



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA OLIVEIRA DAMASCENO

**ESTRUTURA POPULACIONAL DE *ASPIDOSPERMA*
POLYNEURON MUEL. ARG. (APOCYNACEAE) EM
FRAGMENTO FLORESTAL DO BAIXO RIO TIBAGI POR
MARCADORES AFLP**

Londrina
2010

JULIANA OLIVEIRA DAMASCENO

**ESTRUTURA POPULACIONAL DE *ASPIDOSPERMA*
POLYNEURON MUEL. ARG. (APOCYNACEAE) EM
FRAGMENTO FLORESTAL DO BAIXO RIO TIBAGI POR
MARCADORES AFLP**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas

Londrina
2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D155e Damasceno, Juliana Oliveira
Estrutura populacional de *aspidosperma polyneuron* muel. Arg.
(apocynaceae) em fragmento florestal do baixo rio tibagi por marcadores
aflp / Juliana Oliveira Damasceno. – Londrina, 2010.
59 f. : il.

Orientador: Paulo Maurício Ruas.
Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de
Londrina, Inclui bibliografia.

1. Genética da conservação – Teses. 2. Peroba – Teses. 3. Marcador
molecular – Teses. 4. Variabilidade genética – Teses. I. Savioli, Ângela
Marta Pereira das Dores. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Ensino de Ciências e
Educação Matemática. III. Título.

CDU 633.913.1

JULIANA OLIVEIRA DAMASCENO

**ESTRUTURA POPULACIONAL DE *ASPIDOSPERMA POLYNEURON*
MUEL. ARG. (APOCYNACEAE) EM FRAGMENTO FLORESTAL DO
BAIXO RIO TIBAGI POR MARCADORES AFLP**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas

Prof. Dr. Edmilson Bianchini

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas

Prof. Dr. José Antonio Pimenta

Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria

Londrina, 22 de fevereiro de 2010.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Antonio Carlos com amor e gratidão, por me ensinar os caminhos da vitória, e ao meu namorado André, pela grande paciência nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas que, de diferentes formas, contribuíram para a realização deste trabalho. Seguem assim, meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus, pois sem a ajuda e a força que Ele me deu, não teria conseguido.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo, por tudo que me ensinou e pela enorme paciência e dedicação com que me orientou durante o mestrado.

Aos membros da banca: Prof. Dr. Edmilson Bianchini, Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas, Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria, Dr. José Antônio Pimenta, pelas valiosas críticas e sugestões ao trabalho.

À Capes, pela bolsa de mestrado.

Ao proprietário da Fazenda Doralice, Sr. Pedro Favoretto e funcionários.

À toda a minha família, por suportar pacientemente este período, em especial ao meu pai e a Vanessa que sempre estavam dispostos a me ouvir e dar força, a minha vó por tantos carinhos e orações.

Ao meu querido André pela compreensão em momentos de angústias, pelo carinho, cuidado, palavras de ânimo e ternura sempre manifestadas.

A todos os colegas de laboratório que me ajudaram, Maikel, Raquel, Carina, Laís, André, Bruno, Leonardo, Lucas, Eduardo e em especial a Grande amiga Luana que sempre teve paciência em todas as situações, agradeço pela grande ajuda e ótima companhia.

Às minhas eternas amigas Marcela e Silmara.

Aos meus amigos do programa de Agronomia que sempre estiveram dispostos a me ajudar, desde boas críticas ao trabalho até momentos de distrações, e em especial a minha amiga Sara, que me ensinou inúmeras lições de vida nessa nossa caminhada.

À todos os professores que colaboraram com o meu aprendizado, tanto do programa de Agronomia quanto os do programa de Genética, às secretárias Weda e Sueli e a coordenadora do Programa de Agronomia Prof. Dr.^a Carmem.

A todos quantos, direta ou indiretamente, ajudaram-me a chegar até aqui.

Sou grata.

DAMASCENO, Juliana Oliveira. **Estrutura populacional de *Aspidosperma polyneuron* Muel. Arg. (Apocynaceae) em fragmento florestal do baixo rio Tibagi por marcadores AFLP**. 2010. 59 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

O intenso processo de fragmentação das florestas tropicais é um dos problemas ambientais mais marcantes do século XXI, sendo responsável não apenas pela degradação ambiental, como também, por alterações climáticas e perda da biodiversidade. Este processo tem sido foco de muitos estudos que visam, primariamente, identificar o efeito da devastação sobre o pool gênico de espécies e populações de áreas degradadas. A bacia do rio Tibagi, localizada na porção centro-leste do Paraná e com uma área aproximada de 24.711km², detém cerca de 13% da superfície do Estado do Paraná. Por compreender tipos climáticos distintos, a vegetação da bacia do rio Tibagi é altamente heterogênea. Entretanto, devido ao processo de colonização dos últimos 50 anos, a flora da região tem sido fortemente impactada e a cobertura florestal nativa remanescente corresponde, atualmente, a apenas 3,8% da vegetação original. Nestes fragmentos várias populações de espécies arbóreas se encontram mais ou menos isoladas. As técnicas de obtenção de marcadores moleculares têm sido amplamente utilizadas para os estudos de áreas impactadas pela ação humana. Este trabalho teve por objetivo o estudo de duas amostras da espécie arbórea *Aspidosperma polyneuron*, originária da porção de declive (DJ) e plana (PJ) em um fragmento da Fazenda Doralice, localizada no município de Ibiporã, no Estado do Paraná, Brasil, por marcadores AFLP. Sete pares de primers seletivos foram utilizados gerando 200 marcadores, dos quais, 99% e 88,5% foram polimórficos para as amostras das regiões DJ e PJ, respectivamente. O coeficiente de variação foi inferior a 1%, mostrando um ótimo nível de confiabilidade em nossos resultados. Valores para diversidade gênica (H_S) para a amostra DJ foi de 0,3719 e de 0,3072 para a amostra PJ, observando-se uma diversidade maior na região de declive. Os valores de F_{ST} foram 0,26485 com uma distância genética de 0,1479 entre populações. A análise de agrupamento PCoA mostrou a formação de três distintos grupos, sendo o primeiro constituído de indivíduos da amostra DJ, o segundo constituídos de indivíduos da amostra PJ e DJ, e o último com indivíduos pertencente a PJ. Esses resultados foram confirmados pela análise Bayesiana que demonstrou a existência de três agrupamentos ($K=3$) com probabilidade de 95,3%. Os níveis de conservação genética foram considerados satisfatórios e representam informações valiosas para estas amostras de *A. polyneuron*. Este conhecimento é importante não só para estudos mais amplos de populações de *A. polyneuron* em áreas degradadas, mas também, para avaliar os níveis de degradação genética em outras áreas, como também, utilizar estas amostras como fonte de variabilidade genética para recuperação de áreas degradadas.

Palavras-Chave: Genética da conservação. Peroba. Marcador molecular. Variabilidade genética.

DAMASCENO, Juliana Oliveira. **Population structure of a forest fragment of *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg. (Apocynaceae) situated in the Lower Tibagi basin estimated by AFLP markers.** 2010. 59 f. Dissertation (Master's Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

The XXI century is characterized by intense fragmentation of tropical forests around the world which is responsible for environmental degradation, climate changes and loss of biodiversity. Such process is the focus of many studies that intend, primarily, to identify the effect of devastation in the gene pool of species that occupy degraded areas. The Tibagi River basin, situated in the east-center portion of the Paraná State with an approximate area of 24.711Km², comprising around 13% of the area of the State. Extending through different climate zones, the vegetation of the Tibagi River basin is highly heterogeneous. However, due to the colonization process that occurred in the last 50 years, the flora of the region has been highly impacted and the native forest cover corresponds, nowadays, to only 3.8% of its original area. Within these fragments many populations of tree species are more or less isolated. Molecular markers techniques have been widely used in studies of anthropogenic impacted areas. In the present study AFLP molecular markers were used to investigate the genetic structure of two native samples of *A. polyneuron* Muell. Arg. from an accentuated slope area (AS) and a flat area (FA) situated in the Doralice Farm, Ibiporã County, Paraná State, Brazil. The distance between the slope and the flat areas was of 200 meters. Seven pairs of selective primers generated 200 AFLP markers of which 99% and 88.5% were polymorphic for the AS and FA areas, respectively. The coefficient of variation for the number of amplified markers was below 1%, revealing a good level of trustworthiness in our results. The genetic diversity (Hs) was 0.3719 for the AS sample and 0.3072 for the FA area, showing a higher genetic diversity for the sample of slope area. The value of Fst was 0.26485 with a genetic distance of 0.1479 between the samples. PCoA clustering analysis revealing the formation of three distinct clusters. The first cluster was formed by individuals from AS samples, the second group contains both individuals from AS and FA samples, and the third cluster contains only individuals from FA area. Bayesian analysis for K number of clusters further supported the results from PCoA, indicating that in 95.3% of the times individuals were assigned to the three clusters. These results can be used as a parameter to evaluate the genetic impact of disturbed habitat for this and other tree species in semideciduous forest fragments and to provide a source of genetic variation for recovering degraded areas.

Key words: Conservation genetics. Peroba. Molecular markers. Genetic variability.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 FRAGMENTAÇÃO	12
2.2 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE	16
2.3 MARCADORES MOLECULARES.....	19
2.3.1 AFLP	21
2.4 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA.....	25
3 ARTIGO A: ESTRUTURA POPULACIONAL DE <i>ASPIDOSPERMA POLYNEURON</i> MULL. ARG. (APOCYNACEAE) EM FRAGMENTO FLORESTAL DO BAIXO RIO TIBAGI POR MARCADORES AFLP	28
3.1 RESUMO	28
3.2 ABSTRACT	29
3.3 INTRODUÇÃO	29
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.6 CONCLUSÕES	39
3.7 AGRADECIMENTOS	40
3.8 REFERÊNCIAS.....	40
4 CONCLUSÕES GERAIS	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado como o país detentor da maior diversidade genética vegetal do planeta, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, de um total estimado entre 350.000 a 550.000 espécies de plantas (DIAS, 1996). Esta biodiversidade está seriamente ameaçada, pois o ritmo de extinção de plantas encontra-se em um nível 50 a 100 vezes maior que as médias observadas no século passado (TILMAN et al., 1997).

Toda essa diversidade, no Brasil, se encontra em vários biomas, dentre eles podemos destacar no Estado do Paraná a Mata Atlântica. Este bioma abrange uma grande diversidade de formações vegetais como a Floresta Ombrófila Densa, a Floresta Ombrófila Mista, a Floresta Estacional Semidecidual, além de mangues, restingas e formações campestres (CÂMARA, 2003; TABARELLI et al., 2005). A Mata Atlântica é considerada um dos biomas tropicais mais ricos em biodiversidade, com alto número de endemismo (PEIXOTO, 1992; BARBEDO et al., 2002).

O Estado do Paraná apresenta uma área de 200.000km² e possuía inicialmente 85% de sua área coberta por formações florestais (MAACK, 1968). Devido ao intenso processo de devastação, a área de cobertura vegetal encontra-se em, aproximadamente, de 2% a 4% da original. Desta pequena porcentagem, apenas 0,1% se encontram dentro das 26 unidades de conservação do Estado (SEMA, 1995).

A bacia do rio Tibagi detém cerca de 13% da superfície do Estado do Paraná, sendo uma das maiores bacias hidrográficas do estado, localizada na porção centro-leste com uma área de 25.000km², possui diferentes zonas climáticas ao longo de sua área, sendo dividida em baixo, médio e alto Tibagi (MEDRI et al., 2002). No baixo Tibagi a floresta é estacional semidecidual, no médio Tibagi observa-se uma floresta de transição e no alto Tibagi a vegetação é campestre com ilhas de floresta ombrófila densa e floresta ombrófila mista (TOREZAN, 2002). Entretanto, devido ao processo de colonização intensificado nos últimos 50 anos, a flora da região tem sido fortemente afetada. A cobertura florestal nativa foi reduzida a 3,8% da área original, restando poucos remanescentes preservados nos quais,

várias populações de espécies arbóreas se encontram mais ou menos isoladas (SOARES; MEDRI, 2002).

Segundo Bittencourt (2007), o atual estágio de degradação florestal no Estado do Paraná resulta de um processo histórico de ocupação da terra, já que durante anos houve incentivo para expansão da fronteira agrícola. Aliado a este fator, ocorre à falta de conhecimento em relação ao tamanho que uma comunidade deve apresentar, para se manter viável em uma população presente em um fragmento. A presença de fragmentos florestais nativos pode significar a melhoria na diversidade paisagística da área, como também, pode aumentar a conexão funcional, como por exemplo, manutenção do fluxo gênico entre remanescentes.

A elaboração de uma boa estratégia de manejo e conservação envolve diversos parâmetros e varia muito de acordo com o tipo de ambiente a ser recuperado. Dentre estes parâmetros destacamos a melhor compreensão da diversidade genética nas populações naturais, bem como dos efeitos provocados pela fragmentação na estrutura das populações (KOBAYAMA et al., 2003).

Eventos evolucionários envolvidos na determinação da estrutura genética de populações resultam do balanço entre deriva genética, mutação, seleção natural, fluxo gênico e endogamia (WRIGHT, 1943; HAMRICK et al., 1991, 1992). Em plantas, as alterações nas freqüências alélicas que determinam as suas características estão correlacionadas com o ciclo de vida (SALES et al., 2001), sistema reprodutivo, síndrome da dispersão de pólen e sementes (DAWSON et al., 1995), distribuição geográfica (HAMRICK, 1983) e com a habilidade de colonizar novos ambientes (SUN; WONG 2001). Neste contexto, a fragmentação dos ecossistemas, que surge em decorrência de processos que envolvem a expansão das fronteiras agrícolas e o desenvolvimento humano, traz uma série de prejuízos (VIANA, 1990), tais como o isolamento de populações e alterações nos padrões de fluxo gênico (YOUNG et al., 1996; NASON et al., 1998). Este processo é hoje tido como o grande pivô da crise global da biodiversidade (OLIVEIRA, 2000).

