

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico da
erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) em dois fragmentos
florestais na área de entorno do Parque Nacional do Iguaçu**

Vinícius Sandri Diaz

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Programa: Recursos Florestais.
Opção em: Conservação de Ecossistemas Florestais

**Piracicaba
2013**

Vinícius Sandri Diaz
Bacharel em Gestão Ambiental

**Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico da erva-mate
(*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) em dois fragmentos florestais na área de
entorno do Parque Nacional do Iguaçu**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr.: Paulo Yoshio Kageyama

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências, Programa: Recursos Florestais.
Opção em: Conservação de Ecossistemas Florestais

**Piracicaba
2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Diaz, Vinícius Sandri

Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) em dois fragmentos florestais na área de entorno do Parque Nacional do Iguçu / Vinícius Sandri Diaz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

89 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Biodiversidade 2. Diversidade genética 3. Fluxo gênico 4. Marcador molecular
5. Mate 6. Sementes - Dispersão I. Título

CDD 633.77
D542d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A ignorância gera confiança com mais frequência do que o conhecimento: são aqueles que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que tão positivamente afirmam que esse ou aquele problema jamais será resolvido pela ciência.

Charles Darwin

Dedico

*A todos que de alguma forma
contribuíram com esta jornada,
a minha família e amigos,
em especial, à minha companheira
Mayumi*

AGRADECIMENTOS

A minha querida companheira e amiga Katia Mayumi Konno, pelo incentivo incondicional durante todos esses anos de nossa união, por todo amor dedicado, por ser a minha maior incentivadora, por amparar em todas às vezes que precisei, pelas palavras de motivação nos momentos difíceis, pela paciência em suportar a distância e a solidão, por acreditar em mim. A você dedico o meu amor e meu agradecimento especial.

A minha família, principalmente a minha mãe Sirlei Sueli Sandri Diaz, a minha irmã Dayane Sandri Diaz, ao meu irmão Allan Sandri de Loura e ao meu primo Guiosepphe Sandri Marques pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Paulo Yoshio Kageyama, pela orientação, pela confiança, pela amizade, pelos ensinamentos em políticas públicas, pelos ensinamentos sobre restauração e conservação da biodiversidade, por compartilhar a sua vasta experiencia de vida na área pública, muito obrigado Professor!

O meu agradecimento especial ao Pesquisador da Embrapa Florestas Dr. Carlos Eduardo Sícoli Seoane pela grande amizade e orientação; pelos ensinamentos durante estes cinco anos de convivência conjunta em vários trabalhos; pelas conversas que ajudaram a construir um senso crítico que vai muito além da academia; por abrir as portas da Embrapa Florestas e da pesquisa científica; ao seu grande apoio, muito obrigado Edu!

Ao Eng^o Me. Donivaldo Pereira do Instituto Ambiental do Paraná, obrigado pelo incentivo, pela ajuda na articulação do projeto, pela conversa e experiência de vida, por ter indicado as áreas de estudo, pela amizade.

A equipe do Parque Nacional do Iguaçu pelo acolhimento no alojamento do Parque e pelo apoio durante as atividades de campo. O meu agradecimento especial ao Apolônio Nelson de Sousa Rodrigues, Chefe da Área de Conservação e Manejo; ao Ivan Baptiston, Responsável pelo Setor de Proteção e Manejo; ao Pedro Fogaça, Setor de Pesquisa; e em especial ao Adaílido Policena, Piloto do Parque, por seus ensinamentos durante as atividades de campo, por sua paciência e dedicação a pesquisa; por compartilhar sua vasta experiencia de vida. A toda equipe do Parque, muito obrigado!

A equipe da Itaipu Binacional por todo apoio logístico no transporte. O meu agradecimento especial ao Edson Zanlorensi, Gerente da Divisão de Áreas Protegidas que apoiou incondicional este projeto; a Eng.º Me. Veridiana Pereira, da Divisão de Áreas Protegidas, pela ajuda na articulação logística do transporte, pela conversa, por receber bem em sua casa, por acompanhar as coletas de campo; aos técnicos Milton Dutra e Valdecir Nery por pacientemente terem realizado o transporte até as áreas de campo durante toda o período de coleta, pela solidariedade nas horas difíceis, pela conversa e amizade. A toda equipe da Itaipu, muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Flávio Gandara, pela orientação e pela disposição em ajudar em todas às vezes que precisei.

Ao Dr. Alexandre Magno Sebbenn pelas importantes contribuições e pela ajuda na análise dos resultados.

A Me. Maria Andréia Moreno, pelos ensinamentos em todas as etapas do laboratório, pela paciência em explicar tudo novamente quando solicitado, pelas palavras de incentivo nas horas difíceis.

À Biol.^a Elza Martins Ferraz por não me deixar abater, pelo incentivo, pela conversa e amizade, pela ajuda no laboratório.

À toda equipe do laboratório LARGEA Elza, Andreia, Lia, Renata, Bruna, Giulia e Evando, que me acompanharam durante este processo.

Aos companheiros da sala da pós-graduação, Ângela, Felipe, Javier, Eduardo, Ayesca, Zé, Ranieri, Thiago, Alexandre, Leandro pelo companheirismo, amizade e incentivo.

À Dra. Cintia Niva, Prof.º Dra. Sigrid Andersen, Prof.º Me. David José Andrade da Silva e Prof.º Dr. Edmilson Vianna por ensinarem a escrever, pelo apoio e incentivo durante a graduação.

Aos proprietários e funcionários da Fazenda Santa Maria e da Fazenda dos Paulistas por aceitarem realizar o trabalho nas áreas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos companheiros de república, Gilvano, Kuang, Diego, Carlos, Daniel, Raniére, Djair e Elias pela amizade e companheirismo.

As demais pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Objetivos.....	20
1.2 Hipóteses.....	21
2 DESENVOLVIMENTO	22
2.1 Revisão Bibliográfica.....	22
2.1.1 Bioma Mata Atlântica.....	22
2.1.2 Consequências Ecológicas e Genéticas da Fragmentação.....	25
2.1.3 <i>Ilex paraguariensis</i>	26
2.1.4 Metapopulação e conectividade.....	33
2.1.5 Diversidade genética.....	36
2.1.6 Estrutura genética e fluxo gênico.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Desenho experimental	41
3.2 Área de Estudo e Caracterização da Vegetação.....	41
3.2.1 Reserva Particular do Patrimônio Natural Santa Maria.....	43
3.2.2 Fazenda dos Paulistas.....	44
3.3 Análises de Laboratório.....	45
4 ANÁLISE DOS DADOS.....	48
4.1 Análise da diversidade genética e índice de fixação.....	48
4.2 Análise da estrutura genética espacial intrapopulacional.....	48
4.3 Análise de parentesco.....	49
RESULTADOS.....	51
5.1 Distribuição espacial da <i>I. paraguariensis</i>	51
5.1 Diversidade genética e índice de fixação.....	58
5.2 Diversidade genética dentro das populações.....	60
5.3 Distribuição da variação genética	61

5.4 Estrutura genética espacial intrapopulacional.....	62
5.5 Análise de parentesco e fluxo gênico.....	64
6 DISCUSSÃO.....	70
6.1 Diversidade genética	70
6.2 Estrutura genética espacial.....	72
6.3 Fluxo gênico de pólen e sementes.....	73
6.4 Implicações para conservação.....	76
7 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

RESUMO

Diversidade genética, estrutura genética espacial e fluxo gênico da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) em dois fragmentos florestais na área de entorno do Parque Nacional do Iguaçu

A erva-mate, *Ilex paraguariensis*, é uma espécie dioica, clímax com ampla área de distribuição natural. Apesar de sua importância econômica e ecológica são escassos os estudos de conservação e genética da espécie. O objetivo geral do trabalho foi estudar a diversidade genética, a estrutura genética espacial e o fluxo gênico por dispersão de sementes em duas populações naturais de *I. paraguariensis* na área do entorno do Parque Nacional do Iguaçu, com uso de marcadores moleculares microssatélites. Foram encontrados baixos níveis de diversidade genética em oito loci analisados, com divergência genética maior entre do que dentro das populações. A *I. paraguariensis* apresentou baixa densidade populacional, com 0,27 a 0,29 árvores por ha⁻¹ e distribuição espacial agregada, entretanto não foi observado evidência de estrutura genética espacial. A média da distância da dispersão de pólen foi de 393 m e a dispersão de sementes atingiu distância próximas a 2.000 m. Os resultados obtidos, sugerem que a base genética da espécie não é ampla, o que pode dispor a *I. paraguariensis* a um estado crítico de conservação, devido a de erosão genética provocada pela destruição de seus ambientes naturais.

Palavras-chaves: fluxo gênico, biodiversidade, diversidade genética

ABSTRACT

Genetic diversity, spatial genetic structure and gene flow of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) in two forest fragments on at area around of the Iguassu National Park

The yerba mate, *Ilex paraguariensis*, is a species dioecious, climax with wide natural range. Despite their economic and ecological importance are few studies of genetics and conservation of the specie. The overall objective this work was to study the genetic diversity, spatial genetic structure and gene flow by seed dispersal in two natural populations of *I. paraguariensis* around the National Park of Iguassu, using microsatellite molecular markers. It found low levels of genetic diversity at eight loci analyzed, and greater genetic divergence between populations than within population. The *I. paraguariensis* showed low population density with 0.27 to 0.29 trees per ha⁻¹ and spatial clustered distribution, however was not observed evidence of spatial genetic structure. The average distance of pollen dispersal was 393 m and seed dispersal reached near 2,000 m. The results suggest that the genetic basis of species is not large, which may carry the *I. paraguariensis* to critical state of conservation due to genetic erosion caused by the destruction of their natural environments.

Keywords: gene flow, biodiversity, genetic diversity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa dos fragmentos remanescentes do Bioma Mata Atlântica	23
Figura 2 - Mapa dos fragmentos remanescentes do Bioma Mata Atlântica no estado do Paraná.....	24
Figura 3 – Área da distribuição natural da <i>I. paraguariensis</i>	28
Figura 4 – Inflorescências (A -masculinas e B femininas) e flores (C – masculinas e D – femininas) de <i>I. paraguariensis</i>	29
Figura 5 – Folhas da <i>I. paraguariensis</i>	30
Figura 6 – Frutos em diferentes estágios de maturação (A) e sementes (B) de <i>I. paraguariensis</i>	31
Figura 7 – A) RPPN Santa Maria; B) Fazenda dos Paulistas; C) Parque Nacional do Iguaçu.....	42
Figura 8 - RPPN Santa Maria	43
Figura 9 – Fazenda dos Paulistas.....	44
Figura 10 – Localização dos indivíduos adultos da RPPN Santa Maria.....	52
Figura 11 - Localização das plântulas da RPPN Santa Maria.....	52
Figura 12 - Distribuição do DAP em (cm) dos indivíduos adultos da RPPN Santa Maria.....	53

Figura 13 – Distribuição da altura das plântulas em (cm) da RPPN Santa Maria.....	54
Figura 14 - Localização dos indivíduos adultos da Fazenda dos Paulistas.....	55
Figura 15 - Localização das Plântulas da Fazenda dos Paulistas.....	55
Figura 16 - distribuição do DAP em (cm) dos indivíduos adultos da Fazenda dos Paulistas.....	56
Figura 17 - distribuição da altura das plântulas em (cm) da Fazenda dos Paulistas.....	57
Figura 18 – Correlogramas do coeficiente de coancestria em classes de distância entre árvores adultas da <i>I. paraguariensis</i> na RPPN Santa Maria (a), árvores adultas da Fazenda dos Paulistas (b), e plântulas da Fazenda dos Paulistas (c)	63
Figura 19 – Frequência da distância de dispersão do fluxo de pólen.....	67
Figura 20 – distribuição da dispersão de sementes pela estimativa de distância mínima.....	68
Figura 21 – distribuição da dispersão de sementes pela estimativa de distância máxima.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Programação da PCR.....	46
Tabela 2 – Loci de microssatélites de <i>I. paraguariensis</i> com motivos, comprimentos em pares de bases e temperaturas de anelamento em °C.....	47
Tabela 3 – Índices de diversidade genética.....	58
Tabela 4 – Análise de desequilíbrio de ligação.....	59
Tabela 5 – Diversidade genética e índices de fixação de árvores adultas/jovens e plântulas da RPPN Santa Maria.....	60
Tabela 6 - Diversidade genética e índices de fixação de árvores adultas/jovens e plântulas da Fazenda dos Paulistas.....	61
Tabela 7- Diferenciação genética entre e dentro de populações.....	62
Tabela 8 – Distâncias de dispersão de pólen, sementes mínima e sementes máxima.....	65
Tabela 9 - Análise de parentesco das duas populações.....	66

1 INTRODUÇÃO

A transformação de ambientes naturais em áreas de uso antrópico tem convertido ecossistemas contínuos em pequenas manchas na paisagem, separadas e isoladas. Este processo é conhecido por fragmentação, e apresenta efeitos negativos na abundância e estrutura das espécies. A fragmentação é a perda e subdivisão de habitats contínuos em fragmentos menores e isolados devido à ação antrópica (FAHRIG, 2003). Afeta negativamente ambientes naturais, pois promove alterações na qualidade do habitat devido ao aumento das áreas de borda e ao isolamento dos fragmentos remanescentes (EWERS et al., 2007). Por vezes, os efeitos negativos da fragmentação são capazes de promover a extinção de populações locais em áreas fragmentadas.

No Brasil, a conversão do Bioma Mata Atlântica em áreas agrícolas e urbanas reduziu drasticamente a extensão original do Bioma. Atualmente, as áreas remanescentes encontram-se severamente fragmentadas, com tamanho reduzido, dispersas e isoladas pela matriz antrópica (RIBEIRO et al., 2009). Pelo grau de endemismo e riqueza de espécies, e pela situação de ameaça, o Bioma é considerado um dos principais hotspots do planeta (MYERS et al., 2000).

No estado do Paraná a área de extensão original do Bioma Mata Atlântica abrangia quase a totalidade do estado e atualmente restam pouco mais de 10% da floresta original (ATLÂNTICA, 2011). As áreas remanescentes estão distribuídas de forma irregular pelo estado, sendo que em sua maioria, os fragmentos estão concentrados na região litorânea e no oeste, neste último principalmente na região do Parque Nacional do Iguaçu.

No Brasil é de grande relevância estudar o fluxo gênico de espécies arbóreas, devido a sua grande interação com polinizadores e dispersores de sementes. Pressões antrópicas como o desmatamento e a fragmentação, são as principais ameaças a populações naturais de muitas espécies. Por serem em sua maioria alógamas são sensíveis ao efeito da endogamia (KAGEYAMA et al., 1998; YOUNG; BOYLE, 2000). Estudos demonstram que a redução do habitat natural, a subdivisão e o isolamento das populações provocam consequências negativas no sucesso reprodutivo, impedindo por vezes, o fluxo gênico e a migração de sementes (HALL et

al., 1996; SEBBENN et al., 2011; SEOANE et al., 2005; SEBBENN et al., 2011). O fluxo gênico é essencial para a manutenção da variabilidade genética das populações naturais da floresta tropical (YOUNG et al., 1996), e o seu monitoramento pode subsidiar estratégias de conservação.

O estudo do fluxo gênico via dispersão de sementes através do teste de parentesco consiste numa estratégia refinada e eficiente para avaliar a conservação genética de espécies, além de fornecer informações sobre distância e o padrão de dispersão de pólen e sementes. Com isso, é possível prever o status de conservação genética a longo prazo.

A erva-mate, *Ilex paraguariensis*, é uma espécie dioica, clímax tolerante à sombra, de ciclo de vida longo, característica da Floresta Ombrófila Mista, de grande interação com a fauna para polinização e dispersão de sementes (CARVALHO, 2003). Sendo amplamente consumida no país na forma de chimarrão, chá, tererê e planta medicinal. O cultivo e a exploração de ervas nativas, é uma importante atividade econômica, principalmente de pequenas propriedades dos estados do sul do Brasil. Desta forma, a erva-mate é um dos principais produtos florestais não madeireiros do país (ALMEIDA et al., 2009). Apesar de sua importância econômica e ecológica, são escassos os estudos de conservação e genética da espécie.

Neste contexto, o objetivo geral do trabalho foi estudar a diversidade genética, a estrutura genética espacial, e o fluxo gênico por dispersão de sementes em duas populações naturais de *Ilex paraguariensis* na área do entorno do Parque Nacional do Iguaçu.

1.1 Objetivos

Caracterizar a diversidade genética, a estrutura genética espacial e o fluxo gênico das duas populações naturais de *Ilex paraguariensis* na área do entorno do Parque Nacional do Iguaçu com oito loci microssatélites. E de maneira específica:

- i. Comparar a diversidade genética entre indivíduos adultos e regenerantes nos dois fragmentos;
- ii. Caracterizar a estrutura populacional e a regeneração nos dois fragmentos;
- iii. Mensurar a estrutura genética espacial nos dois fragmentos;
- iv. Estabelecer a taxa de migração de pólen e sementes nos dois fragmentos;

- v. Estimar distâncias médias de fluxo gênico via pólen e sementes nos dois fragmentos

1.2 Hipóteses

- i. As árvores adultas apresentarão maior diversidade genética que as plântulas nas duas populações.
- ii. Existe estrutura genética espacial nos indivíduos adultos e nas plântulas nas duas populações.
- iii. O fluxo de pólen será mais restrito que o fluxo de sementes.
- iv. O fluxo gênico por sementes de áreas externas será maior que o fluxo de pólen.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Bioma Mata Atlântica

O Bioma Mata Atlântica (figura1) apresenta um dos mais altos graus de riqueza e endemismo de espécies do planeta (TABARELLI et al., 2010). é considerado o quarto dentre os 25 hotspots mais importantes (MYERS et al., 2000). No entanto, a floresta foi drasticamente reduzida pela ação antrópica. Originalmente a Mata Atlântica ocupava aproximadamente 150 milhões de hectares (ha), dos quais restaram atualmente entre 11,4 a 16% da extensão original (RIBEIRO et al., 2009). O bioma estende-se das latitudes 3°S a 31°S; longitudes 35°W a 60°W, ocorrendo principalmente ao longo da costa brasileira, sendo mais amplo ao sul e estreito ao norte do país (RIBEIRO et al., 2009). O bioma abrange os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Sergipe (ATLÂNTICA, 2011). A área de ocorrência do bioma abrange porções de territórios de outros países entre eles o Paraguai (HUANG et al., 2007) e Argentina (GIRAUDO, 2003).

A mata atlântica apresenta limites complexos com os biomas Pampa ao sul, Pantanal ao oeste-sudoeste, Cerrado a oeste e Caatinga ao noroeste (RIBEIRO, et al., 2009). Abrange várias formações fitoecológicas associadas entre elas Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Estacional Decidual, além dos ecossistemas associados como campos de altitude, brejos interioranos, manguezais, restingas e ilhas oceânicas no litoral (IBGE, 1993).

O bioma encontra-se severamente fragmentado, e aproximadamente 80% dos fragmentos remanescentes apresentam área inferior a 50 hectares, com média de distância entre os fragmentos de 1.440 m. Praticamente a metade destas áreas apresenta uma relação núcleo-borda inferior a 100 m, e as reservas naturais protegem apenas 9% da floresta remanescente e 1% da floresta original (RIBEIRO et al., 2009). A situação do bioma é crítica, pois grande parte das áreas remanescentes são fragmentos pequenos, isolados, sujeitos a mudanças na composição vegetal em virtude, entre outros fatores, dos efeitos de borda e pela

presença de espécies invasoras.

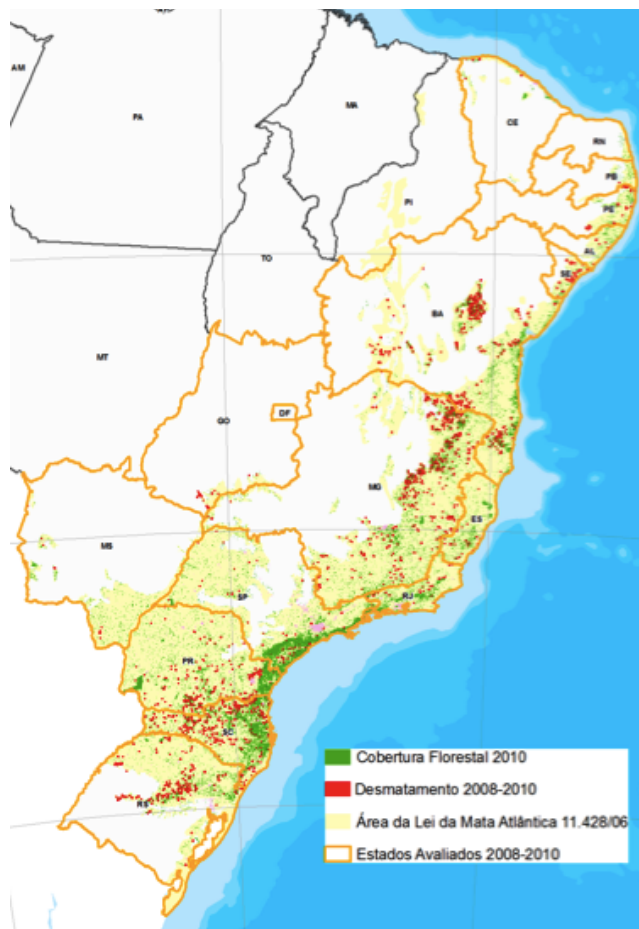


Figura 1 - mapa dos fragmentos remanescentes do Bioma Mata Atlântica no Brasil.
Fonte: Atlântica (2011)

A fragmentação afeta diretamente a biodiversidade do bioma, existindo uma correlação direta entre taxas de cobertura florestal de uma região na abundância e a riqueza de espécies de mamíferos não voadores em fragmentos florestais (PARDINI et al., 2010). Estudos demonstram que espécies especialistas foram negativamente influenciadas quando a cobertura de uma localidade encontrava-se abaixo de 30%. Nesta situação, até mesmo fragmentos maiores apresentaram severa redução (PARDINI et al., 2010). Além disso, fragmentos florestais com área inferior a 25 ha sofrem sensíveis mudanças estruturais, seja pela perda de biomassa, seja pela per-

da de biodiversidade no longo prazo (PÜTZ et al., 2011). Por esta razão é imprescindível conservar os remanescentes e recuperar as áreas degradadas deste bioma. Entretanto a restauração florestal, apesar da experiência acumulada em décadas de trabalho, ainda enfrenta desafios para se firmar como um meio efetivo para conservação da mata atlântica (RODRIGUES et al., 2009).

