66(2A), p. 543– 552, 2006.

MELO, A. T. O. **Fluxo gênico e estrutura genética espacial de *Cabralea canjirana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de Mata Atlântica**. 2012. 87f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2012.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e campos sulinos**. Brasília, 2010. 46p.

MOGLIA, J. G., GONZÁLEZ, D., & SÁNCHEZ, V. Anatomía del leño y dendrología del quebracho iagunero *Aspidosperma triternatum* (Apocynaceae). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, 47(1– 2), 15– 22, 2012.

MORAES FILHO, R. M. **Efeitos genéticos da fragmentação florestal sobre a espécie de sub- bosque *Metrodorea nigra* em áreas remanescentes de floresta estacional semidecidual em Ribeirão Preto– SP**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto– USP, 116f. Ribeirão Preto, 2014.

MORI, S. A.; BOOM, B. M.; FRANCE, E. T. Distribution patterns and conservation of East Brazilian Coastal Forest Species. **Buttonia**, vol. 33, n. 2, p. 233– 245. 1991.

MOROKAWA, R., SIMÕES, A. O., & KINOSHITA, L. S. Apocynaceae s. str. of the Serra da Canastra National Park, State of Minas Gerais, Brazil. **Rodriguésia**, 64(1), 179– 199, 2013.

MURAWSKI, D. A. Reproductive biology and genetics of tropical trees from a canopy perspective. **Forest canopies**, 457– 493, 1995.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. **Genetics**, [S.l.] v. 89, n.3, p.583– 590, jul. 1978.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P.; DANTAS, A. C. M.; STEFENON, V. M.; TENFEN, S. Z. A.; KLABUNDE, G. H. F. **Bioteecnologias**. Apostila do Curso de Bioteecnologias da Universidade de Santa Catarina. Maio de 2016. Disponível em: <<http://lfdgv.paginas.ufsc.br/files/2014/08/Apostila-Bioteecnologia-Gene%CC%81tica-molecular-2016.pdf>> Acesso em: 05 de Ago. 2017.

OLIVEIRA, A.K.M.; CARVALHO, J.M.B.; SOUZA, J.S.; SOUZA, S.A. Germinação de sementes de *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC em diferentes temperaturas **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, p.642– 648, 2015.

PEDERSEN, J. M., BOWMAN, W. R., ELSEGOOD, M. R., FLETCHER, A. J., & LOVELL, P. J. Synthesis of ellipticine: a radical cascade protocol to aryl- and heteroaryl- annulated [b] carbazoles. **The Journal of organic chemistry**, 70(25), 10615– 10618, 2005.

PEREIRA, A. S. S.; SIMOES, A. O.; SANTOS, J. U. M. Taxonomy of *Aspidosperma* Mart.(Apocynaceae, Rauvolfioideae) in the State of Pará, Northern Brazil. **Biota Neotropica** 16.2, 2016.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (apocynaceae). **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 4, 970– 983, 2007

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**. [S.l.], v. 90, n.4, p.502– 503, 1999.

PREFEITURA MUNICIPAL DE CIANORTE. **Bosque da Matriz passa por revitalização**. Publicado em: 15 de dezembro de 2016. Disponível em: <www.cianorte.pr.gov.br/noticias/bosque-da-matriz-passa-por-revitalizacao/#sthash.gh9J99oR.dpbs> Acesso em: 20 de jan de 2018.

PREFEITURA MUNICIPAL DE IBIPORÃ. **Dados Geográficos**. Publicado em: 04 de janeiro de 2011. Disponível em: <www.ibipora.pr.gov.br/conteudo/mostrar/id/1136/titulo/dados+geograficos> Acesso em: 20 de janeiro de 2018.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina: E. Rodrigues, 2001. 328p.

RAMOS, R. F.; MONTEIRO, M.; ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; MARTINEZ, C. A.; MESTRINER, M. A.; MARIN, A. L. A. Microsatellite markers for *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae), na endangered tropical tree species. **American Journal of Botany**, 2011. p 300– 302.

RAMOS, R. **Sistema de cruzamento, fluxo de pólen e isolamento genético de *Aspidosperma polyneuron* Müll. Arg. em um fragmento localizado no interior de São Paulo.** Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2012.

RIDLEY, M. **Evolução.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 752p. 2006.

RODRIGUES, A. B. **Sistema reprodutivo de *Lecythis pisonis* Cambess (Lecythidaceae) em agroflorestas –cacaubruca– no sul da Bahia.** 2015. Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular. Ilhéus, Bahia.

RODRIGUES, L. A. **Estrutura Genética em populações de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler ex Miq.) Engl. (Sapotaceae) por marcadores microssatélites.** Tese apresentada ao Programa de Pós– graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, 73f. Londrina, 2014.

RUGGIERO, M. V.; REUSCH, T. B. H.; PROCACCINI, G. Local genetic structure in a clonal dioecious angiosperm. **Molecular Ecology**, **14**, 957–967, 2005.