O surgimento das técnicas de biologia molecular envolvendo a PCR (reação da polimerase em cadeia) permitiram um acesso direto à variabilidade genética contida no genoma de diferentes tipos de organismos, possibilitando o estudo direto da diversidade genética tanto dentro quanto entre populações de espécies vegetais (FERREIRA et al., 1996).

Dentre essas técnicas, o polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) primeiramente descrita por Vos et al. (1995), explora a simplicidade e geração de grande número de marcadores que abragem todo o genoma sem qualquer sequenciamento prévio do mesmo. Deste modo a técnica de AFLP permite com relativa facilidade a obtenção de marcadores, os quais são importantes na conservação e manejo de espécies em perigo de extinção. Uma das principais vantagens desta técnica é que a sua repetibilidade é relativamente elevada. Porém, os marcadores gerados por AFLP são dominantes e não é possível uma distinção entre homozigotos e heterozigotos (GAUDEUL et al., 2000).

Pelo fato desta técnica ter sido utilizada com sucesso no estudo de várias espécies arbóreas, tais como *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (SOUZA, 2006), *Spondias tuberosa* Arruda (SANTOS et al., 2008), *Myracrodruon urundeuva* Fr. All (FREITAS et al., 2005), resolveu-se aplicar a mesma em *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.. Esta espécie arbórea é conhecida popularmente como peroba ou peroba-rosa e pertence à família *Apocynaceae*, com altura aproximada de 20 a 30m, tronco de 60 a 90cm de diâmetro e folhas glabras. Sua área de distribuição no Brasil abrange desde a Bahia até o Paraná e Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Rondônia, presente principalmente em florestas estacionais semidecíduais. Apresenta importância econômica pela sua madeira pesada, compacta e utilizada na construção civil (CARVALHO, 1994; LORENZI, 2002). Ocorre em solos profundos e férteis, situados nos espigões e nas encostas. Floresce durante os meses de outubro a novembro, sendo a maturação dos frutos nos meses de agosto a setembro (LORENZI, 2002).

A mata da Fazenda Doralice, situada no município de Ibiporã, ao norte do Estado do Paraná é um fragmento de floresta estacional semidecidual nativo, que sofreu ação antropogênica pelo corte seletivo de árvores adultas da espécie estudada. Portanto o objetivo do trabalho é verificar o nível da diversidade genética entre duas subpopulações de *Aspidosperma polyneuron* que ocorrem em áreas diferentes do fragmento, analisado por marcadores AFLP.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FRAGMENTAÇÃO

A conservação da biodiversidade representa um grande desafio em função do elevado nível de perturbações antrópicas dos ecossistemas naturais. Uma das principais consequências dessas perturbações é a fragmentação destes ecossistemas (VIANA et al., 1992; VIANA, 1995; DEAN, 1996; VIANA; PINHEIRO, 1998; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2002; MURCIA, 2002; AGUILAR; GALETTO, 2004). A fragmentação pode ser entendida como o grau de ruptura de uma unidade de paisagem, inicialmente contínua (COLLINGE, 1996; BOTEQUILHA; AHERN, 2002; SERRANO et al., 2002; METZGER, 2003).

O interesse no estudo das consequências da fragmentação florestal sobre a conservação da biodiversidade tem aumentado significativamente (HARRIS, 1984; FORMAN; GODRON, 1986; LOVEJOY et al., 1986; VIANA, 1990; SHAFER; PEARL, 1990; GRADWOHL; GREENBERG, 1991; VIANA et al., 1992; SCHELLAS; GREENBERG, 1997; LAURANCE; BIERREGARD, 1997). A justificativa para este crescente interesse é a constatação de que a maior parte da biodiversidade se encontra hoje localizada em pequenos fragmentos florestais, pouco estudados e historicamente marginalizados pelas iniciativas conservacionistas (GRADWOHL; GREENBERG, 1991).

Os fatores que afetam a dinâmica de fragmentos florestais, e que contribuem com a perda desta biodiversidade são: tamanho, forma, grau de isolamento, tipo de vizinhança e histórico de perturbações (VIANA et al., 1992). A relação entre a área dos fragmentos e seus atributos ecológicos, especialmente a diversidade de espécies, é um elemento central da teoria de biogeografia de ilhas (MACARTHUR; WILSON, 1967). Gimenes e Anjos (2003) apontam resumidamente que esta teoria analisou os fatores determinantes da riqueza de espécies em ilhas e enfatizou que muitos dos princípios observados em arquipélagos aplicam-se a ilhas no continente. Ilhas seriam pequenos fragmentos florestais, já que a similaridade entre estes remanescentes circundados por um ambiente modificado por ação antrópica é considerável. Esta similaridade estimulou pesquisas posteriores

aplicando alguns dos princípios da biogeografia de ilhas para explicar a riqueza de espécies em fragmentos florestais. A distribuição das classes de tamanho dos fragmentos na paisagem é um elemento importante para o desenvolvimento de estratégias para a conservação da biodiversidade (VIANA et al., 1992).

Uma das principais consequências da fragmentação é a dramática alteração das condições abióticas, principalmente em ecossistemas florestais (GEHLHAUSEN et al., 2000). Os fragmentos também têm uma turbulência maior causada pelos ventos, o qual, combinado com elevadas temperaturas, acelera as taxas de perda de água por evaporação (DIDHAM; LAWTON, 1999) e reduz a umidade relativa (BRUNA et al., 2002). Também atua na redução da abundância local de espécies e um aumento do isolamento entre populações, junto com as mudanças ambientais, afetando deste modo, muitos processos ecológicos das populações e comunidades (RATHCKE; JULES 1993).

A fragmentação florestal pode alterar as relações entre plantas e animais, se a alteração causada pelas consequências da fragmentação prejudicar um agente mutualista de uma interação, isso pode levar a um risco de extinção de espécies no fragmento florestal (AGUILAR; GALETTO, 2004). Rodríguez-Cabal et al. (2007) estudaram a interrupção do mutualismo planta-dispersor causada pela fragmentação e observaram influências negativas na população vegetal estudada. O rompimento de um mutualismo de dispersão pode ter profundas consequências para o recrutamento de plântulas, para a demografia vegetal e para a persistência da população, com um potencial efeito cascata para o resto da comunidade. Os animais polinizadores podem ser influenciados pelas alterações no habitat, diretamente pelas mudanças na estrutura reprodutiva da população ou distribuição das plantas, como por exemplo, grandes distâncias entre os fragmentos, ou indiretamente pela variação populacional de polinizadores, ou pelas mudanças nos padrões de comportamento ou vôo (AGUILAR; GALETTO, 2004).

As evidências científicas sobre esses processos têm se avolumado. (SCHELLAS; GREENBERG, 1997; LAURANCE; BIERREGARD, 1997). Atualmente é observado que quanto menor o fragmento, maior a influência dos fatores externos sobre ele (TRINDADE et al., 2004). Em fragmentos pequenos, a intensidade dos efeitos de borda é destacadamente mais evidente, como, por exemplo, aumento da taxa de mortalidade de árvores e alterações microclimáticas severas. Por possuírem menor área, os fragmentos pequenos também abrigam populações pequenas e

muitas vezes inviáveis para a manutenção da espécie (IFC, 2009; RANTA et al., 1998).

A importância da preservação dos remanescentes de floresta que resistiram ao processo de fragmentação tem sido reconhecida na literatura. Mesmo quando pequenas, essas áreas podem, além de manter um número significativo de espécies vegetais e animais características da região, servir como fonte de propágulos para a recomposição de áreas adjacentes, beneficiarem o movimento de animais migratórios e proteger recursos hídricos (KATTAN; ALVAREZ-LÓPES, 1996; TURNER; CORLETT, 1996). Alguns trabalhos têm demonstrado, no entanto, que esses fragmentos florestais podem sofrer um processo crescente de degradação ao longo do tempo, apontando, assim, para a necessidade de alguma forma de manejo, como corte de lianas ou plantio de mudas (TABANEZ et al., 1997ab; VIANA et al., 1997; TABARELLI et al., 1999).

O isolamento dos fragmentos pode atuar como fator limitante para outros organismos, como a chegada de dispersores e polinizadores, distribuição desses dispersores e a estrutura espacial dos indivíduos e que pode influenciar na viabilidade de suas populações (NASON; HAMRICK 1997; CASCANTE et al., 2002; FUCHS et al., 2003; CORDEIRO; HOWE, 2001, 2003). Além disso, o isolamento pode aumentar a taxa de predação de sementes e plântulas (CHACOFF et al., 2004; CURRAN; LEIGHTON, 2000), aumentando o risco de extinção local de espécies representadas por poucos indivíduos (NOSS; CSUTI, 1997, WRIGHT; HUBBELL, 1983).

Nos últimos 100 anos, com a expansão das fronteiras agrícolas (QUEIROGA; RODRIGUES, 2001; FEARNside, 2005), com o grande desenvolvimento industrial e o crescimento da população e dos núcleos urbanos geraram fortes impactos sobre essas florestas, especialmente sobre aquelas localizadas nas regiões sudeste (LEITÃO-FILHO, 1995).

Um elemento chave na manutenção dessas florestas é a preservação das espécies arbóreas, as quais determinam, em grande parte, a arquitetura e as condições climáticas da mata e podem influenciar a persistência de inúmeras outras espécies animais e vegetais (PRIMACK et al., 1985; ALVAREZ-BUYLLA et al., 1996; LAURENCE et al., 1998). Embora trabalhos sobre a dinâmica de comunidades arbóreas em florestas tropicais sejam relativamente abundantes (HARTSHORN, 1980; LANG; KNIGHT, 1983; LIEBERMAN et al., 1985ab;

LIEBERMAN; LIEBERMAN 1987; FOSTER, 1990; GENTRY; TERBORGH, 1990; HARTSHORN, 1990; HUBBELL; FOSTER, 1990; LIEBERMAN et al., 1990; RANKIN-DE-MERONA et al., 1990; OLIVEIRA, 1997; GOMES, 1998), atualmente observa-se muitos trabalhos em áreas fragmentadas, importantes para o estudo da conservação (SOUZA, 2006; SANTOS, 2008; FREITAS et al., 2005; DEBINSKI; HOLT , 2000).

Segundo Viana e Pinheiro (1998), um dos problemas sérios para a restauração da biodiversidade é o emprego de um pequeno número de espécies nos projetos de recuperação ambiental. A restauração da biodiversidade é especialmente importante em áreas destinadas prioritariamente à proteção ambiental onde se deseja restaurar a forma do ecossistema ou ao manejo integrado de pragas em áreas de reflorestamento, agricultura ou pecuária. Estudos de monitoramento por satélite indicam que em várias áreas agrícolas próximas a centros urbanos, os fragmentos florestais nativos são escassos, dificultando as possibilidades de implantação de projetos de união de fragmentos para a formação de corredores ecológicos, pois as mudanças já são consideradas irreversíveis (HORIKOSHI et al., 2006).

Em populações fragmentadas e/ou alteradas, a deriva genética pode eventualmente reduzir a variação genética, especialmente porque o tamanho efetivo da população é usualmente muito menor do que o número de indivíduos reprodutivos da população (FRANKHAM, 1995), podendo causar contínua perda de alelos devido à deriva, caso a população remanescente permaneça isolada por várias gerações (SOUZA, 1997). As predições teóricas indicam que quando se tem poucas gerações, os resultados observados se devem ao efeito de gargalo de garrafa (YOUNG et al., 1996) e que quanto menor for o remanescente populacional, maior será a perda da variabilidade genética. Níveis aumentados de endocruzamento nas populações com variabilidade genética diminuída, podem resultar em um valor adaptativo reduzido devido à depressão por endogamia, afetando o esforço reprodutivo total e diminuição da produção de sementes e eventualmente aumento do risco de extinção das populações (AGUILAR; GALETTO, 2004). Populações com baixa variabilidade genética também possuem um potencial reduzido para se adaptar a mudanças ambientais (ELLSTRAND; ELAM, 1993). Em populações pequenas e isoladas, o acúmulo de mutações deletérias pode reduzir o valor adaptativo, além disto, a reprodução de plantas em pequenas populações pode

levar a redução da variabilidade genética pela existência de incompatibilidade de alelos. Tem sido encontrada em várias espécies, uma correlação positiva entre tamanho e/ou densidade populacional e valor adaptativo de população (FISCHER, 1998).

A manutenção da diversidade genética de populações florestais é a chave para a adaptabilidade da população frente a mudanças ambientais naturais ou induzidas pelo homem, garantindo desta maneira, uma evolução continuada (GREGORIUS, 1985; MULLER-STARCK, 1985; LEDIG, 1988; NAMKOONG, 1991; MULLER-STARCK, 1992), e também para a conservação de floresta ecologicamente sustentável. A biodiversidade inclui a diversidade genética, específica, de paisagem e de ecossistemas (NOSS; COOPERRIDER, 1994). Dada à complexidade dos processos envolvidos, é difícil julgar se florestas estão sendo manejadas de maneira ecologicamente sustentável (BOTKIN; TALBOT, 1992).

Os fragmentos remanescentes de floresta são muito importantes como reserva de germoplasma das espécies de plantas nativas e, onde a sucessão natural não pode ser estabelecida, devido à distância das fontes de propágulos, o plantio sustentável de árvores nativas pode ser uma alternativa promissora (ZANGARO, 1997).

O manejo inadequado de florestas naturais pode levar as mudanças no “pool” gênico local através e vários mecanismos, incluindo seleção dirigida, redução da diversidade genética, endocruzamento e deriva genética (BARNES, 1989; LEDIG, 1992).

2.2 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

Aspidosperma polyneuron Muell. Arg. (Apocynaceae) é uma espécie arbórea, com indivíduos adultos atingindo 20 a 30 metros de altura (CARVALHO, 1994). Segundo Lorenzi (2002), a espécie é esciófita, perenifólia, característica da floresta estacional semidecidual da bacia do rio Paraná. A espécie também é conhecida vulgarmente como peroba ou peroba-rosa, apresenta casca externa acinzentada a castanha-grisácea, profundamente fissurada, formando aletas agudas

e sua casca interna rosa escura, característica de onde vem o nome comum (CARVALHO, 1994).

