



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNO FERNANDES COSTA

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM
Actinostemon concolor (SPRENG.) MÜLL. ARG.
(EUPHORBIACEAE) EM REMANECENTES FLORESTAIS DO
NORTE DO PARANÁ, POR MARCADORES AFLP**

BRUNO FERNANDES COSTA

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM
Actinostemon concolor (SPRENG.) MÜLL. ARG.
(EUPHORBIACEAE) EM REMANECENTES FLORESTAIS DO
NORTE DO PARANÁ, POR MARCADORES AFLP**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas.

Londrina
2012

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C837d	<p>Costa, Bruno Fernandes. Diversidade e estrutura genética em <i>actinostemon concolor</i> (spreng.) müll. arg. (euphorbiaceae) em remanentes florestais do norte do paraná, por marcadores aflu / Bruno Fernandes Costa. – Londrina, 2012. 60 f.: il.</p> <p>Orientador: Paulo Mauricio Ruas. Disserta�o (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Gradua�o em Agronomia, 2012. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Genética florestal – Teses. 2. Marcadores biológicos – Teses. 3. Florestas - Conserva�o – Teses. 4. Degrada�o ambiental – Teses. 5. Euforbiaceae – Teses. 6. Genética de popula�es – Teses. I. Ruas, Paulo Mauricio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Gradua�o em Agronomia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 575.17:634.0.2</p>
-------	--

BRUNO FERNANDES COSTA

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM
***Actinostemon concolor* (SPRENG.) MÜLL. ARG.**
(EUPHORBIACEAE) EM REMANECENTES FLORESTAIS DO
NORTE DO PARANÁ, POR MARCADORES AFLP

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edmilson Bianchini
UEL – Londrina – PR

Dr. Eduardo Augusto Ruas
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. José Antônio Pimenta
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas
UEL – Londrina - PR

Londrina, 04 de maio de 2012

DEDICO

*Aos meus pais e irmã, pelo apoio
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina pela minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia pela oportunidade de realização do Mestrado, e à Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

À todos os professores que contribuíram com minha formação, pela amizade e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Edmilson Bianchini e ao Dr. Eduardo Augusto Ruas por aceitarem o convite e participarem da banca examinadora.

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Simões de Almeida e ao Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza, pelas valiosas considerações feitas, as quais foram imprescindíveis para a realização desse trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Mauricio Ruas e a Prof^a. Dr^a. Claudete de Fátima Ruas por todo conhecimento compartilhado.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética de Plantas, Ana, Carina, Diana, Laís, Jéssica, Marcos, Natália, Thiago, e em especial a Luana, Léo e Bruna, que sempre me ajudaram e ensinaram muito, tornando-se essenciais para a realização deste trabalho.

À todos meus grandes amigos, André, André Lengert, Christof, Fábio Chuk Norris, Felipe, Rafael Elias e Vitor Pimenta, pelos anos de convivência, conversas, discussões e por me mostrarem o valor que uma amizade tem, e que por razões únicas, estão dentro do meu peito, e jamais serão esquecidos.

Agradeço a minha namorada Rafaela não só por todo o carinho e amor recebido, mas por enfrentar comigo momentos de muita dificuldade sem se deixar abater ou desanimar um único dia sequer, mostrando pra mim o quanto ela é importante e o quanto me faz bem. Te amo!

Gostaria de agradecer também a Marcela, Marga e Homero por todo carinho e apoio e dizer que sou muito grato por tudo que vocês fizeram por mim e pela minha família no momento em que mais precisamos. Espero um dia poder retribuir tudo isso!

Agradeço a toda minha família, avós e avôs, tios e tias, primos e primas em especial aos meus pais, Jesus e Luzia, e à minha irmã, Thais, por

estarem sempre ao meu lado me dando força para seguir e alcançar os meus objetivos, por todas as oportunidades oferecidas, pelos valores ensinados, e acima de tudo pelo amor e carinho.

Por fim, agradeço a todos os meus colegas que estão sempre ao meu lado incentivando e acreditando e a todas as pessoas que de alguma forma estiveram envolvidas ao longo da realização deste trabalho de pesquisa.

*"Mude, mas comece devagar,
porque a direção é mais importante
que a velocidade."*

Clarice Lispector

COSTA, Bruno Fernandes. **Diversidade e Estrutura Genética em *Actinostemon concolor* (Spreng.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) em Remanescentes Florestais do Norte do Paraná, por Marcadores AFLP.** 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A Floresta Atlântica foi uma das maiores florestas tropicais do mundo. Entretanto, com o início da colonização do Brasil, no século XVI, esse bioma começou a ser modificado devido à sua ocupação e exploração. Essa degradação perdurou por séculos, e atualmente restam apenas 12% de sua cobertura original. Resultado disso foi a fragmentação de habitats que além de produzir mudanças drásticas em relação à vegetação, pode tornar esses habitats fragmentados em ambientes não sustentáveis. Na tentativa de minimizar os efeitos causados nas espécies pela fragmentação, alguns remanescentes foram designados áreas prioritárias para preservação, por abrigarem grande diversidade de seres vivos e aspectos culturais importantes. Neste contexto, no norte do Paraná destacam-se dois fragmentos, o Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) e o Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF) sendo que o PEMG apresenta um histórico de conservação muito mais longo que o PEMSf. Dentre as espécies arbóreas encontradas nesses fragmentos, a *Actinostemon concolor* (Spreng.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) se destaca por apresentar alta densidade e, sob o ponto de vista ecológico pode ser considerada uma espécie importante na recomposição de florestas heterogêneas degradadas. Assim, fica evidenciada a importância de uma avaliação da estrutura populacional dessa espécie. Portanto, esta pesquisa tem como objetivo investigar, utilizando a técnica de marcadores AFLP, a diversidade e estrutura genética de *A. concolor* comparando indivíduos jovens e adultos, presentes nos remanescentes biológicos do Parque Estadual Mata dos Godoy e do Parque Estadual Mata São Francisco, com o intuito de contribuir para o estabelecimento de estratégias mais eficientes, a serem empregadas em projetos de conservação e de recuperação da biodiversidade em áreas degradadas, e assim, garantir a manutenção da diversidade da espécie. Para tanto, foram utilizados marcadores AFLP para investigar a estrutura genética de duas populações de *A. concolor* com um total de 104 indivíduos, adultos e jovens, dos Parques Estaduais Mata dos Godoy e Mata São Francisco utilizando seis pares de *primers* seletivos, os quais geraram 158 marcadores. A porcentagem de locos polimórficos nos dois parques ficou próxima a 88%. O valor do coeficiente de variação foi de 11%, apresentando boa confiabilidade. A análise de agrupamento PCoA demonstrou a formação de dois grupos. Esses resultados foram confirmados pela análise Bayesiana (K=2). Entretanto, o valor de diferenciação genética entre os dois grupos ($F_{ST} = 4,72$) é considerado baixo. Esses dados sugerem que a fragmentação pode não ter ou estar afetando a diversidade genética dessa espécie, sendo que a estruturação dessas populações poderia já existir mesmo antes da fragmentação, devido à curta distância geográfica que as separa e, também, pela possibilidade de ocorrer fluxo gênico entre elas, devido aos “trampolins ecológicos” existentes entre os parques. Os níveis de conservação genética foram considerados satisfatórios e representam informações valiosas para a espécie. Este conhecimento é importante não só para subsidiar estudos mais amplos de populações de *A. concolor* em áreas degradadas mas também para avaliar os níveis de degradação genética em outras áreas, contribuindo como fonte de variabilidade genética para recuperação de áreas degradadas.

Palavras-chave: AFLP. Conservação. Áreas degradadas. Marcadores moleculares. Variabilidade genética.

COSTA, Bruno Fernandes. **Genetic Diversity and Structure in *Actinostemon concolor* (Spreng.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) in Forest Remnants of Northern Paraná, by AFLP Markers.** 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The Atlantic Rainforest was one of the largest rainforests in the world. However, with the beginning of colonization of Brazil in the sixteenth century, this biome began to be modified due to its occupation and exploitation. This type of degradation has lasted for centuries, and today only 12% of the original area remains. The result of this process of occupation was the fragmentation of habitats, which produces drastic changes in the vegetation and may convert a fragmented forest in a non-sustainable area. In an attempt to minimize the effects caused by the fragmentation of the Atlantic Rainforest, some remaining habitats have been designated as priority areas for preservation, since it harbors a great species diversity. In this context the Mata dos Godoy State Park (PEMG) and Mata São Francisco State Park (PEMSF) were studied for its high degree of conservation, even though the PEMG present an earlier history of preservation than PEMSF. Among the tree species found in these fragments, *Actinostemon concolor* (Spreng.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) is notable because it appears in high density and therefore, from the ecological stand point, can be considered an important species for the restoration of degraded heterogeneous forests. Therefore, this research aims to investigate, using the technique of AFLP markers, the diversity and genetic structure of *A. concolor*, comparing young and adult individuals, present in the PEMG and PEMSF, in order to contribute to the establishment of more efficient strategies to be employed in projects of conservation and restoration of biodiversity in degraded areas, and thus ensure the maintenance of species diversity. The study was conducted with 104 individuals, young and adults, from Mata dos Godoy State Park and Mata São Francisco State Park, using six pairs of selective primers, which generated 158 markers. The percentage of polymorphic loci to both parks was close to 88% and the coefficient of variation was 11%, demonstrating good reliability of the amplified markers. Principal Coordinates Analysis (PCoA) showed the formation of two distinct groups separating the individuals from PEMG and PEMSF. These results were confirmed by Bayesian analysis, which revealed the presence of two distinct clusters ($K = 2$). However, the value of genetic differentiation between the groups ($F_{ST} = 4.72$) is considered low. These results suggest that fragmentation may not had or be affecting the genetic diversity of this species, since the structure of these populations might already have existed even before fragmentation, due to the short geographic distance that separates them, and may still be occurring gene flow between these forest fragments because of smaller forest fragmentes between these parks that act as "Stepping Stones" for the gene flow. The genetic conservation levels were considered satisfactory and represent valuable information for the species. This knowledge is important not only for further studies with populations of *A. concolor* in degraded areas, but also to assess levels of genetic deterioration in other areas, and contribute as a source of genetic variability for the recovery of degraded areas.

Keywords: AFLP. Conservation. Degraded area. Genetic variability. Molecular markers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Ilustração demonstrativa da área total original da Mata Atlântica e os seus remanescentes florestais em 2007	17
Figura 2.2 – Mapa de localização do Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, Paraná	18
Figura 2.3 – Classes da cobertura vegetal no Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, PR.....	19
Figura 2.4 – Imagem aérea do Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, PR	20
Figura 2.5 – Mapa de localização do Parque Estadual Mata São Francisco entre os municípios de Santa Mariana e Cornélio Procópio, Paraná.....	21
Figura 2.6 – Imagem aérea do Parque Estadual Mata São Francisco, Cornélio Procópio, PR.....	22
Figura 2.7 – Ramo de um indivíduo de <i>Actnostemon concolor</i>	26
Figura 2.8 – Ramo de um indivíduo de <i>Actnostemon concolor</i> evidenciando sua inflorescência.....	27
Figura 2.9 – Esquema simplificado das etapas da técnica de AFLP	31
Figura 3.1 – Localização do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina-PR, e do Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio-PR	38
Figura 3.2 – Gráfico do Coeficiente de Variação (CV) para 158 marcadores AFLP em indivíduos de <i>Actnostemon concolor</i>	43
Figura 3.3 – Padrão eletroforético de marcadores AFLP para a espécie de <i>Actnostemon concolor</i>	43
Figura 3.4 – Imagem de satélite mostrando os fragmentos existentes entre os Parques Estaduais Mata dos Godoy (PEMG), Londrina - PR, e Mata São Francisco (PEMSF) Cornélio Procópio – PR.....	47
Figura 3.5 – Gráfico da coordenada principal baseada nas distâncias genéticas para 104 indivíduos de <i>A. concolor</i> provenientes do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina-PR, e do Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio-PR, através do software FAMD.....	48

- Figura 3.6** – Dendrograma baseado na distância genética, método UPGMA, (modificado de NEIGHBOR, procedimento de PHYLIP versão 3.5 para os indivíduos do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina-PR, e do Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio-PR.....49
- Figura 3.7** – Análise Bayesiana (K=2), para os indivíduos do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina-PR, e do Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio-PR, através do software STRUCTURE49

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Número de Indivíduos de <i>Actinostemon concolor</i> coletados para análises genéticas	38
Tabela 3.2 – <i>Primers Eco</i> e <i>Mse</i> utilizados na amplificação seletiva de <i>Actinostemon concolor</i>	40
Tabela 3.3 – Número de marcadores obtidos para cada combinação de <i>Primers Eco</i> e <i>Mse</i> utilizados para <i>Actinostemon concolor</i>	42
Tabela 3.4 – Porcentagem de locos polimórficos (P%), diversidade gênica dentro de populações (Hs), índice de Shannon (I) e diversidade genética total (Ht) para indivíduos de <i>Actinostemon concolor</i> provenientes do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina, PR. e Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio, PR., baseado em marcadores de AFLP	45
Tabela 3.5 – Análise da variância molecular (AMOVA) para a espécie <i>Actinostemon concolor</i> do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina, PR. e Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio, PR., baseada em marcadores de AFLP	46
Tabela 3.6 – Distância Genética entre pares de populações de <i>Actinostemon concolor</i> para os indivíduos jovens e adultos do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina-PR, e do Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio-PR, obtidas por marcadores AFLP, de acordo com Nei (1978).....	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Floresta Atlântica	16
2.1.1 Parque Estadual Mata dos Godoy	17
2.1.2 Parque Estadual Mata São Francisco	20
2.2 FRAGMENTAÇÃO AMBIENTAL	22
2.3 EFEITOS GENÉTICOS DA FRAGMENTAÇÃO	23
2.4 <i>ACTINOSTEMON CONCOLOR</i> (SPRENG.) MÜLL. ARG. (EUPHORBIACEAE)	25
2.5 MARCADORES MOLECULARES	27
2.5.1 Marcadores AFLP	29
3 ARTIGO: DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM <i>Actnostemon concolor</i> (SPRENG.) MÜLL. ARG. (EUPHORBIACEAE) EM REMANECENTES FLORESTAIS DO NORTE DO PARANÁ, POR MARCADORES AFLP	33
3.1 RESUMO E ABSTRACT	33
3.2 INTRODUÇÃO	34
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.3.1 Amostragem	37
3.3.2 Extração e Quantificação do Material Coletado	39
3.3.3 Reação de AFLP	39
3.3.4 Análise Estatística	41
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.5 CONCLUSÃO	50
4 CONCLUSÕES GERAIS	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica abrangia cerca de 150 milhões de hectares antes do início de sua ocupação e exploração no séc. XVI. Foi uma das maiores florestas tropicais do mundo e se apresentava em condições ambientais altamente heterogênea. Atualmente é considerada um dos ecossistemas mais ameaçados do planeta, uma vez que resta apenas cerca de 12% do total de sua cobertura original, e esses remanescente se apresentam de forma fragmentada (SOS Mata Atlântica, INPE, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009).