No estado do Paraná, a cobertura original do bioma Mata Atlântica ocupava aproximadamente 98% da área do estado, constituindo-se de distintas unidades fitogeográficas, entre elas, Floresta Ombrófila Densa e seus ecossistemas associados, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Estacional Semidecidual, além de Estepes e Savanas (RODERJAN et al., 2002). Deste total, restaram atualmente, 10,65% de remanescentes (figura 2) da extensão original do bioma (ATLÂNTICA, 2011). O estado possui apenas 8,7% do seu território protegido em unidades de conservação, sendo apenas 2% de proteção integral e 6,7% de uso sustentável. Em sua maioria, as unidades de conservação são de pequeno porte e mal distribuídas e entre elas, poucas tem a capacidade de representar a diversidade biológica dos remanescentes do bioma (VICENTE et al., 2009).

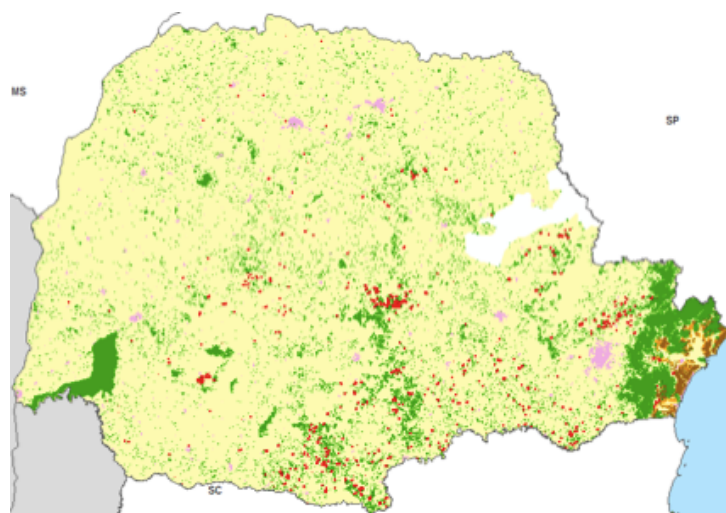


Figura 2 - mapa dos fragmentos remanescentes do Bioma Mata Atlântica no estado do Paraná.

Fonte: Atlântica (2011)

2.1.2 Consequências Ecológicas e Genéticas da Fragmentação

A fragmentação é o processo de perda e subdivisão de habitats contínuos em fragmentos menores e isolados devido à ação antrópica (FAHRIG, 2003). A fragmentação promove alterações na qualidade do habitat devido ao aumento de áreas de borda e ao isolamento dos fragmentos remanescentes (EWERS et al., 2007). A borda de um fragmento é a justaposição entre dois ecossistemas adjacentes com mudanças nas condições microclimáticas e ecológicas distintas daquelas encontradas no interior de um fragmento (CAROLINA, 1995). Por consequência, o efeito de borda promove o incremento da radiação solar e da temperatura; e a diminuição da umidade do solo nas áreas de ocorrência da borda (RIES et al., 2004). O efeito de borda é capaz de alterar negativamente a estrutura da comunidade vegetal de espécies tropicais (LAURANCE et al., 2007; LAURANCE, 2011), ocorrendo, por exemplo, alterações das taxas de recrutamento e mortalidade de plântulas nas áreas de borda (BENITEZ-MALVIDO; MARTÍNEZ-RAMOS, 2003; URIARTE et al., 2010); especialmente de fragmentos com área inferior a 25 ha (PÜTZ et al., 2011).

Paisagens fragmentadas podem prejudicar a movimentação de polinizadores e dispersores devido às barreiras gerada pela matriz antropogênica (GHAZOUL, 2005). Por consequência, a fragmentação afeta negativamente taxas de cruzamento e de diversidade genética de espécies de plantas se comparadas a populações naturais contínuas (AGUILAR et al., 2008). Espécies de plantas polinizadas por animais com sistemas de polinização generalista quanto aquelas polinizadas por animais com sistemas de polinização especialista são igualmente prejudicadas pela fragmentação (ABRAMSON et al., 2011; ASHWORTH et al., 2004). Diversos estudos demonstram redução das taxas de fluxo de pólen de espécies tropicais em áreas fragmentadas (LLORENS et al., 2012; ROSAS et al., 2011; SEOANE et al., 2005). Também indicam redução do fluxo gênico via pólen e sementes (SEBBENN et al., 2011; SEOANE et al., 2005). Por consequência, menores níveis de fluxo gênico, elevam as taxas de autofecundação e endogamia em paisagens fragmentadas (COLLEVATTI et al., 2010).

Desta forma, a fragmentação é uma das principais ameaças a conservação

da biodiversidade, pois apresenta consequências imediatas pela redução do tamanho das populações naturais e o aumento do grau de isolamento entre fragmentos remanescentes (YOUNG; BOYLE, 2000). Em médio prazo a fragmentação provoca a erosão genética por excesso de endocruzamento e a perda de alelos pela diminuição de mecanismos de compensação aos efeitos da deriva genética aleatória (YOUNG et al., 1996).

Espécies de plantas com fecundação cruzada, são especialmente sensíveis à endogamia, devido principalmente à depressão endogâmica provocada pelo aumento da ocorrência de alelos deletérios em homozigose (CHARLESWORTH; WILLIS, 2009; CHEPTOU; SCHOEN, 2007). A endogamia também pode favorecer a deriva, o que provoca a perda de alelos em pequenas populações, reduzindo a heterozigosidade e a adaptabilidade destas (LIENERT, 2004). O efeito da endogamia é mais severo em populações pequenas, o que resulta em uma correlação negativa entre o tamanho da população e o nível de depressão endogâmica (LEIMU et al., 2006; REED, 2005). A perda de diversidade genética, bem como, o aumento da frequência de alelos deletérios, contribuem para o risco de extinção em populações naturais no longo prazo (FRANKHAM, 2005; HEDRICK, 2001).

2.1.3 *Ilex paraguariensis*

A *Ilex paraguariensis* é uma árvore popularmente conhecida por erva-mate, congonha, caúna, entre outros nomes (CARVALHO, 2003). é uma espécie originária da região subtropical da América do Sul, pertencente a divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Aquifoliales, família Aquifoliaceae e gênero *Ilex* (STEVENS, 2001). Com mais de 600 espécies de clima tropical e temperado, o gênero *Ilex* encontra-se distribuído nos continentes Americano, Asiático, Europeu, Pacífico e Africano. é o único representante da família Aquifoliaceae, sendo possível encontrar aproximadamente 300 espécies na parte tropical do continente Americano (LOIZEAU et al., 2005). No Brasil o gênero representa 63 espécies, 47 destas endêmicas do país (GROPPO, 2010). é característica deste gênero a presença de plantas dioicas, a afinidade com locais úmidos e a dispersão das sementes por síndrome de or-

nitocoria, notadamente por aves da família Turdidae (LOIZEAU et al., 2005). A maior parte das espécies do gênero *Ilex* apresenta sementes recalcitrantes, com embriões rudimentares que permanecem imaturos por longos períodos após a maturação dos frutos (MROGINSKI et al., 2011). O gênero é composto por várias espécies de importância econômica, entre as principais, *Ilex aquifolium* L. (Europa), *I. cornuta* Lindl. (Ásia), *I. opaca* Ait. Farage (América do Norte), *I. crenata* Thunb (Ásia) e *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. na América do Sul (HU; BAJAJ, 1989).

A *Ilex paraguariensis* é uma espécie diploide ($2n = 40$), com meiose regular, sem indicação de bivalentes heteromórficos (GREIZERSTEIN et al., 2004). Apresenta flores díclinas, com um dos sexos abortivos, tronco cilíndrico, reto ou levemente tortuoso, geralmente com 20 a 40 cm de diâmetro podendo atingir até 100 cm. A erva-mate pode ser encontrada na forma de arvoreta a árvore perenifólia, podendo atingir até 30 m de altura na floresta nativa. Porém, em situações de cultivo, devido à poda realizada para o manejo comercial, geralmente não ultrapassa os 5 m de altura. é uma espécie clímax tolerante à sombra, característica da Floresta Ombrófila Mista Montana, especialmente em associação com *Araucaria angustifolia*. Ocorre naturalmente em solos de baixa fertilidade, com baixos teores de cátions trocáveis e altos teores de alumínio e pH baixo. De forma geral, a espécie tem preferência por solos de profundidade média a profunda, e textura que varia de solo franca à argilosa (CARVALHO, 2003). Em estado natural, a erva-mate é uma espécie umbrófila, de crescimento lento a moderado, típica de florestas maduras onde pode atingir a densidade de centenas de indivíduos por hectare (CARPANEZZI, 1995).

A sua área de distribuição natural de acordo com Oliveira; Rotta, (1983) abrange as latitudes 21°S a 30°S, e longitudes de 48°30' a 56°10'W, e altitudes entre 500 e 1000 m (figura 3). A espécie também pode ocorrer de forma mais esparsa em regiões abaixo ou acima deste limite. No total, a área de distribuição natural corresponde a 540.000 km² que inclui países como Argentina, Brasil e Paraguai. Entretanto, foi descrita a presença da espécie em pontos isolados no Uruguai (GIBERTI, 1995). A maior parte da área de ocorrência natural da erva-mate encontra-se em território brasileiro, contemplando uma área de aproximadamente 450.000 km², que inclui principalmente as regiões centro sul e sudoeste do estado do Paraná, praticamente todo estado de Santa Catarina, a região centro-norte do Rio Grande do Sul, a

região sul do Mato Grosso do Sul, e em reduzidos nichos de floresta com araucárias em São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. O clima predominante segundo Koepfen, é o Cfb, subtropical temperado úmido, sem estação seca, com temperatura média do mês mais quente inferior a 22°C. A espécie também ocorre nos tipos climáticos Cfa (clima subtropical) e Cwa (clima temperado úmido). A precipitação pluviométrica média anual encontra-se próxima de 1500 mm (OLIVEIRA; ROTTA, 1983). A distribuição da espécie contempla as formações fitoecológicas Floresta Ombrófila Mista e Floresta Estacional Semidecidual (CARVALHO, 2003); também ocorre na Floresta Ombrófila Montana (CATHARINO et al., 2006; RODERJAN, 1994), na floresta Ombrófila Densa Alto Montana (KOEHLER et al., 2002) e é raríssima no Cerrado e na Floresta Ombrófila Densa.

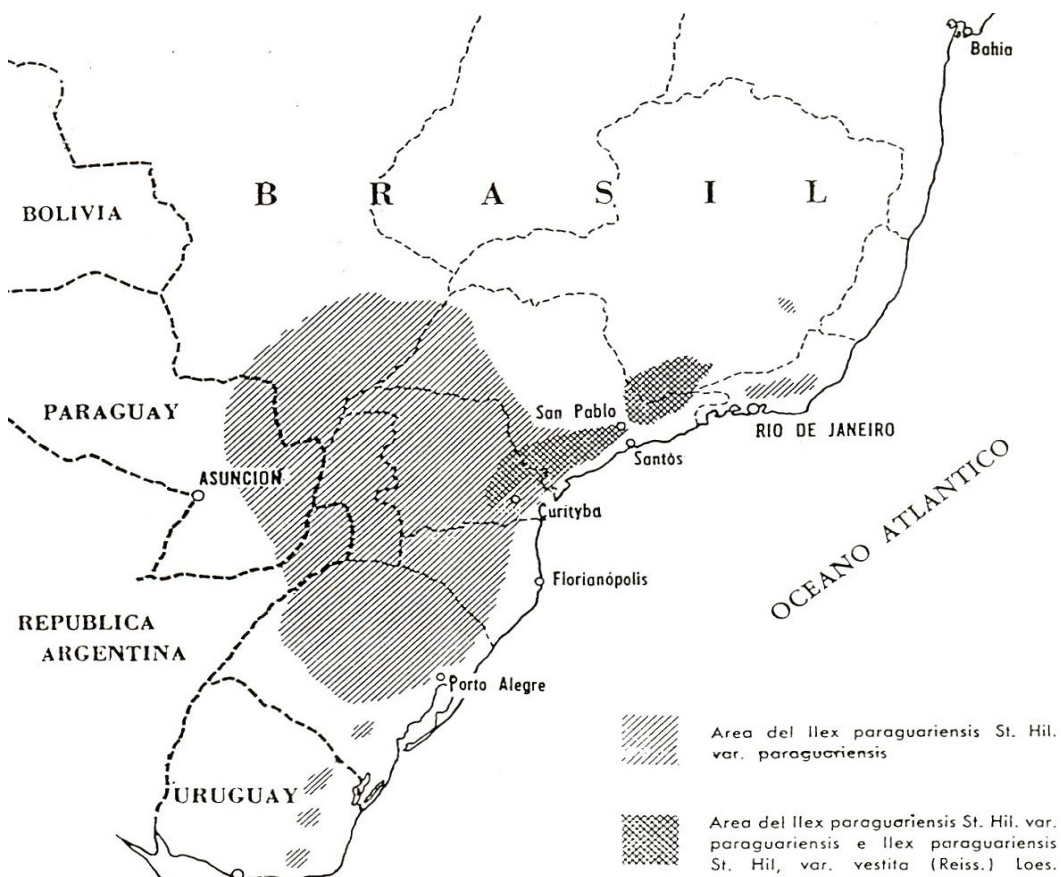


Figura 3 – área de distribuição natural da *I. paraguariensis*.
Fonte: Giberti (1995)

A *I. paraguariensis* é uma planta dioica, com flores diclínas com um dos sexos abortivos (figura 4). As flores masculinas apresentam pistilódio, ou seja, possuem ovário rudimentar não funcional; e as femininas possuem, estaminódios, que são estames rudimentares estéreis (FERREIRA, et al., 1983; GIBERTI; GURNI, 2008). A espécie apresenta floração explosiva com plantas femininas iniciando antese pouco antes da masculina, o que pode dificultar a polinização. As flores são brancas, pequenas, com inflorescência do tipo tirso, em pequenos fascículos em até cinco flores; dispostas nas axilas das folhas superiores, e pedunculadas. Em cada flor percebe-se cálice gamossépalo com quatro sépalas de cor verde clara e uma corola formada por quatro pétalas de coloração branca (CARVALHO, 2003; FONT QUER, 1953).

É uma espécie alógama, entomofílica, sem especificidade de polinizadores sendo polinizada principalmente por insetos das ordens dos Dípteros, Himenópteros, Coleópteros e Hemípteros (FERREIRA et al., 1983) com polinização pelo vento inexistente ou muito reduzida (SANTOS et al., 2003). O seu período de floração ocorre de setembro a outubro, no Rio Grande do Sul; de setembro a novembro no Paraná; de setembro até novembro em Santa Catarina e em novembro no estado de São Paulo (CARVALHO, 2003).

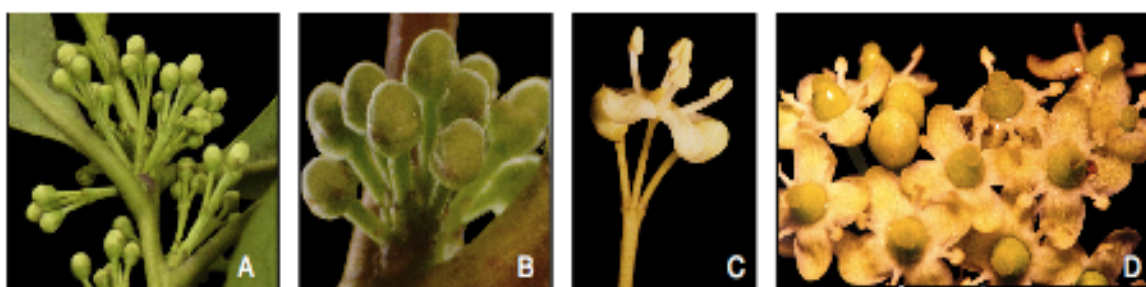


Figura 4 - Inflorescências (A - masculinas e B - femininas) e flores (C - masculinas e D – femininas) de *I. paraguariensis*.

Fonte: Wendt (2005)

A *I. paraguariensis* apresenta folhas simples, alternas, subcoriáceas a coriáceas, geralmente estipuladas, sendo verde-escuras em cima e mais claras embaixo; limbo foliar obovado com aproximadamente 5 a 10 cm de comprimento e 3 a 4 cm de largura; margem cerrilhada, porém irregularmente; ápice obtuso; nervuras laterais

pouco impressas em cima e saliente abaixo; pecíolo curto medindo entre 7 a 15 mm de comprimento (figura 5). Em condições naturais as folhas podem alcançar até 18 cm de comprimento e 5 cm de largura (CARVALHO, 2003). Existe uma grande variação do comprimento e da largura das folhas em populações naturais, que depende além do local de ocorrência e de fatores ambientais, sendo negativamente correlacionada com a intensidade da luz a qual a planta é exposta quando comparadas plantas da mesma população ou folhas da mesma árvore (COELHO et al, 2002).



Figura 5 – folhas da *I. paraguariensis*.
Fonte: Wikipédia (2012)

O fruto da *I. paraguariensis* é drupóide, tetralocular, tetraspérmico, com mesocarpo carnoso, endocarpo ósseo-lenhoso, envolvendo a semente (figura 6). O fruto é globoso, de superfície lisa, lustrosa de coloração roxa, quase preta, quando maduro, com frutificação abundante (KUNIYOSHI, 1983). Durante o processo de maturação do fruto, sua coloração altera-se gradativamente do verde ao branco, ao vermelho, e finalmente preto, quando completa a fase de maturação (MARIATH et al., 1995). Entretanto, ao atingirem o ponto de maturação, apenas 1% das sementes (pirênios) contem embriões desenvolvidos e aptos a germinação. Aproximadamente 99% dos

embriões encontram-se incompletos. Destes, cerca de 70% encontram-se na fase de coração, ou seja, o estágio anterior à maturação do embrião; e 29% encontram-se na fase de torpedo, estágio intermediário na formação do embrião (NIKLAS, 1987). A semente da *I. paraguariensis* é de cor castanho-clara a escura, muito pequena e de forma variável, levemente reniforme a longamente obovoide, cilíndrica, com endosperma carnoso, de cor creme (figura 6). O embrião é minúsculo e situado no ápice, na parte mais atenuada da semente, junto à micrópila; entre o poro exterior e a micrópila há uma câmara preenchida por tecido esponjoso (KUNIYOSHI, 1983).



Figura 6 - frutos em diferentes estágios de maturação (A) e sementes (B) de *I. paraguariensis*.

Fonte: Wendt (2005)

A maturidade sexual da *I. paraguariensis* pode iniciar entre três anos (FERREIRA et al., 1983) a cinco anos de idades em condições adequadas (CARVALHO, 2003). A dispersão da espécie é zoocórica, por síndrome de ornitocoria e seus principais dispersores são aves dos gêneros *Turdus* (Carvalho, 2003). Atualmente existem registrados 14 espécies de aves, pertencentes às famílias *Emberizidae*, *Tyrannidae*, *Muscicapidae*, *Mimidae* e *Pipridae* como potencial dispersores da *I. paraguariensis* (COLUSSI; PRESTES, 2011). Por ser uma espécie dioica pode existir diferenças entre a proporção de indivíduos masculinos e femininos. No Rio Grande do Sul foi encontrada a proporção de sete indivíduos masculinos para cinco indivíduos femi-

ninos (FERREIRA et al., 1983). Outros autores encontraram proporções de um indivíduo masculino para um feminino em condições ótimas de seleção para a espécie (FIOSS, 1994). Próximo à região de estudo deste trabalho foi encontrada a proporção de oito árvores masculinas para cinco árvores femininas (STURION et al., 1995).

As taxas de crescimento médio do Diâmetro a Altura do Peito (DAP) podem variar de acordo com a formação fitoecológica e com a localização. Na floresta ombrófila mista foram encontradas taxas de crescimento que variaram de 0,15 cm/ano a 0,21 cm/ano (FIGUEIREDO FILHO et al., 2010; SCHAAF et al., 2006). Em situação de plantio, no município de Foz do Iguaçu, na mesma região onde foi realizado este trabalho, a espécie apresentou crescimento médio de 8,3 cm/ano do DAP por ano (CARVALHO, 2003).

Extratos provenientes das folhas secas e picadas de *I. paraguariensis* (figura 6) são largamente consumidas por parte das populações da América do Sul na forma de infusão de chá, "chimarrão" no Brasil, "mate" na Argentina e Uruguai e "tererê" no Paraguai ou tererê (no Brasil). O hábito é oriundo dos índios Guaranis de uma região que compreendia o Paraguai, Uruguai, Nordeste da Argentina e o Sul do Brasil. Posteriormente foi adotado pelos conquistadores europeus, devido as suas características como fonte de cafeína e como agente terapêutico com propriedades farmacológicas. O consumo da bebida foi amplamente disseminado depois que os colonizadores jesuítas desenvolveram o cultivo comercial para a espécie (BRACESCO et al., 2011).