No Brasil ocorre da Bahia até o Paraná, sendo classificada como secundária tardia (BERNACCI; LEITÃO-FILHO, 1996), ou seja, uma espécie que se desenvolve no sub-bosque em condições de sombra podendo crescer até o dossel ou a condição emergente. Segundo Carvalho (1994), seu aspecto ecológico apresenta regeneração natural em vários estratos na floresta, não ocorrendo em pastos ou em terrenos abertos, chegando a formar agrupamentos densos conhecidos como “perobais”. E devido ao seu porte emergente, em florestas estacionais semidecíduais, esta espécie contribui com a floresta, permitindo que os outros estratos se desenvolvam, além de fornecer alimento para a manutenção de polinizadores (MALTEZ, 1997).

Plantas desta espécie estão presentes no Estado do Paraná a uma altitude de 80 a 1.000m em regiões com um regime pluviométrico uniforme. A peroba-rosa ocorre em solos bem drenados e de textura franca-arenosa a argilosa, atinge grande porte em latossolos de fertilidade alta e em terra roxa estruturada (nitossolo), provenientes da decomposição do basalto e do diabásio. Nos solos mais fracos, de origem arenítica e nos espigões mais secos, ela atinge menor porte (CARVALHO, 1994).

Morellato (1991), baseado na síndrome floral de *A. polyneuron*, sugere que sua polinização provavelmente seja realizada por mariposas e pequenos insetos. Tal síndrome é caracterizada pelo pequeno tamanho das suas flores, com coloração esbranquiçada e cheiro atraente. Apesar de existirem diversas espécies de mariposas, podendo alcançar diferentes distâncias de vôo, esse pode ser um indicativo de que há possibilidade de que o fluxo de pólen também seja efetivo a longa distância na espécie em estudo (MALTEZ, 1997).

O florescimento de *A. polyneuron* em geral ocorre de setembro a dezembro, e a maturação dos frutos ocorre de junho a novembro. O florescimento não é anual, produzindo grande quantidade de sementes apenas a intervalos de 2 a 4 anos, sendo suas sementes aladas, o que facilita a dispersão anemocórica, não possuem dormência e perdem a viabilidade em seis meses quando armazenadas em laboratório. A espécie é longeva, podendo ultrapassar 1.200 anos de idade (CARVALHO, 1994). A peroba leva mais de 50 anos para atingir seu estágio

reprodutivo e sua taxa de crescimento é de 10 a 15 anos para aumentar seu diâmetro de altura do peito em 5cm (TOREZAN et al., 2005).

Sua madeira é moderadamente pesada (0.79g/cm^3) e dura, sendo muito utilizada na indústria de móveis e na construção civil. Grande parte da madeira de peroba-rosa utilizada no Brasil é importada do Paraguai, onde é abundante, mas pouco utilizada (CARVALHO, 1994). A espécie também apresenta alcalóides na casca e no lenho, como cumarina, óleos essenciais e saponinas. Schumutz (1960) e Marcondes-Ferreira (1998) relatam que seus alcalóides podem ser usados na recuperação de lesões produzidas pela hanseníase. A espécie apresenta uma casca amarga que é adstringente e também é usada em chás na medicina popular, para combater a febre. É também utilizada na ornamentação principalmente em parques e no reflorestamento ambiental, pois a espécie é recomendada para a recuperação de ecossistemas e reposição de matas ciliares em locais sem inundação (CARVALHO, 1994).



Figura 1 – Características morfológicas de *Aspidosperma polyneuron* (A). Em detalhe ramos com flores (B), sementes (C), casca (D) e aspecto da madeira (E) (Lorenzi, 1998).

A. polyneuron é frequentemente encontrada em levantamentos florísticos e fitossociológicos realizados em matas estacional semidecidual apresentando geralmente um alto valor de IVI (Índice de Valor de Importância), devido tanto ao grande número de árvores amostradas quanto ao elevado DAP (Diâmetro na Altura do Peito) dos indivíduos (MALTEZ, 1997).

2.3 MARCADORES MOLECULARES

O estudo da variabilidade genética é de grande interesse para os geneticistas, que desenvolveram uma série de métodos para detectá-la e analisá-la (SOUZA, 2006), facilitando o desenvolvimento de estratégias para conservação de recursos genéticos (RAJORA; MOSSELER, 2001) e condução de programas de melhoramento (SOUZA, 2006).

Os marcadores, até a década de 60, utilizados em estudos de genética e melhoramento eram associados a genes que controlavam caracteres morfológicos, normalmente fenótipos facilmente identificados visualmente tais como: nanismo, deficiência de clorofila, cor da pétala e morfologia foliar. Devido a isso, a disponibilidade desses marcadores era restrita a algumas espécies de plantas, em geral as que eram utilizadas como sistema modelo para o estudo genético, como milho, tomate e ervilha (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Em 1959, Market e Moller descobriram os marcadores isoenzimáticos, que pode ser definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995, 1998). As isoenzimas consistem em múltiplas formas de uma mesma enzima, com função catalítica idêntica ou similar que diferem entre si na sequência de aminoácidos. O princípio básico da técnica consiste na utilização de eletroforese em gel e na visualização da atividade enzimática por métodos histoquímicos. Esta técnica permite analisar vários sistemas isoenzimáticos e grande número de indivíduos, permitindo a visualização de marcadores codominantes. Tem como propriedade mais expressiva a base genética simples envolvida na expressão destas enzimas (SOLTIS; SOLTIS, 1989). Entretanto, apresenta como limitações uma cobertura reduzida dos genomas investigados, devido ao pequeno número de locos que podem ser detectados e o

baixo nível de polimorfismo identificado por loco (ALFENAS, 1998; BORÉM; CAIXETA, 2006).

Os marcadores moleculares de DNA são amplamente utilizados para acessar polimorfismo genético, construir mapas genéticos (WILLIAMS et al., 1990), revisar a posição sistemática de vários grupos de plantas e fazer estudos comparativos, dando assim suporte para que sejam feitas inferências sobre sua origem e evolução (SOUZA, 2006).

Novos estudos possibilitaram o aumento no número de marcadores genéticos bem como sua aplicabilidade que passou a incluir todas as espécies de plantas e animais. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismos da molécula de DNA. Os marcadores moleculares baseados em DNA (RFLP, RAPD, AFLP, SSR) permitiram uma maior cobertura genômica, quando comparados com as isoenzimas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o surgimento das enzimas de restrição na década de 70, surgiu o primeiro marcador molecular que possibilitou detectar diferenças entre indivíduos através da clivagem em sítios específicos no DNA, denominado RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism” (Polimorfismo no Tamanho de Fragmentos de Restrição). Nesta técnica, o DNA genômico de um indivíduo pode ser isolado e digerido com enzimas de restrição e os fragmentos obtidos separados em gel de agarose, gerando fragmentos de tamanho e número variáveis. Os fragmentos gerados por esta técnica necessitam ser transferidos por *Southern blot* para uma membrana de nylon ou nitrocelulose, hibridizados com sonda complementar ao DNA de interesse, marcadas radioativamente e evidenciadas por meio de auto-radiografia (HELENTJARIS et al., 1986). O método evidencia polimorfismo nos sítios de restrição em diferentes indivíduos.

Uma das principais vantagens do RFLP é a sua expressão codominante, que permite distinguir indivíduos homocigotos de indivíduos heterocigotos. Outra vantagem que merece destaque é a possibilidade de utilização de sondas heterólogas, permitindo o mapeamento comparativo entre as espécies. As principais desvantagens são que esta técnica envolve a execução de várias etapas, o alto custo e o uso de radioatividade que necessita de proteção especial (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o surgimento de uma técnica mais simples e eficiente, na década de 80, a reação em cadeia da polimerase – PCR (“Polymerase Chain Reaction”) (MULLIS; FALOONA, 1987) possibilitou multiplicar *in vitro* e em escala exponencial, cópias de segmentos específicos de DNA, na presença da enzima DNA polimerase, gerando uma grande quantidade de cópias de sequência específica de interesse. O desenvolvimento desta técnica levou Kary Mullis a ganhar o prêmio Nobel de química em 1993, devido ao impacto causado pela PCR e dos métodos dela derivados (NOBELPRIZE, 2010).

Souza (2006) relata que dentre os marcadores moleculares destacam-se os codominantes (RFLP, SSR, isoenzimas), pois estes permitem a distinção do genótipo homozigoto do heterozigoto. Já os marcadores dominantes (RAPD, AFLP) apresentam mais limitações por não discriminarem o heterozigoto.

2.3.1 AFLP

Uma das tecnologias mais aplicadas recentemente para obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos nos genomas de procariotos e eucariotos é a análise de AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) (VOS et al., 1995). Esta técnica combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção dos polimorfismos via PCR (“Polymerase Chain Reaction”) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

O AFLP consiste essencialmente de quatro etapas (VOS et al., 1995). Na primeira etapa conhecida por clivagem de DNA genômico, o DNA total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição uma de corte raro (reconhece e corta seis pares de bases), combinada com uma de corte frequente (reconhece quatro pares de bases), elas são adicionadas a um *mix* contendo aproximadamente 500µg de DNA genômico. Assim, essas reações podem gerar três tipos de fragmentos originados do corte das enzimas: um fragmento pequeno, tendo origem da enzima de corte frequente, fragmentos grande, resultado da enzima de corte raro, e os fragmentos de tamanho intermediário, oriundos da ação das duas enzimas.

A segunda etapa consiste na ligação de adaptadores específicos que possuem extremidades complementares aos terminais dos fragmentos de DNA gerados pela clivagem da enzima de restrição. Esses adaptadores possuem de 20 a 30 pares de bases, com sequências diferentes para cada adaptador. Depois desse passo, um grande número de fragmentos poderá ser amplificado via PCR. Entretanto, o número de fragmentos adquiridos nesta etapa é muito grande, sendo impossível a resolução de fragmentos individuais, mesmo em gel de alta resolução. Por isso, após a ligação dos adaptadores, é feita uma diluição de 10 vezes.

Na terceira etapa, é realizado o pré-seletivo. Uma seleção inicial de fragmentos através da utilização de *primers* de 20 a 25 bases em que é adicionado um nucleotídeo, em relação à sequências nos adaptadores. Nesta fase, apenas os fragmentos resultantes da digestão que contenham esta base adicional serão amplificados, limitando assim, o número de marcadores. O produto resultante da reação pré-seletivo também é diluído 10 vezes.

Na etapa final, chamada de seletivo, os fragmentos amplificados são selecionados novamente via PCR, sendo utilizados *primers* que contenham dois ou mais nucleotídeos seletivos em relação ao primer pré-seletivo. Este material é separado em eletroforese de gel de poliacrilamida de alta resolução, restringindo ainda mais o número de fragmentos amplificados, para tornar possível a resolução e visualização de marcadores individuais.

A figura 2 mostra as etapas necessárias para obtenção dos marcadores de AFLP e a figura 3 ilustra o polimorfismo gerado a partir da aplicação da técnica de AFLP, em um gel de poliacrilamida de alta resolução.

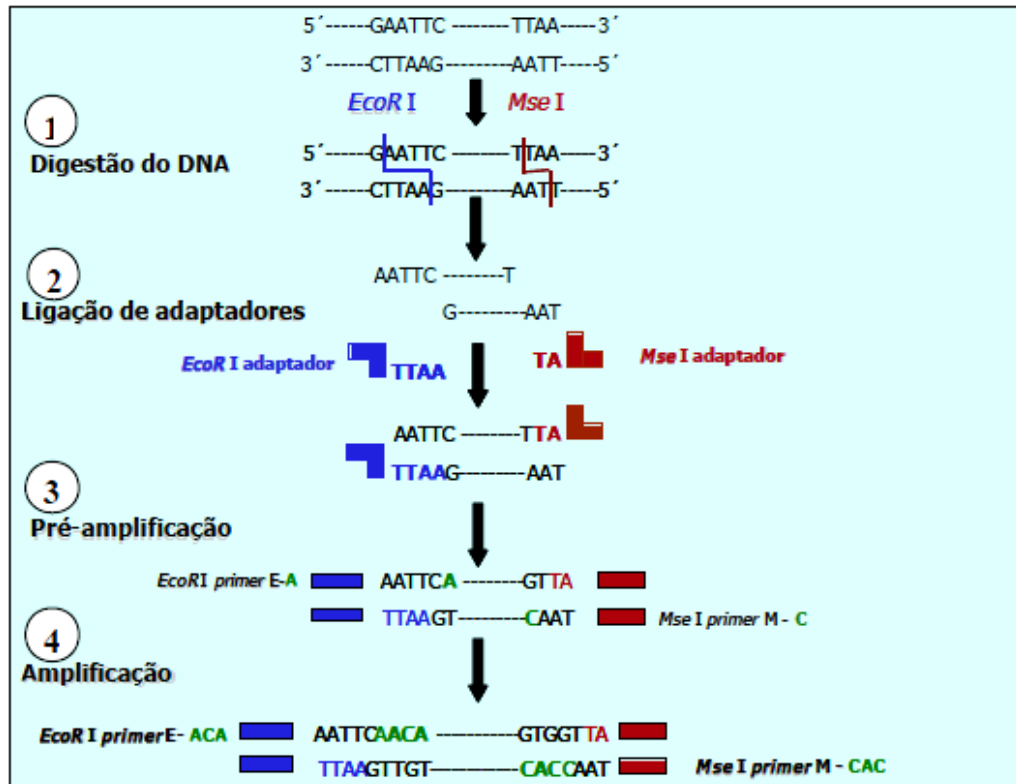


Figura 2 – Etapas de reação da técnica de marcadores moleculares de AFLP. (cf. Ruas, 2009).

