

**DOUGLAS TRAUTMANN E SILVA**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Ilex*  
*paraguariensis* A. St.-Hil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Dr. Adelar Mantovani

**LAGES  
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Silva, Douglas Trautmann e  
Diversidade e estrutura genética de populações de *Ilex  
paraguariensis* A. St.-Hil / Douglas Trautmann e Silva. --  
2019.  
101 p.

Orientador: Adelar Mantovani  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,  
Programa de Pós-Graduação , Lages, 2019.

1. Marcadores microssatélites. 2. Erva-mate. 3.  
Variabilidade genética. 4. Fluxo gênico. 5. Genética de  
populações. I. Mantovani, Adelar. II. Universidade do Estado  
de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,  
Programa de Pós-Graduação . III. Título.

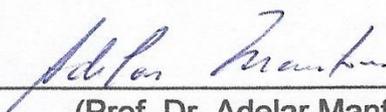
**DOUGLAS TRAUTMANN E SILVA**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Ilex*  
*paraguariensis* A. St.-Hil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

**Banca Examinadora:**

Orientador:



---

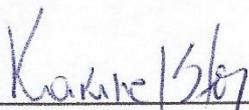
(Prof. Dr. Adelar Mantovani)  
UDESC

Membros:



---

(Prof. Dra. Denise Olkoski)  
IFRS



---

(Prof. Dr. Karine Louise dos Santos)  
UFSC

**Lages, 28 de fevereiro de 2019.**



À minha família, pelo amor, compreensão e estímulo em todos os momentos, e, em especial a minha amada esposa que nunca mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa em minha vida.

Dedico!



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela Sua presença constante em minha vida e por mais esta oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais Francisco Landvoigt e Silva e Lenir F. da S. T. e Silva, pelos ensinamentos e apoio incondicional e imenso amor.

À minha esposa, Débora Balestrin Bridi e Silva, que sempre esteve ao meu lado não somente nos momentos de alegria e conquistas merecidas, mas me encorajando nos momentos difíceis ao longo dessa jornada. Você é um presente que Deus me deu, obrigado por fazer parte de minha vida!

A minha Família, que são minha fonte de inspiração de persistência, honestidade e amor! Obrigado por lutarem diariamente para que meus sonhos sejam realizados, por acreditarem em mim e não me deixarem desistir diante das dificuldades. Não cabem em palavras o amor e gratidão que sinto por vocês!

Aos meus irmãos Diego, Eduardo e minha irmã Cátia, pela amizade e ensinamentos, e também pelos lindos presentes que deram a nossa família, meus sobrinhos e afilhados Augusto, Victor, Paulo Artur e Carlos Eduardo que são a alegria dos meus dias e esperança de um futuro melhor!

Aos gestores das unidades de conservação e produtores rurais, que disponibilizaram seu tempo e suas áreas para que tornando assim esse trabalho concluído.

Aos professores do Laboratório de DNA, em especial, Denize, Newton, Flávia. Pela ajuda prestada, e todos os ensinamentos nos momentos de dúvidas nas análises dos resultados.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Genética – Pesquisa, em especial, Larissa, Lucas e Mailuce. Por todo companheirismo e ajuda prestada nas idas à campo; também as amigas adquiridas no mestrado. Franciele, Jussara, Gesieli. pelos momentos de descontração e amizade!

Ao Prof. Adelar Mantovani pela oportunidade da realização do mestrado, pela atenção e ensinamentos repassados durante a orientação.

Ao Prof. Altamir F. Guidolin por me auxiliar ao longo desse trabalho. Obrigada por toda atenção e dedicação durante a realização deste trabalho. Sua ajuda foi fundamental!

Ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal e Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade da realização deste curso de qualidade.

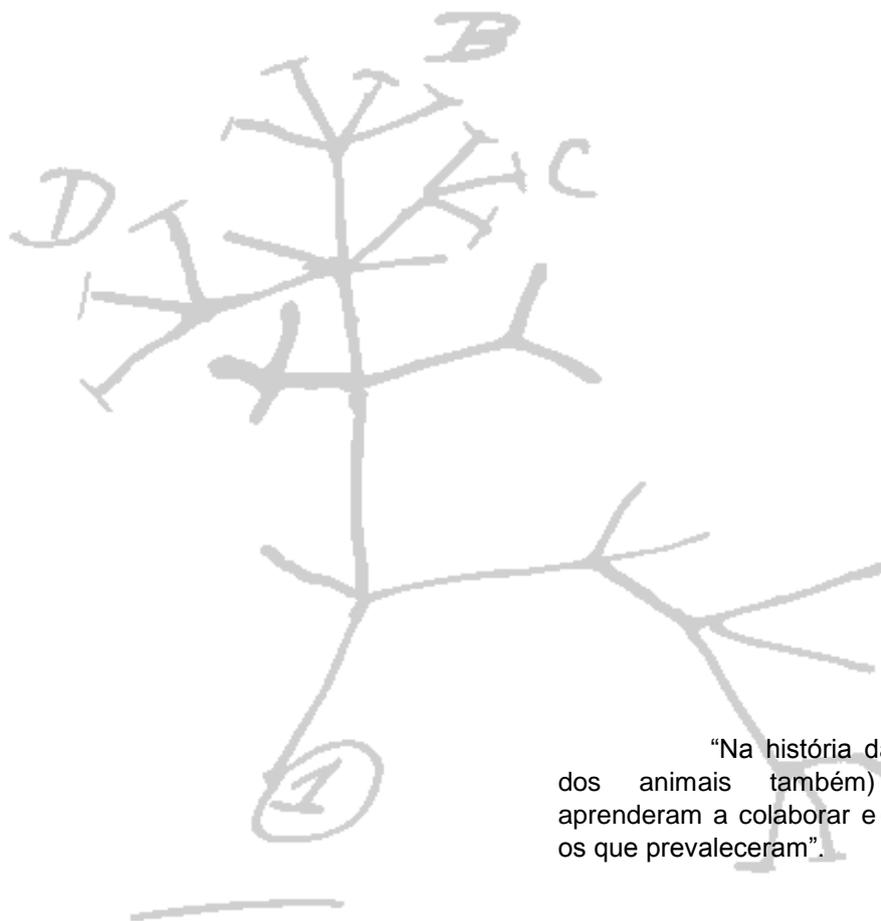
A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal pelos ensinamentos repassados.

A Capes pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, mas que por ventura não foram citados aqui, peço desculpas pela omissão, e agradeço pelo apoio.

Obrigado!

*I think*



“Na história da humanidade (e dos animais também) aqueles que aprenderam a colaborar e improvisar foram os que prevaleceram”.

(Charles Darwin)



## RESUMO

SILVA, D. T. **DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.** 2019. 95f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal – Área: Melhoramento e Recursos Genéticos) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2019.

O processo de exploração da erva mate no Sul do Brasil e a expansão de áreas com monocultivos agrícolas em tempos que eram desfavoráveis o mantimento de ervais ativos, reduziu drasticamente as populações naturais e plantadas da espécie, produzindo uma situação de ameaça e risco de extinção. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal, caracterizar a diversidade genética e a estrutura populacional em populações naturais de *Ilex paraguariensis*, visando estabelecer estratégias de manejo para a conservação da espécie. Para a execução do trabalho foram coletados materiais botânicos de 500 indivíduos abrangendo dez áreas de estudo, sendo elas, Floresta Nacional de Chapecó, Floresta Nacional de Três Barras, Parque Nacional das Araucárias, Parque Teixeira Soares, Parque Nacional de São Joaquim, Complexo Serra da Farofa, e propriedades particulares nos municípios de: Arvorezinha - RS, Santa Cecília – SC, Lacerdópolis – SC e Xaxim - SC, sendo todas populações nativas. Para a caracterização genética foram coletadas amostras foliares de 50 indivíduos adultos em cada população, as coletas respeitaram a distância mínima de 50 metros entre plantas. Também foram coletadas informações geográficas dos indivíduos. As frequências alélicas mostraram a existência de alelos em baixa frequência e alelos exclusivos. Quando analisados 10 *loci* microssatélites, para populações particulares a média da heterozigosidade esperada foi 0,770, já para a heterozigosidade observada este valor foi 0,447, gerando um índice de fixação 0,415, já para populações em unidades de conservação, a média da heterozigosidade esperada foi 0,770, já para a heterozigosidade observada este valor foi 0,440, gerando um índice de fixação 0,430. Para efeitos comparativos foram reanalisados os indivíduos das populações de unidades de conservação e propriedades particulares para os mesmos 10 *loci*. Os valores das heterozigosidades esperadas foi de 0,7700, para a heterozigosidade observada 0,4424, e índice de fixação de 0,4242. As estatísticas F de Wright, para o conjunto de populações  $\hat{F}_{IT} = 0,472$   $\hat{F}_{IS} = 0,426$  e a divergência genética entre populações  $\hat{F}_{ST}$  foi de 0,085. Os índices de diversidade são compatíveis com outros trabalhos, porém os índices de fixação são altos para uma espécie dióica.

**Palavras-chave:** Marcadores microssatélites. Erva-mate. Variabilidade genética. Fluxo gênico. Genética de populações.



## ABSTRACT

SILVA, D. T. **DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE OF POPULATIONS OF *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.** 2019. 95f. Dissertation (Master in Plant Production - Area: Breeding and Genetic Resources) - State University of Santa Catarina. Postgraduate Program in Plant Production, Lages, 2019.

The process of exploiting mate in the South of Brazil and the expansion of areas with monoculture crops in times that were unfavorable to the maintenance of active herbs, drastically reduced the natural and planted populations of the species, producing a situation of threat and risk of extinction. In this context, the main objective of this work was to characterize the genetic diversity and the population structure in natural populations of *Ilex paraguariensis*, aiming to establish management strategies for the conservation of the species. For the execution of the work, botanical materials of 500 individuals were collected covering ten areas of study: Chapecó National Forest, Três Barras National Forest, Araucarias National Park, Teixeira Soares Park, São Joaquim National Park, Serra da Farofa, and private properties in the municipalities of: Arvorezinha - RS, Santa Cecília - SC, Lacerdópolis - SC and Xaxim - SC, all of which are native populations. For the genetic characterization, foliar samples of 50 adult individuals were collected in each population. The samples respected the minimum distance of 50 meters between plants. Geographic information was also collected from individuals. Allele frequencies showed the existence of low frequency alleles and exclusive alleles. When 10 microsatellite loci were analyzed, the expected heterozygosity was 0.770 for private populations. For heterozygosity, this value was 0.447, generating a fixation index of 0.415, for populations in conservation units, the mean of the expected heterozygosity was 0.770, already for the observed heterozygosity this value was 0.440, generating a fixation index 0.430. For comparative purposes, the individuals from the populations of protected areas and private properties for the same 10 *loci* were reanalyzed. The expected heterozygosity values were 0.7700, for the observed heterozygosity 0.4424, and fixation index of 0.4242. The Wright F statistics for the population set  $\hat{F}_{IT} = 0.472$   $\hat{F}_{IS} = 0.426$  and the genetic divergence between populations  $\hat{F}_{ST}$  was 0.085. The diversity indexes are compatible with other studies, however the indexes of fixation are high for a dioecious species.

**Keywords:** Microsatellite markers. Erva-mate. Genetic variability. Gene flow. Population genetics.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Inflorescências e flores de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill. (a) inflorescências masculinas. (b) inflorescências femininas. (c) flor masculina, destaque para as anteras desenvolvidas e ovário não desenvolvido. (d) flor feminina, destaque para o ovário bem desenvolvido e anteras não desenvolvidas .....36
- Figura 2 – Disposição geográfica dos remanescentes florestais onde foram realizadas as coletas de material botânico. Em verde: Unidades de Conservação; Em amarelo: Propriedades Particulares .....54
- Figura 3 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil na Floresta Nacional de Chapeco, distribuídos em 870 ha .....56
- Figura 4 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil na Floresta Nacional de Três Barras, distribuídos em 132 ha de floresta nativa .57
- Figura 5 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil na Parque Nacional das Araucárias, distribuídos em 680 ha de floresta nativa .58
- Figura 6 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil Parque Nacional de São Joaquim, distribuídos em 191 ha de campo e floresta nativa .....59
- Figura 7 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil Parque Natural Municipal Marcelino Ramos, distribuídos em 285 ha floresta nativa .....59
- Figura 8 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil RPPN Complexo Serra da Farofa, distribuídos em 191 ha de floresta nativa .....60
- Figura 9 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil RPPN Ervateira Soccol, distribuídos em 153 ha de floresta nativa no município de Xanxerê – SC .....61
- Figura 10 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil RPPN Ervateira Valério, distribuídos em 67,6 ha de floresta nativa no município de Ilópolis – RS .....62
- Figura 11 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil Propriedade Particular Klabin S/A, distribuídos em 103 ha de floresta nativa .....62
- Figura 12 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil Propriedade Particular Lacerdópolis, distribuídos em 4 fragmentos de floresta nativa, totalizando 53,96 ha .....63

- Figura 13 – Representação esquemática da idade foliar e etapas do protocolo de extração de DNA de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. adaptado ..... 64
- Figura 14 – Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de NEI (1978), para as dez populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., onde em (a) dendrograma das distâncias genéticas de NEI, (b) distâncias geográficas ..... 79
- Figura 15 – Dendrograma baseado na correlação entre as distâncias genéticas de NEI (1978), com as distâncias geográficas, para as dez populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. .... 79