A fragmentação do habitat, além de produzir mudanças drásticas em relação à vegetação original, introduz um limite na paisagem, tornando-a simplificada (AIZER; FEINSINGER, 1994). Os fragmentos, quando pequenos demais, podem ser insuficientes para manter as populações de forma sustentável, tanto no aspecto ecológico como no genético (LANDE, 1988). Estas alterações no habitat podem afetar diretamente a distribuição das diferentes espécies (SILVA; CASTELETI, 2003).

Algumas pesquisas reforçam a hipótese de que tais fragmentos podem não ser auto-sustentáveis, uma vez que esta alteração da paisagem, em conjunto com a diminuição de uma área de floresta natural, pode levar à redução exponencial do número de espécies que compõem a fauna e flora locais, comprometendo assim a sustentabilidade destas florestas (VIANA; PINHEIRO, 1998). Entretanto, na tentativa de minimizar os efeitos causados nas espécies pela fragmentação, alguns remanescentes tornaram-se áreas de preservação, ou seja, áreas geralmente extensas, que podem ou não ter histórico de impactos causados pelo homem, mas que sejam dotadas de atributos abióticos e bióticos, estéticos ou culturais, e que tem como objetivo básico proteger a diversidade biológica.

No norte do Paraná destacam-se dois importantes remanescentes biológicos, o Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) e o Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF). O PEMG possui uma área de 680 hectares, enquanto o PEMSF possui área total de 832 hectares, estando, os dois, entre as maiores Unidades de Conservação do norte do Paraná. Apesar de ambos os parques, atualmente, serem circundados em quase toda extensão por áreas agrícolas, predominando as monoculturas de soja, milho e trigo, e também por pastagens, estes tem históricos de conservação diferentes. O PEMG era uma área que estava

sendo protegida e estudada mesmo antes de se tornar um parque, ou seja, é uma área que sofreu muito menos com as ações antrópicas do que o PEMSF, o qual até pouco tempo antes de se tornar um parque, era marcado por extração de madeiras e de outros elementos. Atualmente, mesmo estas áreas sendo consideradas importantes remanescentes biológicos, uma vez que são Parques Estaduais, estão sujeitas a constantes perturbações antrópicas indiretas, devido à paisagem heterogênea que as cercam.

Dentre as muitas espécies arbóreas encontradas nessas áreas, a *Actinostemon concolor* (Spreng.) Müll.Arg. (Euphorbiaceae), também chamada popularmente de laranjeira do mato, apresenta-se em alta abundância, sendo considerada um elemento importante na composição florestal. Em um estudo realizado por Bianchini *et al.*, (2003) na área alagável do PEMG, a densidade de *A. concolor* foi superior a densidade de outras áreas do mesmo fragmento, o que pode indicar maior tolerância da espécie a ambientes alagados.

As particularidades de cada espécie, são informações indispensáveis, para se compreender a interação das mesmas, com as áreas em que estão inseridas. Desta forma, parte-se do pressuposto de que para a elaboração de estratégias para conservação, ou mesmo para restauração da vegetação são necessários investimentos em pesquisas sobre fitossociologia, dinâmica populacional e, fundamentalmente, estudos genéticos. Tais estudos devem avaliar a diversidade e estrutura populacional para que possam inferir sobre o sistema reprodutivo e o número efetivo populacional (OLIVEIRA, 2000). A estrutura populacional diz respeito tanto à estrutura genética das populações, quanto à distribuição dos indivíduos no espaço, em diferentes estágios de vida. Estes estudos são muito importantes para auxiliar na determinação da diversidade genética das populações e no estabelecimento de áreas destinadas à preservação, bem como, no estabelecimento de prioridades para se realizar as intervenções e manejos (FRANKHAM; BALLOU e BRISCOE, 2008). Isso significa que estudos dessa natureza são de suma importância e podem ser utilizados como recurso para o planejamento de ações e estabelecimento de políticas de conservação da biodiversidade.

Nesse contexto, os marcadores moleculares se apresentam como uma importante ferramenta para assessorar a avaliação da diversidade e da estrutura genética. Dentre as técnicas de marcadores moleculares o AFLP (*Amplified*

Fragments Length Polymorphism) destaca-se pelo grande número de marcadores gerados por ensaio, bom poder de detecção de variabilidade genética e por apresentar boa repetibilidade (VOS *et al.*, 1995). No entanto, por serem marcadores dominantes, não permitem a identificação de heterozigotos sendo, portanto, pouco informativos por *locus*. Entretanto, os estudos de simulação mostram que o grande número de marcadores que podem ser obtidos em um ensaio com AFLP, compensa o baixo conteúdo de informação genética por *locus* (MARIETTE *et al.*, 2002).

A questão central desta pesquisa reside em saber se ações antrópicas que alteraram a paisagem no passado, e que ainda ocorrem mesmo que de forma atenuada, como o efeito de borda gerado pela diminuição ou descontinuidade da paisagem, podem ter ou estar interferindo diretamente na estruturação genética da espécie *A. concolor*.

Portanto, esta pesquisa tem como principal objetivo investigar, utilizando a técnica de marcadores AFLP, a diversidade e estrutura genética de *A. concolor* comparando indivíduos jovens e adultos, presentes nos remanescentes biológicos do Parque Estadual Mata dos Godoy e do Parque Estadual Mata São Francisco, já que hoje estas áreas são protegidas e importantes para a conservação, mas que possuem históricos de intervenções antrópicas diferentes, com o intuito de contribuir para o estabelecimento de estratégias mais eficientes, a serem empregadas em projetos de conservação e de recuperação da biodiversidade em áreas degradadas, e assim, garantir a manutenção da diversidade da espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FLORESTA ATLÂNTICA

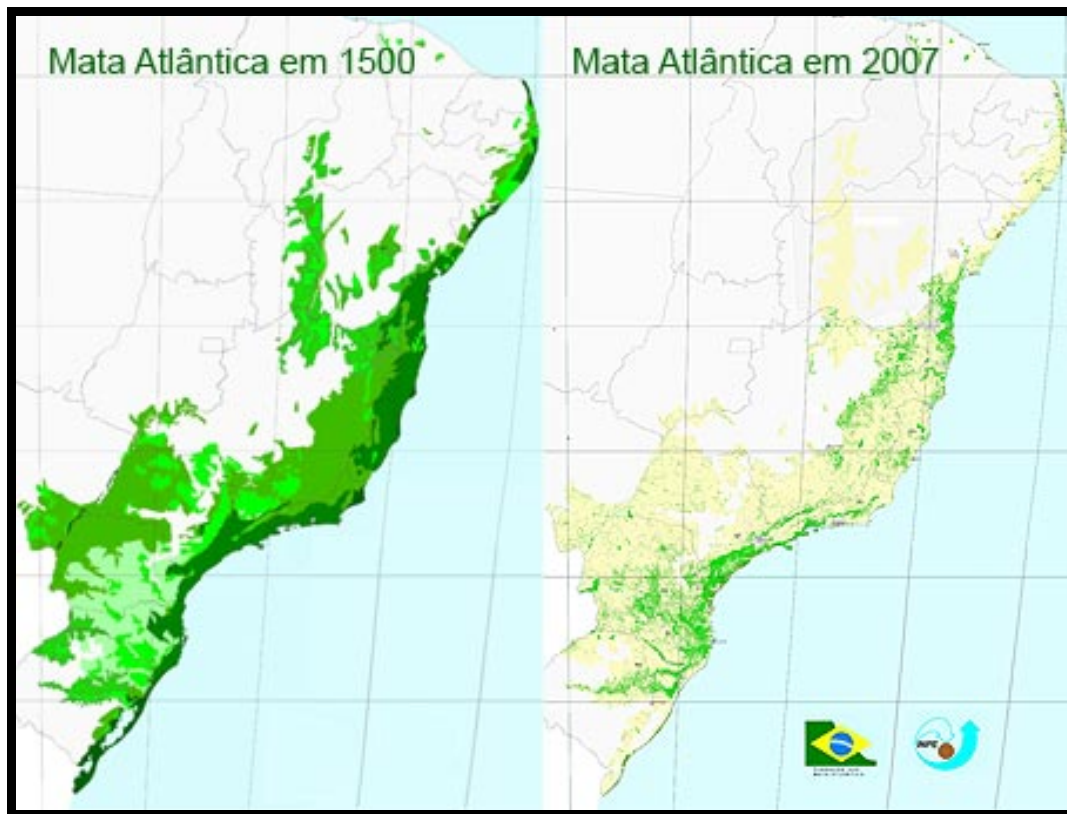
A Floresta Atlântica foi uma das maiores florestas tropicais existentes no mundo. Inicialmente, abrangia uma área em torno de 150 milhões de hectares e se apresentava em condições ambientais altamente heterogêneas (RIBEIRO, *et al.*, 2009).

Historicamente, foi a primeira floresta brasileira a receber iniciativas de ocupação pelos colonizadores. Desde então, vários ciclos econômicos se desenvolveram em seu domínio. Os resultados decorrentes de todos esses ciclos foram a perda de grande parte dessas florestas restando, atualmente, cerca de 12% do total da cobertura original (Mata Atlântica, INPE, 2008; RIBEIRO, *et al.*, 2009). Isso a coloca como um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo.

Paradoxalmente, mesmo apresentando um elevado índice de degradação, a Mata Atlântica mantém uma alta diversidade e endemismo, abrigando mais de 20.000 espécies de plantas, 261 espécies de mamíferos, 688 espécies de aves, 200 espécies de répteis e 280 espécies de anfíbios. Apesar da expressividade desses números ainda existem inúmeras espécies que necessitam de identificação e de descrição científica (GOERCK, 1997; MITTERMEIER *et al.*, 1999; SILVA; CASTELETI, 2003). A flora e fauna desse bioma podem incluir de 1 a 8% de todas as espécies existentes no mundo (SILVA; CASTELETI, 2003), sendo considerado um dos 25 “*hotspots*” da biodiversidade mundial. “*Hotspots*” se referem às biomas com alta representatividade da diversidade biológica global, porém com elevado grau de degradação, sendo um ecossistema prioritário em termos de conservação (MYERS *et al.*, 2000).

A Figura 2.1, a seguir, demonstra como se apresentava, em 2007, a área original da Mata Atlântica e dos seus remanescentes florestais.

Figura 2.1 – Ilustração demonstrativa da área total original da Mata Atlântica e os seus remanescentes florestais, em 2007



Fonte: <<http://saude-joni.blogspot.com/2011/02/ano-internacional-das-florestas-2011.html>>.

No estado do Paraná, a Mata Atlântica originalmente cobria mais de três quartos da sua superfície. Atualmente estima-se que restam apenas 2% desta cobertura natural. Na região norte do estado, a floresta se apresentava de forma contínua e, com o passar do tempo, foi reduzida a inúmeros pequenos fragmentos que totalizam menos de 1% de toda a área original (TOREZAN, 2002).

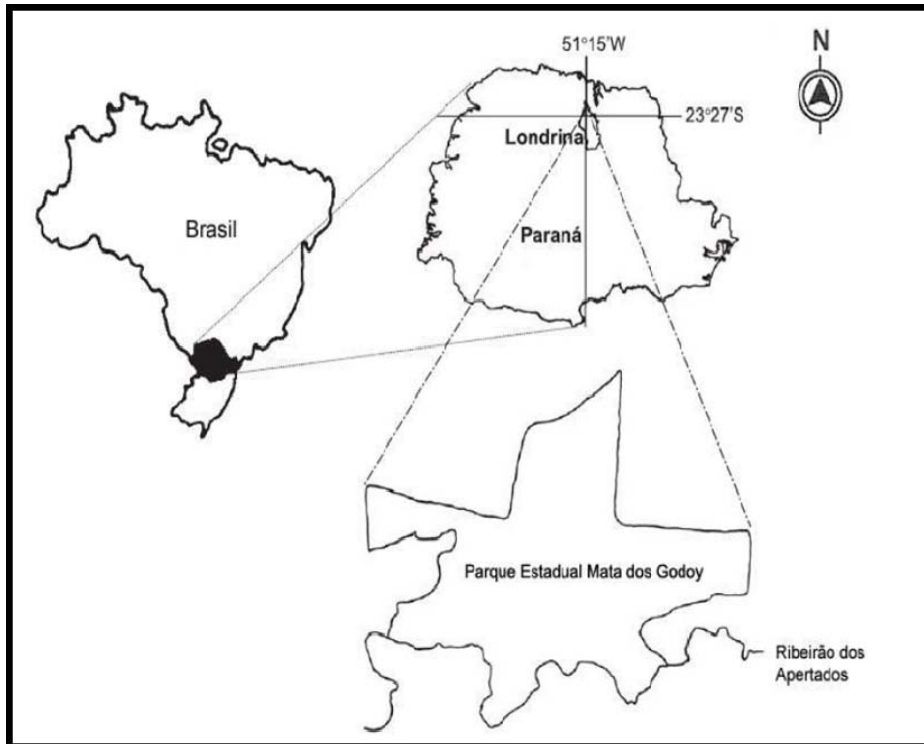
No norte do Paraná destacam-se dois importantes remanescentes biológicos, o Parque Estadual Mata dos Godoy e o Parque Estadual Mata São Francisco.