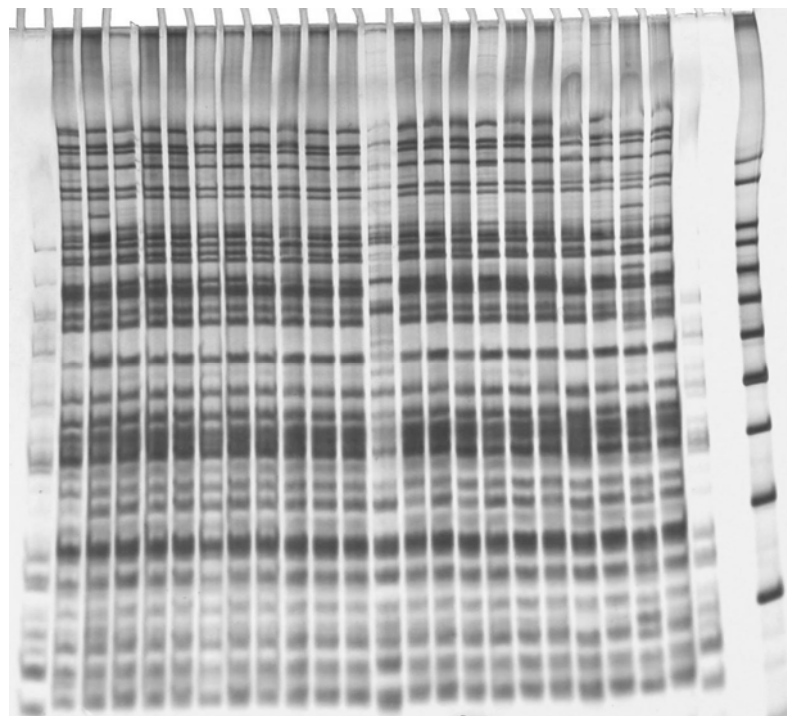


Figura 3 – Padrão eletroforético de marcadores AFLP, resolvidos em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata, para a espécie de *Aspidosperma polyneuron*.

Uma das principais vantagens dos marcadores AFLP é o fato de não ser necessário o conhecimento do genoma da espécie a ser estudada. Entre todos os marcadores disponíveis, o AFLP é o que fornece o maior número de fragmentos em uma única análise, além do grande poder de detecção de variabilidade genética, que explora simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição, tal como no RFLP, e a ocorrência ou não de amplificação a partir de sequências arbitrárias, tal como no RAPD (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; VOS et al., 1995).

Isto gera uma flexibilidade na obtenção dos marcadores polimórficos e uma maior robustez no AFLP quando comparado ao RAPD. Isto se deve a utilização de *primers* mais longos nas etapas de PCR, o que aumenta significativamente a especificidade da amplificação, evitando com isso a competição que ocorre durante a PCR na técnica de RAPD (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; VOS et al., 1995).

Já a principal desvantagem dos marcadores AFLPs, assim como nos RAPDs, é sua característica dominante, que acarreta em um baixo conteúdo de informação por loco. Outras desvantagens são: necessidade de um DNA puro e íntegro para que não ocorra nenhuma alteração nos padrões de banda. Comparado ao RAPD, exige uma infraestrutura maior e é mais trabalhoso, pois requer um número maior de etapas até se obter o resultado final (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; VOS et al., 1995).

Vários trabalhos recentes tem usado este tipo de marcador molecular para um grande número de estudos, tais como detecção de variedades vegetais (MANUBENS et al., 1999), diversidade genética intrapopulacional e interpopulacional (KEIPER; MCCONCHIE, 2000), análises de parentesco (GERBER et al., 2000), filogeografia (MUELLNER et al., 2005; TARRAB et al., 2008) e construção de mapas genéticos (CHAGNE et al., 2002), além dos diversos estudos com espécies arbóreas como *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. (SOUZA, 2006), *Spondias tuberosa* (SANTOS et al., 2008), *Myracrodruon urundeuva* (FREITAS et al., 2005).

2.4 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA

A diversidade genética é de importância fundamental para o potencial evolutivo de uma espécie e determina suas chances de sobrevivência em longo prazo (FLEISHMAN et al., 2001; JONES et al., 2001). Trata-se da "matéria-prima" que possibilita as mudanças evolutivas de uma espécie (MAMURIS et al., 2001; PITHER et al., 2003). Populações com pouca variabilidade genética podem ser incapazes de responder às mudanças ambientais (SHARMA et al., 2000; TANSLEY; BROWN, 2000; JONES et al., 2001; MATOCQ; VILLABLANCA, 2001; SHARMA, 2001), pois, a perda da variabilidade genética resulta em baixo potencial evolutivo (HOLSINGER; OTTLIEB, 1991) e provoca a redução da adaptabilidade, tanto do indivíduo quanto da população (KOPPITZ, 1999; BOUZAT, 2001; MATOCQ; VILLABLANCA, 2001). Assim, a redução da variabilidade genética pode conduzir uma espécie à extinção (BOUZAT, 2001; SHARMA et al., 2000; SHARMA, 2001), sendo, portanto, uma das principais ameaças à existência de uma espécie (JAGGI et al., 2000; TANSLEY; BROWN, 2000).

Independentemente do padrão de diversidade genética de cada espécie, a manutenção da variabilidade genética é considerada essencial para a preservação do potencial evolutivo de espécies (FLEISHMAN et al., 2001) e para sua sobrevivência em longo prazo (TANSLEY; BROWN, 2000). Muitos programas de conservação de plantas raras ou ameaçadas visam manter os níveis existentes de variabilidade genética, evidenciando a importância de pesquisas em genética de populações para a conservação de espécies (JAMES; ASHBURNER, 1997). Zucchi (2002) relata que o sucesso de qualquer programa de conservação depende do conhecimento da variabilidade genética existente na espécie.

Segundo Hamrick (1983), Loveless e Hamrick (1987), o estudo da estrutura genética de populações naturais compreende a descrição dos níveis de variação genética mantida dentro das populações, bem como a forma em que a variação genética é dividida entre as mesmas.

Estudos da estrutura intrapopulacional de espécies arbóreas tem demonstrado que a distribuição de alelos e genótipos não é aleatória dentro das populações (COLES; FOWLER, 1976; LOVELESS; HAMRICK, 1984; CHUNG;

EPPERSON, 2000). Tal estrutura pode ser determinada pela dispersão de pólen e sementes, distribuição de habitat e seleção microambiental (HAMRICK, 1983).

Os fatores que afetam a reprodução e fluxo gênico são particularmente determinantes da estrutura genética de populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Polinizadores como morcegos e beija-flores, por exemplo, devido a sua capacidade de vôo, promovem o aumento da variabilidade dentro de populações, enquanto diminuem a divergência entre populações ao mantê-las ligadas por fluxo gênico. Da mesma forma, sementes dispersas pelo vento promovem o deslocamento de alelos dentro da população e eventualmente entre populações. O limitado fluxo gênico mesmo dentro de populações pode levar à formação de pequenos grupos de indivíduos geneticamente mais similares, de modo que uma população pode ser constituída de várias subpopulações geneticamente diferenciadas (FISCHER et al., 2000).

O sistema reprodutivo preferencial (autogamia ou alogamia), também contribui com a determinação da estrutura genética (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Em espécies preferencialmente alógamas, espera-se encontrar alta diversidade dentro de populações e baixa diversidade entre populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984, 1987).

A relação temporal e espacial entre indivíduos próximos aumenta a probabilidade de intercruzamento e se os mecanismos de dispersão de pólen e sementes forem restritos a uma pequena vizinhança, aumentam as chances de estes indivíduos serem aparentados (COLES; FOWLER, 1976).

Entre os fatores que aumentam a chance de indivíduos serem aparentados na população temos a endogamia. A endogamia observada dentro de populações naturais de espécies florestais é determinada pelo sistema de reprodução, mais especificamente pela taxa de autofecundação. Se o movimento de genes é extenso, resultando em fluxo gênico a longa distância, é esperada baixa endogamia dentro das populações e baixa divergência genética entre populações. Se, contudo o fluxo de genes efetivo é limitado e a troca gênica entre árvores vizinhas é comum, pode ocorrer uma alta proporção de endogamia dentro das populações e alta divergência entre populações (COLES; FOWLER, 1976).

Segundo Park e Fowler (1982), em populações de espécies florestais arbóreas, que apresentam baixa densidade de indivíduos, é possível verificar o aumento da endogamia, fator este que pode ocasionar efeitos deletérios

sobre a sua sobrevivência e vigor. O processo de fragmentação submete as populações a um acentuado efeito de borda e à redução do seu tamanho efetivo, comprometendo a sustentabilidade de plantas ou animais associados (VIANA et al., 1992).

A conservação da biodiversidade representa um dos maiores desafios em função do elevado nível de perturbação dos ecossistemas naturais (VIANA; PINHEIRO, 1998). Diante da alta diversidade de comunidades arbóreas tropicais, torna-se importante acompanhar os processos dinâmicos das espécies separadamente, de forma a revelar as variações dos parâmetros demográficos ocultos em estimativas que consideram a comunidade como um todo (FONSECA, 2001).

Na conservação genética a perda de uma parte da população pode ser tão crítica quanto à perda de uma população inteira, isso porque a variabilidade genética dentro das populações é, principalmente, garantida pela variabilidade genética existente entre subpopulações (HAMRICK, 1983). Portanto, a estrutura genética das populações envolve o conhecimento dos níveis de variabilidade genética e de sua distribuição entre e dentro das populações, sendo este conhecimento muito importante por permitir a adoção de estratégias de manejo mais adequados para a conservação genética e também na exploração desta variabilidade em melhoramento vegetal (KAGEYAMA, 1987; DIAS; KAGEYAMA, 1991).

Para caracterizar a estrutura genética das populações naturais diversas abordagens têm sido utilizadas como a análise de número de locos polimórficos (BERG; HAMRICK, 1997), diversidade gênica e distância genética segundo Nei (1978) e estatística F (WRIGHT, 1965).

3 ARTIGO A: ESTRUTURA POPULACIONAL DE *ASPIDOSPERMA POLYNEURON* MULL. ARG. (APOCYNACEAE) EM FRAGMENTO FLORESTAL DO BAIXO RIO TIBAGI POR MARCADORES AFLP

3.1 RESUMO

Resumo

Aspidosperma polyneuron Muell. Arg. é uma espécie arbórea comumente encontrada em florestas estacionais semidecíduais. Apresenta importância econômica devido a sua madeira e medicinal por apresentar alcalóides e óleos essenciais. Sob o ponto de vista ecológico é considerada uma das espécies mais importantes na recomposição de florestas heterogêneas degradadas. Utilizou-se marcadores de AFLP para investigar a estrutura genética de duas subpopulações naturais de *A. polyneuron* originárias da porção de declive acentuado (DJ) e plano (PJ) na Fazenda Doralice (FD), localizada no município de Ibiporã, no Estado do Paraná, Brasil. Sete pares de *primers* seletivos foram utilizados gerando 200 marcadores, dos quais, 99% e 88,5% foram polimórficos para as subpopulações das regiões DJ e PJ, respectivamente. O coeficiente de variação foi inferior a 1%, mostrando um ótimo nível de confiabilidade em nossos resultados. Valores para diversidade gênica (H_S) para a subpopulação DJ foi de 0,3719 e de 0,3072 para a subpopulação PJ, observando-se uma diversidade maior na região de declive. Os valores de F_{ST} foram 0,26485 com uma distância genética de 0,1479 entre populações. A análise de agrupamento PCoA mostrou a formação de três distintos grupos, sendo o primeiro constituído de indivíduos da subpopulação DJ, o segundo constituídos de indivíduos da subpopulação PJ e DJ, e o último com indivíduos pertencente a PJ. Esses resultados foram confirmados pela análise Bayesiana que demonstrou a existência de três agrupamentos ($K=3$) com probabilidade de 95,3%. Os níveis de conservação genética foram considerados satisfatórios e representam informações valiosas para estas subpopulações de *A. polyneuron*. Este conhecimento é importante não só para estudos mais amplos de populações de *A. polyneuron* em áreas degradadas, mas também, para avaliar os níveis de degradação genética em outras áreas, como também, contribuir como fonte de variabilidade genética para recuperação de áreas degradadas.

Palavras-Chave: Genética da conservação. Peroba. Marcador molecular. Variabilidade genética.

3.2 ABSTRACT

Abstract

Aspidosperma polyneuron Muell. Arg. is a tree species commonly found in semi-deciduous forests. This species shows an economic importance due its wood, and compounds of medical importance such as alkaloids and essential oils. It is considered an important species for reforestation of degraded heterogeneous forest. AFLP molecular markers were used to investigate the genetic structure of two native groups of *A. polyneuron* from an accentuated slope area (AS) and a flat area (FA) situated in Doralice Farm, Ibiporã County, Paraná State, Brazil. The distance between the slope and the flat areas was 200 meters. Seven pairs of selective primers generated 200 AFLP markers of which 99% and 88.5% were polymorphic for the AS and FA areas, respectively. The coefficient of variation for the number of amplified markers was bellow 1%, revealing a good level of trustworthiness in our results. The genetic diversity (Hs) was 0.3719 for the AS sample and 0.3072 for the FA area, showing a higher genetic diversity for the sample of slope area. The value of Fst was 0.26485 with a genetic distance of 0.1479 between the groups. PCoA clustering analysis revealing the formation of three distinct clusters. The first cluster was formed by individuals from AS sample, the second group contains both individuals from AS and FA samples, and the third cluster contains only individuals from FA area. Bayesian analysis for K number of clusters further supported the results from PCoA, indicating that in 95.3% of the times individuals were assigned to the three clusters. These results can be used as a parameter to evaluate the genetic impact of disturbed habitat for this and other tree species in semideciduous forest fragments and to provide a source of genetic variation for the recovery degraded areas.

Key words: Conservation Genetics. Peroba. Molecular markers. Genetic variability.