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Produtos alimentícios obtidos através de extrativismo no Brasil, principais produtos, quantidade produzida em toneladas e valor em mil reais da produção .....30
- Tabela 2 – Localização e descrição dos remanescentes florestais onde foram realizadas as coletas de material botânico.....53
- Tabela 3 – Sequência dos marcadores microssatélites de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. e condições da temperatura de anelamento na PCR, formando dois painéis multiplex, para análises neste estudo.\* Diferença encontrada na região de amplificação para o presente estudo a região situa-se entre 130 -160. ....66
- Tabela 4 – Parâmetros de diversidade genética em dez *loci* de microssatélites para cada população de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil, em que: N – Número total de indivíduos;  $N_a$  – Número de alelos;  $N_e$  – Número de alelos efetivos; R – Riqueza alélica;  $H_o$  – Heterozigosidade observada;  $H_e$  – Heterozigosidade esperada; F – Índice de fixação  $*(p<0,05)$ .....67
- Tabela 5 – Parâmetros de estrutura genética em dez *loci* de microssatélites para as populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. em Unidades de Conservação, em que:  $F_{IS}$  – Diversidade genética dentro das populações  $F_{ST}$  – Diversidade genética entre populações;  $F_{IT}$  – Diversidade genética total; IC – Intervalo de confiança (\*significativamente diferente de zero) .....69
- Tabela 6 – Alelos privados por *loci* de microssatélites por população de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. em Unidades de Conservação, com as respectivas frequências.....70
- Tabela 7 – Parâmetros de diversidade genética em dez *loci* de microssatélites para cada população de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil, em que: N – Número total de indivíduos;  $N_a$  – Número de alelos;  $N_e$  – Número de alelos efetivos; R – Riqueza alélica;  $H_o$  – Heterozigosidade observada;  $H_e$  – Heterozigosidade esperada; F – Índice de fixação  $*(p<0,05)$ .....72
- Tabela 8 – Parâmetros de estrutura genética em dez *loci* de microssatélites para as populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. em Propriedades Particulares, em que:  $F_{IS}$  – Diversidade genética dentro das populações;  $F_{ST}$  – Diversidade genética entre populações;  $F_{IT}$  – Diversidade genética total; IC: Intervalo de confiança, (\*significativamente diferente de zero) .....73
- Tabela 9 – Alelos privados por *loci* de microssatélites por população de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. em Propriedades Particulares, com as respectivas frequências.....74
- Tabela 10 – Parâmetros de estrutura genética em dez *loci* de microssatélites para dez populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., em que:  $F_{IS}$  – Diversidade genética dentro das populações;  $F_{ST}$  – Diversidade genética entre populações;  $F_{IT}$  – Diversidade genética total; IC: Intervalo de confiança, (\*significativamente diferente de zero) .....75

Tabela 11 – Riqueza alélica (R), heterozigosidades esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) e índice de fixação (F) entre dois grupos de populações de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil. separadas em Unidades de Conservação (FLONA Chapecó; PN Araucária; PM Teixeira Soares; RPPN Serra da Farofa; FLONA de Três Barras e PN São Joaquim) e Propriedades Particulares (Ervateira Soccol; Ervateira Valério; PP Lacerdópolis e PP Klabin) .....	77
Tabela 12 – Matriz número de migrantes entre as populações de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil. ....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

CTAB	K Hexadecil Trimetil Amônio Brometo
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleosídeos Trifosfatos
EDTA	Etileno Diamino Tetracético
EP	Erro Padrão
GDA	Genetic Data Analysis
GPS	Sistema De Posicionamento Global
KCL	Cloreto De Potássio
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto De Magnésio
Na <sub>2</sub> EDTA	Etilenodiaminatetereacetato Dissódico
NaCl	Cloreto De Sódio
Pb	Pares De Bases
PVP	Polivinil Pirrolidona
PVPP	Polivinil Polipirrolidona
RPM	Rotação Por Minuto
TBE	Tris-Boro-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris (Hidroximetil) Aminometano
Tris-HCl	Tris (Hidroximetil) Aminometano Hipoclorida
FLONA	Floresta Nacional
UC	Unidade De Conservação
PARNA	Parque Nacional
RPPN	Reserva Particular Do Patrimônio Nacional
HW	Hardy Weinberg
APP	Área de Preservação Permanente
PFNM	Produto Florestal não Madeireiro



## LISTA DE SÍMBOLOS

°	Graus
°C	Graus Celsius
$H_S$	Heterozigosidade dentro da população
$D_{ST}$	Heterozigosidade entre populações
$H_T$	Heterozigosidade Total
>	Maior
®	Marca registrada
<	Menor
"	Minutos
%	Porcentagem
'	Segundos
$\hat{N}_e$	Tamanho efetivo populacional
$\hat{F}_{IS}$	Variabilidade dentro populações
$\hat{F}_{ST}$	Variabilidade entre populações
$\hat{F}_{IT}$	Variabilidade total



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>29</b>
2.1	DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE.....	34
2.2	CONSERVAÇÃO .....	38
2.3	GENÉTICA DE POPULAÇÕES .....	41
2.4	ISOLAMENTO DE DNA E PCR .....	44
2.5	MARCADORES MOLECULARES.....	45
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
3.1	COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO .....	53
<b>3.1.1</b>	<b>Aspecto geral das áreas de coleta.....</b>	<b>54</b>
3.2	ISOLAMENTO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA .....	63
3.3	ANÁLISE DOS DADOS .....	66
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
4.1	DIVERSIDADE GENÉTICA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO .....	67
4.2	DIVERSIDADE GENÉTICA EM ÁREAS PARTICULARES COM EXTRATIVISMO .....	71
4.3	DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA QUANDO COMPARADAS AS DEZ POPULAÇÕES.....	75
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas naturais vêm sofrendo perturbações ambientais desde o momento em que o fogo e a caça começaram a ser utilizados. Com a domesticação de plantas e animais, o desmatamento se deu progressivamente, provocando uma rápida diminuição da cobertura vegetal natural, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (AZEVEDO, 2003).

Esta alteração promoveu a fragmentação da paisagem que, desta forma, passa a ser composta por mosaicos de vegetação nativa estruturados em fragmentos florestais de diferentes dimensões e formas (AZEVEDO, 2003).

A estrutura e a dinâmica da fragmentação da paisagem variam em função de uma série de fatores como: o histórico de perturbação; a forma dos fragmentos; o tipo de vizinhança e o grau de isolamento. A paisagem fragmentada apresenta uma série de características que a diferenciam da paisagem contínua da qual se originou e, dependendo destas características, pode sofrer maior ou menor alteração (SHELHAS; GREENBERG, 1996). Dentre as inúmeras alterações que a paisagem fragmentada sofre, o aspecto mais grave da fragmentação florestal é a perda da biodiversidade, que ocorre através da modificação da sua estrutura física, incluindo a perda de diversidade genética, que como consequência pode ter a redução na capacidade adaptativa das espécies (DE AZEVEDO, 2017)

Atualmente os estudos e pesquisas na área da genética de populações têm crescido, principalmente devido à fragmentação como mencionado anteriormente. Haja vista, que populações com tamanho reduzido, são mais suscetíveis aos efeitos dos fatores evolutivos, podendo ocasionar o isolamento espacial das populações, prejudicando o sucesso reprodutivo e o fluxo gênico das espécies (SEOANE; SEBBEN; KAGEYAMA, 2000; SHIMIZU; JAEGER; SOPCHAKI, 2000; KAGEYAMA, 2005).

Para o estudo e compreensão das características genéticas das espécies, bem como a comparação entre as populações, é utilizado como base o princípio do equilíbrio de Hardy – Weinberg, expressando o equilíbrio de uma população de tamanho relativamente grande, de indivíduos diploides, de reprodução sexuada, com cruzamentos aleatórios, em que, todos os genótipos têm igual viabilidade e fertilidade, na ausência dos fatores evolutivos, sendo estes, mutação, migração, seleção e deriva genética (HARTL; CLARK, 2010) .

Com isso no presente trabalho foi realizado uma comparação da diversidade genética entre indivíduos adultos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., em populações presentes nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com vistas a determinar a variabilidade Genética intra e interpopulacional, e avaliar se os diferentes locais e sistemas de práticas de manejo utilizados favorecem a conservação in situ.

*I. paraguariensis* pertence à família botânica Aquifoliaceae, é uma espécie perene, clímax, com porte arbóreo e longeva, podendo alcançar cem anos. Espécie considerada dióica, ou seja, possui indivíduos masculinos e indivíduos femininos (WENDT, 2005).

A espécie possui área de distribuição natural na América do Sul, onde é comum nos estados do sul do Brasil, no Paraguai, Argentina e partes do Uruguai. A distribuição brasileira da espécie inclui os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso Do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (DE OLIVEIRA; ROTTA, 1983).

Da Croce (2000) menciona a importância da erva-mate para o estado de Santa Catarina, descrevendo que a erva-mate é uma atividade consolidada no sul do Brasil, com elevada importância socioeconômica e ambiental, própria da pequena propriedade, com ocupação de mão-de-obra e alto rendimento, servindo para manter o produtor rural num patamar estável quando ocorrerem flutuações no mercado nas culturas anuais. A exploração excessiva deste recurso natural até 1930, (auge do ciclo econômico da erva-mate) aliado à falta de planejamento da mesma, teve como consequência a erradicação de grande parte dos ervais nativos existentes (ANDRADE, 1999). Assim, houve uma redução desta matéria prima provocando um aumento dos preços, o que incentivou novos produtores a reflorestar com erva-mate, surgindo assim os monocultivos a partir da década de 50-70 (ANDRADE, 1999; DA CROCE, 1999).

Segundo Andrade (1999), o perfil dos produtores de erva-mate está relacionado diretamente com o sistema de produção, com o tamanho da área dos ervais e a produtividade dos mesmos. Ressalta-se que para a produção de erva-mate podem ser utilizadas folhas e ramos de plantas de *I. paraguariensis*, sendo a origem (erval nativo, erval plantado) da matéria prima muito importante para o beneficiamento da mesma (SUERTEGARAY, 2002).

Por se tratar de uma espécie que atualmente está sendo valorizada para vários segmentos da indústria, sendo de grande importância econômica e social; outrora

grandes áreas foram convertidas para a implantação de culturas anuais e ou em campos para criação de gado extensiva, estes fatores sugerem um aumento na fragmentação florestal, onde, provavelmente muitas informações acerca da variabilidade genética da espécie tenham sido perdidas, antes mesmo de ser estudada. Justifica-se então, realizar a caracterização da variabilidade e estrutura genética existentes nos remanescentes florestais de *Ilex paraguariensis*, que fornecerá informações quanto a diversidade da espécie, a ocorrência de trocas genéticas entre as populações, e principalmente dará subsidio para inferências quanto ao uso e a conservação desse recurso florestal tão importante nos Estados do sul do Brasil.

Portanto, o objetivo geral do trabalho é caracterizar a diversidade genética, a estrutura genética e o fluxo gênico de populações de *Ilex paraguariensis*, levando em consideração populações consideradas preservadas e populações com histórico de antropização, utilizando marcadores microssatélites.

Este estudo abordará: a diversidade e estrutura genética de *Ilex paraguariensis* em unidades de conservação; a diversidade e estrutura genética de *Ilex paraguariensis* em áreas particulares que possuem extrativismo da espécie; afim de verificar se: Existe relação entre a distância geográfica e a distância genética de *Ilex paraguariensis*; O avanço do campo e das lavouras sobre as florestas / ervais, refletiu na redução da variabilidade genética da espécie; Há diferenças entre remanescentes de *Ilex* de ocorrência natural em populações florestais considerados preservados daqueles antropizados, quanto a diversidade genética;



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A erva-mate possui grande importância econômica, social e cultural para o Sul do Brasil, Nordeste da Argentina e grande parte do Paraguai. Integra um dos mais tradicionais sistemas agroflorestais, sendo uma das culturas que colabora para a manutenção do pequeno produtor no meio rural (DUTRA et al., 2008).

No Brasil, país detentor de uma das maiores riquezas em biodiversidade, a lista de espécies que são utilizadas para fibras, alimentação, oleaginosas e medicinais, que são obtidas por meio de extrativismo, soma 21 espécies (IBGE, 2017). A erva-mate está entre as sete espécies que são utilizadas como produtos alimentícios. Na Tabela 1 são apresentadas as principais informações do IBGE para estes sete produtos.

No Brasil, é explorada economicamente em cerca de 596 municípios dos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul, com 180 mil propriedades rurais envolvidas, sendo na maioria, constituídas de pequenos e médios produtores. A erva-mate abastece 750 indústrias, gerando 710 mil empregos, com uma produção de aproximadamente 700 mil toneladas por ano do produto industrializado (MACCARI JUNIOR, 2000).

O Rio Grande do Sul foi o maior produtor brasileiro na década de 70, respondendo por 50% da produção, mas ao passar dos tempos sua produção foi decrescendo com a substituição dos ervais por outros tipos de culturas anuais, já em 1999 sua participação foi reduzida para 25%, neste ano o Paraná passou a ocupar o seu lugar, produzindo 37% do total, seguido de Santa Catarina com 36% (IBGE, 2017).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2017 o Brasil obteve produção total de erva-mate nativa igual a 354.398 toneladas, sendo o principal produto não madeireiro da extração vegetal no País (IBGE, 2017). Entre os estados produtores, o Paraná é responsável por 85,16% (301.813 toneladas) do total da produção nacional de erva-mate nativa, seguido pelo estado de Santa Catarina, 9,94% (35.250 toneladas), Rio Grande do Sul com 4,84% (17.163 toneladas) e Mato Grosso do Sul com 0,048% (172 toneladas) (IBGE, 2017).

Tabela 1 – Produtos alimentícios obtidos através de extrativismo no Brasil, principais produtos, quantidade produzida em toneladas e valor em mil reais da produção

<b>Principais Produtos</b>	<b>Quantidade produzida na extração vegetal (toneladas)</b>	<b>Valor da produção na extração vegetal (Mil Reais)</b>
<b>Açaí (fruto)</b>	219885	596768
<b>Castanha-de-caju</b>	1715	5479
<b>Castanha-do-pará</b>	26191	104147
<b>Erva-mate</b>	354398	423907
<b>Palmito</b>	4350	14625
<b>Pinhão</b>	9293	22956
<b>Umbu (fruto)</b>	7465	7760

Fonte: Adaptado de IBGE (2017).