2.1.1 Parque Estadual Mata dos Godoy

O Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) foi criado pelo Decreto Estadual nº 5150 de 05 de junho de 1989, e está localizado no município de Londrina, Paraná, sul do Brasil (23°23'30"S e 51°11'05"W). Este Parque se situa a 18 km do centro da cidade, possuindo 680 hectares de floresta estacional

semidecidual em boas condições de preservação, sendo circundado por terras cultivadas, pastagens, áreas florestadas e de reflorestamento, sendo delimitado ao sul pelo Ribeirão dos Apertados (Figura 2.2), único curso de água permanente (BIANCHINI; PIMENTA; SANTOS, 2001 e SILVA; SOARES-SILVA, 2000).

Figura 2.2 – Mapa de localização do Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, Paraná



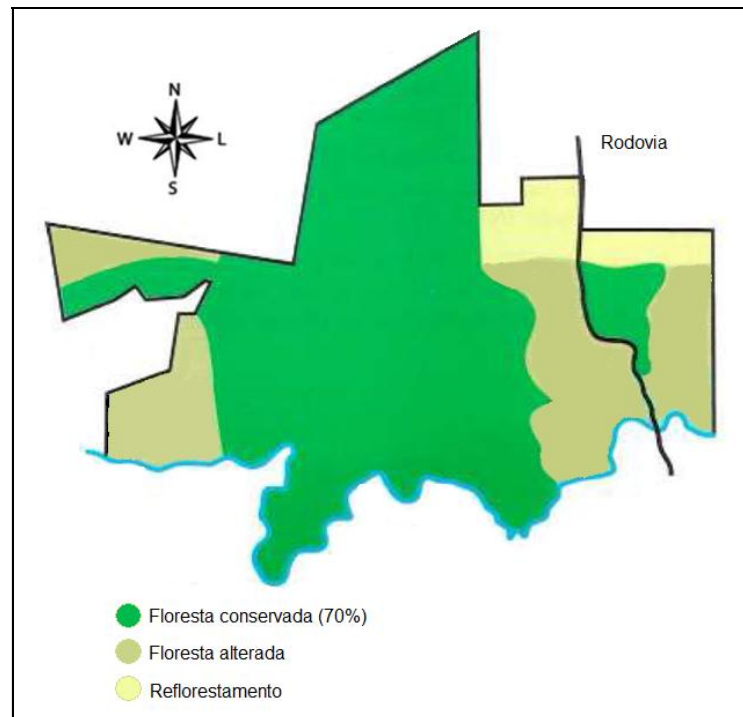
Fonte: Mapa adaptado de Sofia; Santos e Silva (2004).

A altitude do PEMG varia de 600 m, na face norte, a 500 m, na face sul (BIANCHINI *et al.*, 2003). A porção norte apresenta latossolo roxo eutrófico, profundo e bem drenado, enquanto na porção sul ocorre o latossolo roxo hidromorfizado na base (BIANCHINI; PIMENTA e SANTOS, 2006). O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cfa – clima subtropical úmido. O mês de janeiro é o mais quente do ano (média de 23,8 °C) e o mês de junho é o mais frio (média de 16,6°C) apresentando uma temperatura média anual de 20,9°C (BIANCHINI *et al.*, 2003). A precipitação média anual é de aproximadamente 1.600 mm, sendo o verão (dezembro-fevereiro) caracterizado por maior pluviosidade quando comparado ao inverno (junho-agosto).

Um levantamento fitossociológico realizado na porção norte do Parque Estadual Mata dos Godoy por Soares-Silva e Barroso (1992), mostra que as famílias com maior número de espécies foram Myrtaceae, Meliaceae, Lauraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Salicaceae que, quando somadas, representavam 53% das espécies encontradas. Este estudo incluiu todas as árvores com DAP (diâmetro a altura do peito) superior ou igual a 5 cm encontradas em uma área de 1ha, e registrou 1.471 indivíduos, reunidos em 36 famílias, 63 gêneros e 100 espécies.

O PEMG possui áreas em diferentes estágios de conservação. Aproximadamente 70% de todo o parque é composto por uma vegetação muito conservada, conforme pode ser observado nas Figuras 2.3 e na 2.4, a seguir.

Figura 2.3 – Cobertura vegetal no Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, PR



Em outra área a vegetação é dada por reflorestamento. Já outras áreas encontram-se em processo de regeneração e os indivíduos formam uma cobertura vegetal heterogênea, ora apresentando grandes clareiras, com o substrato coberto por capim colônia (*Panicum sp*), ora apresentando o dossel mais fechado, podendo-se observar regenerantes de várias espécies (CUNHA, 2006), conforme demonstra a Figura 2.4.

Figura 2.4 – Imagem aérea do Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, PR



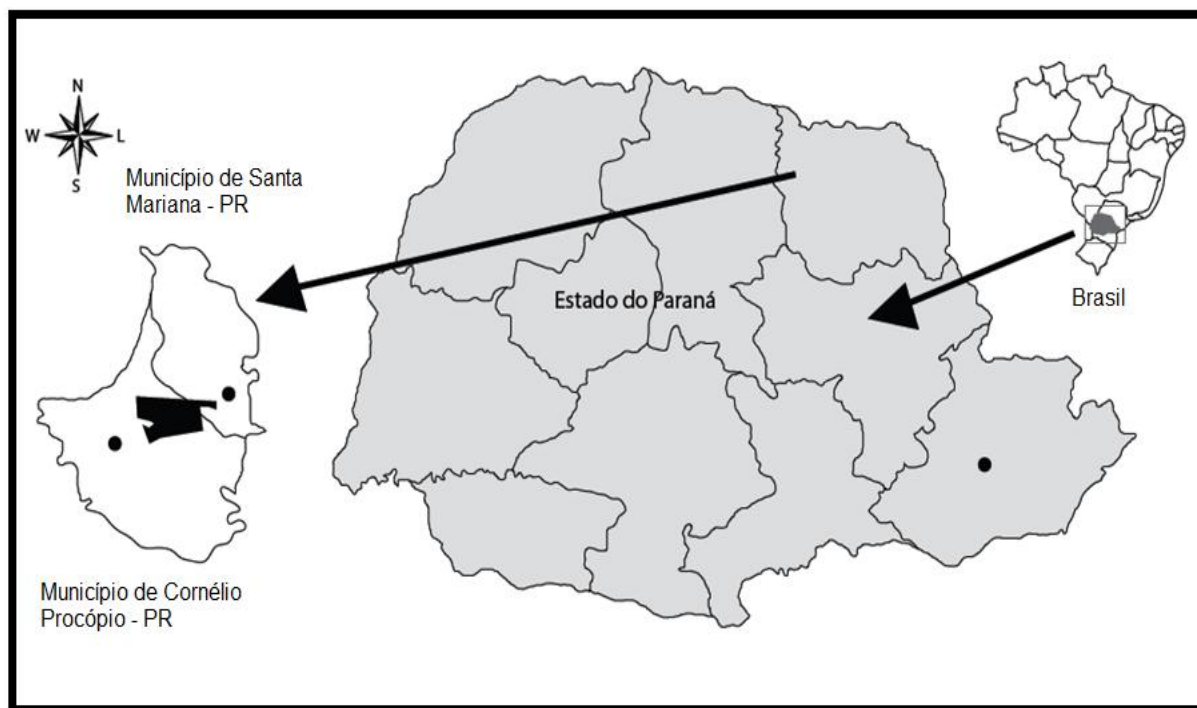
Fonte: Google Earth (2012).

2.1.2 Parque Estadual Mata São Francisco

O Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF) (Figura 2.5) foi criado a partir do decreto lei nº. 4.333 de 05.12.1994, sendo este, um remanescente de floresta estacional semidecidual, de 832,58 hectares, com altitude de 676 metros, situado entre os municípios de Cornélio Procópio e Santa Mariana, ao norte do estado do Paraná (23°18'111" S e 50°64'667" W) (CIPOLA; ZEQUI, 2011).

Esta área, que pertence a Bacia do Rio das Cinzas, foi, durante anos, intensamente explorada com a retirada desordenada de madeira e palmito, além de ter passado por diversas queimadas. Reflexo disso, esta área apresenta alguns desequilíbrios como o excesso de lianas e taquaras (TOMÉ; VILHENA, 1996).

Figura 2.5 – Mapa de localização do Parque Estadual Mata São Francisco entre os municípios de Santa Mariana e Cornélio Procópio, Paraná



Fonte: Cipola e Zequi, (2011).

O clima é Subtropical (Cfa), seguindo a classificação de Köppen. O trimestre mais frio é o dos meses de junho, julho e agosto com média de 15°C a 17°C, enquanto o mais quente é o dos meses de dezembro, janeiro e fevereiro, com valores de 26°C a 28°C. A maior média de precipitação ocorre no verão (dezembro – fevereiro) atingindo 400 a 500 mm, e a menor no inverno (junho – agosto) com média de 175 a 200 mm. A região apresenta média anual de precipitação entre 1200 e 1400 mm e a umidade relativa anual é de 70 a 75% (CIPOLA; ZEQUI, 2011). O solo é classificado como Latossolo Vermelho Distroférico e o local é circundado por culturas agrícolas (Figura 2.6) de soja (*Glycine max* (L.) Merr.), milho (*Zea mays* L.) e trigo (*Triticum* spp. (L)), e também pela espécie exótica capim colônia (*Panicum* sp.) de acordo com Cipola e Zequi, 2011.

Figura 2.6 – Imagem aérea do Parque Estadual Mata São Francisco, Cornélio Procopio, PR



Fonte: Google Earth (2012).

2.2 FRAGMENTAÇÃO AMBIENTAL

A fragmentação de ambientes introduz uma série de mudanças e de novos fatores na história evolutiva de populações naturais de plantas e animais. Essas mudanças afetam os parâmetros demográficos de mortalidade e natalidade de diferentes espécies e, portanto, interferem na estrutura e na dinâmica das comunidades. No caso de espécies arbóreas, fatores como a alteração na abundância de polinizadores, dispersores, predadores e patógenos, podem modificar as taxas de estabelecimento de novas plântulas, já que influenciam no número de sementes e na dispersão das mesmas (LAURANCE *et al.*, 1997).

O grau de prejuízos causados pela fragmentação irá depender de uma série de atributos, classificados em espaciais e ecológicos. Entre os atributos espaciais, temos o efeito de borda, que é específico para cada caso e pode acarretar uma série de distúrbios ecológicos como o aumento da temperatura e a diminuição da umidade. Outros atributos importantes são a área, a forma e a relação perímetro/área do fragmento, que estão fortemente relacionados com o grau de perturbação causado pelo efeito de borda. A conectividade entre os fragmentos, a heterogeneidade de habitats e a paisagem ao qual o fragmento está inserido

também interferem e determinam se os danos serão amenos ou intensos (COLLINGE, 1996).

A justificativa para este interesse é a constatação de que grande parte da biodiversidade se encontra localizada em pequenos fragmentos florestais, pouco estudados e historicamente marginalizados pelas iniciativas conservacionistas (GRADWOHL; GREENBERG, 1991). Porém, faltam dados a respeito de isolamento, mudanças no tamanho populacional e redução da cobertura vegetal, que afetam a manutenção de níveis de diversidade genética dentro de espécies, e de como esses aspectos interferem em processos genéticos, como cruzamento, fluxo gênico e seleção, conforme salientam Young, Boyle e Brown (1996).

2.3 EFEITOS GENÉTICOS DA FRAGMENTAÇÃO

Young e Boyle (2000) sintetizam os principais efeitos genéticos da fragmentação florestal como sendo: a perda de diversidade genética por populações e espécies, a mudança na estrutura interpopulacional, deriva genética e o aumento da endogamia. A deriva genética e endogamia resultam na diminuição do tamanho efetivo populacional, tendo como uma das principais consequências a perda da variabilidade genética e a redução da heterozigosidade, respectivamente. A perda de variabilidade genética resulta na diminuição da possibilidade das populações resistirem a mudanças ambientais, levando muitas espécies a atingirem uma limitação evolutiva (BARRET; KOHN, 1991; HELDRICK; MILLER, 1992; ELLSTRAND; ELAM, 1993; FRANKHAN, 1995).

Segundo Tabarelli e Gascon (2005), a fragmentação de habitats representa o passo inicial para a modificação da paisagem natural, sendo que grande parte da degradação ecológica resulta de fatores como perda de habitat, efeito de borda e uso de solo na matriz circundante. Tais fatos trazem, como principais consequências, as alterações nas relações entre as espécies, o colapso da biomassa, diminuição da biodiversidade e a extinção das espécies não adaptadas às novas condições do ambiente. Além disso, impede o fluxo gênico, restringe o tamanho efetivo populacional (TURNER, 1996; ALVAREZ-BUYLLA *et al.*, 1996; LAURANCE; BIERREGARD, 1997), propicia a reprodução entre indivíduos aparentados, ou entre menor número de indivíduos e colonização de espécies exóticas (ELLSTRAND; ELAM, 1993).

A variabilidade genética é a “matéria-prima” que possibilita as mudanças evolutivas de uma espécie (MAMURIS; SFOUGARIS e STAMATIS, 2001; PITHER; SHORE e KELLMAN, 2003). Populações com pouca variabilidade genética podem ser incapazes de responder às mudanças ambientais (JONES; GLIDDON e GOOD, 2001; MATOCQ; VILLABLANCA, 2001) que resulta em baixo potencial evolutivo provocando a redução do *fitness* (adaptabilidade) da espécie (BOUZAT, 2001; MATOCQ; VILLABLANCA, 2001).

Porém, baixa diversidade genética nem sempre implica em risco de extinção, e tal condição pode não ter sido causada por ação antrópica. Muitos endemismos, por exemplo, podem ser explicados por refúgios de glaciações (FUTUYMA, 1997). Muitas espécies parecem “conviver” com a baixa variabilidade genética ou com populações reduzidas de distribuição muito restrita (COATES; ATKINS, 2001; FLEISHMAN *et al.*, 2001), desde que as condições do ambiente se mantenham constantes.

Amos e Balmford (2001) afirmam que perdas de variabilidade genética de até 25% em populações florestais não afetam a capacidade destas em manter o processo evolutivo e, conseqüentemente, a capacidade de adaptação às alterações ambientais.