3.3 INTRODUÇÃO

O rio Tibagi nasce ao sul do Estado do Paraná, região sul do Brasil, e sua bacia hidrográfica está localizada na região centro leste, correspondendo cerca de 13% da área do Estado do Paraná. Devido a sua extensão ocorrem variações climáticas, podendo ser dividida em três distintas regiões ecológicas: baixo, médio e alto Tibagi (MEDRI et al., 2002). No baixo Tibagi, a floresta é estacional semidecidual, no médio Tibagi observa-se uma floresta de transição, e por fim no alto Tibagi a vegetação é campestre com ilhas de floresta ombrófila densa e floresta ombrófila mista (TOREZAN, 2002). Com a ação do homem essa paisagem

atualmente encontra-se alterada, onde sua cobertura nativa foi reduzida em aproximadamente 96%, restando poucos remanescentes (MEDRI et al., 2002).

Fragmentação e distúrbios nos habitats devido ao desmatamento, invasão de plantas daninhas, queimadas e a introdução de animais, podem reduzir diretamente os tamanhos efetivos de populações de plantas e alterar a abundância e eficiência dos polinizadores e dispersores de sementes (LAMONT et al., 1993; AIZEN; FEISINGER, 1994; KREMEN; RICKETTS, 2000). Tais fatores podem levar estas populações à redução da diversidade, isolamento genético e aumento de endogamia. Estes processos quando muito acentuados podem levar tais populações a uma grande diminuição em sua adaptabilidade e até mesmo a extinção (FRANKHAM, 1995; NEWMAN; PILSON 1997; SACCHERI et al., 1998).

Observou-se um rápido aumento no número de estudos que visam determinar os efeitos genéticos, que ocorrem nas populações de plantas as quais tem sofrido recentes ações antropogênicas, tais como fragmentação dos habitats (ELLSTRAND; ELAM, 1993; GUSTAFSSON et al., 2000; YOUNG; CLARKE, 2000). Nesse contexto, os marcadores dominantes AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), técnica que combina clivagem de fragmentos de DNA com enzima de restrição e amplificação dos mesmos por PCR (VOS et al., 1995), tem sido empregada com sucesso em estudos de diversidade genética e estruturação populacional (YAN et al., 1999; BUSATO et al., 2004).

A espécie arbórea *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg., conhecida comumente como peroba ou peroba-rosa, pertence à família *Apocynaceae*. Esta espécie é amplamente distribuída no Brasil abrangendo os estados da Bahia, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Rondônia e Paraná, presentes principalmente em florestas estacionais semidecíduais, como as da bacia do baixo rio Tibagi. A peroba é uma árvore com aproximadamente de 20 a 30m, tronco de 60 a 90cm de diâmetro e folhas glabras. Ocorre em solos profundos e férteis, situados nos espigões e nas encostas. Floresce durante os meses de outubro a novembro, sendo a maturação dos frutos nos meses de agosto a setembro. Produz grande quantidade de sementes apenas em intervalos de 2 a 4 anos. As sementes são aladas, o que facilita a dispersão anemocórica, não possui dormência e perdem a viabilidade em seis meses quando armazenadas em laboratório, sendo que a disseminação de pólen entre as flores se dá provavelmente por mariposas e/ou pequenos insetos (MORELLATO, 1991). A espécie é longeva, podendo ultrapassar

1.200 anos de idade (CARVALHO, 1994), levando mais de 50 anos para atingir seu estágio reprodutivo, e sua taxa de crescimento é de 10 a 15 anos para aumentar seu diâmetro na altura do peito em 5cm (TOREZAN et al., 2005). *A. polyneuron* apresenta importância econômica pela sua madeira pesada e compacta utilizada na construção civil (LORENZI, 2002).

O objetivo do presente estudo é verificar se ocorre diferenças na estrutura genética de duas subpopulações de *A. polyneuron* localizadas em dois diferentes microhabitats do fragmento de floresta semi-decídua pertencente a fazenda Doralice.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da Área de Estudo

O fragmento florestal está localizado na Fazenda Doralice (FD), município de Ibiporã, PR, Brasil (23°16'S e 51°03'W) a 464m de altitude. Esse fragmento possui uma área aproximada de 1,7km² de floresta estacional semidecidual que está circundado por plantios de monoculturas, pomares e pastagens. O fragmento apresenta uma área de declive acentuado (DJ), às margens do rio Tibagi, que se estende por cerca de 40 a 50m do rio (Figura 1). Na sequência a topografia vai se atenuando gradualmente até se tornar praticamente plana (PJ). A distância entre as áreas PJ e DJ onde as amostras foram coletadas é de cerca de 200m. As plantas coletadas eram indivíduos jovens com no máximo 2m de altura, estando na fase pré-reprodutiva.

O solo do fragmento da FD apresenta textura argilosa, com concentrações de argila variando de 46 a 64%, havendo aumento da concentração com a profundidade, possui acidez baixa e níveis de fertilidade entre médio e alto (SOARES-SILVA; BARROSO, 1992). A porção PJ apresenta solo mais argiloso, profundo, maior densidade de indivíduos de peroba, maior cobertura do dossel, pH mais ácido, maior teor de umidade e menor luminosidade no sub-bosque; já a porção DJ apresenta o solo mais pobre em nutrientes, mais raso com aflorações rochosas e a densidade populacional de *A. polyneuron* é menor (COSTA, 2009).



Figura 1 – Fragmento florestal da Fazenda Doralice, Ibiporã PR, Brasil. PJ (área de platô); DJ (área de declive) (GOOGLE EARTH, 2009).

Para este estudo, folhas jovens de 30 indivíduos na fase pré-reprodutiva de *A. polyneuron* foram amostradas de cada uma das porções (DJ e PJ), do fragmento da fazenda, respectivamente. A distância mínima de 30 metros entre plantas individuais foi considerada para minimizar a possível coleta de indivíduos irmãos.

Isolamento de DNA e Reações de AFLP

O DNA genômico total foi isolado de aproximadamente 0,5g de folhas jovens frescas usando o método CTAB, conforme descrito por Doyle e Doyle (1987). As reações de AFLP foram realizadas essencialmente como descrita por Vos et al. (1995). Resumidamente, as amostras de DNA foram submetidas à restrição através das endonucleases *EcoRI* / *MseI* (5 e 5 unidades, respectivamente) e ligação com seus respectivos adaptadores. Após a incubação a 37°C por 16 horas, as amostras foram diluídas (1:10) em água pura. A pré-amplificação seletiva foi feita utilizando *primers* complementares aos adaptadores com a adição de nucleotídeo 3' seletivo e diluída em 1:10. Para amplificação seletiva, foi realizada uma triagem inicial de quatro indivíduos de cada população, utilizando 16 combinações de

primers com nucleotídeos seletivos. As sete combinações de *primers* escolhidos para a PCR seletiva foram: *EcoRI*-AGC / *MseI*-CAC, *EcoRI*-AGC / *MseI*-CAG, *EcoRI*-AGC / *MseI*-CAT, *EcoRI*-AGC / *MseI*-CTA, *EcoRI*-ACG / *MseI*-CAT, *EcoRI*-ACG / *MseI*-CAC e *EcoRI*-AGC / *MseI*-CA. Os produtos de amplificação seletiva foram separados em géis de poliacrilamida 7% (29:1) acrilamida: bis acrilamida durante 3 horas a 200 V e corados com nitrato de prata 20%. Um marcador molecular de 50bp (Ludwig) foi utilizado para determinar os pesos moleculares dos fragmento analisados. Os fragmentos amplificados observados nesta análise apresentaram entre 50-1000 pares de base. Os resultados da análise foram exportados para uma matriz de presença/ausência.

Análise dos Dados

A matriz de presença/ausência originou-se de sete combinações de *primers* e foi importada para diversos *softwares* para análise genética. A estimativa das frequências alélicas e diversidade genética de populações de marcadores dominantes pode ser problemática (ZHIVOTOSKY, 1999; ALEXANDER et al., 2004). A possibilidade de desvios estatísticos poderiam ser eliminados através de dados altamente polimórficos (KRAUSS, 2000). Também foi mostrado que, para estimativas precisas dos parâmetros de genética populacional, um grande número de locos de AFLP deve ser usado, sendo que no mínimo 30 indivíduos por população (TERO et al., 2003). O *software* dBoot v 1.1 (COELHO, 2001) foi aplicado nos dados para verificar o coeficiente de variação (CV) para o número de marcadores amplificados, gerando um parâmetro para determinar uma confiabilidade nos resultados das análises estatísticas. A porcentagem de locos polimórficos, a diversidade genética (NEI, 1978), índice de Shannon e a distância genética foram calculadas para ambas as amostras, utilizando o *software* POPGENE v. 1.31 (YEH et al., 2000). Para avaliar a distribuição da variação genética dentro e entre populações, bem como o índice F_{ST} foi usada a análise de variância molecular (AMOVA), com o *software* Arlequin v. 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005). A análise de coordenada principal foi utilizada para avaliar a distribuição da distância genética em *clusters* pelo *software* FAMD (SCHLÜTER; HARRIS, 2006). A confiabilidade destes

clusters foi testada pela análise Bayesiana de agrupamento através do *software* STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variabilidade Genética das Amostras

As sete combinações de *primers* seletivos geraram 200 marcadores AFLP para as duas subpopulações de *Aspidosperma polyneuron* localizada na Fazenda Doralice, município de Ibiporã, Estado do Paraná, Brasil. O número médio de marcadores foi de 28,57 por combinação de *primers* seletivos. O coeficiente de variação (CV) foi inferior a 1%, demonstrando um ótimo grau de confiança quanto ao número de marcadores AFLP utilizados.

A porcentagem de locos polimórficos para as subpopulações localizadas nas regiões DJ e de PJ foi de 99,0% e 88,5% e a diversidade gênica de Nei (1978) (H_s) foi de 0,3719 e 0,3072, respectivamente. A diversidade gênica total (H_t) foi de 0,3873 e o índice de Shannon (I) foi de 0,5488 para a subpopulação localizada na região DJ e de $I=0,4601$ para a subpopulação situada na região PJ (Tab. 1). Torezan et al. (2005) utilizando marcadores RAPD verificaram a variabilidade genética de *Aspidosperma polyneuron* em seis fragmentos florestais localizados na região do baixo rio Tibagi. Entre estes fragmentos, o Parque Estadual Mata dos Godoy foi incluído com três áreas estudadas, por ser uma unidade de conservação, envolvendo uma área de 6,8km², livre de corte seletivo de árvores e outros impactos antropogênicos. Estes autores encontraram uma diversidade genética (H_t) de 0,2780, o qual é inferior ao encontrado no fragmento localizado na Fazenda Doralice. Isto se deve ao fato de que Torezan et al. (2005) analisaram junto com o Parque Estadual Mata dos Godoy mais cinco fragmentos que foram severamente impactados pela ação do homem. Para o estudo da diversidade gênica de Nei (1978) e do índice de Shannon três amostragem no Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) foi analisada por Torezan et al. (2005). A diversidade gênica de Nei (1978) foi de 0,2530, 0,3159 e 0,2880 para as amostras PEMG₁, PEMG₂ e PEMG₃, respectivamente. Os valores encontrados no fragmento da Fazenda Doralice conforme descritos acima são semelhantes a estes, mostrando que embora

no passado a subpopulação PJ deste fragmento tenha sofrido ação antropogênica pelo corte seletivo de árvores adultas, a geração seguinte não teve sua variabilidade genética comprometida. Os índices de Shannon para as amostras do Parque Estadual Mata dos Godoy foi de 0,3420, 0,4290 e 0,3900. Os valores dos índices de Shannon para as duas subpopulações da Fazenda Doralice são superiores aos encontrados para as amostra do Parque Estadual Mata dos Godoy. Todos estes índices analisados acima mostram que o fragmento da floresta estacional semidecidual localizado na Fazenda Doralice encontra-se em estado relativamente conservado.

Tabela 1 – Porcentagem de locos polimórficos (Pp), diversidade gênica dentro de populações (Hs), índice de Shannon (I) e diversidade genética total (Ht) de duas amostras oriundas do fragmento florestal da Fazenda Doralice, município de Ibiporã, estado do Paraná, Brasil, baseado em marcadores de AFLP.

População	(Pp)	(Hs)	(I)
Declive	99.0	0.3719	0,5488
Plano	88.5	0.3072	0,4601
(Ht)	0.3873		
Distância genética	0.1479		

O fragmento da Fazenda Doralice apresenta uma área de cobertura bem menor (1,7km²) que o fragmento localizado no Parque Estadual Mata dos Godoy (6,8km²). Assim, esperava-se que os valores de diversidade genética encontrados por Torezan et al. (2005) fossem superiores aos encontrados no presente trabalho. Porém tal fato não foi observado, por esse valor ser analisado junto aos dados das outras áreas que são degradadas (0,278). No entanto, quando o valor é dado comparando somente os dados de diversidade genética total (Ht) das três áreas da Mata dos Godoy, apresenta um resultado de 0,312, sendo este próximo ao nosso (0,307) para a subpopulação PJ, concluindo que as duas subpopulações de *A. polyneuron* da fazenda Doralice estão geneticamente conservadas.

Vários estudos realizados com árvores tropicais mostraram resultados semelhantes ao deste trabalho quanto à variabilidade genética, Gallo et

al. (2002) verificaram em *Luehea divaricata* Mart. uma maior variabilidade genética na população que se encontrava na região de declive utilizando marcadores RAPD. Pither et al. (2003) também com RAPD encontraram para *Terminalia amazônia* (J. Gmel) Exell. valores de índices de Shannon (I) que variaram entre 0,32 a 0,38. Em *Swietenia macrophylla* King., Gillies et al. (1997) encontraram índice de Shannon (I) de 0,35, e Aide e Rivera (1998) encontraram um valor de 0,59 para *Poulsenia armata* (Miq.) Standl. Com base nos dados destes autores demonstra-se que o fragmento da Fazenda Doralice também se encontra em um estado conservado em relação a variabilidade genética..