Entre as principais propriedades farmacológicas da *I. paraguariensis* descritas pela literatura em seres humanos distingui-se a redução do colesterol, ação antioxidante, melhora do sistema circulatório, auxílio no controle da diabete, efeito estimulante e combate à fadiga (BASTOS et al., 2007); além de reduzir a perda de massa óssea em mulheres na pós-menopausa (CONFORTI et al., 2012). Entre os principais compostos contidos nas folhas distinguem-se alcaloides (cafeína, teofilina, teobromina), ácidos fólicos e cafeico, vitaminas (A, B1, B2, C, e E), sais minerais (alumínio, ferro, fósforo, cálcio, magnésio, manganês e potássio), proteínas e glicídios entre outros compostos (HECK; MEJIA, 2007). Também detectaram-se efeitos anti-mutagênicos e redutor de peso em estudos realizados com animais (BRACESCO et al., 2011). Testes em laboratório com saponina purificada a partir das folhas secas

de erva-mate foram capazes de inibir a proliferação de células do câncer de cólon do útero in vitro (PUANGPRAPHANT et al., 2011).

As suas folhas são largamente consumidas no país na forma de chimarrão, chá, tererê e como planta medicinal; com isso, a erva-mate é um dos principais produtos florestais não madeireiros do Brasil (ALMEIDA et al., 2009). A produção nacional em 2010 foi de aproximadamente 227.462 toneladas e gerou uma receita estimada de 100 milhões de reais. O estado do Paraná é o principal produtor nacional, com uma produção estimada de 166.682 toneladas de erva-mate em 2010 (IBGE, 2010). O estado destinou parte de seus 7.579.058 ha utilizados para atividades agrícolas, com aproximadamente 25.319 ha para a cultura da erva-mate, a uma taxa de crescimento esperado para a cultura de 0,3% ao ano (IBGE, 2010; DELGADO; ZANCHET, 2011).

2.1.4 Metapopulação e conectividade

Com o surgimento da teoria da biogeografia de ilhas formulou-se pela primeira vez um modelo simples para explicar a riqueza de espécies encontradas em um determinado local (MACARTHUR; WILSON, 1967). Esta teoria propôs que o número de espécies em uma ilha é determinado pelo equilíbrio dinâmico entre as taxas de imigração e extinção. Essas taxas são diretamente relacionadas pela distância da ilha ao continente e por sua área total. Isto deve-se ao fato de Ilhas maiores apresentarem maior variedade e maior extensão de habitat. A proximidade com o continente facilita a imigração, o que reduz a probabilidade de extinção devido a flutuações populacionais ao acaso. Esta teoria pode ser resumida em três pontos principais: i) comunidades insulares apresentam menor riqueza de espécies comparadas a comunidades continentais equivalentes; ii) a riqueza aumenta com o tamanho da ilha; iii) a riqueza diminui com o isolamento da ilha (MACARTHUR; WILSON, 1967)

Na conservação, o modelo de biogeografia de ilhas foi aplicada a fragmentação florestal, predizendo que fragmentos maiores apresentariam maior riqueza de espécies e suportariam populações maiores do que pequenos fragmentos (WILCOX; MURPHY, 1985). Com base na teoria, foi sugerido que ao criar unidades de conservação seria preferível criar uma única grande reserva a várias reservas menores,

cuja soma das áreas totais fossem iguais ao grande fragmento (DIAMOND, 1975). A discussão em torno do tema ficou conhecido por “single large or several small ou SLOSS”; e motivou na década de 70 do século passado o surgimento do experimento “The Biological Dynamics of Forest Fragments Project” na floresta amazônica, cujo objetivo inicial foi avaliar os efeitos da fragmentação sob áreas com diferentes tamanhos que, variavam de 1 a 100 ha (LAURANCE et al, 2004). O programa continua em andamento e conta com mais de 30 anos de experiência acumulada sobre os efeitos da fragmentação na floresta tropical (LAURANCE et al., 2011).

A teoria de biogeografia de ilhas foi o paradigma dominante da conservação até meados da década de 80 do século passado (HANSKI; SIMBERLOFF, 1997). Entrou em declínio pois, apesar das semelhanças, existente entre ilhas e fragmentos florestais, o modelo não é capaz de incorporar a diferença existente, entre as manchas de habitats encontrados em um fragmento. Os fragmentos florestais apesar de estarem cercados por uma matriz antropogênica não estão totalmente isolados na paisagem ocorrendo fluxos biológicos frequentes com a matriz e com os outros fragmentos.

Em busca de uma teoria para explicar a dinâmica de populações em áreas fragmentadas, redescobriu-se o conceito de metapopulações de Levis (1969). O conceito mais elementar de uma metapopulação é o conjunto de sub-populações isoladas espacialmente em manchas de habitat e unidas funcionalmente por fluxos biológicos (LEVINS, 1969). Desta forma, o conceito de metapopulações considera que populações estão estruturadas em conjuntos de sub-populações e que a migração entre as populações locais, permite o restabelecimento de populações em caso de extinção (HANSKI, 1998). O conceito de metapopulações permite a união das abordagens ecológica e genética (HANSKI; SIMBERLOFF, 1997). Os conceitos chaves em genética de populações, tais como, efeito fundador, endogamia, deriva, fluxo gênico, tamanho efetivo populacional e estruturação genética, assumem necessariamente populações espacialmente estruturadas, ou melhor, organizadas em metapopulações.

Com o aprimoramento conceitual de metapopulações surgiram trabalhos sugerindo que corredores ou outros meios para aumentar a conectividade, poderiam interligar fragmentos florestais e conectar populações isoladas. Desta forma, facilitariam a migração e o fluxo gênico, e com isso aumentaria as chances de sobrevivên-

cia das populações interligadas (HANSKI; SIMBERLOFF, 1997). Para entender estes mecanismos, recentemente foram desenvolvidos diversos trabalhos que indicam efeitos positivos da conectividade. Os benefícios incluem o uso de corredores como habitat para diversas espécies florestais (WEHLING; DIEKMANN, 2009) e o aumento da riqueza e da abundância da fauna em fragmentos conectados por corredores (AWADE; METZGER, 2008; PARDINI et al., 2005). Outros estudos indicam aumento no deslocamento de espécies nativas em fragmentos conectados (HADDAD et al., 2003).

No geral, a conectividade da paisagem facilita a movimentação de polinizadores (VAN GEERT et al., 2010); a movimentação de aves (BOSCOLO et al., 2008; IBARRA-MACIAS et al., 2011) sendo determinante para a diversidade de algumas espécies. Inclusive em alguns casos, a conexão foi mais relevante que o tamanho da área dos fragmentos (MARTENSEN et al., 2008). Animais de grande porte como *Ursus americanus* também apresentaram taxas superiores de movimentação em paisagens conectadas por corredores ecológicos (DIXON et al., 2006).

Estes trabalhos demonstram que a conectividade é um fator-chave para a conservação da biodiversidade. Também indicam que as ações para conservação não devem concentrar-se apenas na implantação de áreas protegidas, devendo também, promover o aumento dos níveis de conexão de paisagens fragmentadas (MARTENSEN et al., 2008). A conectividade poderá ser importante ao amenizar impactos na biodiversidade advindos com a mudança climática, numa escala temporal mais ampla (MARINI et al., 2009).

Estes trabalhos demonstram a existência de benefícios diretos do aumento da conectividade em paisagens fragmentadas. A maioria dos trabalhos desenvolvidos até o momento avaliou o uso de corredores na movimentação da fauna. Entretanto, poucos estudos foram realizados para entender os efeitos da conexão da paisagem na estrutura genética de populações fragmentadas; sobretudo de espécies arbóreas tropicais. A pesquisa destes dados poderá contribuir para a construção de modelos que integrem a conectividade da paisagem como elemento estratégico de conservação da biodiversidade (CHETKIEWICZ et al., 2006; HUCK et al., 2010).

2.1.5 Diversidade genética

De forma geral pode-se dividir em três principais categorias a diversidade biológica existente: a diversidade de ecossistemas, a diversidade de espécies e a diversidade genética dentro das espécies. A diversidade genética permite as populações naturais manterem processos evolutivos, e por consequência, a capacidade de adaptação a mudanças ambientais constantes na natureza (FRANKHAM et al., 2010).

A mutação é um fator evolutivo que aumenta a diversidade genética nas populações. Por outro lado, a deriva e a seleção natural tendem a diminuir a diversidade. A mutação altera a diversidade genética inserindo novos alelos em uma população pelos erros surgidos ao acaso durante a replicação do DNA. A migração permite a dispersão dos novos alelos a outras populações, desta forma, a migração homogeneiza as frequência alélica das populações naturais (ALLENDORF; LUIKART, 2007).

Através da análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) é possível detectar fenômenos evolutivos em uma determinada população. Segundo esse princípio as frequências alélicas irão manter-se constantes pelas gerações na ausência de mutação, migração e seleção natural. O princípio do EHW é um modelo desenvolvido para populações infinitas, com cruzamento aleatório (panmítica) e sem sobreposição de gerações (EDWARDS, 2008). O desvio do EHW indica que fenômenos evolutivos, subdivisão de uma população ou endogamia provocada pelo sistema reprodutivo estão alterando a diversidade genética da população estudada. A subdivisão de uma população afeta a diversidade genética reduzindo a média de heterozigotos em relação à esperada em condição de EHW. Em situações de ocorrência da subdivisão populacional, é esperado que exista diferença entre as frequências alélicas entre as subpopulações. Essa diferenciação genética pode ser resultado da seleção favorável a algum genótipo, por processos aleatórios na transmissão dos alelos entre as gerações ou pelas diferenças casuais na frequência alélica dos fundadores iniciais da subpopulação (HARTL; CLARK, 2007).

Outro fenômeno que altera o EHW é a endogamia que consiste na probabilidade de alelos serem idênticos por descendência de um ancestral comum aos progenitores ou por autofecundação, em espécies de plantas hermafroditas, e pode ser determinada pelo índice de fixação (F ou f) de Wright (1949). A endogamia

altera as frequências em EHW devido à diminuição da frequência de heterozigotos e ao aumento de alelos em homozigose, o que pode favorecer a deriva genética aleatória e com isso a perda de alelos, principalmente em populações de pequeno tamanho. A deriva genética está associada a perda da diversidade genética e por consequência, é esperado redução dos níveis reprodutivos e de sobrevivência das populações afetadas (FRANKHAM et al., 2010).

A diversidade genética é estimada por meio de marcadores que podem ser morfológicos, por estimar a diversidade genética através de características fenotípicas, muito utilizados em programa de melhoramento; ou podem ser marcadores moleculares que estimam a diversidade genética por meio de análise direta do DNA ou indiretamente pela sequência de uma proteína ou RNA. Os marcadores moleculares utilizam técnicas específicas para avaliar o polimorfismo do DNA, e com isso, podem medir a diversidade genética pela diferença existente nas sequências do DNA (HOSHINO et al., 2012).

A técnica mais utilizado para avaliar os padrões de variação genética por meio de marcadores moleculares é através da reação em cadeia de polimerase (PCR), que permite de forma seletiva, a amplificação de pequenos fragmentos de DNA. Os marcadores que utilizam a técnica da PCR, destacam-se nos estudos de variação genética de espécies arbóreas tropicais (FINKELDEY; HATTEMER, 2007).

Dentre os marcadores moleculares que utilizam a técnica da PCR, os marcadores microssatélites ou repetições de sequências simples, destacam-se nos estudos de diversidade genética. Por apresentarem altas taxas de mutação e codominância, os marcadores microssatélites permitem detectar genótipos de indivíduos heterozigotos e altos níveis de polimorfismo. Os marcadores microssatélites são pequenos fragmentos de DNA, geralmente com dois ou três pares de bases de comprimento, que são repetidos várias vezes e distribuídos largamente no genoma. Os marcadores microssatélites são desenvolvidos especificamente para uma espécie, entretanto, podem ser transferido para espécies estreitamente relacionadas que normalmente são do mesmo gênero (FINKELDEY; HATTEMER, 2007). Por serem altamente informativos, de fácil detecção e atualmente de baixo custo por reação, os marcadores microssatélites são os marcadores mais utilizados em estudos de diversidade genética (HOSHINO et al.,

2.1.6 Estrutura genética e fluxo gênico

A estrutura genética espacial (EGE) refere-se à distribuição não aleatória de alelos ou genótipos no espaço e no tempo. Devido à mobilidade limitada das plantas, sua estrutura genética implica em real estrutura espacial, que pode ocorrer entre populações geograficamente distintas, dentro de uma mesma população ou grupo de indivíduos, e entre progênies de uma mesma matriz. A estrutura genética é o reflexo do contexto histórico e biológico de cada espécie de planta, sendo influenciada por fatores como sistema reprodutivo, ciclo de vida, morfologia das flores, síndromes de polinização e dispersão de sementes, distribuição espacial; e por forças evolutivas, tais como, mutação, migração, deriva e seleção (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Além desses aspectos, o desequilíbrio de ligação, ou associações não aleatórias de alelos, em loci independentes podem provocar a estrutura genética (HARTL; CLARK, 2007).

Em plantas que predominantemente realizam fecundação cruzada (alógamas), pertencentes a estágios sucessionais avançados, é esperado encontrar maior divergência genética dentro do que entre populações devido ao intenso fluxo gênico. Por outro lado, espécies que realizam autofecundação, pertencentes a estágios sucessionais iniciais ou espécies anuais, é esperado encontrar baixa diversidade dentro das populações e grande divergência entre populações (LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Para caracterizar a EGE no estudo de genética de população foram desenvolvidos modelos estatísticos proposto por Wright, através das estatísticas F (WRIGHT, 1949; WRIGHT, 1965), N_e pela análise da diversidade gênica em populações subdivididas (NEI, 1973; NEI, 1977) e Cockerham pelo coeficiente de coancestria (WEIR; COCKERHAM, 1984).

Para descrever a organização espacial das subpopulações Mayer et al., (2009) desenvolveu três modelos para identificar a estrutura genética espacial em ordem decrescente de conectividade: (i) populações agregadas, (ii) metapopulação, e (iii) população isolada. No primeiro modelo, as subpopulações são consideradas

parte de uma população contínua. As subpopulações são bem conectadas por dispersão, existindo baixo risco de extinção local em cada subpopulação. O segundo modelo propõe que as subpopulações são organizadas em uma metapopulação, existindo manchas de habitat parcialmente isoladas, com dinâmica de extinção e recolonização das subpopulações. No terceiro modelo, as subpopulações são isoladas, separadas em pequenas populações, e uma vez extinta a população local não ocorrerá a recolonização.

Desta forma, é possível prever padrões de fluxo gênico e distribuição da variação genética dentro das subpopulações. No modelo (i) é esperado alto nível de fluxo gênico e imigração entre as subpopulações, com ausência de estrutura genética espacial, sem existência de diferenciação genética significativa, e aderência ao EHW. No modelo (ii) espera-se dispersão restrita, ocorrendo principalmente entre subpopulações próximas, com baixas taxas de imigração e fluxo gênico, existindo diferenciação genética significativamente e desvio do EHW, principalmente no déficit de heterozigotos. O modelo (iii) prevê populações isoladas sem fluxo gênico e imigração, desvio de EHW, resultando em deficiência de heterozigotos, e fortes efeitos da deriva e endogamia (MAYER et al., 2009).

A EGE em espécies arbóreas tropicais ocorre, principalmente em situações de limitação da dispersão de sementes. Em espécies onde o fluxo gênico via pólen é restrito, se a dispersão de sementes for de longa distância, provavelmente não deverá ocorrer EGE, pois os indivíduos estreitamente relacionados (meio-irmãos ou irmãos completos) estarão amplamente distribuídos no espaço. Por outro lado, se a dispersão de sementes é restrita espera-se produzir EGE mesmo em situações onde o fluxo de pólen atinge longas distâncias, devido ao fato dos descendentes encontrarem-se agregados (DICK et al., 2008). Em situações onde a dispersão de sementes é restrita e o fluxo de pólen também for restrito, é esperado forte EGE (SEBBENN, et al., 2011).

O fluxo gênico pode ser definido como a transferência de material genético entre populações, através da movimentação de indivíduos ou de seus gametas. Em genética de populações, o fluxo gênico é expresso pela taxa de migração (m), que estima a proporção de alelos oriundos pela migração em uma determinada população numa dada geração (AVISE, 1994). A migração tende a homogeneizar

populações e aumentar a variação genética dentro das populações. Desta forma, em situações com pouca migração, é possível evitar uma significativa divergência genética entre populações (HAMRICK; NASON, 2000).

O estudo de fluxo gênico via pólen permite a estimativa da taxa de imigração de pólen, do padrão e da distância da dispersão, e o estudo de diferenças na fertilidade e do sistema de reprodução. Por outro lado, a utilização de plântulas estabelecidas permite o estudo dos fatores acima mencionados, mas adicionalmente, permite o estudo da taxa de imigração de sementes, do padrão e da distância de dispersão de sementes (SEBBENN, et al., 2011). As matrizes e regenerantes podem ser analisadas pelo teste de parentesco (HALL et al., 1996; SEBBENN et al., 2011; SEOANE, et al., 2005). O teste estabelece a proporção de plântulas que não são descendentes das matrizes presentes no local, sendo possível estimar a taxa de imigração de sementes (SEBBENN et al., 2011). A vantagem deste estudo é a possibilidade de avaliar o fluxo gênico recente, e melhorar a compreensão da dinâmica populacional (BURCZYK et al., 2004). Dependendo da taxa de fluxo gênico, a migração poderá reduzir o impacto da fragmentação florestal; com imigração suficiente, uma população fragmentada poderá apresentar a mesma estrutura genética de uma grande população contínua (FRANKHAM, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

Em levantamentos preliminares, foi observado a baixa densidade populacional da *I. paraguariensis* na região do estudo. Devido a esta característica da distribuição espacial, possibilitou a este trabalho a realização do censo na área total dos dois fragmentos, onde todos os indivíduos observados da *I. paraguariensis* foram georreferenciados e tiveram amostras foliares coletadas para extração de DNA. Também foi medido a Circunferência à Altura do Peito (CAP) dos indivíduos com altura acima de 1,30 m e nas plântulas foi medida a sua altura com uso de fita métrica. Os indivíduos jovens, adultos e plântulas foram marcados com plaquetas metálicas, devidamente numeradas e georreferenciados com auxílio de um aparelho GPS (Garmin GPSMAP 76S). Foi utilizado o programa Garmin BaseCamp para transferir os dados do aparelho para o computador. A etapa de coleta contemplou o período de março a setembro de 2011.

3.2 Área de Estudo e Caracterização da Vegetação

O Parque Nacional do Iguaçu (PARNA Iguaçu) é o segundo parque nacional brasileiro, foi criado em 10 de janeiro de 1939 pelo decreto lei nº 1.035. Atualmente sua área total abrange 185.262,2 ha apenas no território brasileiro. Recebeu em 1986 recebeu o título, de Patrimônio Natural da Humanidade, concedido pela UNESCO. Com uma das mais espetaculares cataratas do mundo, o PARNA Iguaçu abriga a maior e mais importante área de floresta Estacional Semidecídua do País (ICMBIO, 2012). O clima na região próximo ao Parque Nacional do Iguaçu, segundo a classificação de Koeppen, é do tipo Cfa, subtropical úmido ou mesotérmico com verão quente, e temperaturas médias entre 15°C e 25°C e índice pluviométrico, entre 1500 mm a 2000 mm anuais, tendo os meses de outubro, novembro, dezembro e janeiro como os mais chuvosos. A intensidade média dos ventos é em torno de 11 km/h, não apresentando variações significativas ao longo do ano (MELO et al., 2006)

Segundo Ziller (1998), a formação vegetal predominante na região é a

Floresta Estacional Semidecídua, cuja característica é a presença de árvores caducifólias. Nas áreas mais altas, acima de 600 m, ocorrem remanescentes de Floresta Ombrófila Mista. Ambas formações vegetais pertencem ao Bioma Mata Atlântica. As maiores árvores da região atingem 35 m de altura, sendo comum encontrar, nas partes bem conservadas, troncos com mais de um metro de diâmetro (ZILLER, 1998).

Os fragmentos a serem estudados estão localizados na área do entorno do PARNA Iguaçu, nos municípios de Santa Terezinha de Itaipu e São Miguel do Iguaçu. A Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Santa Maria encontra-se em linha reta a uma distância aproximada de 3,7 km do Parque Nacional do Iguaçu; e o fragmento Fazenda dos Paulistas a uma distância aproximada de 3,9 km do parque (figura 7). Os fragmentos estão separados entre si por uma distância aproximada de 18,1 km.



Figura 7 - A) RPPN Santa Maria; B) Fazenda dos Paulistas; C) Parque Nacional do Iguaçu. Fonte: adaptado do Google earth

3.2.1 Reserva Particular do Patrimônio Natural Santa Maria

A área de estudo Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Santa Maria é uma unidade de conservação localizada na Fazenda Santa Maria (figura 8). RPPN é uma categoria do Sistema de Unidades de Conservação, cujo objetivo é conservar a diversidade biológica em propriedades particulares (SNUC, 2000). Apresenta uma área de aproximadamente 320 ha, encontrando-se em linha reta a uma distância aproximada de 3,7 km do PARNA Iguaçu (figura 7). O fragmento está localizado nas latitudes 25°29'08"S a 25°30'15"S e longitudes 54°21'26"O a 54°22'26"O, a uma elevação média de 296 m, com máxima de 338 m e mínima de 283 m.