Independente do padrão de diversidade genética de cada espécie, a manutenção da variabilidade genética é considerada essencial para a preservação do potencial evolutivo das espécies e para sua sobrevivência em longo prazo (TANSLEY; BROWN, 2000), assim como para a aplicação de técnicas de manejo nas florestas e estabelecimento de ações de conservação *in situ* (KAGEYAMA; GANDARA, 1993).

Em populações naturais, a variabilidade genética pode ser tanto perdida quanto acrescida por processos naturais. Os processos que podem introduzir variabilidade continuamente nas populações são basicamente dois: mutação e fluxo gênico, e esta variabilidade pode ser perdida por deriva genética e seleção natural (COLE, 2003).

A perda da variabilidade genética pela fragmentação de habitats pode ocorrer devido à redução do tamanho populacional criando, assim, gargalos genéticos, nos quais indivíduos remanescentes participam apenas com uma pequena parcela da amostra do conjunto gênico original para a formação de novas populações. Caso a população que teve seu tamanho reduzido permaneça isolada

por muitas gerações, poderá haver ainda perda contínua de alelos devido à ocorrência de deriva genética (BARRET; KOHN, 1991; CHARLESWORTH; CHARLESWORTH, 1987).

O aumento da utilização dos recursos florestais, em face da perda gradual da diversidade biológica (KAGEYAMA, 1987), confere grande importância ao estudo da variabilidade genética em florestas naturais. O estudo em áreas nativas é essencial para que se tenha compreensão destas complexas relações do comportamento ecológico dos seres no ecossistema. A regeneração das espécies tropicais dá-se através da chuva de sementes (sementes dispersadas recentemente), através do banco de sementes do solo (sementes dormentes no solo), através do banco de plântulas (plântulas estabelecidas no chão da floresta), e através da formação de bosque (emissão rápida de brotos e/ou raízes provenientes de indivíduos danificados) (GARWOOD, 1989). A recolonização, pela vegetação, de um ambiente perturbado ocorre principalmente através dos bancos de sementes no solo, mantendo este um papel fundamental no equilíbrio dinâmico da floresta (SCHMITZ, 1992). O banco de sementes no solo refere-se a todas as sementes viáveis no solo ou associadas à serapilheira para uma determinada área num dado momento. É um sistema dinâmico com entrada de sementes através da chuva de sementes e dispersão, podendo ser transitório, com sementes que germinam dentro de um ano após o início da dispersão, ou persistente, com sementes que permanecem no solo por mais de um ano (CALDATO *et al.*, 1996). Esta persistência personifica segundo Simpson; Leck e Parker (1989), uma reserva do potencial genético acumulado.

Dessa forma, a conservação e o manejo da biodiversidade mesmo em áreas protegidas, constituem-se em um desafio complexo que requer o conhecimento básico sobre a distribuição e riqueza de espécies, a biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações (ZUCCHI, 2002).

2.4 *ACTINOSTEMON CONCOLOR* (SPRENG.) MÜLL. ARG. (EUPHORBIACEAE)

Apesar da importância ecológica das espécies vegetais nesses fragmentos as informações, quando disponíveis, são em sua maioria referentes à morfologia. Sendo assim, pouco se sabe da biologia reprodutiva ou dos polinizadores ligados a elas e até das relações ecológicas estabelecidas com outras

espécies. Isto reforça a necessidade de mais estudos, visando preencher tais lacunas de conhecimento.

A espécie *Actinostemon concolor* é conhecida popularmente como laranjeira do mato. Esta espécie é considerada uma árvore de folhas simples, alternas, lisas e brilhantes, apresentando glândulas no limbo foliar, próximas à base, ocorrendo principalmente em áreas de sub-bosque (Figura 2.7). É uma planta esciófita e seletiva higrófito que ocorre preferencialmente no interior das florestas pouco alteradas, situadas em solos úmidos, no início das encostas e em solos rochosos do alto das encostas (REITZ, 1988).

Figura 2.7 – Ramo de um indivíduo de *Actinostemon concolor*



Fonte: http://www.ib.usp.br/labtrop/guiamatinha/pagina%20plantas/Actinostemon_pagina/actinostemon_concolor.html

A espécie *A. concolor*, floresce de agosto a setembro e frutifica de setembro até novembro (PERINA, 2011) (Figura 2.8). Segundo Yamamoto, Kinoshita e Martins (2007), a espécie não apresenta especificidade de polinização, sendo polinizada por pequenos insetos, como vespas, abelhas, moscas, borboletas, mariposas e besouros, que visitam flores morfologicamente pouco especializadas. Quanto à dispersão dos frutos, estes mesmos autores, sugerem que eles são dispersos principalmente por animais (zoocoria). Entretanto, outros autores sugerem que a dispersão ocorre por autocoria (SILVA; RODAL, 2009; PERINA, 2011).

Figura 2.8 – Ramo de um indivíduo de *Actinostemon concolor* evidenciando sua inflorescência



Fonte: http://www.ib.usp.br/labtrop/guiamatinha/pagina%20plantas/Actinostemon_pagina/actinostemon_concolor_flores.html

2.5 MARCADORES MOLECULARES

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico do DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Neste sentido, as técnicas de biologia molecular permitem observar o polimorfismo diretamente no DNA. Os marcadores moleculares abrem novas perspectivas para as pesquisas de biologia populacional e de conservação de espécies, e têm sido largamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Existem muitas maneiras de acessar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma determinada espécie. Historicamente, até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos. A disponibilidade de marcadores morfológicos era essencialmente restrita as poucas espécies de plantas utilizadas como sistemas modelos para o estudo de genética (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Com a introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas, ainda na década de 60, iniciou-se a era dos marcadores moleculares ampliando, assim, o número de marcadores que poderiam ser utilizados. Com a aplicabilidade dessa técnica os estudos passaram a incluir, potencialmente, todas as espécies de plantas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Com os avanços na biologia molecular, surgiram diversas técnicas para detecção de variabilidade genética diretamente na sequência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Os marcadores moleculares referem-se a diferenças observadas entre indivíduos nas suas sequências de nucleotídeos ao longo da fita de DNA e podem ser classificados como dominantes e co-dominantes. Em termos gerais, informações sobre a variabilidade genética existente entre e dentro de populações são fundamentais para se fazer inferências sobre diversos processos envolvidos na manutenção de diversidade, tais como: endogamia, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural. A obtenção de dados a partir de marcadores moleculares baseados em polimorfismos de DNA tem se tornado uma forma eficiente de gerar informações para um grande número de indivíduos, populações e espécies (CIAMPI, 1999).

Os marcadores de DNA mais utilizados em estudos genéticos de plantas são: *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e microssatélites ou sequências simples repetidas (SSR), de acordo com Ferreira e Grattapaglia (1998). Outros marcadores também são utilizados com bons resultados no estudo genético de plantas, como por exemplo, os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismos de Base Única), que se caracterizam por mutações pontuais. A priori, os SNPs, podem ser bi, tri ou tetra alélicos, ou seja, possuírem duas, três ou quatro formas diferentes, porém, os dois últimos tipos são extremamente raros. As variações mais frequentes são substituições entre bases nitrogenadas de mesma característica estrutural (A/G ou G/A e C/T ou T/C), que são chamadas de transições. As outras substituições são conhecidas com transversões (GALVES, 2006).

Estes marcadores podem diferir, entre si, com respeito a características, tais como: abundância genômica, nível de polimorfismo detectado,

informação genética, especificidade dos *loci*, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimentos financeiros (BUSO *et al.*, 2003).

2.5.1 Marcadores AFLP

Os marcadores de AFLP (“*Amplified Fragment Length Polymorphism*”) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados representam uma tecnologia para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos ao longo dos genomas de procariotos e eucariotos. A técnica de AFLP 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, 1998), revelando *locos* dispersos pelo genoma sem exigência de conhecimento prévio das sequências-alvo ou de uso de sondas para hibridização (LOPES *et al.*, 2002).

A técnica de AFLP consiste essencialmente em quatro etapas (VOS *et al.*, 1995):

1ª Etapa: Clivagem do DNA genômico

Nesta etapa, são utilizadas duas enzimas de restrição, uma de corte raro que reconhece e corta seis pares de bases (ex. *EcoRI*) e uma de corte frequente que reconhece apenas quatro pares de bases (ex. *MseI*). Dessa forma, vários cortes são feitos ao longo do genoma, podendo gerar três tipos de fragmentos: fragmentos grandes, resultantes do corte com a enzima de corte raro; fragmentos pequenos, originados pelo corte com a enzima de corte frequente e fragmentos de tamanho intermediário resultado da combinação da enzima de corte raro e frequente.

2ª Etapa: Ligação de adaptadores

Na segunda etapa, adaptadores específicos serão ligados as extremidades clivadas, uma vez que, são complementares às extremidades resultantes da clivagem pelas enzimas de restrição. Estes adaptadores possuem de vinte a trinta pares de bases, e as sequências são 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 difícil a resolução de fragmentos individuais, mesmo em gel de alta resolução. Assim, após a ligação dos adaptadores é feita uma diluição de 10 a 20 vezes de acordo com o material estudado.

3ª Etapa: Pré-seletivo

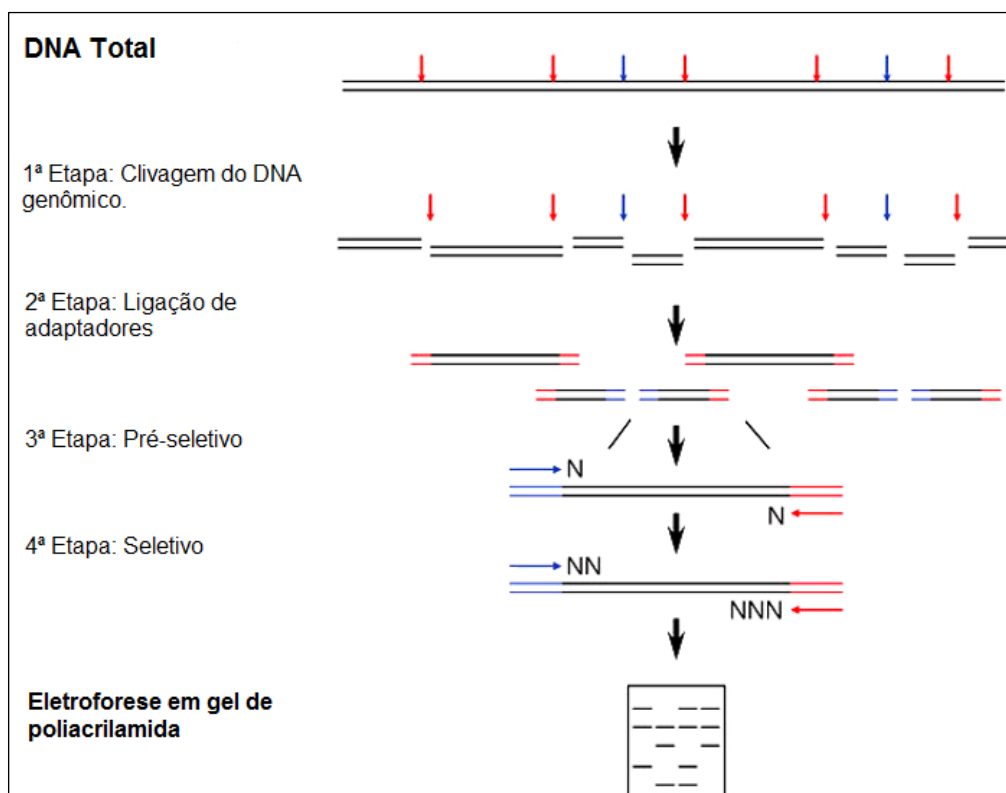
Na terceira etapa é realizada uma amplificação pré-seletiva dos fragmentos usando *primers* complementares aos adaptadores inseridos, com mais um nucleotídeo seletivo adicional na extremidade 3', que se pareia com o primeiro nucleotídeo localizado logo após o sítio original de restrição para uma seleção branda. Nesta etapa, apenas fragmentos ligados aos adaptadores que contenham esta base adicional serão amplificados, limitando assim o número de fragmentos.

4ª Etapa: Seletivo

Nesta etapa é feita uma nova seleção dos fragmentos que serão amplificados via PCR, através da utilização de *primers* que contenham dois ou mais nucleotídes seletivos, desta forma, restringindo ainda mais o número de fragmentos amplificados, e assim, tornando possível a resolução e visualização de marcadores individuais. Os fragmentos amplificados são separados em eletroforese de gel de poliacrilamida para posterior análise.

O esquema simplificado das etapas da técnica de AFLP pode ser visualizado na Figura 2.9, a seguir:

Figura 2.9 – Esquema simplificado das etapas da técnica de AFLP



Fonte: Adaptado de Chial (2008).

Uma das principais vantagens dos marcadores AFLP é o fato de não ser necessário o conhecimento do genoma da espécie a ser estudada. A técnica de AFLP é muito eficiente na amostragem ampla e simultânea de um genoma. 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). A maior robustez do AFLP, quando comparado ao RAPD, se deve ao fato de que na técnica de AFLP utiliza-se *primers* mais longos nas etapas de PCR, aumentando significativamente a especificidade da amplificação e, assim, evitando a competição que ocorre durante a PCR na técnica de RAPD (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; VOS *et al.*, 1995).

Por ser um marcador dominante, assim como o RAPD, esta técnica apresenta um baixo conteúdo de informação por *locus* (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; VOS *et al.*, 1995), no entanto ela é simples e relativamente

barata. Por isto, é amplamente utilizada em diversos estudos biogeográficos e de diversidade genética (SOUZA, 2006).