De acordo com os dados da Tabela 1, a erva-mate é o principal produto florestal não madeireiro em termos de produção, porém, em valor de produção o açaí é o principal PFM comercializado no Brasil.

Sua principal utilização é na produção de bebidas, principalmente na forma de chimarrão e chás, mas devido às suas propriedades fitoquímicas, apresenta grande potencial para outras aplicações industriais como corante, conservante alimentar, medicamentos, produtos de higiene e cosméticos (MACCARI JUNIOR, 2000).

A erva-mate apresenta na sua composição química substâncias de grande interesse terapêutico como: cafeína, teobromina, substâncias tânicas, flavonoides, vitaminas e minerais, que agem sobre o sistema cardiovascular, respiratório, tecido muscular, trato gastrointestinal e também apresentam propriedades estimulantes sobre o sistema nervoso central, assim como, função antirreumática, antioxidante e diurética (ALIKARIDIS, 1987; FUCHS; WANNMACHER, 1998; MACCARI JUNIOR, 2000).

O aumento do consumo de *I. paraguariensis*, tanto no mercado interno quanto externo, e a queda de produção dos ervais nativos, devido ao desmatamento e expansão da fronteira agrícola, motivou o plantio desta espécie em cultivos homogêneos puros ou em associação (WENDT, 2005).

Para MATTOS (2012), as comunidades estão influenciando na estrutura demográfica através dos manejos diferenciados. No entanto, percebe-se que as populações de plantas estão num processo incipiente de domesticação, devido a

ainda ser encontrada nas duas tipologias (erval explorado com práticas simples de manejo e pouca intervenção humana e manejo com criação de animais no sub-bosque e intervenção humana intensa), uma grande diversidade de morfotipos de erva-mate.

O sistema extrativista utilizado no início do ciclo da erva-mate, aliado aos bons preços pagos aos grãos como soja e milho, desencadeou uma instabilidade econômica para a cultura. A exploração deste recurso natural de forma desorganizada, sem técnicas adequadas e visão preservacionista, fez com que boa parte dos ervais nativos, juntamente com seu habitat de florestas nativas, fossem reduzidos, dando lugar às explorações de culturas anuais. Isto reduziu a oferta de matéria-prima para a indústria ervateira, provocando uma elevação dos preços. Os produtores motivados por esta alta implantaram reflorestamentos com erva-mate em monocultivos (LINHARES, 1969). Na década de 90, todavia, constatou-se o retorno do plantio de erva-mate como uma forma de enriquecimento de florestas, através do cultivo consorciado com outras espécies florestais, ou até mesmo com culturas anuais, buscando a melhoria da qualidade da matéria-prima e o maior rendimento econômico. Além disto, a diferenciação nos valores da matéria-prima pagos aos produtores tem sido observada, consoante ao sistema de cultivo utilizado, isto é, a pleno sol ou em ambiente sombreado. Esta situação decorre da alegação de que a fito massa oriunda de cultivos em ambientes sombreados apresenta “gosto mais suave” em relação à erva cultivada a pleno sol e, por isto, alcança maior preço no mercado. Em função deste contexto, as pequenas propriedades rurais, responsáveis por 90% da produção de erva-mate na Região Sul do Brasil, têm encontrado dificuldades para a venda do produto originário de plantios homogêneos (DA CROCE, 1996).

O setor ervateiro precisa acompanhar as tendências que vêm ocorrendo no mercado de consumo de bebidas e as mudanças comportamentais do consumidor de mate (MAZUCHOWSKI, 2000). O consumidor exige qualidade na pureza do produto, nos aspectos microbiológicos, na composição físico-química e, principalmente, na qualidade sensorial (DUARTE, 2000). É necessário, portanto, caracterizar os produtos, mostrando as qualidades, bem como as características sensoriais de cada um, para investir em ações de marketing e propaganda (RUCKER; MACCARI; ROCHA, 2002).

Atualmente há uma intensa discussão no setor ervateiro em torno da normatização do Ministério da Saúde, através da Vigilância Sanitária, para o

estabelecimento de identidade e qualidade para a erva-mate, e seus compostos. As Normativas, além de possibilitarem a fiscalização do produto, também dão início à “Regulamentação Higiênico–Sanitárias e Boas Práticas de Fabricação”, que especifica como o produto deverá ser produzido, manipulado, processado, armazenado e conservado para atingir a qualidade higiênico-sanitária indispensável (MENDES, 2005).

Em virtude dos benefícios oferecidos pela erva-mate, e por ser esta considerada uma das plantas mais rica em substâncias benéficas para a saúde humana do mundo, a erva-mate vem sendo alvo de estudos não somente no Brasil, mas também no exterior. Devido ao aumento do consumo do chimarrão, chá, pó solúvel, refrigerante e extração de essências e vitaminas, surgiu a necessidade de ampliar não somente os conhecimentos, mas também o controle de qualidade no processo industrial (DA CROCE, 2000).

Os fatores que influenciam a diferenciação no sabor da erva-mate têm sido objeto de especulações e pouco conhecidos. Uma das dificuldades nessa determinação é a caracterização microclimática dos ambientes de sistemas agroflorestais onde a espécie é cultivada, devido a heterogeneidade da distribuição de radiação solar naqueles ambientes e, por consequência, da qualidade da luz disponível às plantas.

O macroclima das regiões produtoras no Sul do Brasil é caracterizado por precipitações médias anuais em torno de 1500mm, variando de 1100 a 2300mm (CARVALHO, 1994). O regime de chuvas é uniforme ou estacional na maior parte da área de ocorrência (Região Sul), sendo as chuvas concentradas no verão e as estações secas pouco pronunciadas ou ausentes no inverno. A temperatura média anual do ar nessas regiões situa-se entre 12 e 24°C, com maior ocorrência entre 15 a 18°C. A temperatura média do ar do mês mais frio nas regiões produtoras situa-se entre 8 e 19°C, sendo que nos locais mais frios pode ocorrer uma alta frequência de geadas. Além disto, no que concerne à radiação solar, a erva-mate adapta-se à sombra em qualquer idade, tolerando plena exposição à radiação solar e ao frio na fase adulta. Sua ocorrência foi observada em regiões frias, nas quais os valores de temperatura mínima absoluta do ar podem atingir até -12°C (CARVALHO, 1994). Portanto, os elementos climáticos podem atuar como fatores limitantes da produção da erva-mate. Dados de Ferreira et al. (1994) mostram que o microclima pode alterar

a data de ocorrência dos estádios de desenvolvimento da planta em algumas regiões do Sul do Brasil.

No Brasil o melhoramento é mais recente, mas cabe destacar os programas desenvolvidos pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Santa Catarina) e Embrapa Florestas, com a seleção de procedências, progênies, indivíduos e clones (DA CROCE; FLOSS, 1999; RESENDE et al., 2000). O único parâmetro de avaliação nestes programas consiste na produção de massa foliar. Entretanto, a preocupação com a qualidade do produto final tem despertado o interesse dos melhoristas em associar outras características ao processo de seleção de indivíduos. As análises fitoquímicas, visando determinar e quantificar os componentes químicos presentes na erva-mate, podem ser empregadas para selecionar plantas com determinadas características para a indústria, como por exemplo, sabor suave (DONADUZZI et al., 2000).

Com relação ao programa de conservação dos recursos genéticos de erva mate, além dos dois grupos citados anteriormente, uma terceira equipe multi-institucional formada pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) e Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), está envolvida na formação de bancos de germoplasma (WINGE, 1997).

Entretanto, existem poucos trabalhos sobre a biologia e, principalmente, sobre a estrutura genética da erva-mate. Algumas pesquisas foram realizadas utilizando marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) para determinar a diversidade genética em populações naturais (GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000) e também em testes de procedências e progênies de programas de melhoramento onde os resultados obtidos indicam que a base genética da erva-mate é relativamente estreita, colocando-a como uma espécie potencialmente em risco de extinção (VIDOR et al., 2002a; VIDOR et al., 2002b).

Wollheim; Winge (1992) realizaram um estudo preliminar sobre paternidade e fluxo gênico, analisando as progênies de três árvores, através de marcadores isoenzimáticos. Porém, as autoras sugerem que outras populações sejam estudadas.

Estudos clássicos de genética de populações devem ser conduzidos para estimar diversos parâmetros que influenciam a estrutura genética, como a variação genética entre e dentro de populações, a heterozigosidade esperada e observada, a herança genética e o fluxo gênico. Esse conhecimento é fundamental para o

estabelecimento de estratégias de coleta e conservação genética, formação dos bancos de germoplasma e desenvolvimento de programas de melhoramento.

Dentre os marcadores moleculares que utilizam a técnica de 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 heterozigóticos 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 são desenvolvidos especialmente para uma espécie, entretanto podem ser transferidos 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., 2012).

Os marcadores microssatélites ou Simples Repetições de Sequências (SSR) são uma ferramenta popular na Genética de Populações (DUTECH et al., 2004), pois são muito mais polimórficos que alozimas. O maior nível de variação em *loci* microssatélites sugere que eles devem ser mais confiáveis do que alozimas para detectar mudanças no tamanho efetivo da população, estrutura genética, e taxa de cruzamento (CONTE et al., 2008).

Informações de ecologia e genética em populações naturais de espécies arbóreas tropicais são incipientes na literatura, em função da alta diversidade e complexidade de espécies, trazendo dificuldades na amostragem e nas metodologias apropriadas para seu estudo, no entanto, nos últimos anos tem-se observado diversos avanços na área de genética de populações. Esse conhecimento é essencial para o entendimento da estrutura genética das populações e, portanto, para o delineamento de estratégias de conservação, melhoramento e manejo sustentável (definição de tamanho de reservas, manejo adequado das espécies, recuperação de áreas degradadas, coleta de sementes para plantios com espécies nativas). Tais informações são estratégicas para a conservação da Floresta Ombrófila mista e da Mata Atlântica (KAGEYAMA, 2003).

## 2.1 DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE

*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., popularmente conhecida como erva mate, é nativa da América do Sul e é comum nos estados do sul do Brasil, no Paraguai, Argentina e partes do Uruguai. A distribuição brasileira da espécie inclui os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso Do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (GRONDONA, 1954).

O gênero *Ilex* pertence à família Aquifoliaceae que apresenta cerca de 600 espécies, sendo 220 nativas da América do Sul, das quais 68 ocorrem no Brasil (SCHERER, 1997).

A erva-mate é uma espécie perene, com porte arbóreo e longeva, podendo alcançar cem anos. Sua altura é variável, dependendo da idade e do tipo de sítio, podendo atingir até 30 metros na floresta, porém, quando podada, geralmente não ultrapassa os 7 metros de altura (MAZUCHOWSKI, 1989; CARVALHO, 2003).

Possui o tronco cilíndrico, reto ou pouco tortuoso, geralmente com 20 a 40 cm de diâmetro, podendo chegar a 100 cm. A casca possui espessura de até 20 mm, sendo a externa de cor cinza-clara a acastanhada, persistente e com textura de áspera a rugosa. A casca interna apresenta textura arenosa e cor branca-amarelada que, após incisão, escurece rapidamente em contato com o ar (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; CARVALHO, 2003).

As folhas são simples, alternas, geralmente estipuladas, de textura variando de subcoriáceas a coriáceas, glabras e mostram-se estreitas na base e geralmente obtusas no vértice. O limbo foliar apresenta forma obovada, com 5 a 10 cm de comprimento por 3 a 4 cm de largura; a margem é irregularmente serrilhada ou denteada, sendo o terço da base geralmente liso. As nervuras laterais são pouco impressas na face adaxial, e salientes na abaxial. O pecíolo é relativamente curto, medindo de 7 a 15 mm de comprimento (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; MAZUCHOWSKI, 1989; CARVALHO, 2003).

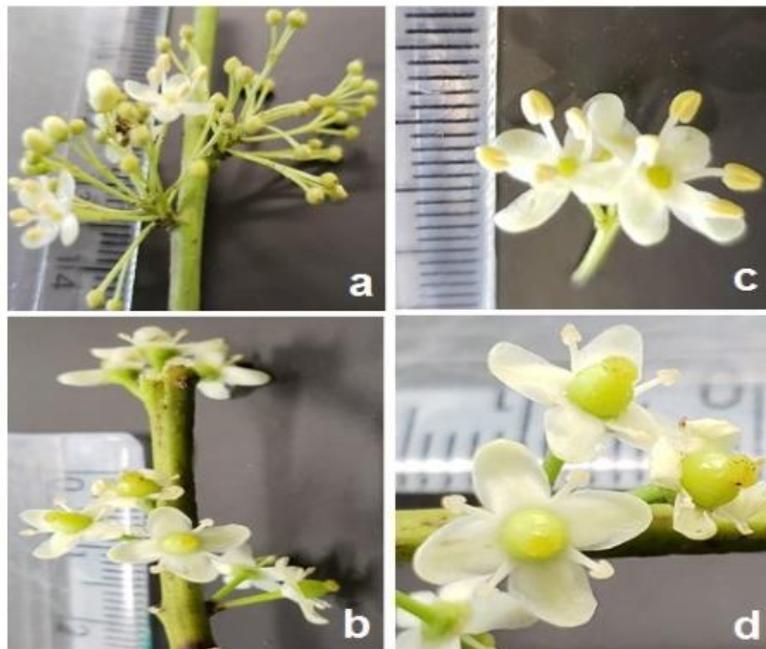
A espécie é dióica críptica ( $2n = 40$ ), com flores díclinas, com um dos sexos abortivo (flores masculinas e femininas em indivíduos separados). As flores masculinas possuem ovário rudimentar não funcional (pistilódio) e as femininas, estames rudimentares estéreis (estaminódios) (FERREIRA et al., 1983).