Figura 8 - RPPN Santa Maria.
Fonte: adaptado do google earth

3.2.2 Fazenda dos Paulistas

A outra área de estudo é uma Reserva Legal de acordo com o Código Florestal (1965) localizada na Fazenda dos Paulistas (figura 09). O fragmento apresentou uma área de aproximadamente 320 ha, de tamanho muito similar a RPPN Santa Maria. Encontra-se em linha reta a uma distância aproximada de 3,9 km do PARNA Iguaçu e está localizado nas latitudes $25^{\circ}24'19.5''\text{S}$ a $25^{\circ}26'04.1''\text{S}$ e longitudes $54^{\circ}10'33.6''\text{O}$ a $54^{\circ}11'33.2''\text{O}$, a uma elevação média de 259 m, com máxima de 309 e mínima de 226 m.

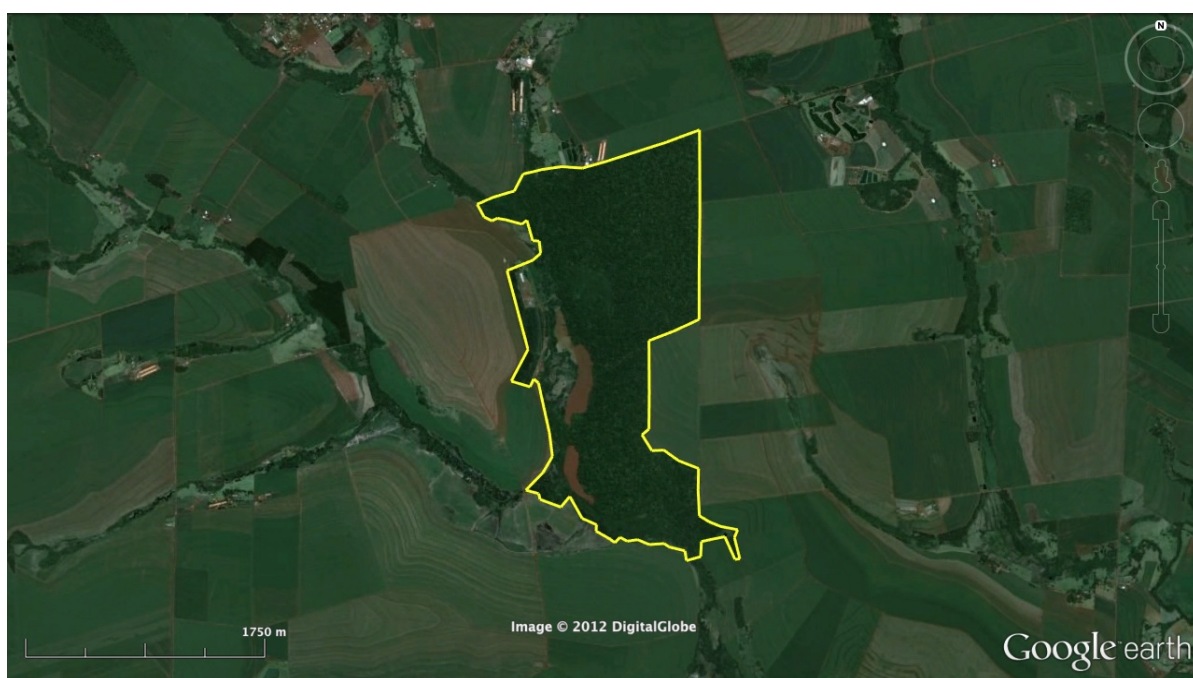


Figura 9 – Fazenda dos Paulistas.
Fonte: adaptado do google earth

3.3 Análises de Laboratório

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com o procedimento adaptado de Doyle; Doyle (1987) que consisti em: CTAB 3%, 1,4 NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, adicionado PVP 1,0%, β -mercaptoetanol 0,2%. Para extração de amostras foliares frescas foi utilizado aproximadamente 80 mg de tecido vegetal para as amostras frescas, e aproximadamente 120 mg para o material conservado em sílica-gel. As amostras foram acondicionadas em microtubos de 1,7 ml e maceradas com auxílio de nitrogênio líquido. Em seguida foi adicionado 700 μ l de tampão de extração. Os microtubos foram incubados no banho-maria à 65°C por uma hora, sendo agitados manualmente a cada 10 minutos. Após essa etapa, os microtubos foram resfriados até temperatura ambiente, e foi adicionado 600 μ l de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1. Posteriormente foram agitados e centrifugados por 10 minutos a 13.000 rpm, e o sobrenadante, de aproximadamente 400 μ l foi transferido para um novo microtubo. Em seguida foi adicionado 400 μ l de isopropanol e o material foi armazenado em freezer a -20°C por 12 horas. Posteriormente foi centrifugado durante 10 minutos a 13000 rpm para formação dos pellets. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram lavados por duas vezes a 500 μ l de etanol 70%, e por uma vez a 500 μ l de etanol 95%. Retirado o etanol, os microtubos permaneceram à temperatura ambiente sobre a bancada por aproximadamente 05 horas para secagem. Os pellets foram ressuspensos com 60 μ l de tampão TE (10 mM Tris- HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) acrescido de RNase (15 mg/ml) e incubados a 37°C por uma hora. Após essa etapa, as amostras foram armazenadas a -20°C.

Devido a dificuldades na amplificação, provavelmente devido a compostos secundários da *I. paraguariensis*, após a extração, as amostras foram submetidas a um processo de purificação de DNA. Dentre os vários protocolos testados, o que apresentou melhor resultado foi a purificação com acetato de amônio (OLIVEIRA et al., 2007). Entretanto, apenas parte das amostras apresentaram resultados satisfatórios, sendo assim, foi possível genotipar dentre as amostras coletadas pelo censo 34 adultos/ou jovens e 10 plântulas da RPPN Santa Maria, que representam respectivamente 40% e 14,29% das amostras coletadas. Na Fazenda dos Paulistas

foi possível genotipar 58 adultos e 50 plântulas, que representam respectivamente 63,74 e 100% das amostras coletadas.

A quantificação do DNA foi realizada por meio da análise comparativa com amostras de concentração conhecida (λ). O DNA das amostras e o λ foram submetidos à eletroforese durante 30 minutos em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Posteriormente, as amostras foram diluídos a 2,5 ng/ μ l em água Miliq.

O coquetel para a realização da amplificação das amostras foi composto por 7,5 ng de DNA genômico, 250 μ M de dNTP, 0,5 μ M de MgCl₂, tampão para PCR 1X (10mM de Tris-HCl, 50mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, pH 8.3), 2,5 μ g/ml de BSA, 0,2 μ M de cada iniciador e 1U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi realizada em termociclador do tipo MJ Research PTC-100, utilizando-se o seguinte protocolo: 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de hibridação específica de cada par de iniciadores por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e terminando com 72°C por 7 minutos (tabela 1).

Tabela 1 – Programação da PCR

Ciclo	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
1	94	5
2	94	1
3	Temp. desejada	1
4	72	1
5	30X times to 02	
6	72	7
7	4	infinito
8	END	

Os indivíduos foram genotipados com uso de oito marcadores microssatélites nucleares (tabela 2) desenvolvidos para a espécie por Pereira et al. (no prelo). Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida a 5%, em corrida de uma hora e trinta minutos em tampão TBE 1X em cuba vertical, pré-aquecida por no mínimo 40 minutos. Posteriormente, foram

revelados com coloração de nitrato de prata, seguindo o protocolo de Creste et al. (2001). Os géis foram interpretados depois de secarem por cerca de 24 horas, escaneados e posteriormente descartados. O tamanho dos alelos foi estimado através da comparação com marcador de peso molecular padrão aplicado no gel com tamanho de 10-pb ladder. Foram considerados alelos distintos os fragmentos que diferiram por pelo menos dois nucleotídeos.

Tabela 2 – Loci de microssatélites de *I. paraguariensis* com motivos, comprimento em pares de bases e temperaturas de anelamento em °C por Pereira et al. (no prelo)

Locus	Repetição	Comprimento (pb)	Temperatura em °C
lpg_07	(AG)13	160-190	58
lpg_19	(AT)6	190-195	56
lpg_23	(AT)9	250-280	62
lpg_37	(GT)7 (AG)6	150-180	56
lpg_43	(TC)6	150-180	56
lpg_49	(TC)8	100-150	58
lpg_50	(TC)9	150-170	56
lpg_52	(TG)6 (TA)6	140-170	62

4 ANÁLISE DOS DADOS

4.1 Análise da diversidade genética e índice de fixação

A diversidade genética de adultos e plântulas de cada população, e do total amostrado, foi estimada a partir do número de alelos (A), da heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) em equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco e para média de todos os loci. O nível de endogamia entre adultos e plântulas foi estimada utilizando o índice de fixação (F).

O significado dos valores foi calculada usando permutações de alelos entre indivíduos (1.000) e uma correção de Bonferroni sequencial para comparações múltiplas (95%, $\alpha = 0,05$), as análises foram executados utilizando o programa FSTAT, versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). Adicionalmente, realizou-se um teste de desequilíbrio de ligação entre pares de loci. A distribuição da diversidade genética entre e dentro de pares de amostras, foi realizada utilizando-se a estatística F_{ST} com base no método de Weir; Cockerham (1984). Ambos os testes de desequilíbrio de ligação e diferenciação entre populações foram realizados utilizando o programa FSTAT.

4.2 Análise da estrutura genética espacial intrapopulacional

A Estrutura Genética Espacial (EGE) intrapopulacional foi estimada utilizando o coeficiente de coancestria média (θ_{xy}) proposto por Loiselle et al. (1995), entre pares de árvores adultas/jovens e pares de plântulas com o programa SPAGEDI (Spatial Pattern Analysis of Genetic Diversity) versão 1.3 (HARDY; VEKEMANS, 2002).

Para visualizar a EGE, os valores θ_{xy} foram calculados sobre um conjunto de oito classes de distância. Para testar se os valores médios diferiram significativamente de zero, um intervalo de confiança a 95% foi calculado para cada valor observado em cada classe de distância, através de 10.000 permutações. O intervalo de confiança foi utilizado para construir o correlograma no gráfico conjuntamente com os valores observados.

4.3 Análise de parentesco

A estimativa do fluxo gênico contemporâneo de sementes foi realizada através da análise de parentesco de acordo com Marshall et al., (1998). Para tanto foram comparados os genótipos das plântulas e adultos, realizando-se o teste de exclusão de paternidade e maternidade com uso do programa Cervus 3.0 (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI et al., 2007). A análise de parentesco foi realizada por atribuição de máxima verossimilhança (MEAGHER, 1986) com base nos genótipos multilocus das 58 árvores adultas e 50 plântulas da Fazenda dos Paulistas, e das 34 árvores adultas e 10 plântulas da RPPN Santa Maria. Os pares de pais e mães prováveis foram determinados pela estatística Δ (Marshall et al, 1998) utilizando por referências as frequências alélicas da população adulta (MEAGHER; THOMPSON, 1987).

A simulação gera valores críticos, de modo que a significância dos valores de Δ , encontrado nos testes de parentesco possa ser determinada. Para simulação foram utilizadas 10.000 repetições com taxa de erro de genotipagem de 0,01 e intervalo de confiança, restrito a 95%, para determinar um provável parental (MARSHALL et al.,1998). Considerou-se um provável parental ou por um par de prováveis parentais os valores de Δ maiores que o valor crítico calculado por meio de simulações em comparação com os indivíduos selecionados ao acaso.

Por todos os indivíduos das duas populações apresentaram posição espacial conhecida, em termos de coordenadas geográficas, as plântulas que apresentarem ambos os parentais dentro das duas populações foram utilizadas para determinar as distâncias média, mediana, estimativas mínima e máxima da dispersão de pólen.

Para a estimativa de dispersão de sementes, por não ter sido possível identificar o sexo das árvores durante as etapas de coleta no campo nas duas populações, foram realizadas duas estimativas para determinar a suposta árvore doadora de sementes e a suposta árvore doadora de pólen a partir da posição espacial das plântulas. A primeira estimativa considerou o parental localizado mais proximamente, em relação a posição espacial da plântula, como árvore doadora de sementes, e o parental localizado mais distantemente como árvore doadora de

pólen. A segunda estimativa considerou o parental localizado mais distantemente, em relação a posição espacial da plântula, como árvore doadora de sementes e o parental localizado mais proximamente como árvore doadora de pólen. As duas estimativas foram realizadas para as plântulas que apresentarem ambos os parentais dentro das duas populações. Se apenas um único progenitor foi identificado nas populações, foi assumido que este seria o parental maternal.

RESULTADOS

5.1 Distribuição espacial da *I. paraguariensis*

A distribuição espacial da *I. paraguariensis* na RPPN Santa Maria foi agregada, com localização em solos predominante encharcados nas margens de rios e nascentes do fragmento (figura 10 e 11). Foram encontrado ao todo 85 indivíduos adultos e/ou jovens que apresentaram DAP médio de 6,24 cm, com mínima de 0,95 cm e máxima de 41,22 cm. A população apresentou majoritariamente indivíduos com DAP abaixo de 10 cm (figura 12). A densidade dos indivíduos adultos e/ou jovens da RPPN Santa Maria foi raríssima com 0,27 indivíduos por hectare. Foram encontradas 70 plântulas que em sua maioria estavam localizadas próximas as árvores adultas e/ou jovens, e apresentaram altura média de 82,8 cm, com mínima de 7 cm e máxima de 130 cm (figura 13).

Os indivíduos encontrados na Fazenda dos Paulistas, de forma semelhante a RPPN Santa Maria, também apresentaram distribuição espacial agregada (figura 14 e 15). Entretanto, na Fazenda dos Paulistas, a *I. paraguariensis* foi localizada predominantemente em locais com solo constantemente encharcado, porém semelhantes a várzeas ou banhados, e apenas parte foi localizada às margens de rios. Foram encontrados ao todo 91 indivíduos adultos e/ou jovens com DAP médio de 5,96 cm, com mínima de 1,11 cm e máxima de 48,22 cm. Semelhante à RPPN Santa Maria, a população apresentou majoritariamente indivíduos com DAP inferior a 10 cm (figura 16). A densidade dos indivíduos adultos e/ou jovens da Fazenda dos Paulistas foi raríssima com 0,29 indivíduos por hectare. As plântulas apresentaram distribuição agregada e geralmente próximas as árvores adultas e/ou jovens. Foram encontradas ao todo 50 plântulas com altura média de 97,6 cm, com mínima de 15 cm e máxima de 130 cm (figura 17).



Figura 10 – localização dos indivíduos adultos da RPPN Santa Maria.
Fonte: adaptado do google earth

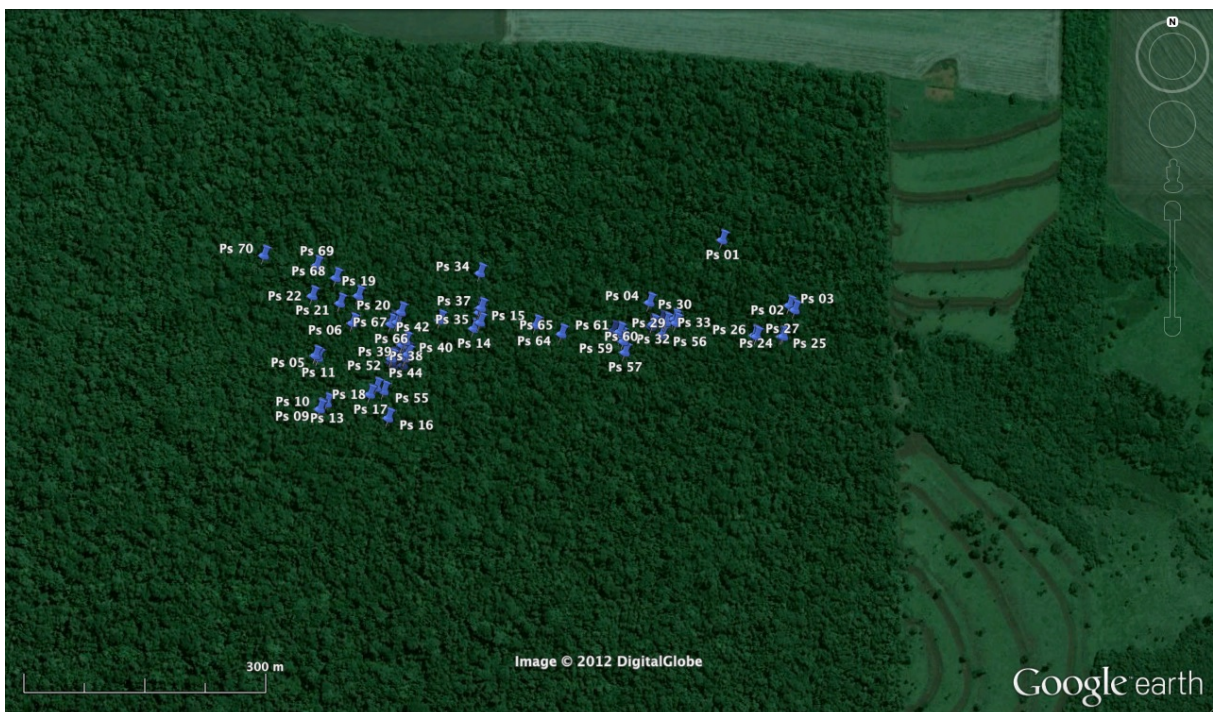


Figura 11 – localização das plântulas da RPPN Santa Maria.
Fonte: adaptado do google earth

Distribuição do DAP das Árvores da RPPN Santa Maria

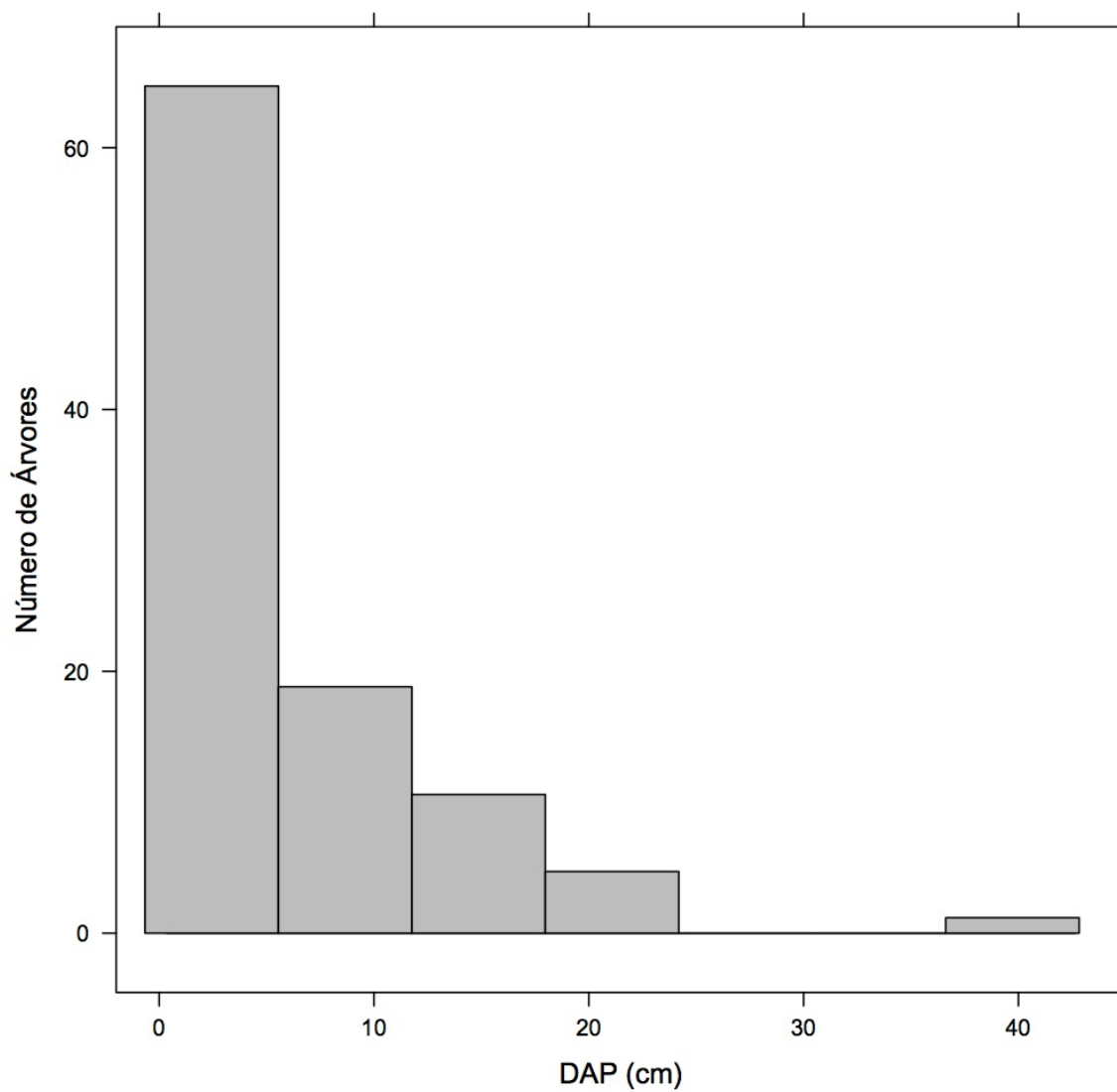


Figura 12 – distribuição do DAP em (cm) dos indivíduos adultos da RPPN Santa Maria