3 ARTIGO

DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM *Actinostemon concolor* (SPRENG.) MÜLL. ARG. (EUPHORBIACEAE) EM REMANECENTES FLORESTAIS DO NORTE DO PARANÁ, POR MARCADORES AFLP

3.1 RESUMO E ABSTRACT

Resumo: A Floresta Atlântica foi uma das maiores florestas tropicais do mundo, mas atualmente restam apenas 12% dessa cobertura, devido a sua exploração e ocupação a partir do século XVI. Resultado disso foi a fragmentação de habitats que além de produzir mudanças drásticas em relação à vegetação, pode tornar os habitats fragmentados não sustentáveis. *Actinostemon concolor* (Spreng.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae) é uma espécie arbórea comumente encontrada em florestas estacionais semidecíduais. Sob o ponto de vista ecológico pode ser considerada uma espécie importante na recomposição de florestas heterogêneas degradadas, uma vez que tem alta densidade em diversos fragmentos. Nesta pesquisa foram utilizados marcadores AFLP para investigar a estrutura genética de duas populações de *A. concolor*. O estudo foi realizado com 104 indivíduos, adultos e jovens, dos Parques Estaduais Mata dos Godoy e Mata São Francisco, utilizando seis pares de *primers* seletivos, os quais geraram 158 marcadores. A porcentagem de locos polimórficos nos dois parques ficou próxima a 88%. O valor do coeficiente de variação foi de 11%, apresentando boa confiabilidade. A análise de agrupamento PCoA demonstrou a formação de dois grupos. Esses resultados foram confirmados pela análise Bayesiana (K=2). Entretanto, o valor de diferenciação genética entre os dois parques ($F_{ST} = 4,72$) é considerado baixo. Esses dados sugerem que a fragmentação pode não ter ou estar afetando a diversidade genética dessa espécie, sendo que a estruturação dessas populações poderia existir antes mesmo da fragmentação, devido à curta distância geográfica que as separa, e também pela possibilidade de estar ocorrendo fluxo gênico entre elas, devido aos “trampolins ecológicos” existentes entre os parques. Os níveis de conservação genética foram considerados satisfatórios e representam informações valiosas para a espécie. Este conhecimento é importante não só para estudos mais amplos de populações de *A. concolor* em áreas degradadas, mas também, para avaliar os níveis de degradação genética em outras áreas, contribuindo como fonte de variabilidade genética para recuperação dessas áreas.

Palavras-chave: AFLP. Conservação. Áreas degradadas. Marcadores moleculares. Variabilidade genética.

Abstract: The Atlantic Rainforest was one of the largest rainforests in the world. However, with the beginning of colonization of Brazil in the sixteenth century, this biome began to be modified due to its occupation and exploitation. This type of degradation has lasted for centuries, and today only 12% of the original area remains. *Actinostemon concolor* (Spreng.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae) is a tree species commonly found in seasonal semideciduous forests and from the ecological stand point, can be considered an important species for restoration of degraded heterogenous forests. In this study AFLP markers were used to investigate the genetic structure of two populations of *A. concolor*. The study was conducted with 104 individuals, young and adults, from Mata dos Godoy State Park (PEMG) and Mata São Francisco State Park (PEMSF), using six pairs of selective primers, which generated 158 markers. The coefficient of variation was 11%, demonstrating good reliability of the amplified markers. The percentage of polymorphic loci from both parks was close to 88%. Principal Coordinates Analysis (PCoA) showed the formation of two groups. These results were confirmed by Bayesian analysis, which revealed the presence of two clusters ($K = 2$). However, value of genetic differentiation between the groups PEMG and PEMSF ($F_{ST} = 4.72$) is considered low. These results suggest that fragmentation may not had or be affecting the genetic diversity of this species, since the structure of these populations might already have existed even before fragmentation, due to the short geographic distance that separates them, and may still be occurring gene flow between these forest fragments because of smaller forest fragmentes between these parks that act as "Stepping Stones" for the gene flow. The genetic conservation levels were considered satisfactory and represent valuable information for the species. This knowledge is important not only for further studies with populations of *A. concolor* in degraded areas, but also to assess levels of genetic deterioration in other areas, and contribute as a source of genetic variability for the recovery of degraded areas.

Keywords: AFLP. Conservation. Degraded area. Genetic variability. Molecular markers.

3.2 INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica foi uma das maiores florestas tropicais existentes no mundo. Inicialmente, abrangia uma área em torno de 150 milhões de hectares e se apresentava em condições ambientais altamente heterogêneas (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Historicamente foi a primeira floresta brasileira a receber iniciativas de ocupação pelos colonizadores. Desde então, vários ciclos econômicos se desenvolveram em seu domínio. Os resultado decorrente de todos esses ciclos foi a perda de grande parte dessas florestas restando, atualmente, cerca de 12% do total da cobertura original, que se encontram isoladas em fragmentos (SOS Mata Atlântica, INPE, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009).

A fragmentação de ambientes introduz mudanças na história evolutiva de populações naturais de plantas e animais, modificações essas, que afetam os parâmetros demográficos de mortalidade e natalidade de diferentes espécies e, portanto, interferem na estrutura e na dinâmica de ecossistemas. No caso de espécies arbóreas, fatores como a alteração na abundância de polinizadores, dispersores, predadores e patógenos, podem modificar as taxas de estabelecimento de novas plântulas, já que influenciam no número de sementes e na dispersão das mesmas (LAURANCE *et al.*, 1997). Neste contexto, os remanescentes biológicos protegidos por lei com a finalidade de preservação ambiental são imprescindíveis para salvaguardar a biodiversidade ainda existente.

No norte do Paraná destacam-se dois importantes remanescentes biológicos de Floresta Atlântica: o Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG) e o Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF). Apesar de ambos os parques, atualmente, serem circundados em quase toda a sua extensão por áreas agrícolas, estes tem históricos de conservação bastante diferentes. O PEMG é uma área que estava sendo protegida e estudada mesmo antes de se tornar, legalmente, um parque, ou seja, é uma área que sofreu muito menos com as ações antrópicas do que o PEMSF, que até a pouco tempo, era marcado por extração de madeiras e de outros elementos naturais.

Dessa forma, a conservação e o manejo da biodiversidade mesmo em áreas protegidas, constituem-se em um desafio complexo que requer o conhecimento básico sobre a distribuição e abundância no número de espécies, sua biologia reprodutiva e a estrutura genética de suas populações (ZUCCHI, 2002).

A espécie *Actinostemon concolor*, conhecida popularmente como laranjeira do mato, é uma espécie arbórea que ocorre, principalmente, em áreas de sub-bosque e floresce no período de agosto a janeiro. É uma planta esciófita e seletiva higrófito que ocorre preferencialmente no interior das florestas primárias situadas em solos úmidos, no início das encostas e em solos rochosos do alto das encostas (REITZ, 1988). Segundo Yamamoto e colaboradores (2007), essa espécie é polinizada por pequenos insetos, como vespas, abelhas, moscas, borboletas, mariposas e besouros, que visitam flores morfológicamente pouco especializadas. Os frutos são dispersos predominantemente por autocoria (PERINA, 2011), no entanto, isto não impossibilita uma dispersão secundária realizada por animais (SILVA; RODAL, 2009).

Portanto, esta pesquisa tem como principal objetivo investigar, utilizando a técnica de marcadores AFLP, a diversidade e estrutura genética de *A. concolor* comparando indivíduos jovens e adultos, presentes nos remanescentes biológicos do Parque Estadual Mata dos Godoy e do Parque Estadual Mata São Francisco, situados no norte do estado do Paraná. Hoje, estas áreas são protegidas e importantes para a conservação, embora possuam históricos de intervenções antrópicas diferentes. Os resultados da pesquisa têm como intuito contribuir para o estabelecimento de estratégias mais eficientes, a serem empregadas em projetos de conservação e de recuperação da biodiversidade em áreas degradadas e, assim, garantir a manutenção da diversidade da espécie.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Define-se por marcador molecular todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico do DNA. As técnicas de biologia molecular permitem observar o polimorfismo diretamente no DNA. Os marcadores moleculares abriram novas perspectivas para as pesquisas de biologia populacional e de conservação de espécies, e têm sido largamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética de acordo com Ferreira e Grattapaglia (1995, 1998).

Os avanços da biologia molecular trouxeram diversas técnicas para detecção de variabilidade genética, diretamente na sequência de DNA, e melhor entendimento sobre o polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Os marcadores moleculares referem-se a diferenças observadas entre indivíduos nas suas sequências de nucleotídeos ao longo da fita de DNA e podem ser classificados como dominantes e co-dominantes. Em termos gerais, as informações sobre a variabilidade genética, existente entre e dentro de populações, são fundamentais para se inferir sobre diversos processos envolvidos na manutenção de diversidade, tais como: endogamia, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural. A obtenção de dados a partir de marcadores moleculares baseados em polimorfismos de DNA tem se tornado uma forma eficiente de gerar informações para um grande número de indivíduos, populações e espécies (CIAMPI, 1999).

3.3.1 Amostragem

Amostras de folhas de 104 indivíduos de *A. concolor* foram coletadas aleatoriamente dentro do perímetro do PEMG e PEMSf (Figura 3.1), mantendo uma distância mínima de 10 m entre espécimes visando diminuir o risco de coletar indivíduos aparentados (Tabela 3.1). As amostras foram armazenadas em sílica para posterior extração do DNA.

Figura 3.1 – Localização do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina-PR, e do Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio-PR

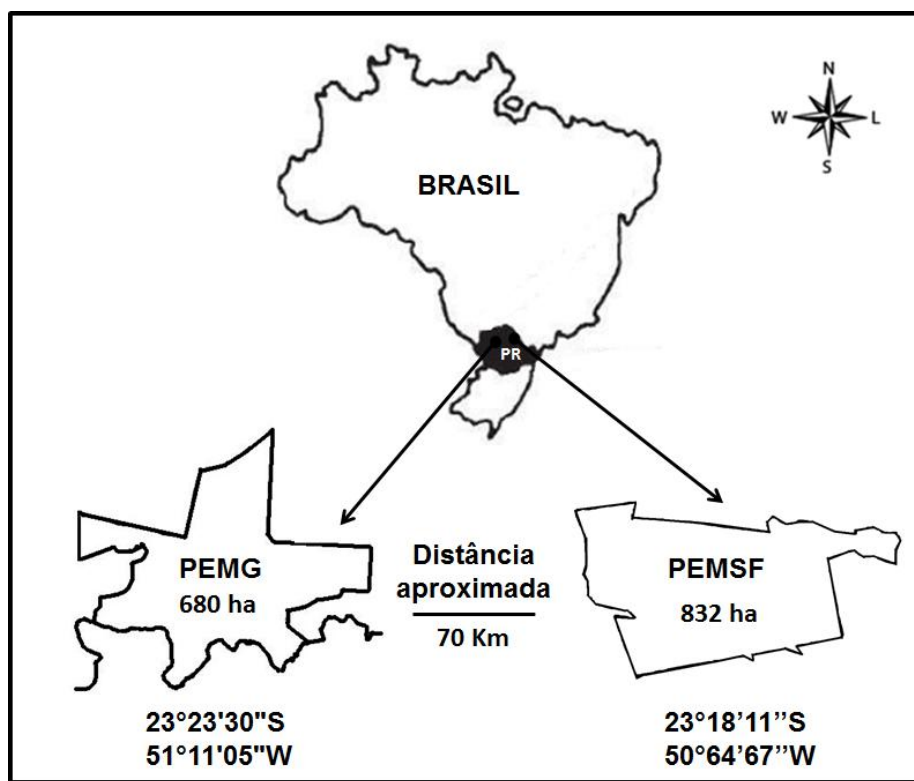


Tabela 3.1 – Número de Indivíduos de *Actnostemon concolor* coletados para análises genéticas

Espécie	Estágio/Local	N Amostral	Coordenadas Geográficas	Tamanho aproximado do Fragmento
<i>A. concolor</i>	Adultos/PEMG	27	23°23'30"S e 51°11'05"W	680 ha
	Jovens/PEMG	27		
	Adultos/PEMSF	26	23°18'11"S e 50°64'667"W	832 ha
	Jovens/PEMSF	24		

3.3.2 Extração e Quantificação do Material Coletado

As extrações de DNA de cada indivíduo foram realizadas segundo protocolo CTAB de Doyle e Doyle (1987). As concentrações de DNA foram estimadas por meio de gel de agarose 1%, utilizando-se como padrão lambda DNA (Promega).

3.3.3 Reação de AFLP

Os marcadores moleculares AFLP foram utilizados para determinar a variabilidade genética seguindo o protocolo adaptado por Vos *et al.* (1995).

O DNA genômico foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*, em uma reação contendo DNA (concentração de aproximadamente 700ng), 17,25 µL de H₂O Milli-Q, 5,0 µL de Tampão Mse 10X, 0,5 µL da enzima *MseI* (5 unidades) e 0,25 µL da enzima *EcoRI* (5 unidades). A reação de digestão foi colocada em estufa a uma temperatura constante de 37°C por 17 horas.

Posteriormente, os fragmentos gerados foram ligados às sequências adaptadoras específicas, complementares às extremidades clivadas pelas duas enzimas.

As sequências de adaptadores utilizadas para a ligação nas pontas cortadas foram: Primers Adaptadores *EcoRI*: 5'CTCGTAGACTGCGTACC3' / 5'AATTGGTACGCAGTCTAC3' e Primers Adaptadores *MseI*: 5'GACGATGAGTCCTGAG3' / 5'TACTCAGGACTCAT3'.

Em cada amostra após a digestão, foram acrescentados 4,8 µL de H₂O Milli-Q, 1,0 µL do adaptador *EcoRI* (5 mM), 1,0 µL do adaptador *MseI* (50 mM), 1,0 µL de tampão T4 DNA ligase, 0,2 µL da enzima T4 DNA ligase, 0,5 µL de BSA 1ng/ml, 1,0 µL NaCl 0,5 M e 0,5 µL de DTT. As amostras foram incubadas em termociclador em um ciclo de 3 horas a 37°C, 30 min a 17°C, 10 min a 70°C e 10 min a 4°C. Após esta etapa, as amostras foram visualizadas em gel de agarose 1,0% para avaliar se ocorreu a digestão e ligação com os adaptadores.

Em 25 µL de restrição-ligação (clivado e ligado aos adaptadores) foi adicionado 75 µL de H₂O Milli-Q. Para a reação de pré-seleção, foram adicionados 1,92 µL de H₂O Milli-Q, 4,5 µL de Green Taq Master Mix (Promega), 0,58 µL de

Primer Pré-seletivo e 3,0 µL de produto da restrição-ligação. A pré-seleção foi realizada com iniciadores contendo uma base seletiva, *Eco-A /Msel-C*.