SARTORETTO, L. M.; FARIAS, P. C. M. Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. **Unoesc & Ciências – ACET**, Joaçaba, v. 1, n. 2, p. 155– 162, jul./dez. 2010

SAUERESSIG, D. **Plantas do Brasil: Árvores Nativas.** v.3, 1. ed. Irati/PR: Plantas do Brasil, 2015. 432p.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**. v.18, 200. p 233– 234.

SEBBEN, A. M. **Distribuição da variação genética de populações de jequitibá–rosa [*Cariniana legalis* (Mart.) O. ktze.] por caracteres quantitativos e isoenzimas.** 2001. Tese de doutorado. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2001.

SERROTE, C. M. L.; REINIGER, L. R. S.; STEFENON, V. M. **Simulações em Genética de População e Conservação de Recursos Florestais.** Jundiaí: Paco Editorial, 2016. 116p.

SHARMA, I.K.; CLEMENTS, M.A.; JONES, D.L. Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 29:681– 695, 2001.

SILVA, A; SOUTO, E. B.; CIELO– FILHO, R.; SILVA, S. D. S. R. Ecofisiologia da germinação de sementes de *Aspidosperma cylindrocarpon* Müll. Arg. (Peroba–Poca). **Revista Instituto Florestal**, v. 23, n.1, p.109– 116, 2011.

SILVA, S. M. M.; MARTINS, K., MESQUITA, A. G. G.; WADT, L. H. O. Parâmetros genéticos para a conservação de *Hymenaea courbaril* L. na amazônia sul–ocidental. **Ciência Florestal**, 24(1), 2014.

- SILVA, S. M. M.; MARTINS, K.; MESQUITA, A. G. G. M.; WAD, L. H. O. Parâmetros genéticos para a conservação de *Hymenaea courbaril* L. na Amazônia Sul-Ocidental. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.24, n.1, p.87– 95, 2014.
- SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBENN, A. M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). **Scientia Forestalis**, n. 65, p.70– 79, 2004.
- STOECKEL, S.; GRANGE, J.; FERNÁNDEZ-MANJARRES, J. F.; BILGER, I.; FRASCARIA-LACOSTE, N.; MARIETTE, S. Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species—*Prunus avium* L. **Molecular Ecology**, 15(8), 2109– 2118, 2006.
- TABARELLI, M., SILVA, J. M. C.; GASCON, C. Forest fragmentation, synergisms and the impoverishment of neotropical forests. **Biodiversity and Conservation** 13:1419– 1425. 2004
- TARAZI, R. **Diversidade genética, estrutura genética espacial, sistema de reprodução e fluxo gênico em uma população de *Copaifera langsdorffii* Desf. no cerrado**. 2009. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Piracicaba.
- TOREZAN, J. M. D.; SOUZA, R. F. D.; RUAS, P. M.; RUAS, C. D. 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**, 48(2), 171– 180, 2005.
- VAN PELT– VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J. P. **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification**. Springer. 330p, 1st ed. 2008.
- VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine– scale spatial genetic structure analysis in plant populations. **Molecular Ecology**, 13:921–935, 2004.
- VINSON, C. C.; KANASHIRO, M.; HARRIS, S. A.; BOSHIER, D. H. Impacts of selective logging on inbreeding and gene flow in two Amazonian timber species with contrasting ecological and reproductive characteristics. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 1, p. 38– 53, 2015.
- WANDERLEY, M.G.L., SHEPHERD, G.J., MELHEM, T.S., MARTINS, S.E., KIRIZAWA, M., GIULIETTI, A.M. Apocynaceae In: **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 4, pp: 35– 92, 2005.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F– statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, [S.l.], v.19, n.3, p.395– 420, 1965.
- YEH, F. C.; YANG, R. C; BOYLE, T. **Popgene: version 1.31. Microsoft Window– based Freeware for population genetics analysis**. 1999. Disponível em: <<https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf>> Acesso em: 02 fev 2018.
- YOUNG, A. G.; CLARKE, G. M. Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations. **Cambridge University Press**, Cambridge, UK. 2000.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology and Evolution**, 11(10), 413–418, 1996.

ZIMBACK, L.; MORI, E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; HIDEYO, A. O. K. I. Estrutura genética de peroba (*Aspidosperma polyneuron*) no Estado de São Paulo, Brasil. Genetic structure of *Aspidosperma polyneuron* in the State of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto Florestal**, 23(2), 265–277, 2011.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética da *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. 130f. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ). Piracicaba, 2002.

ZUCCHI, M. I.; CAVALLARI, M. M.; SIQUEIRA, M. V. B. M.; A Importância do Conhecimento sobre Diversidade e Estrutura Genética de Populações e sua Utilidade para Conservação e Manejo de Espécies Vegetais. **Pesquisa e Tecnologia**, Guanabara (SP), v. 8, n. 2, 6p., 2011.