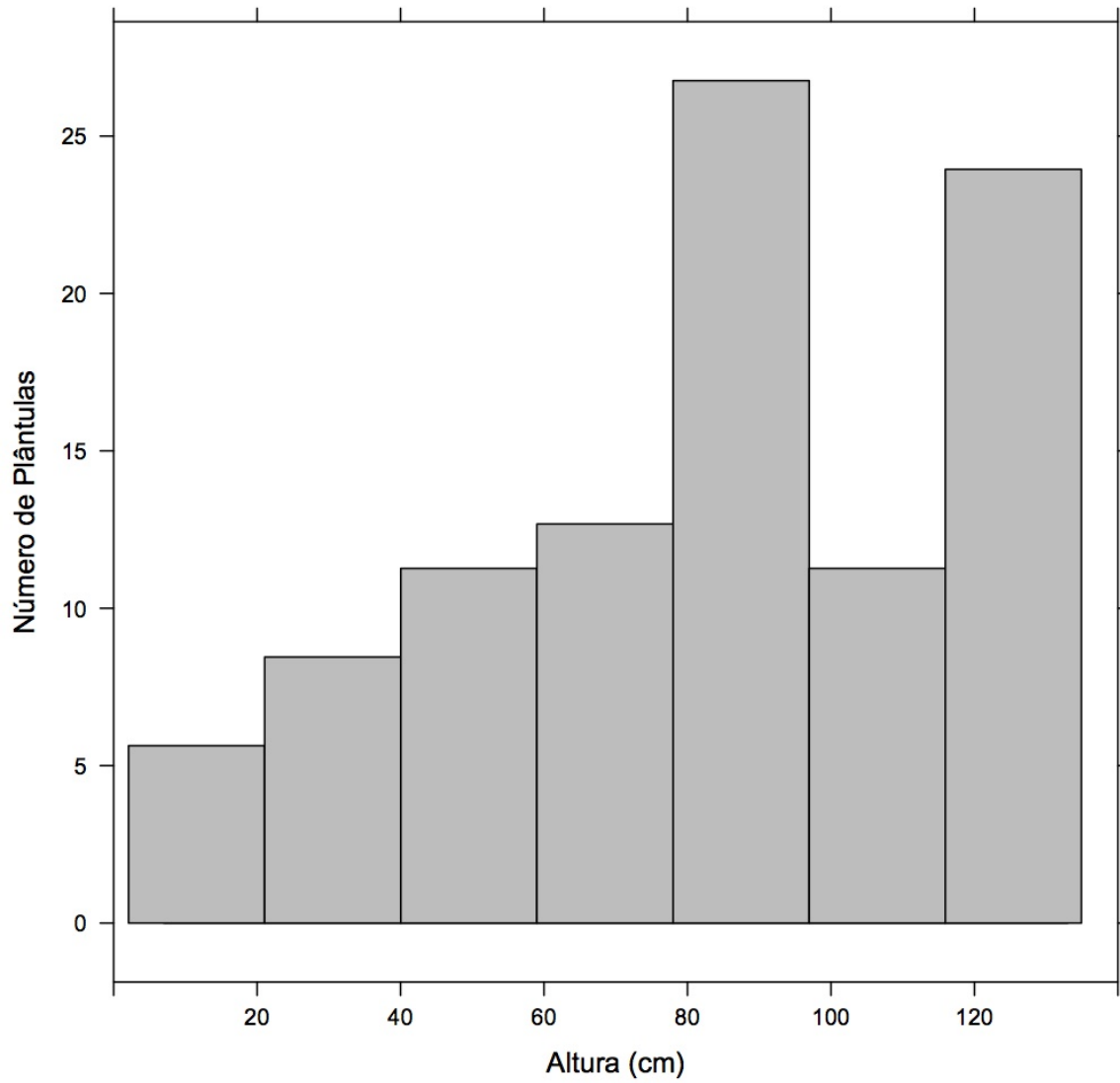
Distribuição da Altura das Plântulas da RPPN Santa Maria

Figura 13 – distribuição da altura das plântulas em (cm) da RPPN Santa Maria



Figura 14 – localização dos indivíduos adultos/jovens da Fazendas dos Paulistas.
Fonte: adaptado do google earth



Figura 15 – localização das Plântulas da Fazendas dos Paulistas.
Fonte: adaptado do google earth

Distribuição do DAP das Árvores da Fazenda dos Paulistas

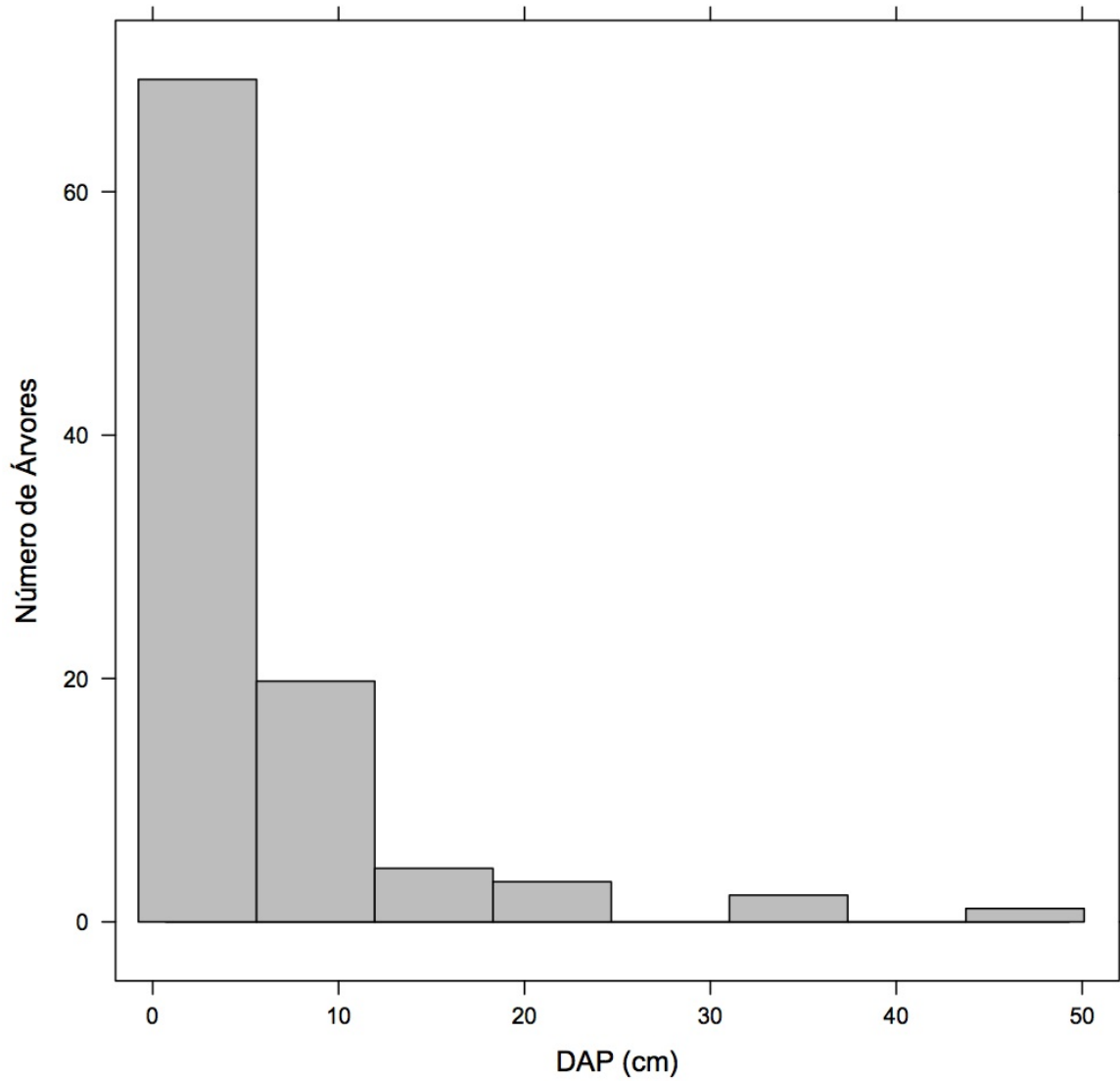


Figura 16 – distribuição do DAP em (cm) dos indivíduos adultos da Fazenda dos Paulistas

Distribuição da Altura das Plântulas da Fazenda dos Paulistas

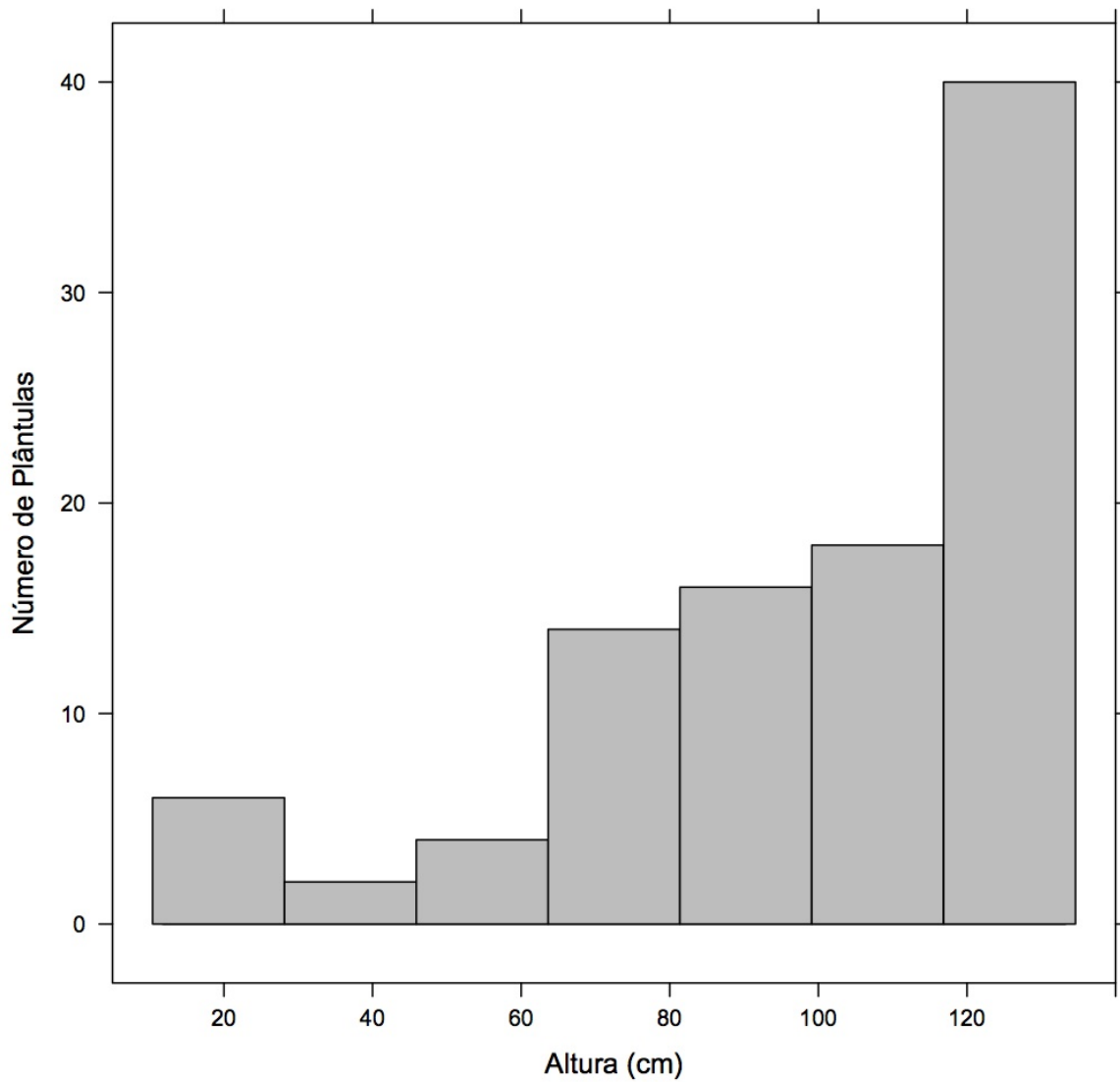


Figura 17 – distribuição da altura das plântulas em (cm) da Fazenda dos Paulistas

5.1 Diversidade genética e índice de fixação

A análise contemplou apenas parte das amostras coletadas, somente aquelas que apresentaram resultados satisfatórios na genotipagem. Sendo assim, foi possível genotipar dentre as amostras coletadas pelo censo 34 adultos/jovens e 10 plântulas da RPPN Santa Maria, que representam respectivamente 40% e 14,29% das amostras coletadas. Na Fazenda dos Paulistas foi possível genotipar 58 adultos/jovens e 50 plântulas, que representam respectivamente 63,74 e 100% das amostras coletadas.

Os oito loci apresentaram polimorfismo na amostra total de 152 indivíduos. O número total de alelos foi 34, com média de 4,25 e variação de 3 a 7 alelos por loco (tabela 3). A heterozigosidade observada variou de 0,143 a 0,800, com média de 0,401. A heterozigosidade esperada oscilou entre 0,154 a 0,754, com média de 0,424. O índice de fixação foi positivo na média dos loci com valor de 0,054 e variação entre -0,202 a 0,295, porém não foi observado desvio de EHW (tabela 3). Os 08 loci não apresentaram desequilíbrio de ligação, portanto, foram ideais para análise de parentesco e fluxo gênico (tabela 4).

Tabela 3 - Índices de diversidade genética.

Locus	A	H_o	H_e	F	P_{Pair}
lpg_07	7	0,800	0,754	-0,061	0,650
lpg_19	4	0,418	0,593	0,295	0,823
lpg_23	3	0,638	0,531	-0,202	0,861
lpg_37	3	0,143	0,154	0,074	0,988
lpg_43	3	0,412	0,439	0,062	0,905
lpg_49	4	0,307	0,369	0,167	0,931
lpg_50	5	0,309	0,307	-0,008	0,952
lpg_52	5	0,178	0,242	0,265	0,971
Média	4,25	0,401	0,424	0,054	----
Desvio	1,39	0,223	0,197	0,167	----
Soma	34				0,999

Nota: A é o número de alelos; H_o é a heterozigosidade observada; H_e é a heterozigosidade esperado; F é o índice de fixação e P_{Pair} é a probabilidade de exclusão do primeiro parental.

Tabela 4 – Análise de desequilíbrio de ligação

Combinação de Locus			P-Value limite a 5%	P-value Adultos SM	P-value Plântulas SM	P-value Adultos FP	P-value Plântulas FP	P-value Todos
lpg_07	X	lpg_19	0,0016	1,0000	nc	1,0000	0,3871	0,6836
lpg_07	X	lpg_23	0,0016	nc	nc	0,3429	0,0571	0,0021
lpg_07	X	lpg_37	0,0016	0,6082	nc	0,8582	nc	0,7000
lpg_07	X	lpg_43	0,0016	nc	nc	0,5468	0,7982	0,7439
lpg_07	X	lpg_49	0,0016	1,0000	nc	0,9129	0,6814	0,8721
lpg_07	X	lpg_50	0,0016	1,0000	nc	0,1914	0,0696	0,1307
lpg_07	X	lpg_52	0,0016	nc	nc	nc	0,5361	0,7604
lpg_19	X	lpg_23	0,0016	nc	nc	0,5075	0,1904	0,2929
lpg_19	X	lpg_37	0,0016	0,6007	nc	0,2057	nc	0,3211
lpg_19	X	lpg_43	0,0016	0,8432	nc	0,7314	0,9725	0,9886
lpg_19	X	lpg_49	0,0016	0,0864	nc	0,5154	0,4082	0,4482
lpg_19	X	lpg_50	0,0016	0,1186	nc	0,3993	0,6214	0,4404
lpg_19	X	lpg_52	0,0016	nc	nc	0,4954	0,9496	0,9943
lpg_23	X	lpg_37	0,0016	nc	nc	0,3946	nc	0,3300
lpg_23	X	lpg_43	0,0016	1,0000	nc	0,2668	0,7900	0,6539
lpg_23	X	lpg_49	0,0016	1,0000	nc	0,8757	0,1279	0,2057
lpg_23	X	lpg_50	0,0016	1,0000	nc	0,4000	0,8000	0,8704
lpg_23	X	lpg_52	0,0016	nc	nc	1,0000	0,2629	0,5843
lpg_37	X	lpg_43	0,0016	0,9246	nc	0,1471	nc	0,3011
lpg_37	X	lpg_49	0,0016	0,0582	nc	0,2914	nc	0,0982
lpg_37	X	lpg_50	0,0016	0,5093	nc	0,7014	nc	0,3350
lpg_37	X	lpg_52	0,0016	nc	nc	0,2439	nc	0,0024
lpg_43	X	lpg_49	0,0016	0,9979	1,0000	0,9036	0,1071	0,7736
lpg_43	X	lpg_50	0,0016	0,1089	nc	0,4811	0,6289	0,1568
lpg_43	X	lpg_52	0,0016	nc	nc	nc	0,0304	0,0029
lpg_49	X	lpg_50	0,0016	0,6729	nc	0,5275	0,2132	0,3539
lpg_49	X	lpg_52	0,0016	nc	1,0000	0,4389	0,3286	0,1225
lpg_50	X	lpg_52	0,0016	nc	nc	0,4514	0,9636	0,9421

Nota: nc não calculável.

5.2 Diversidade genética dentro das populações

A diversidade genética encontrada na RPPN Santa Maria foi baixa entre adultos e plântulas sendo menor para a última (2,75 e 1,43), o que também refletiu na heterozigosidade observada (0,412 e 0,268) e esperada (0,425 a 0,258). O provável motivo foi a baixa genotipagem dos indivíduos desta população que apresentaram somente parte dos indivíduos com genotipagem em todos os loci. A situação foi particularmente crítica para as plântulas da RPPN Santa Maria. O índice de fixação foi positivo para adultos e plântulas da RPPN Santa Maria (0,151 e 0,376), porém não foi observado desvio de EHW (tabela 5).

A diversidade genética encontrada na Fazenda dos Paulistas foi ligeiramente superior para as plântulas em comparação aos indivíduos adultos (3,37 e 3,25), o que também refletiu na heterozigosidade observada (0,474 e 0,420) e esperada (0,420 e 0,384). O índice de fixação foi negativo para os adultos da Fazenda dos Paulistas (-0,027) e positivo para as plântulas (0,013), porém não foi observado desvio de EHW (tabela 6).

Tabela 5 – Diversidade genética e índices de fixação de árvores adultas/jovens e plântulas RPPN Santa Maria

Locus	Adultos Santa Maria (N=34)				Plântulas Santa Maria (N= 10)			
	A	H_o	H_e	F	A	H_o	H_e	F
lpg_07	3	0,666	0,833	0,200	nc	nc	nc	nc
lpg_19	3	0,222	0,563	0,605	1	nc	nc	nc
lpg_23	3	0,334	0,317	-0,053	1	nc	nc	nc
lpg_37	2	0,250	0,227	-0,100	1	nc	0	nc
lpg_43	2	0,571	0,505	-0,130	2	0,250	0,583	0,571
lpg_49	4	0,520	0,605	0,140	2	0,222	0,375	0,407
lpg_50	4	0,320	0,346	0,075	1	nc	0,000	nc
lpg_52	1	nc	0	nc	2	0,333	0,333	0,000
Média	2,75	0,412	0,425	0,151	1,43	0,268	0,258	0,376
Desvio								
o	1,03	0,172	0,257	0,253	0,53	0,058	0,254	0,294

Nota: A é o número de alelos; H_o é a heterozigosidade observada; H_e é a heterozigosidade esperado; F é o índice de fixação, nc não calculável.

Tabela 6 – Diversidade genética e índices de fixação de árvores adultas/jovens e plântulas Fazenda dos Paulistas

Locus	Adultos Fazenda dos Paulistas (N=58)				Plântulas Fazenda dos Paulistas (N=50)			
	A	H_o	H_e	F	A	H_o	H_e	F
lpg_07	7	0,812	0,727	-0,117	5	0,807	0,738	-0,094
lpg_19	3	0,333	0,502	0,336	4	0,625	0,692	0,097
lpg_23	3	0,593	0,461	-0,286	3	0,792	0,634	-0,249
lpg_37	3	0,263	0,279	0,057	1	nc	0,000	nc
lpg_43	2	0,417	0,394	-0,058	3	0,355	0,422	0,158
lpg_49	3	0,334	0,294	-0,136	3	0,158	0,236	0,330
lpg_50	3	0,306	0,320	0,043	4	0,348	0,307	-0,133
lpg_52	2	0,091	0,091	0,000	4	0,231	0,332	0,304
Média	3,25	0,394	0,384	-0,027	3,37	0,474	0,420	0,013
Desvio	1,58	0,220	0,188	0,182	1,19	0,266	0,254	0,224

Nota: A é o número de alelos; H_o é a heterozigotidade observada; H_e é a heterozigotidade esperado; F é o índice de fixação, nc não calculável.

5.3 Distribuição da variação genética

Na comparação, a distribuição da variação genética foi maior entre do que dentro das populações. A variação foi de 7,67% entre os adultos das duas populações, 8,09% entre os adultos da Fazenda dos Paulistas e as plântulas da RPPN Santa Maria, 8,98% entre os adultos da RPPN Santa Maria e as plântulas da Fazenda dos Paulistas. Dentro das amostras, adultos e plântulas da RPPN Santa Maria apresentaram variação de 2,51%, na Fazenda dos Paulistas a variação foi de 1,87% entre adultos e plântulas (tabela 7).