Quanto ao sistema reprodutivo, é caracterizada obrigatoriamente como alógama, já que é uma espécie dióica. Considerada uma espécie clímax, é ciófito, ou seja, aceita sombreamento em qualquer etapa de seu desenvolvimento, tolerando mais luz na fase adulta, e seletiva higrófito (CARVALHO, 2003; DANIEL, 2009;

LORENZI, 2014; MARQUES et al., 2012; RESENDE et al., 2000; SOUSA; DAROS; STURION, 2003).

A identificação do sexo das árvores pode ser realizada através das características de suas inflorescências e flores, conforme descritas por Schoenberg; Dinoutti (1989). Segundo os autores, as árvores masculinas apresentam inflorescências constituídas por pedúnculo muito curto (braquiblasto), que se ramifica (quatro ou cinco ramos) e cada ramo possui duas ou três flores dispostas no mesmo nível, tendo pedúnculos mais longos do que das flores femininas. As flores masculinas caracterizam-se pelo ovário abortado, com aspecto rudimentar, sem estigma. O androceu possui anteras maiores, perfeitas férteis. As inflorescências femininas apresentam apenas uma unidade peduncular (braquiblasto), constituída por ramos curtos e concrecidos e as flores dispõem-se em diversos níveis ao longo da unidade caulinar. O ovário é bem desenvolvido, sem estilete, com estigma amplo. As anteras são menores, modificadas e estéreis (Figura 1).

Figura 1 – Inflorescências e flores de indivíduos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hill. (a) inflorescências masculinas. (b) inflorescências femininas. (c) flor masculina, destaque para as anteras desenvolvidas e ovário não desenvolvido. (d) flor feminina, destaque para o ovário bem desenvolvido e anteras não desenvolvidas



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

As flores são pequenas, pedunculadas e dispostas nas axilas das folhas superiores. Possuem um cálice gamossépalo com quatro sépalas de cor verde clara e uma corola formada por quatro pétalas de coloração branca. Entre as pétalas aparecem quatro estames (FONT QUER, 1953).

O período de floração ocorre de setembro a dezembro, sendo predominante em outubro (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; SOUSA; DAROS; STURION, 2003). A polinização é basicamente entomófila, sem especificidade de polinizadores, sendo realizada por inúmeros insetos (Hymenoptera, Coleoptera, Hemiptera e Diptera), embora alguma transferência de pólen pelo vento não possa ser descartada (FERREIRA et al., 1983).

Segundo Pires et al (2014) os visitantes mais frequentes nas flores masculinas foram da ordem Coleóptera, enquanto nas femininas foram da ordem Díptera, também observaram que insetos da ordem Hymenoptera frequentaram mais inflorescências femininas do que masculinas, já a ordem Lepdoptera foram observadas visitas apenas em inflorescências masculinas.

Os frutos são drupas globosas de 4 a 6 mm de diâmetro, tetraloculares, de superfície lisa. Durante o processo de maturação, a coloração do fruto altera-se, passando de verde a branco, no início do processo, para vermelho ou violáceo até quase preto, quando completamente maduro. A polpa é mucilaginosa e cada fruto produz quatro ou cinco sementes. As mesmas apresentam uma coloração marrom que varia de claro a escuro, são muito duras, pequenas e de forma variável (MARIATH et al., 1995; CARVALHO, 2003).

O amadurecimento dos frutos começa em dezembro e estende-se até março (REITZ; KLEIN; REIS, 1988; SOUSA; DAROS; STURION, 2003; PIRES et al, 2013). A maturação é bastante heterogênea, sendo encontrados, na mesma árvore, frutos verdes, fisiologicamente maduros e frutos que ultrapassaram o período de maturação (ZANON, 1988). A dispersão dos frutos e sementes é zoocórica, realizada principalmente pelos pássaros (ornitocoria), que se alimentam dos frutos maduros (CARVALHO, 2003).

## 2.2 CONSERVAÇÃO

No decorrer do tempo, a vegetação pode ter suas características originais modificadas em virtude dos eventos antropogênicos que alteram o ambiente, como grandes desmatamentos, avanço de áreas urbanas sobre limites rurais, expansões agrícolas e pecuária extensiva são fatores que podem fragmentar e reduzir as populações de espécies nativas.

A fragmentação como baseia-se em um processo antrópico que intensifica a modificação da paisagem, tendo como consequência a mudança na composição e na diversidade genética de muitas espécies, bem como interferências na dispersão e colonização das espécies, tanto dos vegetais como dos animais. Além disso, uma excessiva fragmentação florestal diminui o tamanho efetivo da população, o que compromete a sustentabilidade destas populações, bem como dos demais organismos, animais e plantas associadas (LONGHI et al., 2000; NASCIMENTO; LAURENCE, 2006; SARMENTO; VILLELA, 2010; SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016; SHIMIZU; JAEGER; SOPCHAKI, 2000; VIANA; PINHEIRO, 1998; VIEIRA, et al., 2001).

Desta forma, tem-se uma tendência ao aumento na demanda por conhecimento e do incentivo às pesquisas, para o uso e a conservação dos recursos florestais brasileiros, bem como o aumento do interesse em atividades que visam à preservação do ambiente. Preservação esta que vem ocorrendo atualmente, por meio de projetos de recuperação de áreas degradadas, conscientização da população quanto ao uso das florestas e diminuição da exploração não sustentável de florestas nativas (ZIMBACK et al., 2004).

Nesse contexto, o conhecimento da biodiversidade das espécies nativas e a sua conservação genética é relevante, tanto no âmbito econômico, geopolítico e social, além da questão ecológica, para a reprodução da vida e equilíbrio ambiental, estando, também, ligados ao conhecimento técnico-científico, subsidiando as ações de uso e conservação das espécies. Destaca-se, em decorrência do exposto, a importância de se pesquisar e incentivar a busca por um maior conhecimento sobre espécies nativas, seus usos e exigências, a fim de desenvolver programas para a conservação genética das espécies, e conservação da biodiversidade das florestas (ALBAGLI, 2003; BRACK; KINUPP; SOBRAL, 2007; CARVALHO; SILVA; DAVIDE, 2006; KUNZ et al., 2014; NARVAES; BRENA; LONGHI, 2005; OLIVEIRA;

SCHLEDER; FAVERO, 2006; PIRES et al., 2011; RAMALHO et al., 2012; SILVA et al., 2012; VIANA; PINHEIRO, 1998).

Dentre as principais metas dos programas de conservação, juntamente com à preservação de habitats, é a manutenção dos níveis existentes de diversidade genética em espécies raras, ameaçadas ou que estão inseridas em biomas ameaçados (HAMRICK et al. 1992, NEEL; ELLSTRAND, 2003). A existência de variabilidade genética é de suma importância para garantir o potencial evolutivo e a sobrevivência das espécies em função das mudanças ambientais.

Os parâmetros genéticos populacionais podem ser úteis na detecção de populações que apresentem diferentes magnitudes de variabilidade genética e, desse modo, requerem diferentes estratégias para sua conservação, seja ela *in situ* ou *ex situ* (NEWTON et al., 1999). Ao idealizar um programa de conservação consistentemente auspicioso para espécies vegetais, tornam-se essenciais estudos detalhados da estrutura genética populacional, assim como dos fatores evolutivos que iniciaram e mantêm essa estrutura (HAMRICK et al., 1992). Reis (1996) aponta que a caracterização dos níveis de variabilidade e estruturação genética, assim como o entendimento da dinâmica da movimentação dos alelos nas populações naturais, são fundamentais para subsidiar a conservação de populações naturais.

Para a manutenção da variabilidade genética existente, tanto entre como dentro de populações vegetais, são utilizados, basicamente, três métodos de conservação: “*in situ*”, “*on farm*” e “*ex situ*”. Quando a espécie é mantida no seu habitat natural, para garantir conhecimento do padrão de distribuição, ecologia, entre outros, é chamado de conservação “*in situ*”, porém este tipo de conservação traz como desvantagem a suscetibilidade dos indivíduos a condições adversas, prejudiciais ao desenvolvimento e a própria conservação. Quando as espécies são cultivadas e manejadas de forma contínua no sistema tradicional realizado por comunidades locais e povos indígenas, é chamado de conservação “*on farm*”, legitimando no campo científico e político, o papel fundamental que os agricultores desempenham na conservação e diversificação dos recursos genéticos vegetais, a partir do seu manejo e uso. Quando a espécie é mantida protegida em locais fora do seu habitat natural, como em laboratórios, com o cultivo *in vitro*, jardins botânicos com exemplares a campo, e, também, por meio do armazenamento de sementes, chama-se conservação “*ex situ*”, porém este processo é dependente da viabilidade das sementes, devendo ser realizado de forma complementar à conservação “*in situ*” (CARVALHO; SILVA; DAVIDE, 2006; GUERRA

et al., 2008; PIRES et al., 2011; RAMALHO et al., 2012; SANTONIERI; BUSTAMANTE, 2016; SARMENTO; VILLELA, 2010; SARMENTO; SILVA, A.; SILVA C., 2012).

O Brasil possui uma diversidade biológica muito grande, e é hoje um detentor de grande reserva de biodiversidade, e mesmo havendo grandes perdas pelo desmatamento, nos últimos tempos, vem progredindo em seu programa de conservação, embora ainda muitas espécies nativas com grande potencial não estejam sendo pesquisadas e conservadas de maneira expressiva (ROSSI; SARTORETTO, 2014; SIQUEIRA et al., 2013).

No estado de Santa Catarina e Rio Grande do sul, o bioma predominante é o bioma Mata Atlântica, o qual possui importância expressiva, por ser o segundo maior ecossistema do mundo em biodiversidade, e é considerado um patrimônio natural, genético e cultural, com importância global, todavia encontra-se distribuído em uma paisagem fragmentada por consequência do uso e ocupação do solo, e como essa pressão exercida sobre as florestas nativas pode acarretar na eliminação de algumas espécies. Atualmente o bioma Mata Atlântica é considerado um dos mais ameaçados do planeta. Com isso, tem-se o aumento em pesquisas acerca das formações florestais presentes no bioma, para fornecer bases de inferências quanto ao uso e a conservação (PINTO, 2002; RIBEIRO; TEIXEIRA; BASTOS, 2009; SCIPIONI et al., 2011; MORAES et al., 2013; SILVA; TOZZI, 2013; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017).

Entre as regiões fitoecológicas contidas no bioma Mata Atlântica, tem-se a Floresta Estacional Decidual (FED), Floresta Ombrófila Densa (FOD) e Floresta Ombrófila Mista (FOM). Sendo que a FED é caracterizada por apresentar duas estações definidas, uma chuvosa seguida por longo período biologicamente seco, abrangendo grandes altitudes e baixas temperaturas, com estratos predominantemente caducifólios. A FOD é considerada como mata sempre verde, ou seja, perenifólia, com expressiva diversidade florística, densa vegetação arbustiva ou secundária, e, composta por samambaias, bromélias, palmeiras, entre outras. E por fim a FOM que também é conhecida por Floresta com Araucária, ocorre normalmente em altitudes elevadas, e clima temperado com chuvas regulares, e estações do ano relativamente definidas, com um misto de angiospermas e coníferas, (FARIAS et al., 1994; ; LONGHI et al., 2000; KLAUBERG et al., 2010; GASPER et al., 2013; LINGNER et al., 2015).

Segundo dados do Inventário Florístico do Estado de Santa Catarina (2013) e do SOS Mata Atlântica (2017), o estado de Santa Catarina está completamente inserido no Bioma Mata Atlântica, e hoje restam 29% de cobertura florestal, sendo que desta cobertura, menos de 5% se assemelha ao original. O relatório da Fundação SOS Mata Atlântica indica que no período de 2015-2016 houve 41% a mais de área devastada que em 2014, provavelmente devido ao avanço de áreas agrícolas, e a especulação imobiliária na região litorânea.

Estes fatos reafirmam a necessidade de conhecimento da diversidade genética das populações florestais que compõem o bioma, pois, estas informações são essenciais à conservação dos recursos florestais, já que a pressão antrópica sobre os ecossistemas naturais, afeta os processos evolutivos das espécies, e a permanência, sobrevivência e reprodução das populações e espécies nas condições atuais são igualmente ameaçadas, destacando principalmente que a manutenção desses ecossistemas é de suma importância, tanto no âmbito ambiental, como no social e econômico (SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016).

## 2.3 GENÉTICA DE POPULAÇÕES

Genética de populações é um ramo da ciência que trata de princípios genéticos aplicados em estudos de populações inteiras, é o ramo da genética que fornece subsídio tanto para o melhoramento genético quanto à conservação, já que fornece informações de como se dá a evolução, e estuda a hereditariedade a nível populacional, (NEALE, 2007; PIRES et al., 2011; STEFENON, 2016).

Para o estudo e compreensão das características genéticas, bem como a comparação entre as populações, é utilizado como base o princípio do equilíbrio de Hardy – Weinberg, expressando o equilíbrio de uma população de tamanho relativamente grande, de indivíduos diploides, de reprodução sexuada, com cruzamentos aleatórios, em que, todos os genótipos têm igual viabilidade e fertilidade, na ausência dos fatores evolutivos, sendo estes, mutação, migração, seleção e deriva genética. Estes fatores evolutivos alteram a composição genética, modificando as frequências alélicas e genotípicas, utilizadas para determinar as propriedades genéticas das populações, em que, as frequências alélicas são as proporções dos diferentes alelos de um gene na população, e as frequências genotípicas são as proporções dos diferentes genótipos para o gene considerado.

A compreensão e as comparações das populações são realizadas utilizando uma relação matemática, entre as frequências alélicas e genotípicas, sendo:  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , em que  $p$  e  $q$ , são as frequências alélicas de “A” e “a”, nos gametas de qualquer geração, e  $p^2$ ,  $2pq$  e  $q^2$ , as frequências genotípicas de “AA”, “Aa” e “aa”, respectivamente, nos zigotos de qualquer geração (WHITE; ADAMS; NEALE, 2007; HARTL; CLARK, 2010; PIRES et al., 2011; RAMALHO et al., 2012; SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016).