Estrutura Genética

A análise de variância para dados moleculares (AMOVA) demonstrou um valor de 73,52% para dentro de população e 26,48% entre populações (Tab. 2). *A. polyneuron* é uma espécie alógama, fertilizada provavelmente por mariposas e/ou pequenos insetos (Morellato, 1991) e sementes dispersas pelo vento (Carvalho, 1994), características que corroboram com os resultados de Maguire et al. (2002), que relatam ser comum em espécies de fecundação cruzada, uma maior porcentagem de variabilidade dentro de grupos do que entre grupos. A distância genética de Nei (1978) entre as duas subpopulações foi de 0,1479. As duas subpopulações estão localizadas, a uma distância relativamente pequena, isto é, em torno de 200m. De acordo com Hamrick e Loveless (1989) o baixo nível de diferenciação entre populações é um evento comum em espécies de árvores tropicais em uma pequena escala espacial. Esta conclusão de Hamrick e Loveless (1989) é contraditória ao valor de $F_{st}=26,48$ e a variabilidade entre populações que observamos para *A. polyneuron*. Em outros estudos com árvores, vários outros autores também mostraram que pouca variabilidade genética ocorre entre populações próximas (MERZEAU et al., 1994; LEONARDI; MENOZZI, 1996; TAKAHASHI et al., 2000; MARIETTE et al., 2002). Embora seja um risco usarmos marcadores moleculares neutros para fazermos inferências sobre processos adaptativos, ao menos que a seleção natural esteja ainda atuando ou haja uma forte ligação entre os locos selecionados e o marcador neutro (MERZEAU et al., 1994; LEONARDI; MENOZZI, 1996; TAKAHASHI et al.,

2000; MARIETTE et al., 2002), o possível motivo da diferenciação drástica nos resultados encontrados em *A. polyneuron* da Fazenda Doralice, possivelmente seja de natureza adaptativa. Pois, as subpopulações de *A. polyneuron* apresentam condições ecológicas completamente diferentes, como observado na subpopulação PJ, que apresenta o solo mais argiloso, profundo, maior densidade de indivíduos, maior cobertura do dossel, pH mais ácido, maior teor de umidade, menor luminosidade para o sub-bosque; já a subpopulação DJ apresenta o solo mais pobre em nutrientes e a densidade populacional é menor. Fatos semelhantes foram observados por Gillies et al. (1997) em *Cedrela odorata* L., que encontraram uma correlação entre diferenças moleculares interpopulacional e suas características adaptativas.

Rodrigues et al. (2007) relatam que a correlação entre a distribuição de espécies arbóreas e as variáveis do solo e da topografia tem sido apresentado em diversos estudos de florestas tropicais. Esses autores constataram em estudo sobre comunidade em floresta estacional semidecidual, que a maioria das espécies apresentaram correlação com a fertilidade e textura do solo ao longo de um gradiente topográfico. Descrição similar foi realizada por Carvalho et al. (2005), ao observarem diminuição do porte da floresta à medida que se distanciava da margem do rio. Eles consideravam que provavelmente, a diminuição ocorria em razão da redução da disponibilidade hídrica. Em estudo realizado em floresta estacional semidecidual em mata ciliar de um lago, Campos e Landgraf (2001) constataram haver maior diversidade e abundância de espécies vegetais próximas ao lago, uma das espécies que apareciam apenas distante do lago é a *A. polyneuron*. Bianchini et al (2009), ao realizarem estudo sobre estruturas de populações localizadas no fragmento de floresta estacional semidecidual na Fazenda Doralice, Ibiporã - PR observaram que a distribuição de seis dentre as 13 espécies arbóreas estudadas, estavam associadas ao gradiente topográfico, incluindo a espécie estudada neste trabalho, *A. polyneuron*.

Assim, podemos relacionar a grande diferenciação genética entre as subpopulações de *A. polyneuron*, às diferenças adaptativas entre a subpopulação PJ e DJ da Fazenda Doralice, pois, além das diferenças ecológicas já mencionadas, a subpopulação do declive apresenta um solo menos profundo com afloramentos rochosos em várias de suas porções.

Tabela 2 – Análise da variância molecular (AMOVA) para duas amostras de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. provenientes do fragmento florestal da Fazenda Doralice, município de Ibiporã, estado do Paraná, Brasil, baseado em marcadores de AFLP.

Source of Variation	L. D.	Sum of Squares	Variance Components	% de Variância
Entre população	1	362.501	9.00197 Va	26.48**
Dentre população	73	1824.085	24.98747 Vb	73.52
Total	74	2186.587	33.98944	
Índice de fixação	F_{ST} :	0,26485		

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; (significance test given by 1023 permutations).

O resultado da Coordenada Principal demonstrou a formação de três agrupamentos (Fig. 3), sendo o primeiro constituído de indivíduos pertencentes à subpopulação DJ, o segundo constituído de indivíduos pertencentes à subpopulação PJ e o último com indivíduos das duas subpopulações. Isto pode estar relacionado a dois processos que acontecem aleatoriamente: o primeiro, é que a espécie estudada sofre dispersão pelo vento, e o segundo, pelo fato do agente polinizador provavelmente serem as mariposas e/ou pequenos insetos, sendo eles capazes de voar a uma distância maior que 200m. O agrupamento demonstrado pela formação de indivíduos das subpopulações PJ e DJ se dá possivelmente por serem resultados de hibridização de indivíduos dos dois locais amostrados. Estes resultados são corroborados pelos dados da análise Bayesiana, que demonstrou um K igual a 3, com 95,3% de probabilidade. Além disso, os resultados da diversidade gênica demonstraram um alto valor, sendo que a subpopulação DJ apresentou um valor maior (0,3719) do que a PJ (0,3072), ocorrendo, possivelmente, um fluxo gênico maior da subpopulação do plano para o declive, pois, a subpopulação PJ está mais alta em relação à subpopulação DJ que está a margem do rio, sendo o vento um dos responsáveis pelo fato, levando mais sementes em direção ao declive do que em direção ao plano.

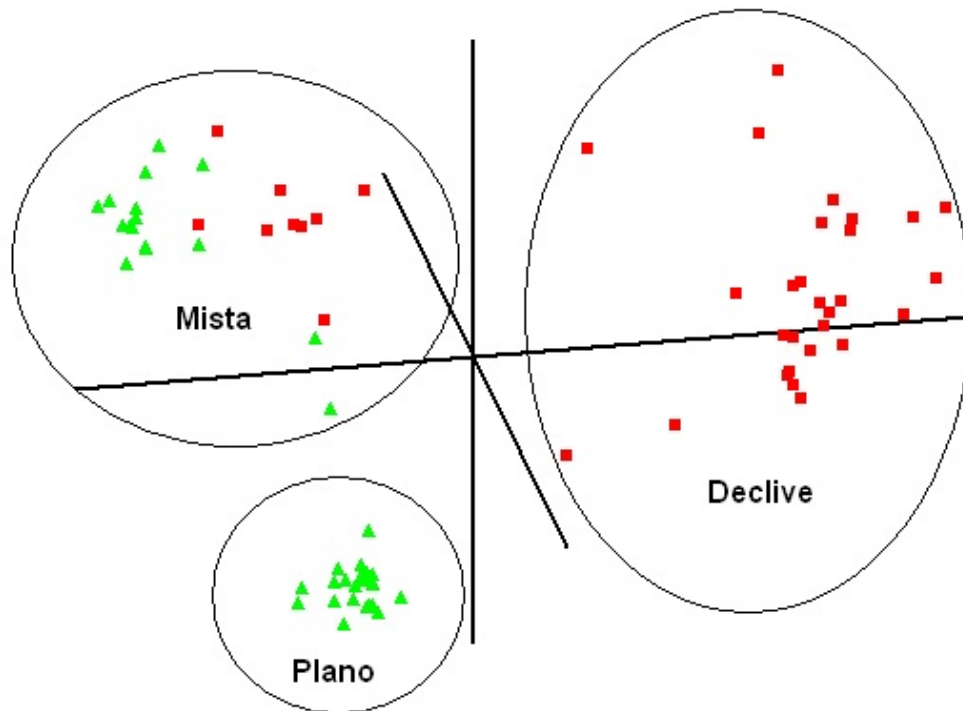


Figura 3 – Coordenada principal de duas amostras de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. provenientes da Fazenda Doralice.

3.6 CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que as duas subpopulações de *A. polyneuron* estudada na Fazenda Doralice estão bem conservadas e o fluxo gênico ocorre por toda esta área, colaborando com a manutenção da variabilidade genética dentro destas, que podem contribuir como um reservatório natural de diversidade genética para a espécie. Este conhecimento é importante não somente para a estrutura genética, mas também para estudos comparativos de populações de *A. polyneuron* posteriores em locais perturbados, avaliando o nível de degradação da variabilidade genética em outras áreas, assim como, o uso desta região como fonte de diversidade genética para futuros projetos de recuperação de áreas degradadas.

3.7 AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (Processo nº 478179/06-5) e a Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

3.8 REFERÊNCIAS

- AIDE, T. M.; RIVERA, E. Geographic patterns of genetic diversity in *Poulsenia armata* (Moraceae): implications for the theory of Pleistocene refugia and the importance of riparian forest. **J. Biog.**, v. 25, p. 695-705, 1998.
- AIZEN, M. A.; FEINSINGER, P. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a chaco dry forest, Argentina. **Ecology**, v. 75, p. 330-351, 1994.
- ALEXANDER, J. A.; LISTON, A.; POPOVICH, J. Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, v. 91, p. 2004–2012, 2004.
- BIANCHINI, E et al. Slope and population structure of tree species in South Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Artigo aceito para publicação. 2009.
- BUSATO, G. R. et al. Análise da Estrutura e Diversidade Molecular de Populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Associadas às Culturas de Milho e Arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 709-716, 2004.
- CAMPOS, J. C.; LANDGRAF, P. R. C. Análise da regeneração natural de espécies florestais em matas ciliares de acordo com a distância da margem do lago. **Ciência Florestal**, v. 11, n. 2, p. 143-15, 2001.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa-CNPQ/Colombo, PR, 1994.
- CARVALHO, D. A. et al. Variações florísticas e estruturais do componente arbóreo de uma floresta ombrófila alto-montana às margens do rio Grande, Bocaina de Minas, MG, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, São Paulo, v. 19, n. 1, mar. 2005, p. 91-109.
- COELHO, A. S. G. **Software dBOOD**: Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap, v. 3.0. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2001.

- COSTA, J. A. de. **Estudo populacional de *Aspidosperma polyneuron* Mull. Arg. (Pocynaceae) em fragmento de floresta estacional semidecidual no sul do Brasil.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation for small quantities 161 of leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, v. 19, p. 11–15, 1987.
- ELLSTRAND, N.C.; ELLAN, D.R. Population genetic consequences of small population sizes: implication for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 24, p. 217-242, 1993.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47–50, 2005.
- FRANKHAM, R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. **Genetical Research**, v.66, p.95-107, 1995.
- GALLO, M. C. C. **Tolerância ao alagamento e caracterização da variação genética em populações de *Luehea divaricata* Mart (Tilliacae).** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002. p. 164.
- GILLIES, A. C. M. et al. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timer species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. **Molecular Ecology**, v. 6 p. 1133-1145, 1997.
- GUSTAFSSON, J. P. et al. Partitioning of base cations and sulphate between solid and dissolved phases in three podzolised forest soils. **Geoderma**, v. 94, p. 311-333, 2000.
- HAMRICK, J. L.; LOVELESS, M. D. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. In: BOCK, J. K., LINDAHART, Y. B. (ed.) **Evolutionary Ecology of Plants**. Westview Press: Boulder, C. O., 1989. p. 129-146.
- KRAUSS, S. L. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1241–1245, 2000.
- KREMEN, C.; T.H. RICKETTS Global perspectives on pollination disruptions. **Conservation Biology**, v. 14, n. 5, p. 1226-1228, 2000.
- LAMONT, W. J. et al. Relay intercropping system of muskmelons with scotch pine christmas trees using plastic mulch and drip irrigation. **HortScience**, v. 28, n. 3, p. 177-178, 1993.
- LEONARDI, S.; MENOZZI, P. Spatial structure of genetic variability in natural stands of *Fagus sylvatica* L. (beech) in Italy. **Heredity**, v. 77, p. 359-368, 1996.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do brasil. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v 2, p.368.

- MAGUIRE, T. L.; PEAKALL, R.; SAENGER, P. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, p. 388-398, 2002.
- MARIETTE, S. et al. Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers. **Molecular Ecology**, v. 11 p. 1145-1156, 2002.
- MEDRI, M. E. et al. Apresentação. In: MEDRI, M.E. et al. (ed.). **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina, edição dos Editores, 2002. p. 20-21.
- MERZEAU, D. et al. Genetic structure of natural stands of *Fagus sylvatica* L. (Beech). **Heredity**, v. 72 p. 269-277, 1994.
- MORELLATO, L. P.C. **Fenologia de árvores, arbustos e lianas em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil**. Tese (Doutorado) – Universidade de Campinas, Campinas, 1991.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583–590, 1978.
- NEWMAN, D.; PILSON D. Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella*. **Evolution**. p. 354–362, 1997.
- PITHER, R.; SHORE, J. S.; KELLMAN, M. Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. **Heredity**, v. 91, p. 307-313, 2003.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHANS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959, 2000.
- RODRIGUES, L. A. et al. Efeitos de solos e topografia sobre a distribuição de espécies arbóreas em um fragmento de floresta estacional semidecidual, em Luminárias, MG. R. **Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2007.
- SACCHERI, I. et al. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. **Nature** v. 392, p. 491-494, 1998.
- SCHLUTER, P. M.; HARRIS, S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology** No tes, v. 6, p. 569-572, 2006.
- SOARES-SILVA, L. H.; BARROSO, G. M. Fitossociologia do estrato arbóreo da floresta na porção norte do “Parque Estadual Mata dos Godoy”, Londrina-PR. Brasil. **Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo**, v. 8 p. 101-112, 1992.
- TAKAHASHI, M. T.; MUKOUDA, M.; KOONO, K. Differences in genetic structure between two Japanese beech (*Fagus crenata* Blume) stands. **Heredity** v. 84, p. 103-115, 2000.