A pré-amplificação foi realizada de acordo com a seguinte programação: um ciclo 72°C por 2 min, vinte ciclos de 90°C por 1 seg, 56°C por 30 seg e 72°C por 2 min e um ciclo final de 60°C por 30 min. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos seis vezes e armazenados a - 20°C.

Os produtos da PCR de pré-amplificação seletiva foram utilizados como moldes na segunda reação, denominada amplificação seletiva, na qual foram utilizados iniciadores com dois e três nucleotídeos seletivos adicionados à extremidade 3' dos iniciadores. Na amplificação seletiva, foi adicionado 0,54 µL do primer seletivo *EcoRI*, 0,54 µL do primer seletivo *Msel*, 3,5 µL de Green Taq Master Mix (Promega), 2,0 µL DNA pré-amplificado e 3,42 µL de H₂O Milli-Q. Para a amplificação foi utilizado o seguinte programa: um ciclo 94°C por 2 min, 65°C por 30 seg e 72°C por 2 min; oito ciclos de 94°C por 1 seg, 64°C por 30 seg e 72°C por 2 min; vinte e três ciclos de 94°C por 1 seg, 56°C por 30 seg e 72°C por 2 min e um ciclo final de 60°C por 30 min.

As combinações de *primers* utilizados, com um total de seis *primers*, estão descritas na Tabela 3.2. Os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilaminada a 7% e corados com nitrato de prata.

Tabela 3.2 – *Primers Eco* e *Mse* utilizados na amplificação seletiva de *Actnostemon concolor*

Combinação	Primer Eco	Primer Mse
1	A-CG	C-AA
2	A-CG	C-AG
3	A-CG	C-TC
4	A-GC	C-AA
5	A-GC	C-ATA
6	A-GC	C-TC

3.3.4 Análise Estatística

Os géis foram analisados visualmente e os marcadores obtidos, através das seis combinações de *primers*, foram assim identificados: para presença de bandas (1) ou ausência (0). Sendo que estes dados foram importados para diversos *softwares* para análise. O *software* DBOOT v 1.1 (COELHO, 2001a) foi aplicado nos dados para verificar o coeficiente de variação (CV) para o número de marcadores amplificados, gerando um parâmetro para determinar a confiabilidade nos resultados das análises estatísticas. A porcentagem de locos polimórficos (P%), a diversidade gênica de Nei (1978) (H_s), o Índice de Shannon-Wiener (I) foram calculadas para as quatro populações (Jovens e Adultos dos dois parques) utilizando o programa POPGENE versão 1.32 (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). Análise da Coordenada Principal baseada nas distâncias genéticas de Nei (1978) foi realizada com o uso do *software* FAMD (SCHÜTER; HARRIS, 2006). A matriz de distância para a espécie foi calculada com o *software* POPGENE versão 1.32 (YEH *et al.*, 2000), sendo o dendrograma construído com o emprego do método UPGMA, baseado na distância genética de Nei (1978), (modificado de NEIGHBOR, procedimento de PHYLIP versão 3.5 (FELSENSTEIN, 1993).

O método “bootstrap” foi aplicado para avaliar o grau de confiança do dendrograma, usando o *software* BOOD, versão 3.0 (COELHO, 2001b). Outra metodologia baseada no método de agrupamento Bayesiano foi usada, para verificar se o número de agrupamentos formados pelas subpopulações (K) é o mais apropriado para interpretação dos dados, sem informação prévia do número de locais em que cada indivíduo foi amostrado. Esta análise foi feita através do *software* STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHANS; DONNELLY, 2000).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

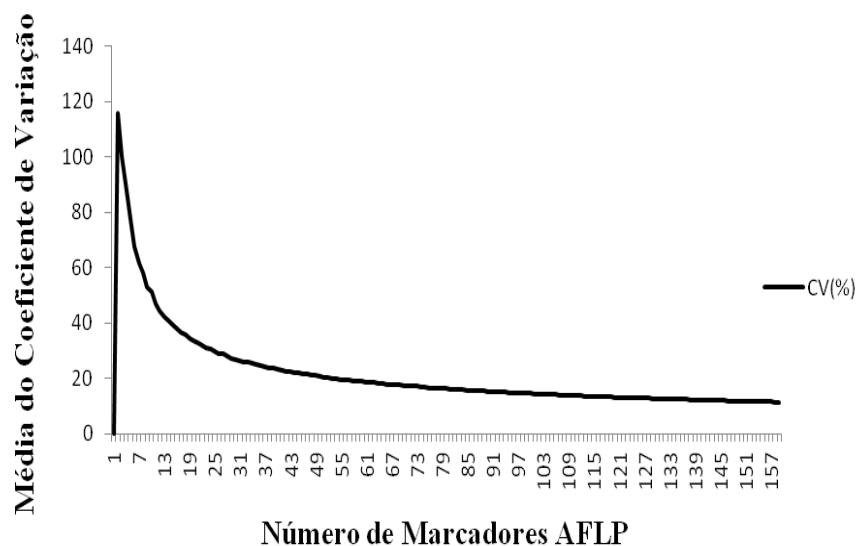
Neste trabalho foram utilizadas seis combinações de *primers* seletivos em *A. concolor* para os 104 indivíduos provenientes dos dois Parques Estaduais localizados na região norte do estado do Paraná, Brasil. As combinações renderam um total de 158 marcadores, com números variáveis de marcadores por combinação de *primers*, conforme mostrado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Número de marcadores obtidos para cada combinação de *Primers Eco* e *Mse* utilizados para *Actinostemon concolor*

Combinação	Primer Eco	Primer Mse	Número de Marcadores
1	A-CG	C-AA	32
2	A-CG	C-AG	30
3	A-CG	C-TC	25
4	A-GC	C-AA	23
5	A-GC	C-ATA	29
6	A-GC	C-TC	19
Média			26,33
Total			158

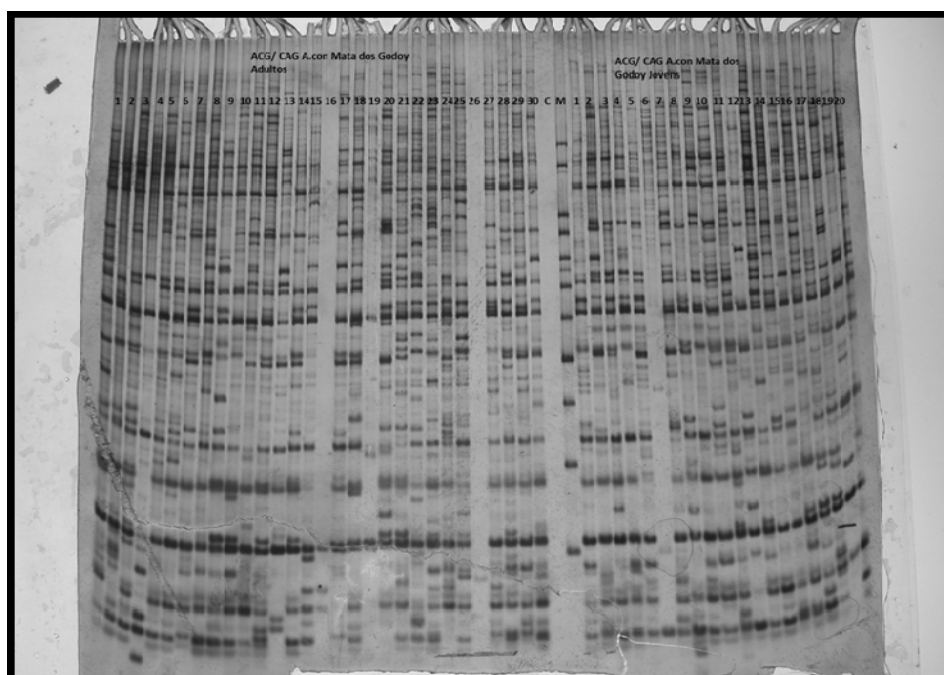
O coeficiente de variação (CV) obtido foi de 11%. Segundo Sebbenn *et al.*, (1998), o valor considerado ótimo para o CV é próximo a 7%, sendo que um valor acima disso poderia indicar a necessidade de inclusão de novas combinações para se obter um maior número de marcadores e conseqüentemente uma maior confiabilidade dos dados. Entretanto, o CV encontrando neste trabalho, mesmo sendo de 11%, demonstra boa confiabilidade, uma vez que a curva do gráfico atingiu uma estabilidade, assegurando a qualidade dos dados na Figura 3.2, a seguir.

Figura 3.2 – Gráfico do Coeficiente de Variação (CV) para 158 marcadores AFLP em indivíduos de *Actnostemon concolor*



O tamanho dos fragmentos amplificados variou, em média, entre 100 a 700 pb. A Figura 3.3 ilustra o padrão de marcadores AFLP obtido com a combinação de *primers EcoRI-ACG/MseI-CAG* em indivíduos de *A. concolor*.

Figura 3.3 – Padrão eletroforético de marcadores AFLP para a espécie de *Actnostemon concolor*



A porcentagem de locos polimórficos (P%) para os indivíduos de *A. concolor* do PEMG foi de 87,34 enquanto para os do PEMSf foi de 88,61. Este índice permite estimar a frequência dos alelos na população, e tem sido utilizado em alguns trabalhos com populações naturais, e estimar a diversidade genética intrapopulacional (ALEXANDER; LISTON; POPOVICH, 2004; XIA *et al.*, 2007). Em um trabalho com *Euterpe edulis*, realizado por Cardoso *et al.*, (2000), observou-se uma proporção de cerca de 92% de locos polimórficos ao se analisar cinco combinações de *primers* AFLP. Em outro trabalho realizado com as espécies arbóreas *Hura crepitans* e *Samanea saman* em fragmentos da Venezuela, foram encontrados resultados muito semelhantes (91,7% e 90,9% respectivamente), sendo que estes níveis foram considerados elevados (NASSAR; GARCÍA-RIVAS; GONZÁLEZ-CARCACÍA, 2011). A porcentagem de locos polimórficos para *A. concolor* (88%), foi maior que a encontrada por Tambarussi *et al.* (2008), estudando *Piptadenia gonoacantha* (74,74%) e é muito semelhante a encontrada por Brandão (2008), para a espécie *Myrcia splendens* (89,7%) em um sistema corredor-fragmento semidecidual no sul de Minas Gerais. Os valores encontrados neste trabalho indicam que *A. concolor* apresenta níveis considerados altos de variação genética. Cavalli e Winge (2003), explica que o polimorfismo mostrado pelas análises com o marcador AFLP é resultante de diversos tipos de mutações que levam à perda ou ganho de um local de restrição reconhecido pelas enzimas utilizadas na digestão, ou pela alteração da sequência reconhecida pelos nucleotídeos dos iniciadores.

Para determinação da diversidade genética, foram utilizados o Índice de Shannon (I), Índice de Diversidade Gênica (H_S) (Nei, 1978) e a Diversidade Genética Total (H_T). Os índices de diversidade genética apresentam a diversidade contida dentro de cada população, sendo que este parâmetro pode ser influenciado pelo tamanho efetivo das populações, cuja redução poderia igualmente reduzir esses índices (PIRY *et al.*, 1999). A H_S variou de 0,2072 para os indivíduos jovens do PEMSf a 0,2185 para os indivíduos adultos do PEMG. A H_T foi de 0,2308, enquanto o I foi de 0,3583 e 0,3675 para o PEMSf e PEMG, respectivamente (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 – Porcentagem de locos polimórficos (P%), diversidade gênica dentro de populações (H_s), índice de Shannon (I) e diversidade genética total (H_t) para indivíduos de *Actinostemon concolor* provenientes do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina, PR e Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio, PR, baseado em marcadores de AFLP

População	P%	H_s	I
Adultos PEMG	81,65	0,2185	0,3468
Jovens PEMG	82,91	0,2146	0,3397
TOTAL PEMG	87,34	0,2311	0,3675
Adultos PEMSf	81,65	0,2089	0,3337
Jovens PEMSf	81,65	0,2072	0,3327
TOTAL PEMSf	88,61	0,2228	0,3583

H_s Média = 0,2123

H_t = 0,2308

Os índices de diversidade genética obtidos para *A. concolor* quando comparados com outros estudos indicam a existência de uma boa diversidade gênica em ambos os Parques Estaduais. Bergamo (2011) encontrou uma diversidade gênica média, $H_s = 0,217$, nas populações amostradas da espécie arbórea *Parapipitadenia rígida* em fragmentos florestais da região Sul do Brasil, sendo este valor muito próximo ao encontrado em *A. concolor* (média de 0,2123). Lowe *et al.* (2004), estudando populações da espécie *Swietenia macrophylla*, encontraram $H_s = 0,0671$ em populações que sofrem e sofreram com o processo antrópico e conseqüentemente a fragmentação e a retirada de madeira e $H_s = 0,1515$ para a mesma espécie em uma área cercada por montanhas e mais conservada da floresta tropical na Costa Rica. Esses estudos mostram que embora tenha ocorrido um processo de fragmentação no habitat da espécie, esta conseguiu manter sua diversidade gênica alta, indicando que a fragmentação pode não ter afetado seriamente sua estrutura genética.

O índice de Shannon varia de 0 a 1 e quanto mais próximo a zero, menor é a diversidade (ESTOPA *et al.*, 2006; DAMASCENO *et al.*, 2011), realizaram um estudo com *Aspidosperma polyneuron* utilizando marcadores AFLP, em um fragmento florestal no norte do Paraná, e encontraram um valor médio do Índice de Shannon de 0,51. Estopa *et al.*, (2006), estudando a espécie arbórea *Eremanthus erythropappus* na região de Minas Gerais encontraram um valor de $I = 0,58$. Esses dois valores são superiores ao obtido no presente estudo ($I = 0,36$), entretanto, o

nível de diversidade genética da espécie pode ser considerado bom, já que ela ainda mantém altas taxas de polimorfismo e diversidade gênica nas duas populações analisadas. O fato de não haver diferenças significativas de diversidade para as populações de *A. concolor* provenientes de áreas com históricos e intensidades de degradações diferentes, pode ser devido ao fato de que essa espécie não possui importância econômica significativa.