Para caracterização genética das populações, são utilizados parâmetros, como, número de alelos por loco, número de alelos efetivos, raros, heterozigosidade observada e esperada, índice de fixação, entre outros. A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) trata-se da estimativa baseada nas frequências alélicas, do número de indivíduos que poderiam ser heterozigotos em uma população, de forma que, um indicativo da ocorrência dos fatores evolutivos, seria um desvio no valor da  $H_e$  em relação à heterozigosidade observada ( $H_o$ ) na população (WHITE; ADAMS; NEALE, 2007; HARTL; CLARK, 2010; SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016).

E, para a caracterização da distribuição da variabilidade genética das populações a abordagem mais utilizada são as estatísticas  $F$  de Wright, em que, considerando as populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg, medem a distribuição da variabilidade entre populações ( $F_{ST}$ ), os desvios das proporções do equilíbrio dentro das subpopulações ( $F_{IS}$ ), e o total considerando as subpopulações estudadas como uma grande população ( $F_{IT}$ ) (WHITE; ADAMS; NEALE, 2007; HARTL; CLARK, 2010; SERROTE; REINIGER; STEFENON, 2016;).

Atualmente os estudos e pesquisas na área da genética de populações têm crescido, principalmente devido à fragmentação como mencionado anteriormente. Haja vista, que populações com tamanho reduzido, são mais suscetíveis aos efeitos dos fatores evolutivos, podendo ocasionar o isolamento espacial das populações, prejudicando o sucesso reprodutivo e o fluxo gênico das espécies (SEOANE; SEBEN; KAGEYAMA, 2000; SHIMIZU; JAEGER; SOPCHAKI, 2000; KAGEYAMA, 2005). Além disso, o distanciamento entre as populações causa uma indesejável diferenciação entre elas, pois, há a diminuição de agentes polinizadores e dispersores, ocasionando o aumento de cruzamentos entre aparentados, ou seja, endogamia, que pode reduzir a variabilidade genética ao longo do tempo, afetando a sobrevivência e vigor da espécie, já que se tem o aumento da homozigose, e de possíveis efeitos deletérios nas progênes. Este evento chamado de depressão por endogamia, afeta

principalmente espécies de fecundação cruzada, e pode ocasionar a perda de alelos que podem ser de interesse para a evolução da espécie (KAGEYAMA; GANDARA; SOUZA, 1998; BITTENCOURT; SEBBEN, 2007; MILAN; MORO, 2012; AGUIAR et al., 2013; GARCIA et al., 2013).

O modo de reprodução das espécies tem implicações diretas quanto a genética das populações. É conhecido que espécies de fecundação cruzada possuem maior potencial de movimentação de genes, portanto, são características por apresentarem taxas elevadas de diversidade genética dentro da população, e baixas taxas de diversidade entre as populações, devido ao fluxo gênico presente entre elas, contudo, também depende da localização geográfica, bem como o padrão de distribuição da espécie, tipo de habitat, tamanho dos fragmentos, etc. Adicionalmente o sistema reprodutivo pode ter efeito sobre a dinâmica e estruturação genética populacional, na heterogeneidade, entre outras (SHIMIZU; JAEGER; SOPCHAKI, 2000; MORAES; KAGEYAMA; SEBBEN, 2005; MONTAGNA et al., 2012).

Estudos quanto à genética de populações, têm ganho eficiência com a utilização de tecnologias, como os marcadores moleculares, para melhorar o entendimento do comportamento das espécies e a sua diversidade (RAMALHO et al., 2012; CAIXETA; FERRÃO; MACIEL-ZAMBOLIM, 2013; TOPPA; JADOSKI, 2013; STEFENON, 2016). Observa-se a crescente utilização dos marcadores de DNA (ácido desoxirribonucleico), pois, estes são pouco influenciados pelo ambiente (BERED; BARBOSA NETO; CARVALHO, 1997), o que constitui grande vantagem em análises genéticas, pois elimina a necessidade de homogeneização das condições em que os indivíduos a serem estudados estão se desenvolvendo, e apresentam mais polimorfismo, discriminando melhor a variabilidade entre as espécies.

Para exemplificar, podemos citar alguns estudos como: em populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. o qual os autores quantificaram a variabilidade intra e interpopulacionais (SEOANE; SEBBEN; KAGEYAMA, 2000); caracterização da estrutura genética de populações de *Araucaria angustifolia* (AULER et al., 2002); investigação do nível de isolamento e os padrões de reprodução de um pequeno pomar de sementes de *Ilex paraguariensis* (WENDT et al., 2009). Esses com marcadores isoenzimáticos.

Neste contexto, alguns autores realizaram estudos sobre a variabilidade e a estruturação genética da espécie *Araucaria angustifolia* (SHIMIZU; JAEGER; SOPCHAKI, 2000, AULER et al., 2002, REIS et al., 2004, MANTOVANI et al., 2006,

STEFENON et al., 2007; BITTENCOURT; SEBBENN, 2007), com o objetivo de entender melhor como está distribuída a variabilidade genética dentro da espécie. As estimativas de diversidade, estrutura genética e sistema reprodutivo, além das estimativas do tamanho efetivo populacional, podem indicar um número de árvores necessárias para coleta de sementes, garantindo uma alta variabilidade genética e fornecendo subsídios para a manutenção genética das espécies em plantios e na recuperação de áreas degradadas (SEBBENN, 2002, 2006; REIS; WIESBAUER, 2006).

Também como exemplo, com a utilização de marcadores de DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD): em populações de *Eugenia uniflora* L. para identificar a variabilidade genética (AGUIAR et al., 2013); em populações naturais de *Mandevilla velutina* K. Schum. para promover informações quanto a conservação *ex situ* da espécie (BERTONI et al., 2010); a quantificação da distribuição da variação genética entre e dentro de progênies e procedências de *Ilex paraguariensis* (WENDT et al., 2007); .

Estudos envolvendo marcadores microssatélites (SSR): com *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze (STEFENON; GAILING; FINKELDEY; HATTEMER, 2007; COSTA et al., 2015); com *Manilkara multifida* T.D. Penn. para elaboração de inferências sobre a conservação genética da espécie endêmica da Mata Atlântica (MORAES et al., 2013).

## 2.4 ISOLAMENTO DE DNA E PCR

O passo chave na análise genética de populações de plantas, através de fragmentos de DNA, é o isolamento e a purificação de quantidades suficientes de DNA de boa qualidade (KIDWELL; OSBORN, 1992) ou seja, o DNA obtido deve estar íntegro, livre de impurezas (MILACH, 1998) e ser passível de amplificação. Vários autores descrevem problemas no isolamento e purificação de DNA vegetal (KIDWELL; OSBORN, 1992; MERCADO et al., 1999; ROMANO; BRASILEIRO, 1999), os quais são resultantes, principalmente, do co-isolamento de polissacarídeos, proteínas, substâncias fenólicas e compostos secundários. Contaminantes, como os compostos polifenólicos e terpenóides, liberados durante a lise celular, principalmente de tecidos de folhas maduras, aderem irreversivelmente ao DNA, inibindo a digestão com endonucleases de restrição e/ou a amplificação através de PCR - “*Polymerase Chain*

*Reaction*" (COUCH; FRITZ, 1990). O rompimento da célula também libera polissacarídeos, os quais são de difícil separação do DNA e inibem muitas diferentes DNA polimerases e enzimas de restrição (LODHI et al., 1994).

Tecidos maduros de muitas espécies de plantas contêm compostos fenólicos envolvidos na defesa contra herbivoria, os quais podem interferir nos procedimentos de extração de DNA. Estes compostos, frequentemente, estão ausentes ou encontram-se em baixas concentrações, em folhas jovens e em sementes ou pólen (MITTON et al., 1979). Entretanto, quando se trabalha com espécies arbóreas em populações naturais, nem sempre se tem acesso a tais tecidos, restritos a determinado estágio reprodutivo da árvore ou maturidade da folha.

O método de extração de DNA mais utilizado para diferentes espécies vegetais é baseado no uso do detergente CTAB - *Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide* (DOYLE et al., 1987; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; VASCONCELOS, 1995; ROMANO; BRASILEIRO, 1999; Mercado et al., 1999). Esse detergente solubiliza as membranas celulares e, dependendo da concentração de NaCl no tampão, forma um complexo com o DNA, podendo, portanto, ser utilizado para precipitá-lo seletivamente nos casos de difícil separação, como folhas maduras (KIDWELL; OSBORN, 1992). As técnicas de otimização de extração de DNA para utilização na reação em cadeia pela polimerase (PCR) permitem a investigação diagnóstica em diferentes amostras biológicas, mesmo quando o DNA está presente em pequenas quantidades. O protocolo com detergente CTAB é utilizado para diversas espécies vegetais, com modificações específicas para cada uma. A extração de DNA de alta qualidade é um dos requisitos para a avaliação molecular de espécies de grande importância como é o caso do pinheiro brasileiro (STEFENON et al., 2003).

## 2.5 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e que serão herdadas geneticamente. Os diferentes tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis, diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA. A análise de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é baseada na amplificação termocíclica de DNA, usando uma gama de oligonucleotídeos como iniciadores (WILLIAMS et al., 1990). A análise de RAPD é rápida, fácil, não utiliza radioisótopos e requer uma quantidade mínima de

DNA, da ordem de nanogramas (ng). Na busca da caracterização genética, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos usando-se enzimas (WINGE et al., 1995) e proteínas de reserva (GREGIANINI, 1999), algumas vezes, não tão estáveis.

Nos últimos anos, houve aumento significativo de metodologias da genética molecular e suas aplicações para resolver problemas e aumentar a eficiência dos programas de conservação e uso dos recursos genéticos. As metodologias para detectar e analisar a variabilidade genética em nível molecular oferecem informações adicionais a outros estudos relativos à conservação e ao uso de bancos de germoplasma. Com o advento das tecnologias modernas de Genética e da Biologia Molecular, surgiram, por exemplo, diversos tipos de marcadores moleculares que detectam o polimorfismo genético diretamente no DNA. O princípio da utilização desses marcadores é baseado no dogma central da Biologia Molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, na maioria das vezes, diferenças fenotípicas. Entre as vantagens dos marcadores moleculares, pode-se citar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente, a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta ou a partir de cultura de células ou tecidos. Há, ainda, a possibilidade de gerar maior quantidade de informação genética por loco no caso de marcadores codominantes.

Com os avanços da genética e da biologia molecular, principalmente, o advento da tecnologia do DNA recombinante, PCR e do sequenciamento automático do DNA foram desenvolvidas poderosas técnicas para o desenvolvimento de marcadores genéticos úteis na identificação, caracterização e avaliação dos recursos genéticos vegetais. Há elevado número de artigos científicos que fazem referência a tais marcadores no estudo de várias espécies e com as mais diversificadas aplicações, evidenciando o impacto dessa tecnologia nos programas de conservação e uso dos recursos genéticos (AYAD et al., 1997).

Entre os marcadores moleculares mais utilizados nos últimos anos podemos citar:

Isoenzimas – Grupo de múltiplas formas moleculares de uma enzima, resultante de variações alélicas dos genes codificadores. A obtenção de marcadores isoenzimáticos envolve a preparação da amostra do tecido, a separação por eletroforese dos polimorfismos em géis de poliacrilamida ou de amido e a visualização dos polimorfismos por meio de corantes enzimáticos específicos. As principais

vantagens dessa técnica são o baixo custo, a facilidade e a rapidez da metodologia, bem como a obtenção de marcadores genéticos codominantes, ou seja, marcadores que permitem a diferenciação dos *loci* em homozigose dos *loci* em heterozigose. As principais desvantagens são o baixo número dos sistemas enzimáticos polimórficos e a influência das condições ambientais e dos tecidos vegetais nas atividades enzimáticas (KEPHART, 1990; MAY, 1992; ALFENAS, 1998).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – RAPDs são fragmentos de DNA amplificados pela PCR utilizando primers curtos (geralmente dez nucleotídeos) de sequência aleatória (Williams et al., 1990). Outra terminologia usada para esses marcadores é a APPCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction) (WELSH; MCCLELLAND, 1990). A obtenção desses marcadores envolve a extração e a amplificação do DNA, eletroforese normalmente em gel de agarose corado com brometo de etídio e foto documentação sob luz ultravioleta. As principais vantagens da técnica são a facilidade e a rapidez para obtenção dos marcadores, a necessidade de quantidades mínimas de DNA e a universalização das análises.

Pode-se trabalhar com qualquer espécie, uma vez que não há a necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção dos primers utilizados. As principais desvantagens referem-se à dominância dos marcadores, não diferenciando os *loci* em heterozigose dos *loci* em homozigose e à baixa reprodutibilidade das marcas por causa da sensibilidade da técnica às condições experimentais, principalmente, quando elas não estão bem padronizadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; FALEIRO et al., 2004e). Para diminuir os problemas de reprodutibilidade do marcador RAPD, primers específicos (15 a 30 pb) podem ser desenhados a partir do sequenciamento de determinado marcador RAPD ligado a uma característica de interesse do geneticista, de modo a produzir marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (PARAN; MICHELMORE, 1993; CORRÊA et al., 2000).