- TERO, N. et al. Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silene tatarica*. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2073–2085, 2003.
- TOREZAN, J. M. D. et al. Genetics variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polineuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal**, v. 48, n. 2, p. 171-180, 2005.
- TOREZAN, J. M. D. Nota sobre a vegetação da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E. (ed.). **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina, edição dos Editores, 2002. p. 106-111.
- VOS, P. T. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407–4414, 1995.
- YAN, G. et al. Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: Comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. **Mol. Ecol.**, v. 8, p. 951-963, 1999.
- YEH, F. C. et al. **Pop Gene 32**. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, v. 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 2000.
- YOUNG, A. G.; CLARKE, G. M. Genetics, demography and Viability of Fragmented Populations. **Conservation Biology**, v. 4, 2000.
- ZHIVOTOVSKY, L. A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 907–913, 1999.

4 CONCLUSÕES GERAIS

A espécie arbórea *A. polyneuron* localizada na Fazenda Doralice, apresenta alta diversidade em suas áreas estudadas. O fluxo gênico entre e dentro destas subpopulações é realizado de forma a garantir maior diversidade dentro do que entre as mesmas, portanto esse fluxo ocorre em toda a área estudada, com a colaboração de seus agentes dispersores (vento) e polinizadores (mariposa e/ou pequenos insetos) naturais. As alterações ambientais provocadas pela fragmentação, não aparentam alterar a variabilidade genética da espécie em estudo, mesmo levando em consideração o grau de desmatamento no Estado do Paraná.

As conclusões obtidas são importantes não somente para este estudo, mas também para os posteriores de *A. polyneuron* em áreas perturbadas, além de contribuir para a avaliação do nível da degradação genética em outras regiões. Sabendo que a conservação depende do conhecimento da variabilidade genética existente na espécie, pode-se utilizar estes resultados como fontes de recuperação em áreas degradadas, contribuindo também como banco de germoplasma para a espécie.

Este conhecimento também nos permitira em futuros estudos de outros fragmentos, comparar estes dados com os obtidos em outras áreas para se ter uma real compreensão do grau de degradação dos fragmentos florestais menores. Desta forma, pode-se direcionar esforços de forma mais efetiva na recuperação de populações desta espécie ao longo da bacia do rio Tibagi.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, R.; GALETTO, L. Effects of forest fragmentation on male and female reproductive success in *Cestrum parqui* (Solanaceae). **Oecologia**, v. 138, p. 513–520, 2004.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p. 574.

ALVAREZ-BUYLLA, E. R. et al. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 27, p. 387-421, 1996.

BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (paubrasil), espécie da Mata Atlântica. **Rev. Brasileira Botânica**, v. 25, n. 4, dez. 2002.

BARNES, B. V., Old-growth forests of the northern lake states: a landscape ecosystem perspective. **Natural Areas Journal**, v. 9, p. 45-57, 1989.

BERG, E. E.; HAMRICK, J. L. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 27, p. 415-424, 1997.

BERNACCI, F. C.; LEITÃO-FILHO, H. F., Flora fanerogâmica da floresta da fazenda São Vicente, Campinas, SP. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 19, p. 149-164, 1996.

BITTENCOURT, J. V. M. Genetic diversity and dynamics in remnant patches of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. forest in Paraná State, Brazil: implications for conservation and restoration. PhD thesis (Landscape Ecology) - The University of Reading, p. 226, 2007.

BÓREM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, 2006. p. 374.

BOTEQUILHA, L. A.; AHERN, J. Applying landscape ecological concepts and metrics in sustainable landscape planning. **Landscape and Urban Planning**. v. 59, p. 65-93, 2002.

BOTKIN, D. B.; TALBOT, L. M. Biological diversity and Forests. In: SHARMA (ed.). **Contemporary issues in forest management: policy implications**. Washington: The World Bank. 1992.

BOUZAT, J. L. The population genetic structure of the Greater Rhea (*Rhea americana*) in an agricultural landscape. **Biological Conservation**, v. 99, p. 277-284, 2001.

BRUNA, E. M. et al. Experimental Buchert, G. P., 1994. Genetics of White Pine and implications for management and conservation. **The Forest Chronicle**, v. 70, n. 4, p. 427- 434, 2002.

CÂMARA, I. G. Brief history of conservation in the Atlantic forest. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. G. (ed.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats, and outlook**. Washington: Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, 2003. p. 31-42.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Embrapa-CNPQ/Colombo, 1994.

CASCANTE, A.; QUESADA, M.; LOBO, J. J.; FUCHS, E. A. Effects dry tropical forest fragmentation on reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology* v. 16(1) p. 137-147, 2002.

CHACOFF, N. P.; MORALES, J. M.; VAQUERA, M. P. Efectos de la fragmentación sobre la aborción y depredación de semillas en el Chaco Serrano. **Biotropica**, v. 36, n. 1, p. 109-117, 2004.

CHAGNE, D. et al. A high density genetic map of maritime pine based on AFLP's. **Annals of Forest Science**, v. 59, n. 5-6, p. 627-636, 2002.

CHUNG, M.G.; EPPERSON, B.K. Spatial structure of allozyme polymorphism in a population of *Eurya japonica*. *Silvae Genetica*, v. 49(1) p. 1-4, 2000.

COLES, J. F; FOWLER, D. A. A inbreeding in neighbouring trees in two White Spruce population. *Silvae Genetica*, v. 25, n. 1, p. 29-34, 1976.

COLLINGE, S. K. Ecological consequences of habitat fragmentation: implications for landscape architecture and planning. **Landscape and Urban Planning**. v. 36, p. 59-77, 1996.

CORDEIRO, N. J.; HOWE, H. F. Low recruitment of trees dispersed by animals in African forest fragments. **Conservation Biology**, v. 15, p. 1733-1741, 2001.

CORDEIRO, N. J.; HOWE, H. F. Forest fragmentation severs mutualism between seed dispersers and an endemic African tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, p. 14052-14056, 2003.

CURRAN, L. M.; LEIGHTON, M. Vertebrate responses to spatiotemporal variation in seed production of mast-fruiting Dipterocarpaceae. **Ecological Monograph**, v. 70, p. 101-128, 2000.

DAWSON, L. K. et al. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. **Heredity**, v. 74, p. 10-18, 1995.

DEAN, W. **A ferro e fogo: a história e a devastação da Mata Atlântica brasileira**. São Paulo: Companhia das Letras, 1996. 484 p.

DEBINSKI, M. D.; HOLT, D. R. Review: A survey and overview of habitat fragmentation experiments. **Conservation Biology**, v. 14, p. 342-355, 2000.

DIAS, B. F. S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1996. p. 10.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Variação genética em espécies arbóreas e conseqüências para melhoramento florestal. **Agrotropica**, Ilhéus, v. 3, n. 3, p. 119-127, set./dez. 1991.

DIDHAM R. K.; LAWTON J. H. Edge structure determines the magnitude of changes in microclimate and vegetation structure in tropical forest fragments. **Biotropica**, v. 31, p. 17-30, 1999.

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

FEARNSIDE; P. M. Carga pesada: o custo ambiental de asfaltar um corredor de soja na Amazônia. In: TORRES, M. **Amazônia revelada: os descaminhos ao longo da BR-163**. Brasília: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 2005. p. 397-423.

FERREIRA, M.E.; GRATAPPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. EMBRAPA. Brasília, 1995.

FERREIRA, P. et al. Cyclophilinrelated protein RanBP2 acts as chaperone for red/green opsin. **Nature**, v. 383, p. 637–640, 1996.

FERREIRA, M. E.; GRATAPPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1998. 220 p.

FISCHER, M., RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (GENTIANACEAE). **American Journal of Botany**, v. 85, n. 6, p. 811-819, 1998.

FISCHER, M.; HUSI, R.; PRATI, D. RAPD variation among and within small and arge populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). **American Journal of Botany**, v. 87, p. 1128-1137, 2000.

FLEISHMAN, E.; LAUNER, A.E; SWITKY, K.R. et al. Rules and exceptions in conservation genetics: genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications for management planning. **Biological Conservation**, v. 98, p. 45-53, 2001.

FONSECA, M. G. **Aspectos demográficos de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. (Apocynaceae) em dois fragmentos de floresta semidecídua no município de Campinas, SP**. 2001. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

FORMAN, R. T. T.; GODRON, M. **Landscape Ecology**. New York: John Wiley and Sons, 1986.

FOSTER, R.B. Long-term change in the successional forest community of the Rio formation during a 10-year period in a tropical moist forest. **Ecology**, v. 64, p. 1075-1080, 1990.

FRANKHAM, R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. **Genetical Research**, v. 66, p. 95-107, 1995.

FREITAS, M. L. M. et al. Variabilidade genética intrapopulacional em *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. Por marcador AFLP. **Cientia florestalis**, n. 68, p. 21-28, ago. 2005.

FUCHS, E. J.; LOBO, J. A.; QUESADA, M. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. **Conservation Biology**, v. 17, n. 1, p. 149-157, 2003.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período 1995-2000**. São Paulo: SOS Mata Atlântica/INPE/ISA, 2002.

GAUDEUL, M.; TABERLET, P.; TILL-BOTTRAUD, I. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1625-1637, 2000.

GEHLHAUSEN, S. M., SCHWARTZ, M. W.; AUGSPURGER, C. K. Vegetation and microclimatic edge effects in two mixed-mesophytic forest fragments. **Plant Ecology** v. 147, p. 21–35, 2000.

GENTRY, A. H.; TERBORGH, J. Composition and dynamics of the Cocha Cashu “mature” foodplain forest. In: GENTRY, A.H. (ed.). **Four neotropical rainforests**. Yale University Press, New Haven and London, 1990. p. 542-564.

GERBER, S. et al. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 8, p. 1037-1048, 2000.

GIMENES, M. R.; ANJOS, L. Efeitos da fragmentação florestal sobre as comunidades de aves. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 2, p.391-402, 2003.

GOMES, E.P.C. **Dinâmica do componente arbóreo de um trecho de mata em São Paulo**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

GRADWOHL, J.; GREENBERG, R. Small forest reserves: Marking the best of a bad situation. **Climatic change**, v. 19, p. 253-256, 1991.

GREGORIUS, H. R., Umweltbelastung und anpassungsfähigkeit von baumpopulationem. **Silvae Genetica**, v. 34, p. 230-214, 1985.

HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD, C. M. et al. *Genetics and conservation*. Menlo Park: The Benjamin/Cummings publishing Company., p. 335-348, 1983.

HAMRICK, J. L. et al. Correlations between Species Traits and Allozyme Diversity: Implication for Conservation Biology. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (ed.). **Genetics and Conservation of Rare Plants**. Oxford University Press, Oxford. 1991. P. 75-86.

HAMRICK, J. L., GODT; M. J. W.; SHERMAN-BROYLERS, S. L., Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New For.**, v. 6, p. 95-124, 1992.

HARRIS, L. D. **The fragmented forest**. Londron: The university of Chicago Press, 1984.

HARTSHORN, G. S. Neotropical forest dynamics. **Biotropica**, v. 12, supl. 7, p. 23-30. 1980.

HARTSHORN, G.S. An overview of neotropical forest dynamics. In: GENTRY, A.H. (ed.). **Four neotropical rainforests**. New Haven and London:Yale University Press, 1990. p. 585-599.

HELENTJARIS, T. et al. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 72, p. 761-769, 1986.

HOLSINGER, K. E.; GOTTLIEB, L. D. Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (ed.) **Genetics and conservation of rare plants**. Oxford: Oxford University Press, 1991. p.195-223.

HORIKOSHI. A. S. et al. Mapeamento do uso do solo com dados do sensor aster para delimitação de fragmentos florestais. In: **XII SIMPOSIO INTERNACIONAL EM PERCEPCIÓN REMOTA Y SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA**, Cartagena de India, Colombia, 2006.

HUBBELL, S.P.; FOSTER, R.B. Structure, dynamics and equilibrium status of old-growth forest on Barro Colorado island. In: GENTRY, A.H. (ed.). **Four neotropical rainforests**. Yale University Press, New Haven and London, 1990. p. 522-541.

INTERNATIONAL FINANCE CORPORATION. **Manual de orientação ao proprietário rural**: "a propriedade rural legal". Disponível em: [http://www.ifc.org/ifcext/spiwebsite1.nsf/0/E5D88BF12FDB20A685257230006A7545/\\$File/APP_MataCiliar_CorredorEcol%C3%B3gico.pdf](http://www.ifc.org/ifcext/spiwebsite1.nsf/0/E5D88BF12FDB20A685257230006A7545/$File/APP_MataCiliar_CorredorEcol%C3%B3gico.pdf). Acesso em: 07 nov. 2009.

JAGGI, C.; WIRTH, T.; BAUR, B. Genetic variability in subpopulations of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura Mountains: implications for a conservation strategy. **Biological Conservation**, v. 94, p. 69-77, 2000.

JAMES, E.A.; ASHBURNER, G.R. Intraspecific variation in *Astelia australiana* (Liliaceae) and implications for the conservation of this Australian species. **Biological Conservation**, v. 82, p. 253-261, 1997.

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

KAGEYAMA, P. Y. Conservação *in situ* de recursos genéticos de plantas. **IPEF**, Piracicaba, v. 35, p. 7-37, abr. 1987.

KATTAN, G.H.; ALVAREZ-LÓPEZ, H. Preservation and management of biodiversity in fragmented landscapes in the Colombian Andes. In: SCHELHAS, J.; R. GREENBERG (ed.). **Forest patches in tropical landscapes**. Washington: Island Press, 1996. p. 3-18.

KEIPER, F. J.; MCCONCHIE, R. An analysis of genetic variation in natural populations of *Sticherus flabellatus* [R. Br. (St. John)] using amplified length fragment polymorphism (AFLP) markers. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 5, p. 571-581, 2000.

KOBIYAMA, M. et al. I Seminário de Hidrologia Florestal: Zona Riparia. Programa de pós-graduação em engenharia Ambiental (PPGEA) – UFSC. Município de Alfredo Wagner – SC. 22 de setembro de 2003.

KOPPITZ, H. Analysis of genetic diversity among selected populations of *Phragmites australis* world-wide. **Aquatic Botany**, v. 64, p. 209-221, 1999.

LANG, G. E.; KNIGHT, D. H. Tree growth, mortality, recruitment and canopy gap formation during a 10-year period in a tropical moist forest. **Ecology**, v. 63, p. 1075-1080, 1983.