Tabela 7 - Diferenciação genética entre e dentro de populações.

	PLSM	ADFP	PLFP
ADSM	0,0251	0,0767	0,0898
PLSM	--	0,0809	0,0668
ADFP	--	--	0,0187
PLFP	--	--	--

Nota: ADSM (adultos RPPN Santa Maria), PLSM (plântulas RPPN Santa Maria), ADFP (adultos Fazenda dos Paulistas), PLFP (plântulas Fazenda dos Paulistas).

5.4 Estrutura genética espacial intrapopulacional

A análise da estrutura genética espacial foi realizada para os adultos das duas populações e para as plântulas, somente na Fazenda dos Paulistas, devido à baixa genotipagem das mesmas na RPPN Santa Maria. Os valores não foram significativamente maiores do que o limite superior do intervalo de confiança de 95%, portanto, não foi observado estrutura genética espacial entre os adultos das duas populações e entre as plântulas da Fazenda dos Paulistas (figura 18). Os resultados obtidos sugerem não existir EGE para a *I. paraguariensis* nas duas populações.

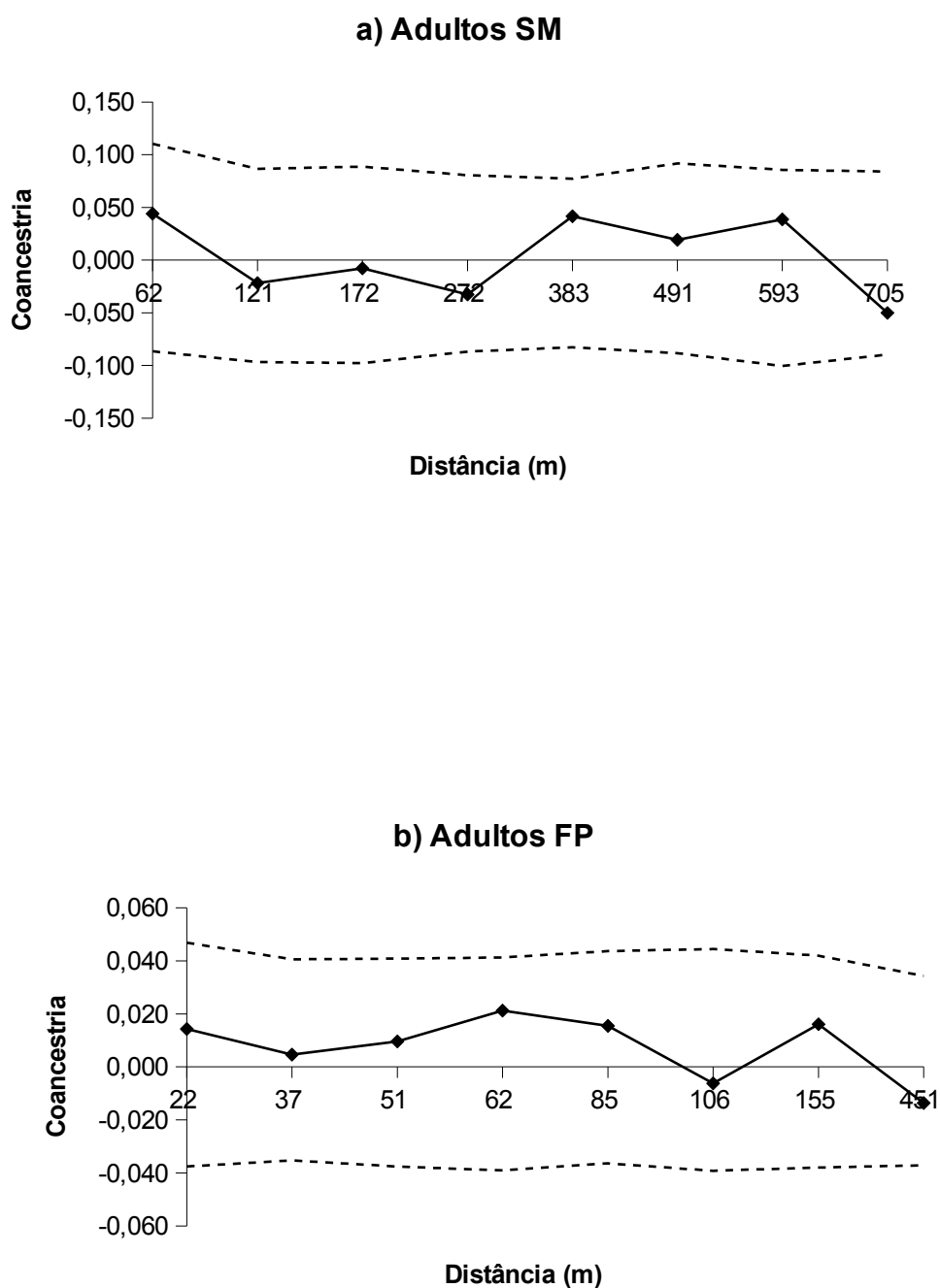


Figura 18 - Correlogramas do coeficiente de coancestria em classes θ_{xy} de distância entre árvores adultas da *I. paraguariensis* na RPPN Santa Maria (a), árvores adultas da Fazenda dos Paulistas, e plântulas da fazenda dos Paulistas (c), linhas pontilhadas significam o limite do intervalo de confiança de 95% (continuação)

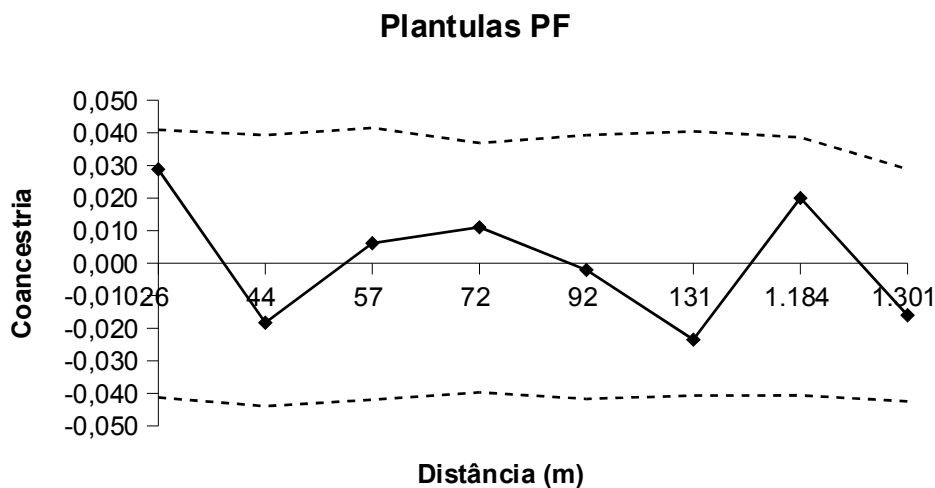


Figura 18 - Correlogramas do coeficiente de coancestria θ_{xy} em classes de distância entre árvores adultas da *I. paraguariensis* na RPPN Santa Maria (a), árvores adultas da Fazenda dos Paulistas, e plântulas da fazenda dos Paulistas (c), linhas pontilhadas significam o limite do intervalo de confiança de 95%

(conclusão)

5.5 Análise de parentesco e fluxo gênico

Do total de plântulas analisadas pelo teste parentesco e fluxo gênico todas apresentaram os parentais no próprio fragmento de ocorrência, ou seja, não foi possível detectar migração por pólen e por sementes no presente trabalho. O teste de parentesco foi realizado para 28 plântulas, utilizando no mínimo 04 e no máximo 08 loci, com probabilidade de exclusão do primeiro parental entre 0,650 a 0,988 (tabela 3). Do total das plântulas analisadas, 02 plântulas são pertencentes a RPPN Santa Maria e 26 plântulas pertencentes a Fazenda dos Paulistas. A média e mediana da distância de dispersão de pólen foi respectivamente 393 m e 96 m, com mínima de 2 m e máxima de 1.589 m (tabela 8). A análise da distribuição espacial do fluxo de pólen estimou em 60,7% da dispersão em distâncias inferiores a 140 m, 85,7% da dispersão em distâncias até 834 m, e apenas 14,3% da dispersão de pólen em distância superiores a 1.000 m (figura 19).

A estimativa de dispersão de sementes mínima, apresentou média e mediana de dispersão de 421 m e 82 m, com mínima de 1 m e máxima de 1.932 m. Pela estimativa de dispersão máxima, a média e mediana de dispersão de sementes foi 740 m e 481 m, com mínima de 4 m e máxima de 1.949 m (tabela 8).

Pela estimativa de dispersão de sementes mínima, aproximadamente 64,3% da dispersão de sementes ocorreu em distâncias inferiores a 100 m, 71,43% da dispersão foi realizada em distâncias inferiores a 160 m, e apenas 14,29% da dispersão de sementes ocorreu em distâncias superiores a 1.000 m (figura 20). Pela estimativa de dispersão de sementes máxima, apenas 35,71% da dispersão de sementes foi realizado em distâncias inferiores a 100 m, 75% da dispersão foi realizado em distâncias até 1.320 m, com 32,14% do total da dispersão de sementes em distâncias superiores a 1.000 m (figura 21).

Os dados da análise de parentesco realizado para as plântulas das duas populações, com os respectivos LOD score estão assinalados na tabela 9. Os resultados com LOD score positivo implicam em maior probabilidade dos candidatos serem os respectivos parentais, em comparação com os indivíduos selecionados ao acaso.

Tabela 8 – distâncias de dispersão de pólen, sementes máxima e sementes mínima

	Pólen	Sementes Mín.	Sementes Máx.
Média	392	421	740
Desvio	523	666	718
Mín.	2	1	4
Max.	1589	1932	1949
Mediana	96	82	481

Nota: distâncias em (m)

Tabela 9 – Análise de parentesco das duas populações

Plântulas	Parental	Pair LOD score	Parental	Pair LOD score	Trio LOD score	Trio Delta
P39SM	53SM	1,4900	82SM	-0,0133	2,1500	0,0064
P71SM	53SM	2,5400	68SM	1,8700	4,4200	0,0053
P02FP	2FP	2,0300	89FP	0,5440	3,8300	0,4580
P04 FP	72FP	3,6300	89FP	-0,1360	4,9900	0,0936
P07FP	9FP	0,7750	71FP	1,2300	3,0600	0,1340
P09FP	10FP	1,0300	11FP	1,0300	2,0700	0,1410
P10FP	64FP	3,0700	77FP	2,0200	5,7000	1,8200
P11FP	77FP	1,3300	82FP	0,7600	3,9100	0,6560
P12FP	26FP	0,7870	64FP	0,4740	1,9400	0,0027
P14FP	71FP	2,1500	72FP	1,3900	4,8700	1,3200
P15FP	10FP	0,8430	11FP	0,8430	1,6900	0,1410
P16FP	49FP	1,1500	85FP	0,8910	2,0400	0,8700
P18FP	10FP	0,1040	26FP	1,5900	2,2700	0,0000
P20FP	21FP	2,1200	71FP	1,1400	4,3700	0,0115
P26FP	48FP	2,9800	77FP	1,0100	6,0300	0,0631
P28FP	10FP	0,8910	11FP	0,8910	1,7800	0,0019
P30FP	71FP	0,5320	72FP	4,0600	6,4900	1,8500
P33FP	26FP	0,4700	50FP	0,6870	1,4700	0,0031
P34FP	39FP	1,2300	61FP	0,4970	2,1500	0,0060
P35FP	50FP	1,8000	55FP	1,5500	3,3500	0,0844
P37FP	10FP	0,8480	82FP	0,7600	2,8400	0,1850
P41FP	26FP	2,1800	39FP	0,3720	3,4500	0,3430
P42FP	10FP	0,6490	58FP	1,4600	2,6900	0,0000
P45FP	26FP	1,2100	50FP	1,4200	2,9500	0,3420
P47FP	10FP	0,2120	82FP	1,0300	1,9200	0,0000
P48FP	12FP	1,2800	75FP	1,2800	2,1400	0,0021

Nota: SM (RPPN Santa Maria), FP (Fazenda dos Paulistas).

Distribuição das Distâncias do Fluxo de Pólen

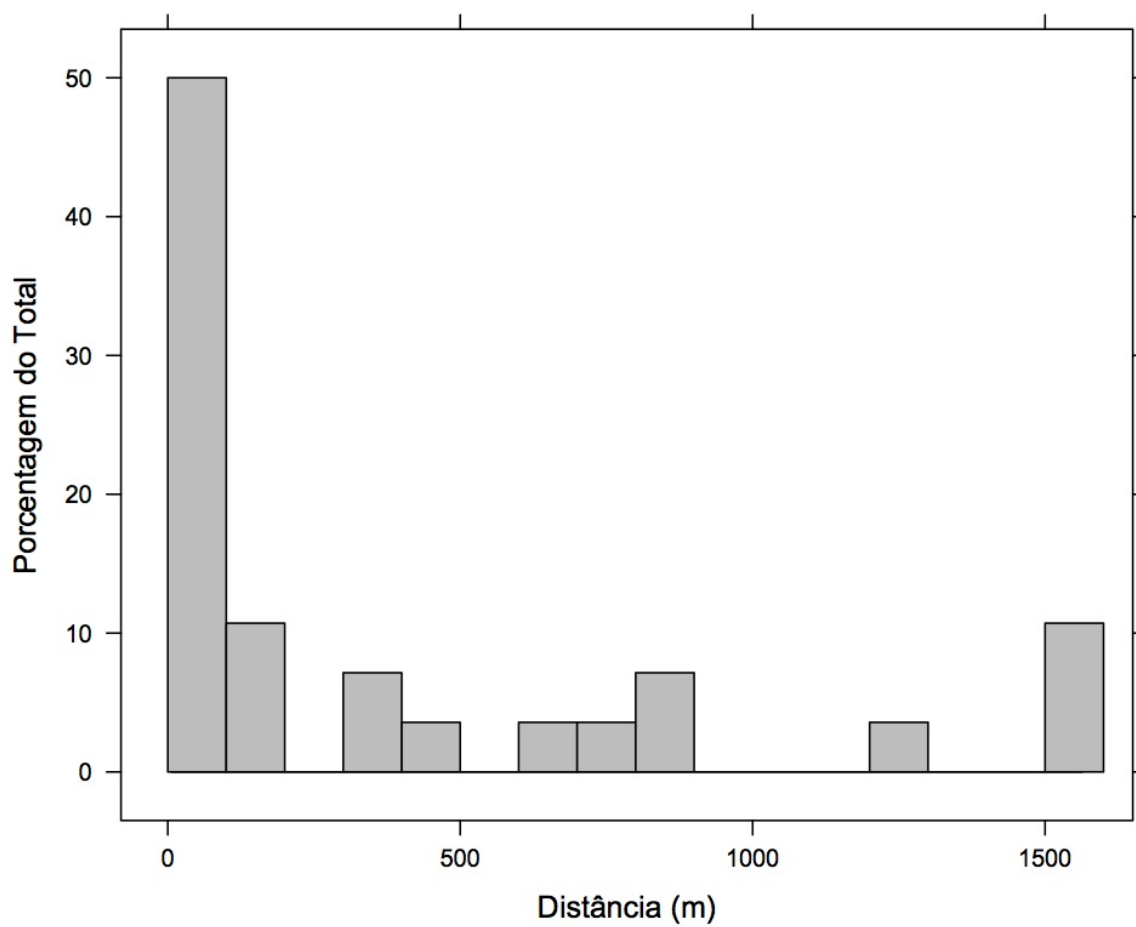


Figura 19 – frequência da distância de dispersão do fluxo de pólen

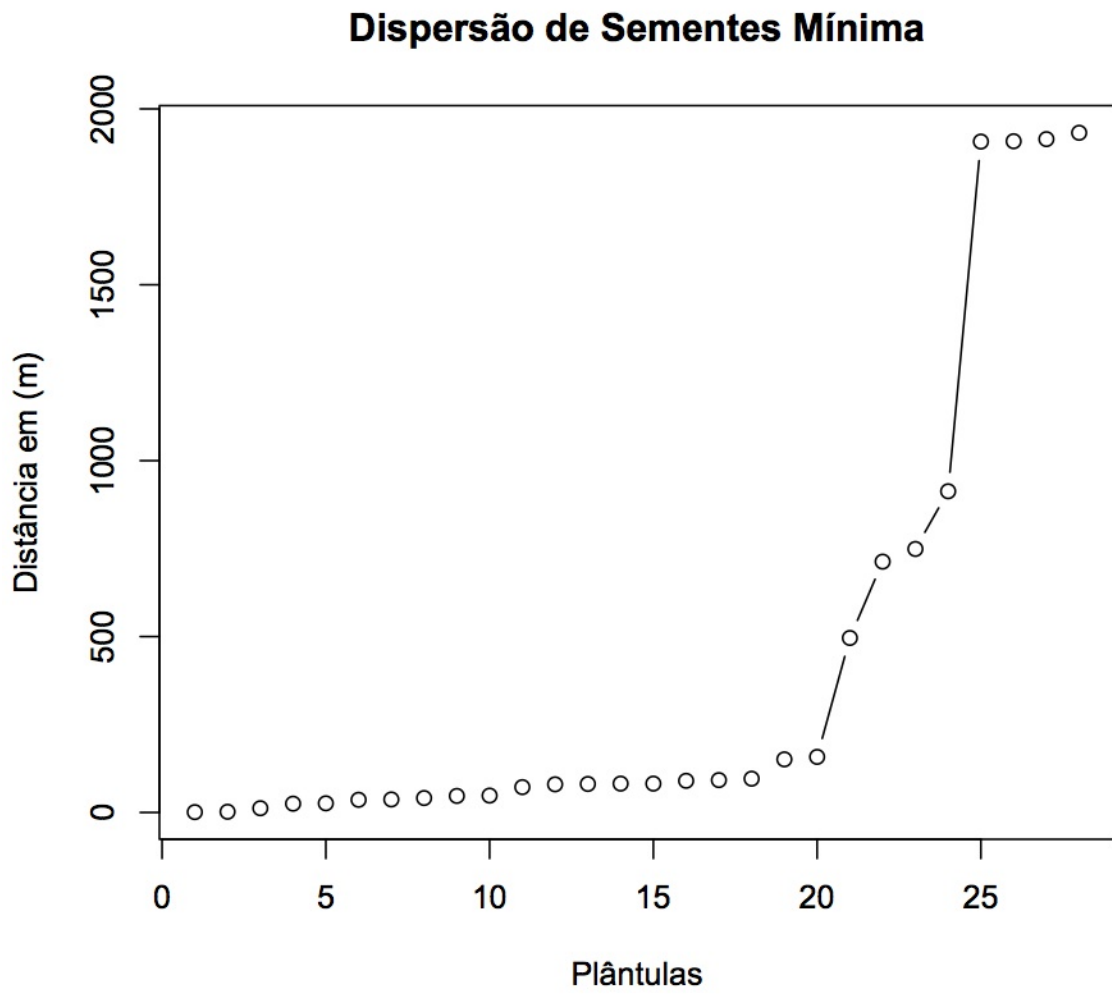


Figura 20 – distribuição da dispersão de semente pela estimativa de distância mínima

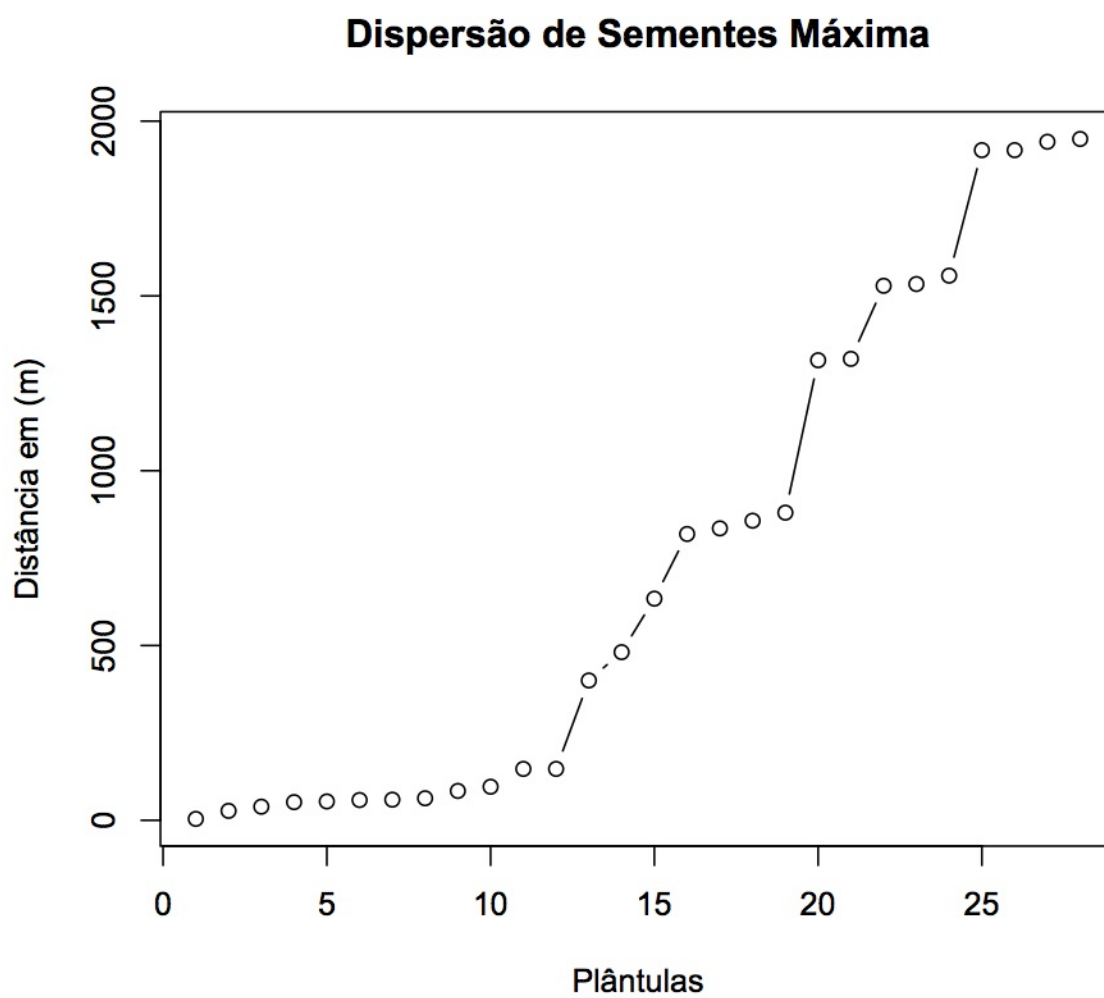


Figura 21 – distribuição da dispersão de sementes pela estima de distância máxima

6 DISCUSSÃO

6.1 Diversidade genética

A *I. paraguariensis* é uma espécie com ampla área de distribuição natural, dioica, de ciclo de vida longo e de interação com a fauna para polinização e dispersão de sementes. Contudo, a diversidade genética encontrada para os oito loci das duas populações naturais foi relativamente baixa, apresentando média de 4,25 alelos por loco (tabela 3). Baixos níveis de diversidade genética foram encontrados em outros estudos com marcadores isoenzimático (WENDT, 2005) e RAPD para *I. paraguariensis* (CANSIAN, 2003). Todavia, é necessário cautela com os resultados deste trabalho, devido a *I. paraguariensis* apresentar-se em área limítrofe de sua distribuição natural.