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – RFLPs são fragmentos de DNA obtidos de enzimas de restrição, separados por eletroforese, e visualizados por meio de hibridizações com sondas de sequências homólogas marcadas com radioatividade ou fluorescência. Marcadores RFLP podem ser obtidos de diferentes genes ou regiões genômicas, inclusive, de DNA ribossomal (rDNA) de mitocôndria (mtDNA), cloroplasto (cpDNA) (AVISE, 1993). As etapas para a aquisição de RFLPs envolvem a extração do DNA, digestão com endonucleases de restrição, eletroforese,

transferência dos fragmentos para uma membrana de nylon, hibridização dos fragmentos com sondas marcadas e visualização dos polimorfismos, normalmente, por auto radiografia. As principais vantagens da técnica são a codominância dos marcadores e a alta reprodutibilidade deles. As desvantagens são a exigência de grande quantidade e qualidade do DNA a ser analisado, necessidade de sondas específicas para a hibridização e o fato de a técnica ser mais trabalhosa, demorada e cara quando comparada a outras técnicas (TANKSLEY, 1983; NEALE; WILLIAMS, 1991; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

**Microsatélites** – Microsatélites são unidades muito curtas (2 a 5 pb) repetidas em tandem, ou seja, uma após a outra. Os marcadores microsatélites são conhecidos, também, como SSR (Simple Sequence Repeats). A obtenção dos marcadores envolve a amplificação dos microsatélites via PCR, utilizando-se primers específicos (geralmente de 20 a 25 pb) para as regiões do DNA que flanqueiam os microsatélites. Nesse sentido, para se conseguir marcadores microsatélites, é necessário, primeiramente o desenvolvimento dos primers específicos para a espécie em estudo. Esse desenvolvimento requer a construção de bibliotecas genômicas, seleção e sequenciamento dos clones positivos e desenho dos primers. Tais primers, em alguns casos, podem ser utilizados para obtenção de marcadores microsatélites em espécies geneticamente relacionadas (FALEIRO et al., 2003d). Uma vez desenvolvidos os primers específicos, as etapas de obtenção são parecidas com as utilizadas para marcadores RAPD: extração e amplificação via PCR do DNA, eletroforese em géis de poliacrilamida ou agarose e visualização do polimorfismo por autorradiografia, coloração com prata ou fluorescência (géis de poliacrilamida), por coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta (géis de agarose) ou eletroforese capilar.

As principais vantagens dos marcadores microsatélites são a codominância dos marcadores, o alto nível de polimorfismo que pode ser detectado, a alta reprodutibilidade das marcas e a possibilidade de detecção de vários microsatélites (multiplex) na mesma reação, facilitando a operacionalização das análises, principalmente, quando é necessária a análise de grande número de acessos. As principais desvantagens são o alto custo requerido no desenvolvimento de primers específicos, quando eles não estão disponíveis para a espécie a ser estudada e o fato de bandas inespecíficas ou géis de baixa resolução que possam dificultar a acurada

avaliação dos polimorfismos (LITT; LUTY, 1989; MORGANTE; OLIVIERI, 1993; QUELLER et al., 1993; FALEIRO et al., 2004e).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) – Os AFLPs são fragmentos de DNA (80 a 500 pb) obtidos com a digestão do DNA com enzimas de restrição, seguidos da ligação de oligonucleotídeos adaptadores e amplificação seletiva dos fragmentos via PCR. Esse tipo de marcador combina os princípios dos marcadores RAPD e RFLP. As etapas de obtenção envolvem a extração do DNA, digestão com endonucleases de restrição, ligação de adaptadores, amplificação seletiva via PCR, eletroforese em géis de alta resolução e visualização dos fragmentos por autorradiografia, coloração com prata ou fluorescência (VOS et al., 1995). As principais vantagens dos AFLPs são a geração de grande número de polimorfismos por reação e o fato de não haver necessidade de conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção dos primers utilizados (FALEIRO et al., 2001). As desvantagens são a dominância dos marcadores, o alto custo e as várias etapas e reagentes necessários à obtenção dos marcadores (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Minissatélites – Minissatélites são unidades de 10 a 100 pb repetidas em tandem, flanqueadas por sítios conservados de endonucleases de restrição. Também são conhecidos por VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats). As etapas de obtenção envolvem a extração e digestão do DNA com endonucleases de restrição, transferência dos fragmentos para uma membrana de nylon, hibridização dos fragmentos com sondas de minissatélites marcadas e visualização dos polimorfismos, normalmente, por autorradiografia (JEFFREYS et al. 1985; DALLAS, 1988). As principais vantagens desse tipo de marcador são a alta reprodutibilidade das marcas e a geração de muitas bandas informativas por reação (no caso de sondas para vários *loci*). As desvantagens são relacionadas à dominância dos marcadores (no caso de sondas para vários *loci*) e ao fato de a técnica ser mais trabalhosa, demorada e cara, à semelhança dos marcadores RFLP (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os métodos analíticos e a interpretação dos dados moleculares em relação à genética de populações, à filogenia, à evolução e suas diferentes aplicações exigem procedimentos de análise multivariada e dependem do tipo do marcador molecular que está sendo utilizado e do objetivo do trabalho (AVISE, 1993; HARTL; CLARK, 1989). Em relação ao tipo de marcador, é importante diferenciar aqueles que fornecem dados de um único loco (Por exemplo: PCR/DNA sequenciamento) daqueles que

fornece dados multi/*loci* obtidos de múltiplas regiões gênicas (por exemplo: RAPD, AFLP, Minissatélites). Essa diferenciação é importante, pois a quantidade da informação acessada influencia as interpretações dos dados. Na definição dos marcadores genético-moleculares mais apropriados, deve-se levar em conta o objetivo do estudo (AVISE, 1993). De modo geral, marcadores moleculares multi/*loci* utilizados em DNA fingerprinting (por exemplo: RAPD, AFLP, Microsatélites, Minissatélites) são mais apropriados para estudos de identidade genética, testes de paternidade e estudos de variabilidade dentro da mesma espécie. Marcadores baseados em comprimentos de fragmentos de restrição como os RFLPs obtidos de mtDNA, cpDNA, rDNA são mais apropriados para estudos de diversidade genética de espécies fortemente relacionadas. Marcadores baseados em análises de sequências (por exemplo: PCR sequenciamento) são apropriados para análises de espécies com alto nível de divergência evolucionária, embora possam ser utilizados para análises de espécies ou acessos com qualquer nível de divergência evolucionária (FALEIRO, 2007).

Os marcadores genético-moleculares permitem gerar grande quantidade de informações sobre a identidade genética, a diversidade, a frequência gênica e os relacionamentos filogenéticos dos recursos genéticos de determinado germoplasma. Tais informações são muito úteis nas diferentes estratégias de conservação dos recursos genéticos como a *ex situ*, *in situ* e *on farm*. Em cada estratégia, os marcadores moleculares podem auxiliar nas diferentes etapas, como a coleta, manutenção, caracterização, manejo, ampliação e uso dos recursos genéticos. As informações moleculares podem complementar as informações ecológicas, morfológicas e agronômicas dos recursos genéticos, contribuindo para aumentar a eficiência dos processos de coleta, direcionar o enriquecimento da base genética, formar e validar coleções nucleares e de trabalho, analisar a diversidade e a pureza genética, identificar acessos duplicados e redundantes, auxiliar trabalhos de classificação botânica e filogenia, subsidiar a seleção de genitores, o planejamento dos cruzamentos e a seleção de genótipos com características desejadas em programas de melhoramento genético.

Marcadores moleculares associados a sistemas de informação geográfica têm permitido estudos da diversidade genética de acessos por regiões, identificação de regiões de maior ou menor diversidade (OLSEN; SCHAAL, 1999; CARVALHO et al., 2000; COSTA, 2004) e a recuperação de informações importantes sobre as condições

ambientais e biológicas dos locais de coleta de cada acesso (GREENE et al., 1999; GUARINO et al., 2002). Essas informações são complementares aos dados fenotípicos e geográficos e têm orientado a escolha de locais para conservação *in situ*, atividades de coleta para conservação *ex situ* e a busca de combinações gênicas de interesse para programas de melhoramento genético (RICK et al., 1974; ZIMMERER; DOUCHES, 1991; HUANG et al., 1998; COSTA, 2004; FALEIRO et al., 2004e).

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis têm capacidade de analisar de forma ampla genomas de interesse, sem influência do ambiente e, dessa forma, gerar informações precisas sobre a diversidade genética e a frequência gênica populacional (HARTL; CLARK, 1989; OUBORG et al., 1999). Tais informações são bastante úteis em todas as fases dos programas de conservação de recursos genéticos, passando pela coleta (DEL RIO et al., 1997), conservação (WU et al., 1998), manutenção (REEDY et al., 1995; SPAGNOLETTI-ZEULI et al., 1995;) e manejo (DEL RIO et al., 1997) das coleções, além de facilitar o uso do germoplasma em programas de melhoramento genético (ABDELNOOR et al., 1995; KARP et al., 1997; FALEIRO et al., 2004c).

As informações de diversidade genética e a frequência gênica obtidas com o uso dos marcadores moleculares geram grande quantidade de características adicionais que podem ser combinadas a dados de pedigree do local de coleta e com características morfológicas, fisiológicas e agronômicas, fornecendo uma análise mais completa da coleção e de cada acesso (LIVINI et al., 1992; ABDELNOOR et al., 1995; VASCONCELOS et al., 1996; CARVALHO et al., 2000, 2000b; HUANG et al., 2002; FALEIRO et al., 2004b, 2004c).

As diferentes metodologias da genética molecular, principalmente os marcadores moleculares do DNA, apresentam várias aplicações para resolver problemas e aumentar a eficiência dos programas de conservação e uso dos recursos genéticos vegetais. As aplicações podem gerar informações úteis para as diferentes estratégias de conservação dos recursos genéticos (*ex situ*, *in situ* e *on farm*) e para as diferentes etapas de cada estratégia (coleta, manutenção, caracterização, manejo, ampliação e uso dos recursos). Logicamente, tais marcadores não podem substituir os outros tipos de marcadores genéticos como os baseados nos caracteres morfoagronômicos. Além disso, práticas de avaliação fenotípica contabilizando os efeitos ambientais e das interações genótipo x ambiente continuarão sendo de grande

importância e essenciais para subsidiar a utilização prática dos recursos genéticos nos sistemas de produção e nos programas de melhoramento.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

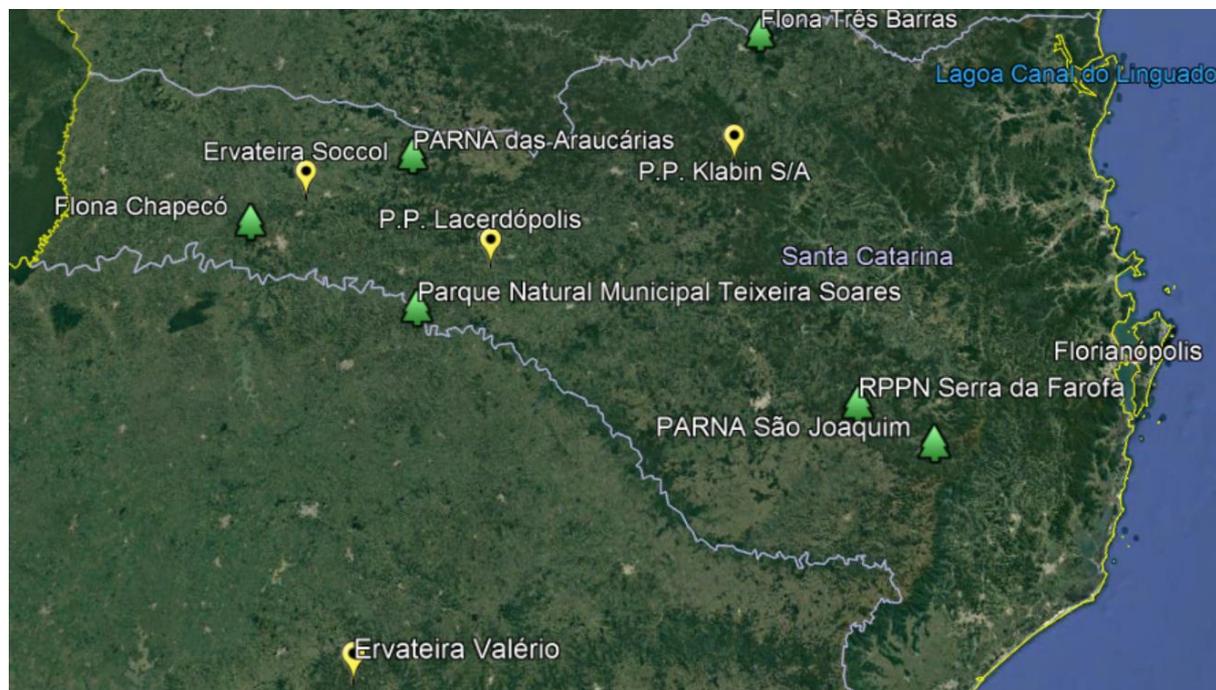
A coleta do material botânico foi realizada em dez remanescentes florestais nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul conforme Tabela 2. Sendo duas áreas de coleta situadas no estado do Rio Grande do Sul e oito no estado de Santa Catarina como podem ser observadas na Figura 2, em todas as áreas previamente foram autorizadas pelo órgão competente (SISBIO) e registradas sob o número de protocolo 60377-1 e 62208-1. Em cada população foram coletados ramos com folhas jovens de pelo menos 50 indivíduos adultos (reprodutivos) de *I. paraguariensis*, os quais foram mapeados com coordenadas geográficas. Os indivíduos cujas folhas foram coletadas estavam distantes 50 m entre si, para reduzir a chance de amostragem de indivíduos aparentados.