LAURENCE, W. F.; BIERREGARD JR., R. O. **Tropical forest remnants. ecology, management, and conservation of fragmented communities**. University of Chicago Press. Chicago, IL, EEUU. p. 616, 1997.

LAURENCE, W.F. et al. Rain forest fragmentation and the dynamics of amazonian tree communities. **Ecology**, v. 79, p. 2032- 2040, 1998.

LEDIG, F. T., The Conservation of diversity in forest trees. **Bioscience**, v. 38, p. 47-479, 1988.

LEDIG, F. T., Human Impacts on genetic diversity in forests trees. **Oikos**, v. 63, p. 87-108, 1992.

LEITÃO-FILHO, H.F. A vegetação da Reserva de Santa Genebra. In: LEITÃO FILHO, H.F.; MORELLATO, L. P. C. (ed.). **Ecologia e preservação de uma floresta tropical urbana: reserva de Santa Genebra**. Campinas: UNICAMP, 1995. p. 19-29.

LIEBERMAN, D. et al. Forest dynamics at La Selva Station, 1969-1985. In: GENTRY, A.H. (ed.). **Four neotropical rainforests**. New Haven and London: Yale University Press, 1990. p. 509-521.

LIEBERMAN, D.; LIEBERMAN, M. Forest tree growth and dynamics at La Selva, Costa Rica (1969-1982). **Journal of Tropical Ecology**, v. 3, p. 347-358, 1987.

LIEBERMAN, D. et al. Mortality patterns and stand turnover rate in a wet tropical forest in Costa Rica. **Journal of Ecology**, v. 73, p. 915-924, 1985a.

LIEBERMAN, D. et al. Growth rates and agesize relationships of tropical wet forest trees in Costa Rica. **Journal of Tropical Ecology**, v. 1, p. 97-109, 1985b.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v. 2, 368 p. ,

LOVEJOY, T. E. et al. Edge and other effects of isolation on amazon forest fragments. In: SOULÉ, M. E. **Conservation biology: the science of scarcity and diversity**. Massachusetts: Sinauer Sunderland, 1986. p. 257-285.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p. 65-95, 1984.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Distribuição de la variación en especies de árboles tropicales. **Revista Biología Tropicales**, v. 35, n. 1, p. 165-175, 1987.

MAACK, R.; **Geografia física do Estado do Paraná**. Curitiba: BADEP/UFPR/IBPT, 1968. 350 p.

MACARTHUR, R. H.; WILSON, E. O. **The theory of island biogeography**. Princeton, Princeton University Press, 1967. p. 203.

MALTEZ, H. M. **Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. - Apocynaceae (Peroba Rosa) em uma floresta estacional semidecidual no estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

MAMURIS, Z.; SFOUGARIS, A. I.; STAMATIS, C. Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. **Biological Conservation**, v. 101, p. 187-196, 2001.

MANUBENS, A. et al. DNA isolation and AFLP fingerprinting of nectarine and peach varieties (*Prunus persica*). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, n. 3, p. 255-267, 1999.

MARCONDEZ-FERREIRA NETO. W. ***Aspidosperma* Mart., nom. cons (Apocynaceae): estudos taxonômicos..** Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia Universidade de Campinas, Campinas, 1998. p. 452.

MATOCQ, M. D.; VILLABLANCA, F. X. Low genetic diversity in endangered species: recent or historic pattern? **Biological Conservation**, v. 98, p. 61-68, 2001.

MEDRI, M. E. et al. Apresentação. In: _____ (ed.). **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina, edição dos Editores, 2002. p. 20-21.

METZGER, J. P. Estrutura da paisagem: o uso adequado de métricas. In: JUNIOR, L. C., PÁDUA, C. V.; RUDRAN, R. **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Curitiba: Ed. da UFPR, 2003. p. 667.

MORELLATO, L. P. C. **Fenologia de árvores, arbustos e lianas em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil**. Tese (Doutorado) – Universidade de Campinas, Campinas, 1991.

MUELLNER, A. N. et al. Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hipochaeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). **Molecular Ecology**, v. 14, n. 1, p. 203-212, 2005.

MULLER-STARCK, G. Genetic differences between “tolerant” and “sensitive” beeches (*Fagus sylvatica* L.) in an environmentally stressed adult forest stand. **Silvae Genetica**, v. 34, p. 241-247, 1985.

MULLER-STARCK, G. Genetic variation within European tree species. **New Forests**, v. 6, p. 23-47, 1992.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

MURCIA, C. Ecología de la polinización. In: GUARIGUATA, M. R.; KATTAN, G. H. (ed.) **Ecología y consevación de bosques Neotropicales**. Costa Rica: Libro Universitario Regional, 2002. p. 493-530.

NAMKOONG, G. Biodiversity: issues in genetics, forestry and ethics. **Forestry Chronicle**, v. 68, p. 438-443, 1991.

NASON, J. D.; HAMRICK, J. L. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. **J. Hered.**, v. 88, p. 264–276, 1997.

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

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583–590, 1978.

NOBELPRIZE – Nobelprize.org, Disponível em:
<http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/>, Acesso em: 07 fev. 2010.

NOSS, R. F.; COOPERRIDER, A. **Saving nature's legacy**: protecting and restoring biodiversity. Washington: Defenders of Wildlife and Island Press, 1994. p. 416.

NOSS, R. F.; CSUTI, B. Habitat fragmentation. In: MEFFE, G.K., CARROLL, R.C. (ed.), **Principles of conservation biology**. 2. ed., Sunderland: Sinauer, 1997. p. 269-304.

OLIVEIRA, A. A. **Diversidade, estrutura e dinâmica do componente arbóreo de uma floresta de terra firme de Manaus, Amazonas**. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

OLIVEIRA, J. R. A. **O impacto de sistemas integrados de lavouras e pastagens na biomassa-C e na atividade biológica de um Latossolo Vermelho-Escuro de Cerrado**. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília, Brasília, 2000. p. 115.

PARK, Y. S.; FOWLER, D. P. Effects of inbreeding and genetic variances in a natural population of tamarack (*Larix laricina* (Du Roi) K. Koch) in eastern **Canada**. **Silvae Genetica**, v. 31, p. 21-26, 1982.

PEIXOTO, A. L. A vegetação da Costa Atlântica. In: MONTEIRO, S.; KAZ, L. (coord.). **Floresta Atlântica**: textos científicos. Rio de Janeiro: Edições Alumbamento, 1992. p. 33-42.

PITHER, R.; SHORE, J. S.; KELLMAN, M. Genetic diversity of the tropical tree *Terminalia amazonia* (Combretaceae) in naturally fragmented populations. **Heredity**, v. 91 p. 307-313, 2003.

PRIMACK, R. B et al. Growth rates and population structure of Moraceae trees in Sarawak, east Malaysia. **Ecology**, v. 66, p. 577-588, 1985.

QUEIROGA, J. L.; RODRIGUES, E. Efeitos de borda em fragmentos de cerrado em áreas de agricultura do Maranhão. Anais. V Congresso Brasileiro de Ecologia, Porto Alegre, 2001.

RAJORA, O. P.; MOSSELER, A. Challenges and opportunities for conservation of Forest genetic resources. **Euphytica**, v. 118, p. 197-212, 2001.

RANKIN-DE-MERONA, J .M.; HUTCHINGS, R. W.; LOVEJOY, T. E. Tree mortality and recruitment over a five-year period in undisturbed upland rainforest of the central Amazon. In: GENTRY, A.H. (ed.). **Four neotropical rainforests**. New Haven and London: Yale University Press, 1990. p. 573-584.

RANTA, P. et al. The fragmented Atlantic rain Forest of Brazil: size, shape and distribution of Forest fragments. **Biodiversity and Conservation**, v. 7, p. 385-403, 1998.

RATHCKE. B. J.; JULES, E. S. Habitat fragmentation and plant-pollinator interactions. **Current Science**, v. 65, p. 273-277, 1993.

RODRÍGUEZ-CABAL, M. A., AIZEN, M. A; NOVARO, A. J. Habitat fragmentation disrupts a plant-disperser mutualism in the temperate forest of South America. **Biological Conservation**, v. 139, p. 195-202, 2007.

SALES, E. et al. Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulaceae) using RAPD markers. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 10, p. 1750-1759, 2001.

SANTOS; C. A. F.; RODRIGUES; M. A.; ZUCCHI; M. I. Variabilidade genética do umbuzeiro no Semi-Árido brasileiro, por meio de marcadores AFLP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1037-1043, ago. 2008.

SCHELLAS, J.; GREENBERG, R. **Forest patches in tropical landscapes**. Washington; Island Press, p. 426, 1997.

SCHUMUTZ, J. Phytochemische betrachtungen zum genus *Aspidosperma*. **Pharm. Acta. Helv.** v. 36, p. 103-118. 1960.

SEMA/GTZ – Secretaria de Estado do Meio Ambiente/deutsche gessellschaft für technische zusammerarbeit. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado do Paraná**. Curitiba, 1995. p. 139.

SERRANO, M. et al. Landscape fragmentation caused by the transport network in Navarra (Spain): Two-scale analysis and landscape integration assessment. **Landscape and Urban Planning**. v. 58, p. 113-123, 2002.

SHAFER, G.; PEARL, J. (ed.). **Readings in Uncertain Reasoning**. San Mateo: Morgan-Kaufmann, 1990.

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**, v. 28, p. 651-663, 2000.

SHARMA, I. K. Understanding clonal diversity patterns through allozyme polymorphism in an endangered and geographically restricted Australian shrub, *Zieria bauerlenii*, and its implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 681-695, 2001.

SOARES, F. S.; MEDRI, M. E. Alguns aspectos da colonização da bacia do rio Tibagi. Cap. 5 In: MEDRI, M. E. et al. (ed.). **A bacia do Rio Tibagi**. Londrina, edição dos Editores, 2002. p. 72-82.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides, 1989.

SOUZA, L. J. E. X. **Envenenar é mais perigoso**: uma abordagem etnográfica. 152 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997.

SOUZA, M. I. F. **Análise da diversidade genética de populações de Araucária angustifolia (Bertol.) Kuntze utilizando marcador AFLP**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Genética) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006. 111 p.

SUN, M.; WONG, K. C. Genetic structure of three archid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **Amer. J. Bot.**, v. 88, n. 12, p. 2180- 2188, 2001.

TABANEZ, A. A. J.; VIANA, V. M.; DIAS, A. S. Conseqüências da fragmentação e do efeito de borda sobre a estrutura, diversidade e sustentabilidade de um fragmento de floresta de planalto de Piracicaba, SP. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 57, p. 47-60. 1997a.

TABANEZ, A. A. J.; VIANA, V. M.; NASCIMENTO, H. E. M. Controle de cipós ajuda a salvar fragmentos de floresta. **Ciência Hoje**, v. 22, p. 58-6, 1997b.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W.; PERES, C. A. Effects of habitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biological Conservation**, v. 91, p. 119-127, 1999.

TABARELLI, M. et al. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, jul. 2005.

TANSLEY, S. A.; BROWN, C. R. RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae): implications for their conservation. **Biological Conservation**, v. 95, p. 39-48, 2000.

TARRAB, A. et al. **AFLP studies indicate a vicariance origin for populations of *Hipochaeris angustifolia* (Asteraceae: Cichorieae), an endemic species of the Atlas Mountains (Marocco)**. *New Phytologist*. 2008.

TILMAN, D.; KNOPS, J.; WENDIN, D. The influence of functional diversity and composition on ecosystem process. **Science**, v. 277, p. 1300-1302, 1997.

TOREZAN, J. M. D. Nota sobre a vegetação do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E. et al. **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina, 2002. p. 103-108.

TOREZAN, J. M. D. et al. Genetic variability of pre and post-fragmentation cohorts of *Aspidosperma polineuron* Muell. Arg. (Apocynaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2, p. 171-180, 2005.

TRINDADE, M. B. et al. A fragmentação da mata atlântica no litoral norte de Pernambuco: uma análise da estrutura da paisagem. IV Jornada de Ensino, Pesquisa e extensão da UFRPE – Recife, imprensa universitária, 2004.

TURNER, I. M.; CORLETT, R. T. The conservation value of small, isolated fragments of lowland tropical rain forest. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 330-333, 1996.

VIANA, V. M. Biologia e manejo de fragmentos florestais. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO. Campos do Jordão. **Anais**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Silvicultura/Sociedade de Engenheiros Florestais. 1990. p. 113-118.

VIANA, V. M.; TABANEZ, A. J.; MARTINEZ, J. L. A. Restauração e manejo de fragmentos florestais. In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2., 1992. Instituto Florestal de São Paulo, São Paulo, 1992. p. 400-407.

VIANA, V. M. Conservação da biodiversidade de fragmentos florestais em paisagens tropicais intensamente cultivadas. In: ABORDAGENS interdisciplinares para a conservação da biodiversidade biológica e dinâmica do uso da terra, Belo Horizonte, 1995.

VIANA, V. M.; TABANEZ, A. A. J.; BATISTA, J. L. F. Dynamics and restoration of forest fragments in the brazilian Atlantic Moist Forest. In: LAURENCE, W.F.; BIERREGARD JR, R.O. (ed.). **Tropical Forest remnants**: ecology, management and conservation of fragmented communities. The University of Chicago Press, Chicago, 1997. p. 351-365.

VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. **Serie Técnica IPEF**, v. 12, n. 32, p. 25-42, dez. 1998.

VOS, P. T. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23. p. 4407–4414, 1995.

WILLIAMS, J. G. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535. 1990.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v. 28, p. 114-138, 1943.

WRIGHT, S. J.; HUBBELL, S. P. Stochastic extinction and reserve size: a focal species analysis. **Oikos**, v. 41, p. 466-476, 1983.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v. 19, n. 3, p. 395-420. 1965.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Tree**, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

ZANGARO, W. **Micorrizas arbusculares em species arboreas nativas da bacia do Rio tibagi (PR) e suas relações com os grupos sucessionais**. 171 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

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