Este padrão de diversidade genética observado para a *I. paraguariensis* difere de outros trabalhos com outra espécie do gênero *Ilex*, a *I. leucoclada*, onde foram encontrados níveis elevados de diversidade genética (TORIMARU; TOMARU, 2005; TORIMARU, et al., 2007). Por ser o único estudo com marcadores microsatélites para a *I. paraguariensis* estes resultados podem não representar o padrão de diversidade genética da espécie. Entretanto, resultados semelhantes foram encontrado em outro estudo com a espécie arbórea tropical *Bagassa guianensis*, onde a espécie apresentou populações pequenas e com baixa densidade (SILVA et al., 2008), situação também encontrada por este estudo. Tais resultados talvez indiquem uma tendência a baixa diversidade genética em populações com estas características.

Entre as populações, a diversidade genética encontrada para as plântulas da Fazenda dos Paulistas foi ligeiramente superior a dos indivíduos adultos, o que também refletiu na heterozigosidade esperada e observada (tabela 6). Estes resultados diferem de outros estudos onde foram encontrados uma tendência de menor diversidade genética para as plântulas em comparação com as árvores adultos (RATHMACHER et al., 2010; RESENDE et al., 2011; SEBBENN et al., 2011).

Na RPPN Santa Maria a diversidade genética foi baixa entre adultos e plântulas sendo menor para a última, o que também refletiu heterozigosidade esperada e observada (tabela 5). Entretanto, estes resultados podem ser devido a baixa amostragem por problemas na genotipagem dos indivíduos desta população,

que apresentaram para este aspecto, situação mais crítica a Fazenda dos Paulistas.

O índice de fixação foi positivo na média para todos os loci, porém não foi observado desvio do EHW (tabela 3). Em outro trabalho com marcadores isoenzimáticos foi observado diferença no índice de fixação entre adultos e plântulas para *I. paraguariensis*, e que poderia indicar seleção favorável ao heterozigoto (WENDT, 2005).

Com baixa divergência, a distribuição da variação genética foi proporcional a distância das amostras, apresentando variação entre 1,87% a 8,98%. A variação foi menor entre adultos e plântulas da mesma população, aumentou entre as plântulas e adultos de populações distintas (tabela 7). A divergência genética foi maior entre os adultos de uma população e plântulas de outra, com divergência entre 8,09% a 8,98% (tabela 7). Estes resultados diferem de outros estudos com uso de marcadores RAPD para *I. paraguariensis*, onde a divergência genética encontrada foi maior dentro do que entre populações (GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000; WENDT, 2005; WENDT et al., 2007; WINGE et al., 1995). Em estudos com marcadores isoenzimáticos também foi encontrado maior divergência genética entre populações geograficamente mais distantes, entretanto, com a principal divergência genética devida a variabilidade intrapopulacional (WENDT, 2005; WINGE et al., 1995).

Em um estudo comparativo entre várias espécies do gênero *Ilex* da América do Sul, Gottlieb et al. (2005) encontrou as médias mais baixas de distância genética entre populações para a *I. paraguariensis*, e que representou a ausência de evidências de um padrão geográfico para a espécie (GOTTLIEB et al., 2005). Para Gauer; Cavalli-Molina (2000) o grande potencial de dispersão de sementes pode estar relacionado as baixas taxas de divergência genética entre populações de *I. paraguariensis*.

O isolamento das duas populações devido a fragmentação, talvez apresente alguma influência na diferença dos resultados obtidos. Os dois fragmentos pertencem a área de entorno do PARNA Iguaçu. Contudo, o fluxo gênico oriundo de outras populações naturais de *I. paraguariensis* pode ser muito baixo nas duas áreas, o que poderia explicar a maior divergência genética entre do que dentro das populações. Algum fluxo gênico poderia justificar a diferença na diversidade genética

entre plântulas e adultos na Fazenda dos Paulistas, o que explicaria a maior diversidade genética das plântulas pela imigração de sementes. Entretanto, pela análise de parentesco, não foi possível detectar migração de pólen e de sementes na Fazenda dos Paulistas.

6.2 Estrutura genética espacial

Para compreender o padrão espacial da variação genética das duas populações de *I. paraguariensis* é necessário considerar as características ecológicas da espécie e do local ocorrência. A *I. paraguariensis* apresenta alta plasticidade de ambientes, e sua área de ocorrência natural abrange variadas formações ecológicas, o que inclui desde a floresta ombrófila densa ao cerrado. Entretanto, sua área de ocorrência típica é a floresta ombrófila mista montana, onde chega a atingir densidade superior a centenas de indivíduos por hectare. Neste trabalho, a espécie apresentou distribuição agregada, com populações pequenas e com baixa densidade populacional, apresentando entre 0,27 a 0,29 árvores por hectare, distribuídas preferencialmente em locais com umidade no solo (figuras 10, 11, 14 e 15). Este padrão de distribuição, em agregados de indivíduos, pode estar relacionado a fatores como fertilidade ou umidade do solo e condições microclimáticas específicas. Desta forma, a distribuição da espécie sugere existir condições diferenciais para a germinação e/ou estabelecimento das plântulas de acordo com características edáficas.

A distribuição espacial em agregados de indivíduos é uma característica comum para a maior parte das espécies arbóreas tropicais (CONDIT et al., 2000). Contudo, não é possível extrapolar os resultados da distribuição espacial deste trabalho para a espécie. Os resultados obtidos aproximam-se da estimativa de densidade populacional da *I. paraguariensis* descrita por Oliveira; Rotta (1983) para a região do estudo. Devido às características de temperatura, altitude e da localização geográfica, era esperado encontrar baixa densidade populacional da *I. paraguariensis* em áreas limítrofes de sua distribuição natural.

Apesar da *I. paraguariensis* apresentar distribuição espacial em agregados de indivíduos, os índices de coancestria foram baixos e seus valores não ultrapassaram

o limite do intervalo de confiança (figura 18). Portanto, não foi observado estrutura genética espacial entre os adultos das duas populações e entre as plântulas da Fazenda dos Paulistas. A ausência de EGE pode estar relacionada ao grande potencial de dispersão de sementes da espécie. Contudo, estudos com outras espécies arbóreas tropicais, com sementes dispersas por aves, encontram características diferentes dos índices de coancestria para as plântulas obtida por este trabalho (MORAN; CLARK., 2012; ZHOU; CHEN, 2010).

6.3 Fluxo gênico de pólen e sementes

A *I. paraguariensis* é uma espécie polinizada por uma grande variedade de insetos (FERREIRA et al., 1983), o que a caracteriza como uma espécie de polinização generalista. A média da distância de dispersão de pólen encontrado por este trabalho foi de 393 m, com metade da distribuição espacial ocorrendo em distâncias inferiores a 100 m e aproximadamente 14% em distância superiores a 1.000 m (tabela 8, figura 19). Os dados obtidos diferem das estimativas de fluxo de pólen de outros estudos realizados com a *I. paraguariensis*. Wendt et al. (2009) utilizando marcadores isoenzimáticos, estimou a distância média de fluxo de pólen para um pomar de sementes de *I. paraguariensis* em 15,9 m. Cansian et al. (2010) utilizando marcadores RAPD encontrou 83% do fluxo de pólen em distâncias inferiores a 20 m em estudos com progênies da *I. paraguariensis*.

A possível explicação desta diferença possa ser a amostragem realizado por estes trabalhos, além da diferença ambiental de cada local. Os trabalhos foram conduzidos em plantios de *I. paraguariensis*, com os indivíduos da espécie em alta densidade, e por esta característica, possa facilitar o deslocamento dos polinizadores a curta distância. Diferentemente, este estudo foi conduzido em populações naturais, com baixa densidade populacional da espécie. Estas características podem levar polinizadores a aumentarem a distância de dispersão de pólen para valores superiores a 500 m (DICK et al., 2008). Vários trabalhos com espécies arbóreas tropicais, polinizadas por pequenos insetos encontram distância

superiores a 1.000 m para dispersão de pólen (DICK et al., 2008; MANOEL et al., 2012; ROSAS et al., 2011).

Pela análise de parentesco não foi possível detectar fluxo gênico de pólen oriundo de outras populações naturais de *I. paraguariensis*. Os dois locais de estudo encontram-se isoladas por uma matriz antrópica composta principalmente por áreas agrícolas e de pastagem intensiva. Os resultados sugerem que os polinizadores da *I. paraguariensis*, podem apresentar dificuldade em deslocar-se de outras populações naturais para os dois fragmentos. Não era esperado encontrar fluxo de pólen entre as duas populações, devido à distância que as separam ser alta para uma espécie polinizada por pequenos insetos. Entretanto, pela proximidade das áreas com o PARNA Iguaçu era esperado encontrar alguma migração de pólen de origem externa, apesar da análise de parentesco contemplar apenas parte das amostras de plântulas coletadas. Possíveis efeitos negativos no fluxo de pólen em áreas fragmentadas foram descritos em outros estudos com espécies arbóreas tropicais polinizadas por animais (LLORENS et al., 2012; MANOEL et al., 2012; ROSAS et al., 2011; SEOANE et al., 2005; SEBBENN et al., 2011).

Para estimar a distância de dispersão de sementes, por desconhecer o sexo dos possíveis parentais, foi realizada duas estimativas para determinar a suposta árvore doadora de sementes. A primeira estimativa considerou a planta doadora de sementes, o candidato parental localizado mais proximamente da posição espacial da plântula. A segunda estimativa considerou o candidato parental localizado mais distantemente, em relação a posição espacial da plântula, como a árvore doadora de sementes. Com isso, a média da dispersão de sementes pela estimativa mínima foi de 421 m e pela estimativa de dispersão máxima foi de 740 m. As duas estimativas apresentaram resultados semelhantes para as distâncias de dispersão mínima e máxima de sementes (tabela 8), contudo foram divergentes em relação a frequência da distribuição espacial (figuras 20 e 21).

Pela estimativa restrita, aproximadamente 64% da dispersão de sementes ocorreu em distâncias inferiores a 100 m e apenas 14% da dispersão em distâncias superiores a 1.000 m (figura 20). Pela estimativa de dispersão de sementes máxima, 36% da dispersão ocorreu em distâncias inferiores a 100 m e 32% em distâncias acima de 1.000 m (figura 21).

As duas abordagens mostraram ser muito divergentes em relação a

frequência da distribuição espacial, com isso ao assumir alguma delas inevitavelmente será subestimada ou superestimada o padrão da dispersão de sementes. Em espécies monoicas e hermafroditas não é possível determinar o sexo dos parentais em estudos com banco de plântulas estabelecidas, sendo necessário optar por alguma das duas estimativas, apesar do erro associado. Este método de análise vem sendo utilizado na situação onde não é possível distinguir com precisão o sexo dos parentais (DOW; ASHLEY, 1998; NAKANISHI et al., 2008; SEBBENN et al., 2011). Em espécies dioicas como a *I. paraguariensis* é possível diferenciar o sexo pela morfologia da flor ou pela presença de sementes nas plantas femininas. Porém, não foi observado sinais de plantas com flores e frutos nas duas populações, durante a etapa de coleta que contemplou o período de março a setembro de 2011. Embora este período contemple o intervalo de florescimento e frutificação da *I. paraguariensis* descritos na literatura para o estado do Paraná (CARVALHO, 2003).

Devido a ausência de EGE nas duas populações é provável que o segundo modelo, consiga relacionar de forma abrangente, os aspectos relacionados ao padrão de dispersão de sementes com o padrão da distribuição espacial das plântulas e adultos nas duas áreas.

Embora a diferença não seja tão extensa, a dispersão de pólen foi mais restrita que a dispersão de sementes, em comparação com estimativa de dispersão de sementes mínima (tabela 8, figuras 19 e 20). Em vista disso, é possível observar que o fluxo de pólen é mais restrito que o fluxo de sementes, principalmente considerando a estimativa de dispersão máxima, cuja diferença é mais evidente em relação a dispersão de pólen (tabela 8, figura 21).

Apesar da grande interação da *I. paraguariensis* com a avifauna para dispersão de sementes, não foi possível detectar migração. As plântulas analisadas pelo teste de parentesco apresentaram os parentais na própria área de estudo. Entretanto, é necessário cautela com os resultados pois apenas parte das plântulas coletadas foram analisadas pelo teste de parentesco (tabela 9). Contudo, outros estudos em espécies arbóreas tropicais sugerem existir distúrbios na migração de sementes de populações em áreas fragmentadas, com efeitos negativo pela redução das taxas de migração (SEOANE et al., 2005), ou ausência de migração de sementes (SEBBENN et al., 2011).

As baixas taxas de divergência genética entre populações naturais de *I. paraguariensis* observadas em outros trabalhos (CANSIAN, 2003; GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000; WENDT, et al., 2005; WENDT, et al., 2007) podem estar relacionados com o grande potencial de dispersão de sementes da espécie. Todavia, os resultados obtidos por este trabalho sugerem existir redução da migração de pólen e de sementes para as duas populações de *I. paraguariensis* devido a fragmentação.

Paisagens fragmentadas prejudicam a movimentação de polinizadores e dispersores devido à barreira gerada pela matriz antropogênica (GHAZOUL, 2005). Com menores níveis de fluxo gênico em paisagens fragmentadas, espécies de plantas elevam taxas de autofecundação e endogamia (COLLEVATTI et al., 2010), o que promove o aumento da divergência genética entre populações.

6.4 Implicações para conservação

O fluxo gênico por sementes aumenta a diversidade genética dentro das populações naturais e reduz a divergência genética entre populações (HAMRICK; TRAPNELL, 2011). A maior divergência genética dentro do que entre populações, descritos em outros trabalhos com a *I. paraguariensis* (CANSIAN, 2003; GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000; WENDT, 2005; WENDT et al., 2007, WINGE et al., 1995) podem indicar que é intensa a migração de sementes entre populações naturais da espécie.

Na comparação entre as duas populações, foi encontrado diferenciação genética, que talvez indique certa restrição ao fluxo gênico oriundas de outras populações naturais de *I. paraguariensis*. Os dois fragmentos pertencem à área de entorno do PARNA Iguazu, uma das principais unidades de conservação do país e um dos principais remanescentes florestais do Bioma Mata Atlântica. A distância que separam as áreas do Parque é relativamente pequena, inferior a 4 km, contudo os resultados sugerem que a fragmentação pode atuar como uma barreira a dispersão de pólen e de sementes para *I. paraguariensis*, apesar da grande interação da espécie com a fauna para a polinização e dispersão.

Todavia, é necessário realizar outros estudos de genética de populações com

a *I. paraguariensis*, especialmente com marcadores microssatélites, para melhorar a compreensão do padrão da diversidade genética da espécie. Apesar de sua ampla área de distribuição natural, os baixos níveis observados de diversidade genética e de heterozigotos obtidos por este trabalho, sugerem que a base genética da espécie não é ampla. Outros estudos com marcadores isoenzimáticos (WENDT, 2005) e RAPD (CANSIAN, 2003) para a *I. paraguariensis* também observaram baixos níveis de diversidade genética.

A despeito da importância cultural e econômica do cultivo da *I. paraguariensis* no país, pode ser preocupante o estado de conservação da espécie. Por ser uma espécie típica do sub-bosque da Floresta Ombrófila Mista, formação florestal severamente ameaçada do Bioma Mata Atlântica, e pouco protegida em unidades de conservação.

Essa situação pode dispor a *I. paraguariensis* a um estado crítico de conservação, devido ao alto potencial de erosão genética em que a espécie está exposta. A perda de variabilidade genética da *I. paraguariensis*, além de suas consequências ecológicas e genéticas, pode comprometer programas de melhoramento a médio e longo prazo da espécie, com graves implicações econômicas para atividade ervateira no Brasil.

A perda da variabilidade genética pode contribuir para o risco de extinção da *I. paraguariensis* em populações naturais. Desta forma, é necessário a criação de programas de conservação in situ, especialmente em áreas de ocorrência natural da espécie que não estão inseridas em unidades de conservação.

7 CONCLUSÕES

1. A *I. paraguariensis* apresentou baixa densidade populacional nas duas áreas de estudo.
2. Os baixos níveis observados de diversidade genética e de heterozigotos nas duas populações, indicam que é estreita a base genética da espécie na região.
3. A divergência genética foi maior entre do que dentro das populações;
4. Não foi observado estrutura genética espacial;
5. A fragmentação pode atuar como barreira a migração de pólen e de sementes para a *I. paraguariensis*.
6. A dispersão do pólen foi mais restrita que a dispersão de sementes.
7. Deve-se aperfeiçoar o protocolo de extração de DNA da *I. paraguariensis* para reduzir a presença de compostos secundários que prejudiquem a PCR.
8. Para melhorar a compreensão do padrão da diversidade genética da *I. paraguariensis* é necessário executar outros estudos em populações naturais com marcadores microssatélites.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, G.; TREJO SOTO, C. A.; OÑA, L. The Role of Asymmetric Interactions on the Effect of Habitat Destruction in Mutualistic Networks. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 6, p. 210-228, 2011.
- AGUILAR, R.; QUESADA, M.; ASHWORTH, L.; HERRERIAS-DIEGO, Y.; LOBO, J. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 24, p. 5177-5188, 2008.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2007. 524 p.
- ALMEIDA, A. N.; BITTENCOURT, A. M.; SANTOS, A. J. DOS; EISFELD, C. L.; SOUZA, V. S. Production and price evolution of the main extractive non timber forest products in Brazil. **Cerne**, Lavras, v. 15, n. 3, p. 282-287, 2009.
- ANGELONI, F.; OUBORG, N. J.; LEIMU, R. Meta-analysis on the association of population size and life history with inbreeding depression in plants. **Biological Conservation**, Beijing, v. 144, n. 1, p. 35-43, 2011.
- ASHWORTH, L.; AGUILAR, R.; GALETTO, L.; AIZEN, M. A. Why do pollination generalist and specialist plant species show similar reproductive susceptibility to habitat fragmentation? **Journal of Ecology**, London, v. 92, n. 4, p. 717-719, 2004.
- ATLÂNTICA, S. O. S. **Atlas dos Remanescentes Florestais da Mata Atlântica—Período 2008-2010**. São Paulo: Fundação SOS MataAtlântica/INPE, 2011. 120 p.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Springer, 1994. 400 p.
- AWADE, M.; METZGER, J. P. Using gap-crossing capacity to evaluate functional connectivity of two Atlantic rainforest birds and their response to fragmentation. **Austral Ecology**, Alice Springs, v. 33, n. 7, p. 863-871, 2008.
- BASTOS, D. H. .; OLIVEIRA, D. M.; MATSUMOTO, R. L. T.; CARVALHO, P. O.; RIBEIRO, M. L. Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, Takamatsu, v. 1, p. 37-46, 2007.
- BOSCOLO, D.; CANDIA-GALLARDO, C.; AWADE, M.; METZGER, J. P. Importance of Interhabitat Gaps and Stepping-Stones for Lesser Woodcreepers (*Xiphorhynchus fuscus*) in the Atlantic Forest, Brazil. **Biotropica**, Lawrence, v. 40, n. 3, p. 273-276, 2008.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 136, n. 3, p. 378-384, 2011.

BRASIL. **lei nº 9.985, de 18 de Julho de 2000**. Regulamenta o artigo 225, § 1º, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/sistema-nacional-de-ucs-snuvcf>>. Acesso em: 15 de abril de 2012.

BURCZYK, J.; DIFAZIO, S. P.; ADAMS, W. T. Gene flow in forest trees: How far do genes really travel? **Forest Genetics**, Zvolen, v. 11, n. 3-4, p. 179-192, 2004.