Uma das consequências da fragmentação de populações naturais é a limitação evolutiva de espécies devido à perda da variabilidade genética. De acordo com Couvet (2002), tais alterações se refletem nos processos de deriva genética, fluxo gênico e seleção natural, os quais são processos determinantes do grau de diversidade genética da espécie. Para *A. concolor* a perturbação nos ambientes é recente e as alterações gênicas ainda não apareceram ou, ainda, as áreas dos fragmentos são suficientemente grandes e estão conectadas a outras áreas mantendo, assim, um fluxo gênico e, conseqüentemente, uma diversidade gênica nas populações analisadas.

A diversidade gênica encontrada em *A. concolor* foi particionada em diversos grupos a partir da análise de variância para dados moleculares (AMOVA) aplicados aos marcadores de AFLP (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Análise da variância molecular (AMOVA) para a espécie *Actinostemon concolor* do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina, PR e Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio, PR, baseada em marcadores de AFLP

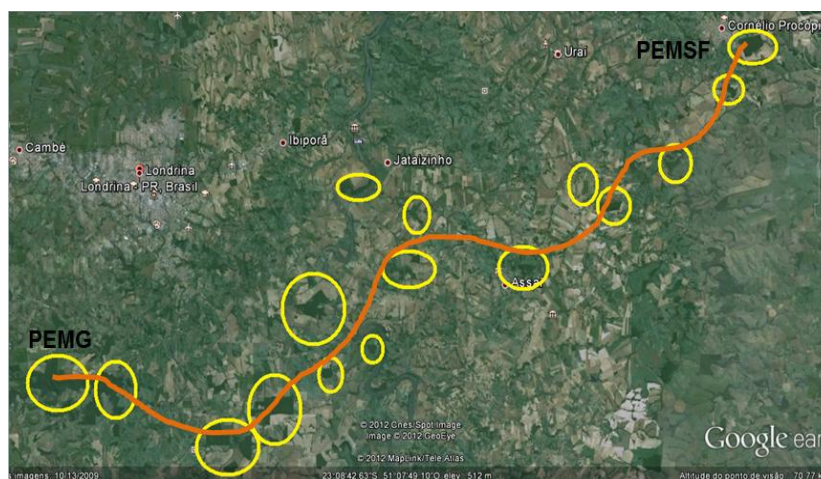
Comparações	Componentes de variância (%)			
	Dentro de grupos	Entre grupos	F_{ST}	P valor
Todas as populações	93,18	6,82	0,0683	$p \leq 0,001$
PEMG (Total) x PEMSf (Total)	95,28	4,72	0,0472	$p \leq 0,001$
PEMG (Adultos) x PEMSf (Adultos)	91,71	8,29	0,0829	$p \leq 0,001$
PEMG (Jovens) x PEMSf (Jovens)	90,82	9,18	0,0918	$p \leq 0,001$
PEMG (Adultos) x PEMG (Jovens)	96,65	3,35	0,0335	$p \leq 0,001$
PEMSf (Adultos) x PEMSf (Jovens)	96,25	3,75	0,0375	$p \leq 0,001$
TOTAL (Adultos) x TOTAL (Jovens)	98,32	-1,68	-0,0168	0,6813

Nota: Teste de significância realizado através de 1.023 permutações.

Foi observado, que a variação genética é maior dentro de populações 95,28%, do que entre populações, 4,72%. Uma maior variação genética dentro de populações, associada a altos níveis de *loci* polimórficos, indicam que as plantas possuem fecundação cruzada ou mista, conforme observado por Hamrick e Godt (1989), sendo assim, é possível inferir que *A. concolor* se encaixe neste grupo.

O valor de diferenciação genética entre os grupos PEMG e PEMSf ($F_{ST} = 4,72$) é considerado baixo indicando que mesmo com a fragmentação ocorrida na região Norte do Paraná, não houve uma grande diferenciação genética entre as populações de *A. concolor* localizadas nos dois parques. Além disso, pode fornecer uma estimativa do fluxo gênico aparente, mostrando que entre as duas populações ainda há uma troca de genes ao longo das gerações (HARTL; CLARK, 2010). Estes níveis de diferenciação atingem seu máximo quando comparamos somente indivíduos jovens entre os Parques, no qual a diferenciação genética fica em torno de 9%, mas ainda assim é considerado um valor baixo. Os baixos valores de F_{ST} podem estar relacionados com a proximidade entre o PEMG e o PEMSf, e ao fato de que as populações são oriundas de um mesmo *pool* gênico original, já que um século atrás estes dois parques faziam parte da mesma mancha de floresta. Outro fato que deve ser levado em consideração é que pode haver fluxo gênico entre as populações, mesmo que pequeno. Isso por que os fragmentos são separados por uma distância de aproximadamente 70 km. Observando a Figura 3.4, é possível notar que existem fragmentos menores entre os parques.

Figura 3.4 – Imagem de satélite mostrando os fragmentos existentes entre os Parques Estaduais Mata dos Godoy (PEMG), Londrina - PR, e Mata São Francisco (PEMSf) Cornélio Procópio – PR

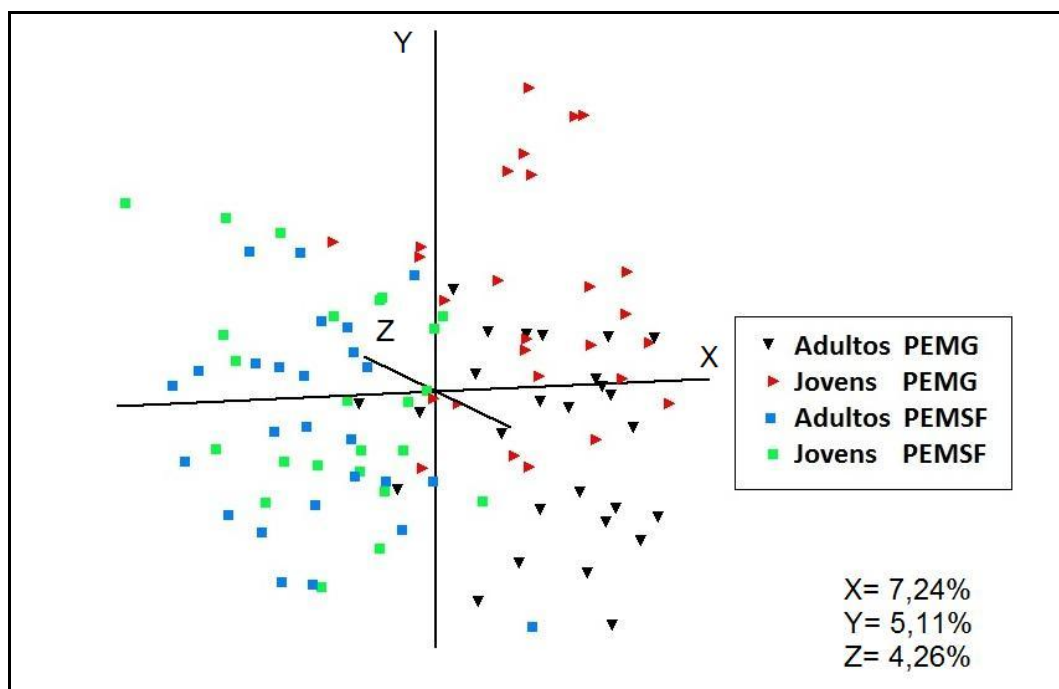


Fonte: Google Earth (2012).

Estes fragmentos menores entre os parques podem funcionar como *Stepping stones* (“*trampolins ecológicos*”), ou seja, pequenas áreas de habitat dispersas pela paisagem, as quais podem facilitar o fluxo de animais, a polinização e a dispersão de sementes, entre o PEMG e o PEMSf, contribuindo para uma manutenção do fluxo gênico.

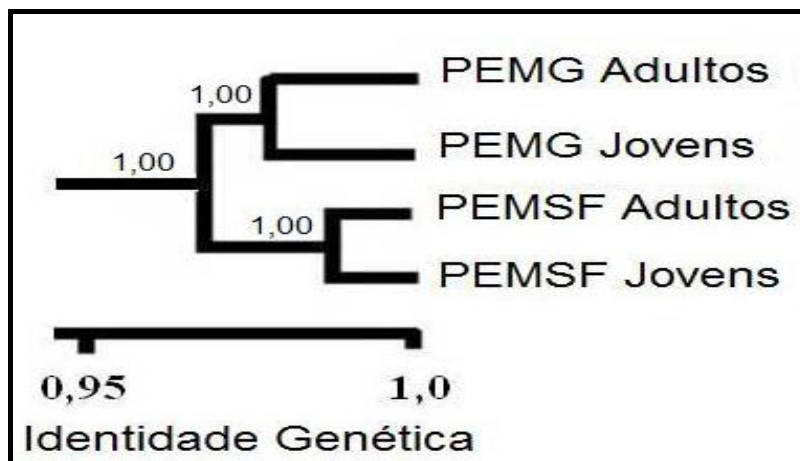
A partir da análise da coordenada principal observa-se que os quatro grupos estudados, apresentaram estruturação genética, sendo possível visualizar a formação de dois grupos. Um representado pelos indivíduos jovens e adultos do PEMG e o outro pelos indivíduos jovens e adultos do PEMSf (Figura 3.5). No entanto, como a distância genética é baixa, pode-se inferir que a estruturação dessas populações poderia já existir mesmo antes da fragmentação, devido à distância física que as separa. Resultado similar foi obtido através do dendrograma (Figura 3.6).

Figura 3.5 – Gráfico da coordenada principal baseada nas distâncias genéticas para 104 indivíduos de *A. concolor* provenientes do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina-PR, e do Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSf), Cornélio Procópio-PR, através do software FAMD



Fonte: Nei (1978), Schüter e Harris (2006).

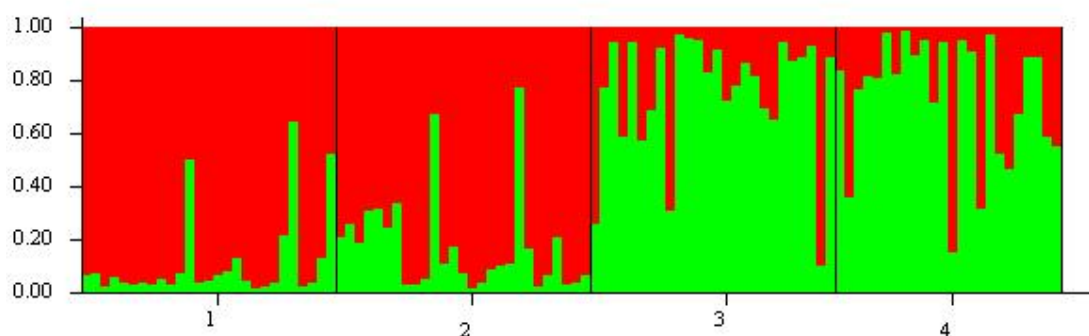
Figura 3.6 – Dendrograma baseado na distância genética, método UPGMA, (modificado de NEIGHBOR, procedimento de PHYLIP versão 3.5 para os indivíduos do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina-PR, e do Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio-PR



Fonte: Nei (1978) e Felsenstein (1993).

Estes resultados são todos corroborados pelos dados da análise Bayesiana, os quais demonstraram um K igual a 2 (Figura 3.7), separando os Parques em grupos.

Figura 3.7 – Análise Bayesiana (K=2), para os indivíduos do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina-PR, e do Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio-PR, através do software STRUCTURE



Fonte: Pritchard et al. (2000).

Além da hipótese da existência de “*trampolins ecológicos*”, citada anteriormente, pode-se também ponderar que a fragmentação foi decorrente da intensificação da ocupação da região pela agricultura em função da terra fértil, que acabou reduzindo a Floresta Estacional Semidecidual à pequenos e esparsos fragmentos florestais (ANJOS, 1998). No entanto, ainda não resultou em perda de

diversidade genética em *A. concolor*, possivelmente devido a alguns atributos relacionados às características intrínsecas à espécie, tais como, modo de reprodução, polinizadores e dispersores, ciclo e história de vida. Estes atributos podem ter contribuído para a manutenção da variabilidade gênica, observada pelos elevados valores de locos polimórficos e diversidade gênica, explicando, assim, a baixa diferenciação existente entre indivíduos adultos e jovens. A variabilidade encontrada dentro das populações avaliadas (93,18%) está de acordo com a afirmação de Loveless e Hamrick (1984), de que o registro de maior variabilidade dentro das populações do que entre elas é típico de espécies que apresentam mecanismos eficientes de polinização e/ou de dispersão de sementes.

A Distância Genética mostrou que as maiores distâncias ocorrem entre amostras provenientes de Parques diferentes (~0,0305), quando comparadas às amostras provenientes de mesmo Parque, (Tabela 3.6) o que corrobora os valores de F_{ST} . Este resultado mostra que o fluxo gênico ocorre predominantemente dentro das populações, ou seja, entre os indivíduos jovens e adultos de cada parque.

Tabela 3.6 – Distância Genética entre pares de populações de *Actinostemon concolor* para os indivíduos jovens e adultos do Parque Estadual Mata dos Godoy (PEMG), Londrina-PR, e do Parque Estadual Mata São Francisco (PEMSF), Cornélio Procópio-PR, obtidas por marcadores AFLP

Estágio/Local	PEMG adultos	PEMG jovens	PEMSF adultos	PEMSF jovens
PEMG adultos	****			
PEMG jovens	0,0189	****		
PEMSF adultos	0,0303	0,0301	****	
PEMSF jovens	0,0343	0,0276	0,0173	****

Fonte: Nei (1978).

3.5 CONCLUSÃO

Estes resultados demonstram que o Parque Estadual Mata dos Godoy e Parque Estadual Mata São Francisco estão bem conservados para a espécie *A. concolor*, e que não há diferença significativa entre as gerações de jovens e adultos, indicando que estes locais podem contribuir como um reservatório natural de diversidade genética para *A. concolor*. Este estudo é importante não só para o conhecimento da estrutura genética, nos locais amostrados, mas também

para estudos comparativos com populações de *A. concolor* em locais perturbados, avaliando o nível de degradação da variabilidade genética nessas outras áreas. Este estudo contribui, também, para demonstrar a importância dos parques como fonte de diversidade genética para futuros projetos de recuperação de áreas degradadas, através da coleta de sementes.