Tabela 2 – Localização e descrição dos remanescentes florestais onde foram realizadas as coletas de material botânico

Estado	Cidade	Propriedade	Descrição
SC	Chapecó	Federal	Floresta Nacional de Chapecó
	Xaxim	Particular	Propriedade de responsabilidade da Ervateira Soccol
	Passos Maia	Federal	Parque Nacional das Araucárias
RS	Marcelino Ramos	Municipal	Parque Natural Municipal Teixeira Soares
	Ilópolis	Particular	Propriedade de responsabilidade da Ervateira Valério
SC	Três Barras	Federal	Floresta Nacional de Três Barras
	Urubici	Federal	Parque Nacional de São Joaquin responsável Ervateira Urubici
	Urupema	Particular	RPPN Complexo Serra da Farofa propriedade de Klabin S/A
	Lacerdópolis	Particular	Propriedades particulares no interior do município
	Major Viana	Particular	Fazenda Palmital do Areão propriedade de Klabin S/A

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Figura 2 – Disposição geográfica dos remanescentes florestais onde foram realizadas as coletas de material botânico. Em verde: Unidades de Conservação; Em amarelo: Propriedades Particulares



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

### 3.1.1 Aspecto geral das áreas de coleta

As Unidades de Conservação são bens de interesse público e ambiental, motivo pelo qual ao serem criadas deve-se levar em consideração uma série de requisitos, visando sempre o cumprimento do objetivo principal de cada unidade de acordo com sua categoria, seja de proteção integral ou de uso sustentável. As unidades de conservação surgiram da necessidade de preservar o Meio Ambiente Natural, visa assegurar um meio ambiente ecologicamente equilibrado, conforme garantia constitucional prevista no art. 225 da Constituição Federal, que dispõe: "Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações". Alguns exemplos de unidades de conservação são as Florestas Nacionais, Parques Naturais e áreas de Reservas Naturais tanto de domínio público quanto privado.

O decreto nº 1.298, de 27 de outubro de 1994, que instituiu o regulamento das Florestas Nacionais, em seu 1º artigo descreve as FLONAs como áreas de domínio

público, provida de cobertura vegetal nativa ou plantada, que são estabelecidas com os seguintes objetivos: I - promover o manejo dos recursos naturais, com ênfase na produção de madeira e outros produtos vegetais; II - garantir a proteção dos recursos hídricos, das belezas cênicas, e dos sítios históricos e arqueológicos; III - fomentar o desenvolvimento da pesquisa científica básica e aplicada, da educação ambiental e das atividades de recreação, lazer e turismo.

As FLONAS da região sul do Brasil foram, quase todas, criadas a partir do Instituto Nacional do Pinho, nas décadas de 40 e 50. O objetivo inicial era o de criar reservas de produção de araucária, em função do crescente desmatamento já identificado na época.

A FLONA de Chapecó foi criada pela Portaria nº 560 de 25 de outubro de 1968, está localizada no oeste de Santa Catarina, nos municípios de Guatambu e Chapecó. A área da UC, de acordo com a restituição aerofotogramétrica realizada no ano de 2006, engloba 1.590,60 hectares, dividida em 3 glebas, dentre estas glebas na área central da unidade de conservação há uma porção de mata nativa onde foram realizadas as coletas, como podem ser visualizadas na Figura 3. A região da FLONA Chapecó abrange ainda o município de Cordilheira Alta, uma vez que parte da bacia do rio Sanga Capinzal que drena para a FLONA Chapecó foi incluído em sua ZA. A Unidade foi destinada ao plantio de *Araucaria angustifolia* com o objetivo de estudar seu crescimento e comportamento, sob diferentes condições silviculturais, mas, também há implantação de espécies exóticas como o *Pinus elliottii* e o *Pinus taeda*.

A FLONA Chapecó, abrange um dos cenários vegetacionais mais heterogêneos e complexos da região sul do Brasil, no qual se destaca o pinheiro-brasileiro *Araucaria angustifolia* na constituição de formações florestais com diferentes composições florísticas e estruturas (associações da Floresta Ombrófila Mista), ora interpenetradas e em contiguidade ora estabelecidas em mosaico com formações campestres (Estepe Gramíneo-Lenhosa), considerando ainda as formações florestais sem a sua presença (Floresta Estacional Decidual), resultando na existência de habitats que guardam significativas riqueza e diversidade vegetais (IBAMA, 1998).

Figura 3 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil na Floresta Nacional de Chapeco, distribuídos em 870 ha



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

A FLONA de Três Barras foi criada pela Portaria Nº 560 do extinto Instituto Nacional do Pinho em 25/11/1968, com uma área total de 4.458,50 ha. Possui uma área de mata nativa representada principalmente por *Araucaria angustifolia*. Segundo IBAMA (2002), a FLONA de Três Barras já apresentou a maior arrecadação dentre as FLONAS do Brasil, oriunda da comercialização de produtos e subprodutos florestais. Está localizada no município de Três Barras, na região do planalto norte catarinense, distante 5 Km da cidade de Canoinhas.

A vegetação da FLONA de Três Barras é composta por Floresta Ombrófila Mista, pertencente ao bioma Mata Atlântica. Esta tipologia destaca-se pela presença marcante da araucária dominando o dossel e caraguatá (*Bromelia anthiacanta* Bertol.) e xaxim (*Dicksonia sellowiana* Hook) no sub-bosque (Klein, 1978). A cobertura florestal é composta por reflorestamento de araucária, reflorestamento Pinus, e, 634,69 ha de floresta nativa com araucária (IBAMA,2002) dentre esta área está localizada as árvores onde foram coletados os 50 indivíduos de *I. paraguariensis* que pode ser observado na Figura 4. Os reflorestamentos de araucária foram implantados

na década de 50, estes plantios foram realizados com sementes de diferentes locais de Santa Catarina.

Figura 4 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil na Floresta Nacional de Três Barras, distribuídos em 132 ha de floresta nativa



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Assim, o objetivo atual das FLONAS representa o desafio de estimular a conservação dos ecossistemas através da geração de critérios para o manejo sustentável dos recursos florestais nativos, compatibilizando a educação ambiental, pesquisa e geração de renda junto as comunidades de entorno.

O Parque Nacional das Araucárias (PNA) foi criado pelo decreto federal s/nº de 19 de outubro de 2005, abrangendo uma área de 12.841 ha. O PNA está localizado na região oeste do estado de Santa Catarina e abrange áreas dos municípios de Ponte Serrada e Passos Maia, está localizado no Bioma Mata Atlântica, especificamente na fitofisionomia denominada como Floresta Ombrófila Mista Figura 5.

Figura 5 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil na Parque Nacional das Araucárias, distribuídos em 680 ha de floresta nativa



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

O Parque Nacional de São Joaquim (PNSJ) foi criado pelo Decreto Nº 50.922, de 06/07/1961, com uma área aproximada de 49.300 ha. Seus limites foram alterados pela Lei Nº 13.273, de 15/04/2016, e sua área passou a totalizar cerca de 49.800 ha, abrangendo os municípios de Bom Jardim da Serra, Grão Pará, Lauro Müller, Orleans e onde está localizada a área de coleta na cidade de Urubici (Figura 6), está inserido no Bioma Mata Atlântica, e devido sua grande abrangência, encontram-se quatro tipos de formações vegetais: floresta ombrófila mista, floresta ombrófila densa, matilhas nebulares e campos de altitude. Os campos de altitude no PNSJ caracterizam-se por rocha nua e brejos de altitude (turfeiras). Ocorrem, ainda, ecossistemas ecotonais ou de transição (áreas de tensão) entre floresta e campo, bem como entre floresta e pasto.

Figura 6 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil Parque Nacional de São Joaquim, distribuídos em 191 ha de campo e floresta nativa



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

O Parque Natural Municipal Mata do Rio Uruguai Teixeira Soares criado através da lei municipal Nº 028/2008, de 05/06/2008, com área de 423,361 ha aproximadamente, está situado no município de Marcelino Ramos, no Estado do Rio Grande do Sul, a área do Parque está situada no Bioma Mata Atlântica, na tipologia florestal de floresta ombrófila mista Figura 7.

Figura 7 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil Parque Natural Municipal Marcelino Ramos, distribuídos em 285 ha floresta nativa



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

A Reserva Particular do Patrimônio Natural Complexo da Serra da Farofa, criada através da Portaria 026/2014 em 27/03/2014. A área total implantada em é de 4.987,16 ha que abrange os municípios de Bocaina do Sul, Paineira, Rio Rufino, Urubici e Urupema, onde está localizada a área de coleta do material botânico Figura 8. Está situada em bioma Mata Atlântica, composta por Floresta de Araucárias, Campos de Altitude, é de propriedade da Klabin S/A.

Figura 8 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil RPPN Complexo Serra da Farofa, distribuídos em 191 ha de floresta nativa



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Segundo o Código Florestal Nacional (lei 12.651 de 25 maio de 2012) áreas rurais particulares devem possuir uma porcentagem mínima de reserva legal que pode ser utilizada para a extração de produtos florestais não madeireiros (PFNM), desde que sejam respeitados principalmente sua integridade e conservação.

As coletas realizadas nas propriedades particulares foram em áreas de florestas conservadas que compõe reservas legais e áreas de preservação permanente (APP), nas áreas pertencentes a Ervateira Soccol Figura 8, em relato pelo proprietário da ervateira, mencionou o fato daquela área ter sido adquirida há mais de 20 anos, e antes deste período a ervateira já realizava o manejo da copa das árvores de *Ilex*, mas sempre respeitando para deixar 1/3 da copa, somente retornando após 2 anos no mesmo indivíduo.

Figura 9 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil RPPN Ervateira Soccol, distribuídos em 153 ha de floresta nativa no município de Xanxerê – SC



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Na propriedade no município de Ilópolis, onde a Ervateira Valério faz o manejo, a propriedade pertence a família há mais de 50 anos onde em conversa com o produtor mencionou que o erval nativo pertencia a seus avós e que sempre foi dado seguimento as atividades ervateiras, atualmente o produtor implantou um erval em área que antes era utilizada para culturas anuais, utilizando os frutos de origem do remanescente florestal, que pode ser observado na Figura 10.

Das propriedades particulares a única que atualmente não realiza manejo em sua área é a propriedade particular pertencente a Klabin S/A localizada no município de Santa Cecília - SC Figura 11, Já a propriedade particular no município de Lacerdópolis Figura 12, foi a propriedade que apresentou os menores fragmentos com ocorrência de *Ilex paraguariensis*, atualmente é manejada e também as árvores pertencentes ao interior dos fragmentos são utilizadas como matrizes de sementes para plantios homogêneos de ervais em áreas próximas a estes remanescentes.

Figura 10 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil RPPN Ervateira Valério, distribuídos em 67,6 ha de floresta nativa no município de Ilópolis – RS



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Figura 11 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil Propriedade Particular Klabin S/A, distribuídos em 103 ha de floresta nativa



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019

Figura 12 – Polígono da área de coleta de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil Propriedade Particular Lacerdópolis, distribuídos em 4 fragmentos de floresta nativa, totalizando 53,96 ha



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

### 3.2 ISOLAMENTO E AMPLIFICAÇÃO DO DNA

Para a extração do DNA genômico total foi utilizado o protocolo CTAB, descrito por Doyle; Doyle (1988), modificado por Silva et al. (2018) para a erva-mate. O qual utiliza em um tubo de alta resistência aproximadamente 200 mg de folhas picadas, sendo inseridas cinco *beads* em seu interior, foi acrescentado 1 mL por amostra do tampão de extração Brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB a 2% (NaCl a 1,4 M; EDTA a 20 mM; Tris-HCl (pH 8,0) a 100 mM; PVP-40 a 2%) com 5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol. A seguir, os tubos foram colocados no Precellys®, no sistema programado *work* (8000 rpm, 3x, 20 segundos, pausa 10 segundos), repetindo este processo por 3 vezes para a maceração das folhas.

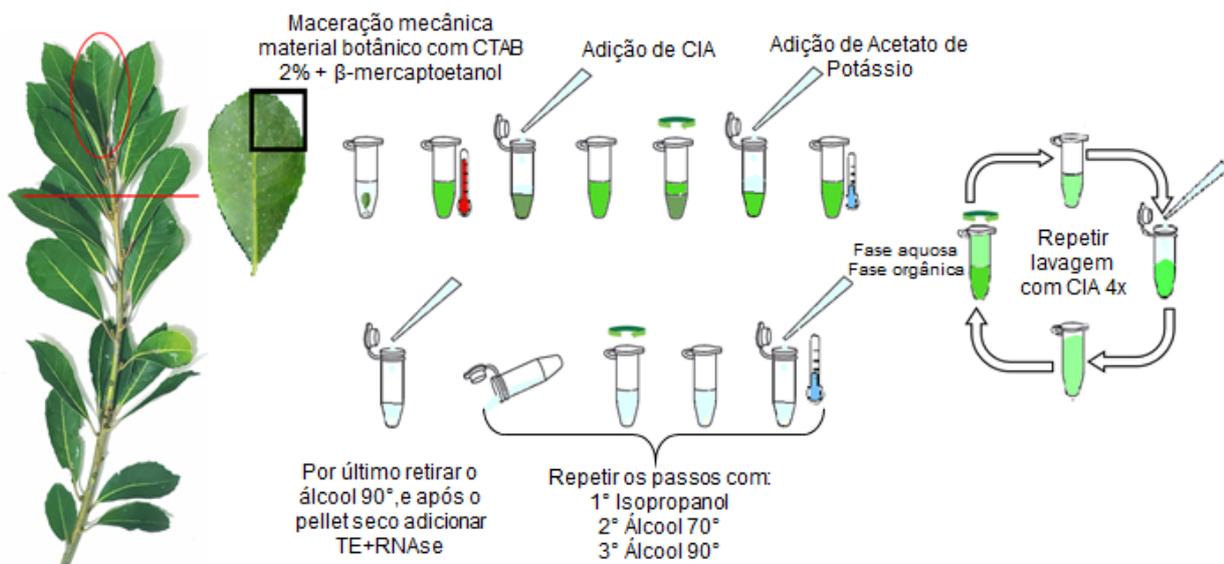
Na continuidade os tubos foram mantidos em banho-maria a 60°C por 40 min, homogeneizando por inversão a cada 10 min. Após este tempo, foram acrescentados 500  $\mu$ L de clorofórmio-álcool isoamílico – CIA (24:1; v/v) em cada tubo, e homogeneizados em mesa agitadora por 5 min a 120 rpm. Em seguida, centrifugou-se a 11500 RPM por 7 min. Depois da centrifugação e da separação das partes

orgânica e aquosa, foram transferidos 700 µL do líquido para um tubo novo de 2 mL, e acrescentados 500 µL de CIA e 200 µL de acetato de potássio (5M) em cada tubo, os quais foram homogeneizados em mesa agitadora por 5 min a 120 rpm, e acondicionadas por 20 minutos a -20°C. Após centrifugou-se a 12500 RPM por 5 min.