CANSIAN, R. L. **Variabilidade Genética e de Compostos Voláteis e Semi-Voláteis em Populações Nativas de *Ilex paraguariensis* (St. Hil.) do Brasil, Visando a Conservação da Espécie**. 82 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade de São Carlos, São Carlos, SP. 2003.

CARPANEZZI, A. A. Cultura da erva-mate no Brasil: conflitos e lacunas. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. (Eds.). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul. Porto Alegre: Ed. da UFRGS**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. p. 43-46.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 1039p.

CHARLESWORTH, D.; WILLIS, J. H. The genetics of inbreeding depression. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, n. 11, p. 783-796, 2009.

CHEPTOU, P.; J. SCHOEN, D. Combining population genetics and demographical approaches in evolutionary studies of plant mating systems. **Oikos**, Copenhagen, v. 116, n. 2, p. 271-279, 2007.

CHETKIEWICZ, C.-L. B.; ST. CLAIR, C. C.; BOYCE, M. S. Corridors for Conservation: Integrating Pattern and Process. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 317-342, 2006.

COLLEVATTI, R. G.; ESTOLANO, R.; GARCIA, S. F.; HAY, J. D. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 6, n. 4, p. 555-564, 2010.

CONDIT, R.; ASHTON, P. S.; BAKER, P. BUNYAVEJCHEWIN, S.; GUNATILLEKE, S.; GUNATILLEKE, N.; HUBBELL, S.P.; FOSTER, R.B.; ITOH, A.; LA FRANKIE, J.V.; LEE, H.S.; LOSOS, E.; MANOKARAN, N.; SUKUMAR, R.E.; YAMAKURA, T. Spatial Patterns in the Distribution of Tropical Tree Species. **Science**, Washington, v. 288, n. 5470, p. 1414-1418, 2000.

CONFORTI, A. S.; GALLO, M. E.; SARAÍVÍ, F. D. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*)

consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. **Bone**, Boston, v. 50, n. 1, p. 9-13, 2012.

CRESTE, S.; NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, n. 4, p. 299-306, 2001.

DIAMOND, J. M. The island dilemma: Lessons of modern biogeographic studies for the design of natural reserves. **Biological Conservation**, Beijing, v. 7, n. 2, p. 129-146, 1975.

DICK, C. W.; HARDY, OLIVIER J.; JONES, F. A.; PETIT, R. J. Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 1, p. 20-33, 2008.

DIXON, J.; OLI, M.; WOOTEN, M.; EASON, T.H.; MCCOWN, J.W.; PAETKAU, D. Effectiveness of a regional corridor in connecting two Florida black bear populations. **Conservation Biology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 155-162, 2006.

DOW, B.D.; ASHLEY, M.V. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. **Heredity**, London, v.89, p.62-70, 1998.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v.12, p.13-15, 1990.

EDWARDS, A. W. F. G. H. Hardy (1908) and Hardy–Weinberg Equilibrium. **Genetics**, Chicago, v. 179, n. 3, p. 1143-1150, 2008.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 487-515, 2003.

FERREIRA, A. G.; KASPARY, R., FERREIRA, H. B.; ROSA, L. M. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Brasil Florestal**, Brasília, n. 53, p. 29-33, 1983.

FINKELDEY, R.; HATTEMER, H. H. **Tropical forest genetics**. Springer: Verlag, 2007. 265 p.

FONT QUER, P. **Dicionário de Botânica**. Barcelona: Editorial Labor, 1953. 1244 p.

FLOSS, P.A. **Variações genéticas entre populações naturais de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Erva mate) avaliadas em Chapecó-SC e Três Barras-SC**. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São paulo, Piracicaba. 1994.

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, Beijing, v. 126, n. 2, p. 131-140, 2005.

FRANKHAM, R. Genetics and landscape connectivity. In: CROOKS, K. R. (Ed.). **Connectivity conservation**. New York: Cambridge Univ Pr, 2006. v. 14, p. 72-91.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. New York: Cambridge University Press, 2010. 529 p.

GAUER, L.; CAVALLI-MOLINA, SUZANA. Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. **Heredity**, London, v. 84, n. 6, p. 647-656, 2000.

GEERT, A. VAN; ROSSUM, F. VAN; TRIEST, L. Do linear landscape elements in farmland act as biological corridors for pollen dispersal? **Journal of Ecology**, London, v. 98, n. 1, p. 178-187, 2010.

GHAZOUL, J. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 80, n. 3, p. 413-443, 2005.

GOOGLE. **Programa google earth** Disponível em: <<http://www.google.com/earth/index.html>>. Acessado em 30 de julho de 2012.

GOTTLIEB, A. M.; GIBERTI, G. C.; POGGIO, LIDIA. Molecular Analyses of the Genus *Ilex* (Aquifoliaceae) in Southern South America, Evidence from AFLP and ITS Sequence Data. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 92, n. 2, p. 352-369, 2005.

GOUDET, J. FSTAT (Version 2.9.3.2.): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, **Cary**, v.86, p.485-486, 2002.

GREIZERSTEIN, E.; GIBERTI, G.; POGGIO, L. Cytogenetic studies of Southern South-American *Ilex*. **Caryologia**, Firenze, v. 57, n. 1, p. 19-23, 2004.

HADDAD, N. M.; BOWNE, D. R.; CUNNINGHAM, DANIELSON, B. J.; LEVEY, D. J.; SARGENT, S.; SPIRA, T. Corridor use by diverse taxa. **Ecology**, Washington, v. 84, n. 3, p. 609-615, 2003.

HALL, P.; WALKER, S.; BAWA, K. Effect of Forest Fragmentation on Genetic Diversity and Mating System in a Tropical Tree, *Pithecellobium elegans*. **Conservation Biology**, Oxford, v. 10, n. 3, p.757-768, 1996.

HAMRICK, J. L.; NASON, J. D. Gene flow in forest trees. In: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Eds.). **Forest conservation genetics: principles and practice**. Wallingford: CABI Publishing, 2000. p. 81-90.

HAMRICK, J. L.; TRAPNELL, D. W. Using population genetic analyses to understand seed dispersal patterns. **Acta Oecologica**, Paris, v. 37, n. 6, p. 641-649, 2011.

HANSKI, I. Metapopulation dynamics. **Nature**, London, v. 396, n. 6706, p. 41-49, 1998.

HANSKI, I.; SIMBERLOFF, D. The Metapopulation Approach, Its History, Conceptual Domain, and Application to Conservation. **Metapopulation Biology**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 5-26.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 618–620, 2002.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of Population Genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 2007. 585 p.

HECK, C. I.; MEJIA, E. G DE. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. **Journal of Food Science**, Malden, v. 72, n. 9, p.138-151, 2007.

HEDRICK, P. W. Conservation genetics: where are we now? **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 16, n. 11, p. 629-636, 2001.

HOSHINO, A. A.; BRAVO, J. P.; NOBILE, P. M.; MORELLI, K. A. Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis. In: CALISKAN, M. (Ed.). **Genetic Diversity in Microorganisms**. Rijeka: InTech, 2012. v. 1, p.149-170.

HUCK, M.; JEDRZEJEWSKI, W.; BOROWIK, T.; Miłosz-Cielma, M.; Schmidt, K.; Jędrzejewska, B.; Nowak, S.; Mysłajek, R. W. Habitat suitability, corridors and dispersal barriers for large carnivores in Poland. **Acta Theriologica**, Warsaw, v. 55, n. 2, p. 177-192, 2010.

IBARRA-MACIAS, A.; ROBINSON, W. D.; GAINES, M. S. Forest Corridors Facilitate Movement of Tropical Forest Birds After Experimental Translocations in a Fragmented Neotropical Landscape in Mexico. **Journal of Tropical Ecology**, Winchelsea, v. 27, n. 05, p. 547-556, 2011.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de vegetação do Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 1993.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da extração vegetal e da silvicultura. **Prod. Extr. veg. e Silvíc.**, Rio de Janeiro, v. 25, p.1-45, 2010.

ICMBIO. **Parque Nacional do Iguaçu**. Disponível em: <http://www4.icmbio.gov.br/parna_iguacu/>. Acesso em: 30 de agosto de 2012.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B. Dinâmica de populações de espécies arbóreas: implicações para o manejo e a conservação. In: **III Simpósio de ecossistemas da costa brasileira**. Anais. Academia de Ciências do Estado de São Paulo p.115-125, 1993.

KAGEYAMA, P.Y.; GANDARA, F.B.; SOUZA, L.M.I. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 12, n. 32, p. 65-70, 1998.

KALINOWSKI, S.; TAPER, M.; MARSHALL, T. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, 2007.

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da semente e da germinação de 25 espécies arbóreas de uma floresta com araucária**. 197 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1983.

LAURANCE, W. F.; CAMARGO, J. L. C.; LUIZÃO, R. C. C.; LAURANCEA, S. G.; PIMMD, S. L.; BRUNAE, E. M.; STOUFFERF, P. C.; WILLIAMSON, G. B.; JULIETA BENÍTEZ-MALVIDOH, VASCONCELOSI, H. L.; HOUTAND, K. S. V.; ZARTMANK, C. E.; BOYLEL, S. A.; DIDHAM, R. K.; ANDRADEA, A.; LOVEJOY, T. E. The fate of Amazonian forest fragments: A 32-year investigation. **Biological Conservation**, Beijing, v. 144, n. 1, p. 56-67, 2011.

LAURANCE, W. F.; MESQUITA, R. C. G.; LUIZAO, R.; PINTO, F. The Biological Dynamics of Forest Fragments Project: 25 Years of Research in the Brazilian Amazon. **Tropinet**, Lawrence, v. 15, n. 2/3, p. 1-3, 2004.

LEIDNER, A. K.; HADDAD, N. M. Combining Measures of Dispersal to Identify Conservation Strategies in Fragmented Landscapes. **Conservation Biology**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 1022-1031, 2011.

LEIMU, R.; MUTIKAINEN, P.; KORICHEVA, J.; FISCHER, M. How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? **Journal of Ecology**, London, v. 94, n. 5, p. 942-952, 2006.

LEVINS, R. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. **Bull. ent. Soc. Am.**, v. 15, p. 237—240, 1969.

LIENERT, J. Habitat fragmentation effects on fitness of plant populations – a review. **Journal for Nature Conservation**, Cobh, v. 12, n. 1, p. 53-72, 2004.

LLORENS, T. M.; BYRNE, M.; YATES, C. J.; NISTELBERGER, H. M.; COATES, D. J. Evaluating the influence of different aspects of habitat fragmentation on mating patterns and pollen dispersal in the bird-pollinated *Banksia sphaerocarpa* var. *caesia*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 314-328, 2012.

LOISELLE, B.A.; SORK, V.L.; NASON, J.; GRAHAM, C. Spatial genetic structure of tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v.82, p.1420-1425, 1995.

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.

MACARTHUR, R. H.; WILSON, E. O. **The theory of island biogeography**. Princeton: Princeton University Press, 1967. 192 p.

MANOEL, R.; ALVES, P.; DOURADO, C. GAINO, A. P. S. C.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, M L. T.; SEBBENN, A.M. Contemporary pollen flow, mating patterns and effective population size inferred from paternity analysis in a small fragmented population of the Neotropical *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Conservation Genetics**, Arlington, v. 13, n. 3, p. 613-623, 2012.

MARIATH, J. E. A.; COELHO, G. C.; SANTOS, R. P. HEUSER, E.D.; AYUB, D.M.; COCUCCI, A.E. Aspectos anatômicos e embriológicos em espécies do gênero *Ilex*. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. (Eds.). **Erva-Mate: Biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. p. 263-280.

MARINI, M. Â.; BARBET-MASSIN, M.; LOPES, L. E.; JIGUET, F. Predicted Climate-Driven Bird Distribution Changes and Forecasted Conservation Conflicts in a Neotropical Savanna. **Conservation Biology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 1558-1567, 2009.

MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUIK, L. E. B.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 5, p. 639–655, 1998.

MARTENSEN, A. C.; PIMENTEL, R. G.; METZGER, J. P. Relative effects of fragment size and connectivity on bird community in the Atlantic Rain Forest: Implications for conservation. **Biological Conservation**, Beijing, v. 141, n. 9, p. 2184-2192, 2008.

MAYER, C.; SCHIEGG, K.; PASINELLI, G. Patchy population structure in a short-distance migrant: evidence from genetic and demographic data. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 2353-2364, 2009.

MEAGHER, T. R. Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents. **American Naturalist**, Chicago, p. 199–215, 1986.

MEAGHER, T. R.; THOMPSON, E. Analysis of parentage for naturally established seedlings of *Chamaelirium luteum* (Liliaceae). **Ecology**, Washington, p. 803–812, 1987.

MELO, L.A.M.N.; SOARES, R.V.; SIQUEIRA, J.DP.; KIRCHNER, F.F. Modelagem de combustíveis florestais no Parque Nacional do Iguaçu, PR, Brasil. **Floresta**, Curitiba, v. 36, n. 3, p.415- 424, 2006.

MORAN, E. V.; CLARK, J. S. Between-Site Differences in the Scale of Dispersal and Gene Flow in Red Oak. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 364-392, 2012.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B. DA; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NAKANISHI, A.; TOMARU, N.; YOSHIMARU, H.; MANABE, T.; YAMAMOTO, S. Effects of seeds- and pollen-mediated gene dispersal on genetic structure among *Quercussalicina* samplings. **Heredity**, London, v.96, p.79-84, 2006.

NEI, M. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of human genetics**, London, v. 41, n. 2, p. 225-233, 1977.

NIKLAS, C. O. Estudos embriológicos y citológicos en la yerba mate *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **Bonplandia**, Corrientes, v. 6, n. 1, p. 45-56, 1987.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. DE A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S.N. **Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. Área de distribuição natural da Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: **X Seminário sobre Atualidades e Perspectivas Florestais: Silvicultura da Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)** Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, p. 28-30, 1983.

PARDINI, R.; SOUZA, S. M. DE; BRAGA-NETO, R.; METZGER, J. P. The role of forest structure, fragment size and corridors in maintaining small mammal abundance and diversity in an Atlantic forest landscape. **Biological Conservation**, Beijing, v. 124, n. 2, p. 253-266, 2005.

PEREIRA, M. F.; CIAMPI, A. Y.; INGLIS, P. W.; SOUZA, V. A.; AZEVEDO, V. C. R. Shotgun sequencing for microsatellite identification in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). **AJB Primer Notes and Protocols**, Columbus, AJB-D-12-00245R2, 2012. No prelo

PUANGPRAPHANT, S.; BERHOW, M. A.; MEJIA, GONZALEZ, E. Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells in vitro. **Food Chemistry**, Reading, v. 125, n. 4, p. 1171-1178, 2011.

RATHMACHER, G.; NIGGEMANN, M.; KÖHNEN, M.; ZIEGENHAGEN, B.; BIALOZYT, R. Short-distance gene flow in *Populus nigra* L. accounts for small-scale spatial genetic structures: implications for in situ conservation measures. **Conservation Genetics**, Arlington, v. 11, n. 4, p. 1327-1338, 2010.

- REED, D. H. Relationship between Population Size and Fitness. **Conservation Biology**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 563-568, 2005.
- RESENDE, L.; RIBEIRO, R.; LOVATO, M. Diversity and genetic connectivity among populations of a threatened tree (*Dalbergia nigra*) in a recently fragmented landscape of the Brazilian Atlantic Forest. **Genetica**, Dordrecht, v. 139, n. 9, p. 1159-1168, 2011.
- RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, CAMARGO, A.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, Beijing, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009.
- RODERJAN, C. V.; GALVÃO, F.; KUNIYOSHI, Y. S.; HATSCHBACH, G. G. As unidades fitogeográficas do Estado do Paraná. **Ciência e ambiente**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 75-42, 2002.
- ROSAS, F.; QUESADA, M.; LOBO, J. A.; SORK, V. L. Effects of habitat fragmentation on pollen flow and genetic diversity of the endangered tropical tree *Swietenia humilis* (Meliaceae). **Biological Conservation**, Beijing, v. 144, n. 12, p. 3082-3088, 2011.
- SANTOS, R. P.; MARIATH, J. E. A.; HESSE, M. Pollenkitt formation in *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 237, n. 3, p. 185-198, 2003.
- SCHAAF, L. B.; FIGUEIREDO FILHO, A.; SANQUETTA, C. R.; GALVÃO, F. Incremento diamétrico e em área basal no período 1979-2000 de espécies arbóreas de uma floresta ombrófila mista localizada no sul do Paraná. **Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 2, 2006.
- SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M. Moraes, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, London, v. 106, n. 1, p. 134-145, 2011.
- SEOANE, C. E. S.; KAGEYAMA, P. Y.; RIBEIRO, A.; MATIAS, R.; REIS, M.S.; BAWA, K.; SEBBENN, A.M. Efeitos da fragmentação florestal sobre a imigração de sementes e estrutura genética temporal de populações de *Euterpe edulis* Martius. **Revista do Instituto Florestal**, Piracicaba, v. 17, n. 1, p. 23-43, 2005.
- SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P. Y. Sistema de reprodução em duas populações naturais de *Euterpe edulis* M. sob diferentes condições de fragmentação florestal. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 69, p. 13-24, 2005.
- SILVA, M. B.; KANASHIRO, M.; YAMAGUISHI, A. C.; THOMPSON, I., SEBBENN, A.M. Genetic effects of selective logging and pollen gene flow in a low-density

population of the dioecious tropical tree *Bagassa guianensis* in the Brazilian Amazon. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 255, n. 5–6, p. 1548–1558, 2008.

STURION, J. A. ; RESENDE, M. D. V.; MENDES, S. Proporção de sexo e produtividade massa foliar em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim de pesquisa florestal**, Colombo, v. 30/31, p. 19-27, 1995.

TORIMARU, T.; TANI, N.; TSUMURA, Y.; NISHIMURA, N.; TOMARU, N. Effects of kin-structured seed dispersal on the genetic structure of the clonal dioecious shrub *Ilex leucoclada*. **Evolution**, Lancaster, v. 61, n. 6, p. 1289–1300, 2007.

TORIMARU, TAKESHI; TOMARU, NOBUHIRO. Fine-scale Clonal Structure and Diversity within Patches of a Clone-forming Dioecious Shrub, *Ilex leucoclada* (Aquifoliaceae). **Annals of Botany**, New York, v. 95, n. 2, p. 295-304, 2005.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 921–935, 2004.

VICENTE, R. F.; LAFORGA VANZELA, A. L.; TOREZAN, J. M. D. Ecosystem Representation in the Protected Areas System of the State of Parana, Brazil. **Natureza & Conservação**, Curitiba, v. 7, n. 1, p. 166-180, abr 2009.

ZILLER, SILVIA R. Avaliação Ecológica Rápida do Parque Nacional do Iguaçu. Diagnóstico Ambiental. **Componente Vegetação**. IBAMA/FUPEF. Curitiba, 1998. 67 p.

WEHLING, S.; DIEKMANN, M. Importance of hedgerows as habitat corridors for forest plants in agricultural landscapes. **Biological Conservation**, Beijing, v. 142, n. 11, p. 2522-2530, 2009.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Lancaster, p. 1358–1370, 1984.

WENDT, S. N. **Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil.** 148 p. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

WENDT, S. N.; SOUSA, V. A.; QUOIRIN, M.; MAZZA, M. C.; STURION, J. A.; SEBBENN, A. M. Baixa taxa de contaminação de pólen, desvios de cruzamentos aleatórios e endogamia em um pomar de sementes de *Ilex paraguariensis*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 82, p. 185-196, 2009.

WENDT, SIMONE NEUMANN; SOUSA, VALDERES A.; QUOIRIN, M.; SEBBENN, A.M.; MAZZA, M.C.; STURION, J.A. Genetic characterization of provenances and progenies of *Ilex paraguariensis* St. Hil. by using RAPD markers. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 35, n. 73, p. 47-53, 2007.

WILCOX, B. A.; MURPHY, D. D. Conservation Strategy: The Effects of Fragmentation

on Extinction. **The American Naturalist**, Chicago, v. 125, n. 6, p. 879-887, 1985.

WINGE, H.; WOLLHEIM, C.; CAVALLI-MOLINA, S.; ASSMANN, E.M.; BASSANI, K.L.L.; AMARAL, M.B.; COELHO, G.C.; FREITAS-SACCHET, A.M.O.; BUTZKE, A.; VALDUGA, A.T. Variabilidade genética em populações nativas da erva-mate e a implantação de banco de germoplasma. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. A.; TARASCONI, L. C. (Eds.). **Erva-mate: biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 1995. p. 323-345.

WIKIPEDIA CONTRIBUTORS. **Ficheiro: Ilex paraguariensis - Yerba mate**. **Wikipedia, the free encyclopedia**. Wikimedia Foundation, Inc. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Ilex_paraguariensis_-_Yerba_mate_-_desc-leaves.jpg>. Acesso em: 8 setembro de 2012.

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

WRIGHT, SEWALL. The genetical structure of populations. **Annals of Human Genetics**, London, v. 15, n. 1, p. 323-354, 1949.

YOUNG, A.; BOYLE, T. Forest Fragmentation. In: YOUNG, ANDREW; BOSHIER, D.; BOYLE, T. (Eds.). **Forest Conservation Genetics**. Collingwood: CSIRO, 2000. p. 123-132.

YOUNG, ANDREW; BOYLE, TIM; BROWN, T. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 413-418, 1996.

ZHOU, H.-P.; CHEN, J. Spatial genetic structure in an understory dioecious fig species: the roles of seed rain, seed and pollen-mediated gene flow, and local selection. **Journal of Ecology**, London, v. 98, n. 5, p. 1168-1177, 2010.