4 CONCLUSÕES GERAIS

As populações de *A. concolor* analisadas se encontram bem conservadas conforme demonstram os elevados valores de porcentagem de locos polimórficos e diversidade genética intrapopulacional. As alterações ambientais provocadas pela fragmentação não alteraram, aparentemente, a variabilidade genética da espécie em estudo, mesmo levando em consideração o alto grau de desmatamento no Estado do Paraná. Pode-se inferir, então, que isso ocorre porque os Parques Estaduais Mata dos Godoy e Mata São Francisco apresentam tamanho suficiente para manutenção do fluxo gênico, dentro destas populações, através dos polinizadores e dispersores, garantindo diversidade maior dentro das populações do que entre as mesmas.

Os resultados sugerem que essas populações conservadas têm alto potencial para compor programas de conservação genética, de recuperação de áreas degradadas e formação de bancos de germoplasma para a espécie estudada. O conhecimento gerado contribui, ainda, para se direcionar esforços de forma mais efetiva na recuperação de populações *da A. concolor*.

Essas conclusões gerais obtidas são importantes não somente para este estudo, mas, também, para estudos posteriores com *A. concolor* em outras áreas o que contribui para a avaliação do nível da degradação genética em outras regiões.

REFERÊNCIAS

- AIZER, M. A.; FEINSINGER, P. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco Dry Forest, Argentina. **Ecology**. v. 75, n. 2, p. 330-351, mar. 1994.
- ALEXANDER, J.A.; LISTON, A.; POPOVICH, S. Genetic diversity of the narrow endemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 91, n. 12, p. 2004-2012, dez. 2004.
- ALVAREZ-BUYLLA, E. R. et al. Demographic and genetics models in conservation biology: Applications and perspectives for tropical rain forest tree species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 27, p. 387-721, 1996.
- AMOS, W.; BALMFORD, A. When does conservation genetics matter? **Heredity**, v. 87, n. 3, p. 257-265, 2001.
- ANJOS, L. Consequências biológicas da fragmentação no norte do Paraná. **Série Técnica IPEF**, Londrina, v. 12, n. 32, p. 87-94, dez. 1998.
- BARRET, S. C. H.; KOHN, J. R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: FALK, D. A.; HOLSINGER, K. E. (Ed.). **Genetic and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 3-30.
- BÉRGAMO, L. S. Estrutura genética de populações de *Parapiptadenia rigida* (Benth) Brenan (Leguminosae-Mimosoideae) na região Sul do Brasil por marcadores AFLP. 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado em Genética Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.
- BIANCHINI, E., PIMENTA, J.A; SANTOS, F. A. M. Spatial and temporal variation in the canopy cover in a tropical semi-deciduous forest. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 44, n. 3, 269-276. 2001.
- BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; SANTOS, F. A. M. Fenologia de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichler) Engl. (Sapotaceae) em floresta semidecídua do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 595-602, out./dez. 2006.
- BIANCHINI, E. *et al.* Diversidade e estrutura de espécies arbóreas em área alagável do município de Londrina, Sul do Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 405-419, jul./set. 2003.
- 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.
- BRANDÃO, M. M. **Diversidade Genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no Sul de Minas Gerais**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BUSO, G. S. C. et al. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Circular Técnica**, 2, p. 1-11, set. 2003.

CALDATO, S. L. et al. Estudo da regeneração natural, banco de sementes e chuva de sementes na reserva genética florestal de Caçador, SC. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 6, n. 1, p. 27-38. 1996.

CARDOSO, S. R. S. et al. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v.9, n.11, p.1753- 1760, 2000.

CAVALLI, S. S.; WINGE, H. Variabilidade genética em populações naturais. In: FREITAS, L. B.; BERED, F. (Org.). **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. p. 165-176.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. **Annu Rev Ecol Syst.** v.18, p. 237-268, 1987.

CIAMPI, A. Y. **Desenvolvimento e utilização de marcadores microssatélites, AFLP e sequenciamento de cDNA, no estudo da estrutura genética e parentesco em populações de Copaiba (*Copaifera langsdorffii*) em matas de galeria no cerrado**. 1999. 204 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.

CIPOLA, N. G.; ZEQUI, J. A. C. Composição e diversidade edáfica de Chilopoda (Arthropoda : Myriapoda) do Parque Estadual Mata São Francisco, Paraná, Brasil. **Terra e Cultura**, v. 27, n. 52, p. 47 – 55, Jan./Jun., 2011.

CHIAL, H. DNA fingerprinting using amplified fragment length polymorphisms (AFLP): No genome sequence required. **Nature Education**, v.1, n. 1, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-fingerprinting-using-amplified-fragment-length-polymorphisms-39051>>. Acesso em: 28 maio 2012.

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

COELHO, A.S.G. **Software: BOOD**. Avaliação de dendrogramas baseada em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. Versão 3.0. Goiânia: Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2001b.

COELHO, A.S.G. **Software: DBOOT**. Avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores, versão 1.1. Goiânia: Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2001 a.

COLE, T. C. Genetic variation in rare and common plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 34, p. 213-237, 2003.

- COLLINGE, S. K. Ecological consequences of habitat fragmentation: implications for landscape architecture and planning. **Landscape and Urban Planning**, v. 36, n. 1, p. 59-77, 1996.
- COUVET, D. Deleterious effects of restricted gene flow in fragmented populations. **Conservation Biology**, v. 16, n. 2, p. 369-376, 2002.
- CUNHA, C. C. **Chuva de sementes em área reflorestada do Parque Estadual Mata dos Godoy**. 2006. 22 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.
- DAMASCENO, J. O.; et al. Genetic differentiation in *Aspidosperma polyneuron* (Apocynaceae) over a short geographic distance as assessed by AFLP markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 2, p. 1180-1187, Jun. 2011.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 24, p. 217-242, 1993.
- ESTOPA, R. A. et al. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 70, p. 97-106, 2006.
- 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.
- FELSENSTEIN, J. **Phylip (phylogeny inference package) version 3.5c**. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1993.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1995.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.
- FLEISHMAN, E.; et al. Rules and exceptions in conservation genetics: genetic assessment of the endangered plant *Cordylanthus palmatus* and its implications of management planning. **Biological Conservation**, v. 98, p. 45-53, 2001.
- FRANKHAM, R. Conservation genetics. **Annual Review of Genetics**, Palo alto, v. 29, p. 305-327, 1995.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: SBG, 2008.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética e CNPq, 1997.

GALVES, M. **Uma abordagem computacional para a determinação de polimorfismo de base única**. 2006. 189 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) – Instituto de Computação - UNICAMP, Campinas, 2006.

GARWOOD, N. C. Tropical soil seed banks: a review. In: LECK, M. A.; PARKER, T. V.; SIMPSON, R. L. (Ed.). **Ecology of soil seed banks**. New York: Academic Press. 1989.

GOERCK, J. M. Patterns of rarity in the birds of the Atlantic Forest of Brazil. **Conservation Biology**, n. 11, p. 112-118, 1997.

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

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, (Ed.) **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sinauer Associates, Sunderland, 1989. p. 43-63.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4.a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HELDRIK, P. W.; MILLER, P. S. Conservation genetics: techniques and fundamentals. **Ecology Applied**, v. 2, p. 30-46, 1992.

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

KAGEYAMA, P. Y. Conservação *in situ* de recursos genéticos de plantas. **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais. IPEF**, Piracicaba, n. 35, p. 7-37, 1987.

KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: SIMPÓSIO DE ECOSISTEMAS DA COSTA BRASILEIRA, 3., 1993, Serra Negra. **Anais...** São Paulo: Academia de Ciências do Estado de **São Paulo**, 1993.

LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. **Science**, n. 241, p.1455-460, 1988.

LAURANCE, W. F.; BIERREGARD, R. O. (Org.). **Tropical forest remnants**. Chicago: University of Chicago Press, 1997.

LAURANCE, W. F.; et al. Tropical forest remnants: synthesis of a dynamic and eclectic. In: BIERREGARD, R.; LAURANCE, W. (Ed.) **Tropical forest remnants: ecology, management and conservation of fragments community**. Chicago: Chicago University Press, 1997. p. 9-15.

LOPES, R. et. al. Marcadores Moleculares Dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.

LOWE, A. J. et al. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in brassica crop species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, p. 1103-1112, 2004.

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.

MAMURIS, Z.; SFOUGARIS, A. I.; STAMATIS, C. Genetic structure 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.

MARIETTE, S. et al. Sampling within the genome for measuring within population diversity: trade-offs between markers. **Molecular Ecology**, n. 11, p. 1145-1156, 2002.

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

MITTERMEIER, R. A. et al. **Hotspots**. Agrupación Sierra Madre. Mexico City: CEMEX, 1999.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, n. 403, p. 853-858, 2000.

NASSAR, J. M.; GARCÍA-RIVAS, A. E.; GONZÁLEZ-CARCACÍA, J. A. Patrones de diversidad genética en especies arbóreas de bosques secos fragmentados en Venezuela. **Interciencia**, v. 36, n. 12, p. 914-922, Caracas, 2011.

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

OLIVEIRA, A. F. **Estrutura genética de populações naturais de *Copaifera langsdorffii* Desf. a partir de isoenzimas**. 2000. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

PERINA, B. B. **Fenologia de espécies arbóreas de uma Floresta Estacional Semidecidual do sul do Brasil**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNEUT, J. J. BOTTLENECK: A. computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **The Journal of Heredity**, Cary, v. 90, n. 4, p. 502- 503, 1999.

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

PRITCHARD, J. K.; et al. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945–959, 2000.

RIBEIRO, et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, n. 142, p. 1141- 1153, 2009.

SCHIMTZ, M. C. Banco de sementes no solo em áreas do reservatório da UHE Paraibuna. In: KAGEYAMA, P. Y. (Org.) **Recomposição da vegetação com espécies arbóreas nativas em reservatórios de usinas hidrelétricas da CESP. IPEF**, Piracicaba, v. 8, n. 25, p. 7-8, out. 1992.

SCHLUTER, P. M.; HARRIS, S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. **Molecular Ecology Notes**, n. 6, p 569-572, 2006.

SEBBENN, A. M.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; KAGEYAMA, P. Y.; MACHADO, J. A. R. Parâmetros genéticos na conservação da cabreúva – *Myroxylon peruiferum* L. F. Allemão. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 53, p.31-38, 1998.

SILVA, J. M. C.; CASTELETI, C. H. M. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I.G. (Ed.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, trends, and outlook**. Center for Applied Biodiversity Science e Island Press, Washington, 2003. p. 43-59.

SILVA, M. C. N. A.; RODAL, M. J. N. Padrões das síndromes de dispersão de plantas em áreas com diferentes graus de pluviosidade, PE, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. São Paulo, v. 23, n. 4, p. 1040-1047, 2009.

SILVA, F. C.; SOARES-SILVA, L. H. Arboreal flora of the Godoy Forest State Park, Londrina, PR., Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**. Edinburgh, v. 57, n. 1, p. 107-120, 2000.

SIMPSON, R. L; LECK, M. A.; PARKER, V. T. **Ecology of Soil Seed Banks**. California: Academic Press, 1989.

REITZ, P. R. Euforbiáceas In: REITZ, P. R. (Org.). **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1988.

SOARES-SILVA, L. H.; BARROSO, G. M. Fitossociologia do estrato arbóreo da floresta na porção norte do Parque Estadual Mata dos Godoy, Londrina, Paraná, Brasil. In Congresso SBPC, 8, **Anais...** Campinas. 1992. p. 101-112.

SOFIA, H. S.; SANTOS, A. M dos; SILVA, C. R. M. da. Euglossine bees (Hymenoptera Apidae) in a remnant of atlantic forest in Parana state, Brazil. **Iheringia**, Série Zoologia, Porto Alegre, v. 94, n. 2, p. 217-222, jul. 2004.

SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2008. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período de 2000 a 2005**. Disponível em: <[http:// www.sosmatatlantica.org.br](http://www.sosmatatlantica.org.br)>. Acesso em: 25 set. 2010.

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

TABARELLI, M.; GASCON, C. Lições da pesquisa sobre fragmentação: aperfeiçoando políticas e diretrizes de manejo para a conservação da biodiversidade. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 181-188, jul. 2005.

TAMBARUSSI, E. V.; et al. Estrutura genética de populações de *Piptadenia gonoacantha* (mart.) macbr. por meio de marcadores moleculares RAPD. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**. V. 7, n. 12, ago. 2008. Disponível em: < www.revista.inf.br/florestal12> Acesso em: 27 maio 2012.

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.

TOME, M. V. D. F.; VILHENA, A. H. T. Levantamento Preliminar de Fragmentos Florestais no Norte do Paraná – Subsídio para conservação florestal e formação de arboreto – estrutura horizontal. In: Simpósio Internacional sobre ecossistemas florestais. **Anais...**Belo Horizonte, 1996. p. 11-13.

TOREZAN, J. M. Nota sobre a vegetação da bacia do rio Tibagi. In: MEDRI, M. E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O. A. e PIMENTA, J. A. (Org.). **A Bacia do rio Tibagi**. Londrina: Editora dos Editores, 2002. p. 103-107.

TURNER, I. M. Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 200-209, Apr. 1996.

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

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4.407- 4.414, 1995.

XIA, T.; CHEN, S.; ZHANG, D.; GAO, Q.; GE, X. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 209-214, 2007.

YAMAMOTO, L. F., KINOSHITA, L. S., MARTINS, F. R. Síndromes de polinização em fragmentos da Floresta Estacional Semidecídua Montana, SP, Brasil. **Acta Botânica. Brasilica**. v. 21, n. 3, p. 553 -573, 2007.

YEH, F. C. et al. **POPGENE 32**. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, v. 1. 32. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, 2000.

YOUNG, A.; BOYLE, T. Forest fragmentation. In: YOUNG, A.; BOYLE, T.; BOSHIER, D. (Ed.). **Forest conservation genetics**. Melbourne: CISRO Publishing, 2000. p. 123-132.

YOUNG, A.; BOYLE, T.; BROWN, T. The population genetics consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution**, Oxford, v. 11, n. 10, p. 413-418, out. 1996.

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