Após esta etapa foram transferidos para um tubo novo de 1,5 mL, 600 µL do líquido, e adicionados 600 µL CIA (24:1; v/v), agitado em mesa agitadora por 5 min a 120 rpm, centrifugado a 12500 RPM por 5 minutos. Procede-se com o processo de lavagem novamente transferindo para um tubo novo de 1,5 mL, 600 µL do líquido, e adicionados 600 µL CIA (24:1; v/v), agitado em mesa agitadora por 5 min a 120 rpm, centrifugado a 12500 RPM por 5 minutos

Após esta etapa foram transferidos para um tubo novo de 1,5 mL, 500 µL do líquido, e adicionados 500 µL de álcool isopropílico (a -20°C) e agitado em mesa agitadora por 5 min a 120 rpm, após foi mantido por uma hora a -20°C. A seguir, foram centrifugados a 12500 RPM por 5 min, e depois disso, o álcool foi descartado com cuidado, e acrescentado 500 µL de etanol a 70% a -20°C, agitado por 5 min a 120 rpm, centrifugado a 12500 RPM por 5 min.

Figura 13 – Representação esquemática da idade foliar e etapas do protocolo de extração de DNA de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. adaptado



Fonte: SILVA et al. (2018).

Após, foi realizada a retirada do etanol a 70%, e adicionado 500 µL de etanol a 96% a -20°C, agitado por 5 min a 120 rpm, centrifugado a 12500 RPM por 5 min.

Então retirado o etanol a 96% cuidadosamente e manteve-se os tubos abertos e virados sobre papel absorvente para a secagem do precipitado por aproximadamente 40 minutos. Para finalizar o processo foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de TE+RNase (TE [10nM], RNase[10  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ]), e incubados a 36°C por 30 min. terminado esse tempo, Deixado overnight em geladeira (2°C) e após armazenado a -20°C até o uso (Figura 13).

Para a amplificação via PCR (reação em cadeia da polimerase) foram utilizados os *loci* para *I. paraguariensis*: lpg\_01, lpg\_03, lpg\_06, lpg\_08, lpg\_10, lpg\_19, lpg\_23, lpg\_41, lpg\_46, lpg\_49, desenvolvidos por Pereira et al. (2013). Separados em dois painéis multiplex em função da temperatura de anelamento (Tabela 3). O protocolo de amplificação via PCR utilizado baseado no manual da Taq DNA polimerase adaptado. A mistura de reação foi composta de tampão da Taq DNA polimerase 1 X (Invitrogen), 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) 0,02 mM de cada dNTP (Invitrogen), 0,02  $\mu\text{M}$  de cada iniciador (Invitrogen) e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), amostra de DNA 2  $\mu\text{l}$  na concentração de 2 ng/ $\mu\text{l}$ , ajustando com volume final de 12,5 $\mu\text{l}$ . A fase de desnaturação foi realizada a 94°C por 1 minuto; 30 ciclos de: 94°C para desnaturação, temperatura de anelamento para cada painel multiplex (60 e 61°C) e 72°C por 1 min cada; por fim um ciclo de 10 min a 72°C de extensão final, em termociclador Veriti® Thermo Scientific®.

A genotipagem foi realizada através da leitura de fluorescência de cada amostra amplificada. A detecção da fluorescência foi realizada por meio da técnica de eletroforese capilar em Sequenciador Automático ABI 3130 (Applied Biosystems). O tamanho dos fragmentos (alelos) de cada reação multiplex foi determinado por interpretação dos picos de fluorescência gerados nos eletroferogramas através do software GeneMapper v.3.2 (Applied Biosystems).

Tabela 3 – Sequência dos marcadores microssatélites de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. e condições da temperatura de anelamento na PCR, formando dois painéis multiplex, para análises neste estudo. \*Diferença encontrada na região de amplificação, para o presente estudo a região encontrada para o marcador situa-se entre 130 -160 pb.

Locí	Sequência Primer (5' – 3')	Motivo	Fragmento (pb)	T <sub>a</sub> (°C)
lpg_06	F: GAGAAACGGCAACAGTGGTC	(AG) <sub>12</sub>	240 – 260 *	60
	R: CACACCTCTCTACACACCCTCA			
lpg_10	F: TCTTCTCGATCAAAGGAACCTC	(AG) <sub>8</sub>	320–360	60
	R: GAGGAAATTCAGAGGCATCAAC			
lpg_19	F: TGAACATTGGAATCCTAGACCC	(GA) <sub>7</sub>	190–195	60
	R: CCGTATATCCCTAAATGCCAAA			
lpg_41	F: AACGCGTGGATCTAATCTTCAT	(TC) <sub>21</sub>	130–160	60
	R: CAAGCTGCAGAGTGATTTGTGT			
lpg_49	F: ATTGCCATAGATCGAAAGGAGA	(TC) <sub>8</sub>	120–150	60
	R: TTTTCTCCCCATTTACTTCATCA			
lpg_01	F: CTTTAACTTTTCGCGGCTTAGA	(AC) <sub>12</sub> (CT) <sub>13</sub>	280–340	61
	R: GCAAGTGACAAAATACATACGGTC			
lpg_03	F: TGCCTATGTCTTCTACAATGCTTC	(ACC) <sub>10</sub>	350–380	61
	R: CATGGGTTTGGTCTCACTAACA			
lpg_08	F: GAATTGCCTTATATGGGTGGAA	(AG) <sub>6</sub>	260–290	61
	R: GTACACATAAATGGGGTTGCCT			
lpg_23	F: ATTAAGAAGCACGGACATGGAT	(AT) <sub>9</sub>	250–280	61
	R: TCATGGATGTTAATGTTGAATGTG			
lpg_46	F: TGATCGTCGTTAACAGCATAAA	(TC) <sub>7</sub>	160–210	61
	R: GAGTGTCAACTAAGCTTTACCTAAGAA			

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019. Adaptado de Pereira et al. (2013).

### 3.3 ANÁLISE DOS DADOS

A diversidade genética foi calculada utilizando os índices de riqueza alélica (R), número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H<sub>o</sub>) e heterozigosidade esperada em equilíbrio de Hardy-Weinberg (H<sub>e</sub>). Para a estimação dos níveis de endogamia será utilizada a expressão de Nei (1978), sendo  $F = H_o/H_e$ , em que, F é o coeficiente de endogamia. Para diferenciar os níveis de diversidade genética (R, H<sub>e</sub> e H<sub>o</sub>) entre as populações, será utilizada o teste unilateral descrito por Goudet (2002), com significância testada por permutações, com 1000 repetições. As análises foram realizadas no software FSTAT versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). Foi realizada a verificação das variações genéticas existentes entre as populações (F<sub>ST</sub>), com o índice de fixação total (F<sub>IT</sub>).

Com as estimativas dos coeficientes de similaridade de Nei foi realizada uma análise de componentes principais (ACP), com o auxílio do software Past, que avaliou a relação genética entre os indivíduos, a partir dos dados dos marcadores.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DIVERSIDADE GENÉTICA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO

Os parâmetros de diversidade genética estimados para os dados de dez *loci* microsatélites estão resumidos na Tabela 4. Foi observado uma média de 9,517 alelos por *loci* totalizando 139 alelos, variando de 4 (IPG\_10, IPG\_19 e IPG\_46) a 18 alelos (IPG\_41 e IPG\_49).

Tabela 4 – Parâmetros de diversidade genética em dez *loci* de microsatélites para cada população de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil, em que: N – Número total de indivíduos; Na – Número de alelos; Ne – Número de alelos efetivos; R – Riqueza alélica; Ho – Heterozigosidade observada; He – Heterozigosidade esperada; F – Índice de fixação \*( $p < 0,05$ ).

Populações	Índices	<i>Loci</i>										Média	SE
		IPG_49	IPG_10	IPG_06	IPG_41	IPG_19	IPG_23	IPG_46	IPG_01	IPG_08	IPG_03		
FLONA Chapecó	Na	12,000	7,000	6,000	12,000	7,000	8,000	6,000	11,000	8,000	8,000	8,500	0,734
	Ne	5,233	2,431	2,984	4,655	4,379	5,375	4,549	2,947	3,201	4,985	4,074	0,341
	Ho	0,733	0,574	0,292	0,511	0,064	0,513	0,419	0,268	0,543	0,056	0,397	0,071
	He	0,809	0,589	0,665	0,785	0,772	0,814	0,780	0,661	0,688	0,799	0,736	0,025
	F	0,093	0,024	0,561	0,349	0,917	0,370	0,463	0,594	0,210	0,931	0,451*	0,098
PARNA Araucárias	Na	15,000	9,000	11,000	15,000	6,000	9,000	6,000	14,000	6,000	9,000	10,000	1,145
	Ne	7,724	4,361	7,365	7,488	4,676	5,602	3,764	7,013	4,208	7,438	5,964	0,505
	Ho	0,660	0,694	0,265	0,553	0,184	0,689	0,244	0,468	0,646	0,103	0,451	0,073
	He	0,871	0,771	0,864	0,866	0,786	0,821	0,734	0,857	0,762	0,866	0,820	0,016
	F	0,242	0,100	0,693	0,362	0,766	0,161	0,667	0,454	0,153	0,882	0,448*	0,091
Parque Municipal Teixeira Soares	Na	12,000	4,000	6,000	18,000	4,000	10,000	4,000	10,000	5,000	6,000	7,900	1,449
	Ne	5,284	2,895	2,242	9,846	2,561	4,858	2,245	5,521	2,263	4,798	4,251	0,755
	Ho	0,771	0,510	0,122	0,542	0,367	0,683	0,391	0,333	0,583	0,225	0,453	0,064
	He	0,811	0,655	0,554	0,898	0,610	0,794	0,555	0,819	0,558	0,792	0,704	0,042
	F	0,049	0,220	0,779	0,397	0,397	0,140	0,294	0,593	-0,045	0,716	0,354*	0,088
FLONA Três Barras	Na	18,000	10,000	10,000	15,000	6,000	10,000	6,000	11,000	6,000	10,000	10,200	1,236
	Ne	8,777	5,676	5,169	8,017	4,836	5,185	4,046	7,805	3,695	4,571	5,778	0,563
	Ho	0,708	0,837	0,429	0,816	0,184	0,605	0,244	0,105	0,417	0,138	0,448	0,089
	He	0,886	0,824	0,807	0,875	0,793	0,807	0,753	0,872	0,729	0,781	0,813	0,017
	F	0,201	-0,016	0,469	0,067	0,768	0,250	0,676	0,879	0,429	0,823	0,455*	0,102
PARNA São Joaquim	Na	16,000	7,000	11,000	17,000	5,000	12,000	6,000	16,000	6,000	10,000	10,600	1,447
	Ne	10,695	2,573	3,552	7,457	3,242	7,617	3,911	10,149	3,460	3,796	5,645	0,965
	Ho	0,735	0,510	0,204	0,633	0,122	0,604	0,413	0,348	0,531	0,222	0,432	0,065
	He	0,906	0,611	0,718	0,866	0,692	0,869	0,744	0,901	0,711	0,737	0,776	0,032
	F	0,190	0,166	0,716	0,269	0,823	0,305	0,445	0,614	0,254	0,698	0,448*	0,077
RPPN Complexo Serra da Farofa	Na	17,000	6,000	8,000	18,000	5,000	10,000	6,000	15,000	5,000	9,000	9,900	1,581
	Ne	11,236	2,978	3,873	9,940	3,054	6,142	3,296	5,064	4,433	3,765	5,378	0,925
	Ho	0,840	0,420	0,380	0,640	0,080	0,696	0,326	0,438	0,600	0,174	0,459	0,075
	He	0,911	0,664	0,742	0,899	0,673	0,837	0,697	0,803	0,774	0,734	0,773	0,028
	F	0,078	0,368	0,488	0,288	0,881	0,169	0,533	0,455	0,225	0,763	0,425*	0,081

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Realizando uma análise das populações de acordo com índices de diversidade observa-se que a heterozigosidade observada para as populações apresentadas foi inferior a heterozigosidade esperada em equilíbrio de HW, o que resultou em índices de fixação elevados para as populações, estes resultados podem ser decorrentes dos

processos antrópicos históricos como: fragmentação dos remanescentes florestais em decorrência da expansão de áreas agrícolas, superexploração e manejo indevido. Estes fatores podem produzir efeito negativo nas populações, uma vez que, reduzindo o tamanho populacional e ocasionando um baixo fluxo de gênico pode aumentar o cruzamento entre aparentados (BARREIRA, 2005).

Comparando a população do Parque Teixeira Soares que apresentou índice de fixação ( $F = 0,354 \pm 0,088$ ), com as populações das FLONAs de Três Barras ( $F = 0,455 \pm 0,102$ ), e Chapecó ( $F = 0,451 \pm 0,098$ ), pode se notar que embora todos estejam elevados, o Parque Municipal Teixeira Soares foi o que apresentou entre todas as unidades de conservação o menor índice de fixação.

Outro ponto a ser relatado, é que o complexo Serra da Farofa, por mais que seja uma RPPN recente, e seu remanescente florestal estava inserido entre plantios homogêneos de espécies exóticas, que pode ter dificultado a troca de alelos entre povoamentos, favorecendo o cruzamento entre aparentados.

Em populações de *Ilex paraguariensis* estudadas por Pereira et al. (2013), com marcadores microssatélites, nos municípios de Putinga e Jaguariaiva, encontraram valores baixos de índice de fixação de  $F = 0,094$  e  $F = 0,107$ , respectivamente, divergindo dos resultados obtidos no presente trabalho. Entretanto, cabe ressaltar que no estudo realizado por Pereira et al. (2013), a amostragem foi de 24 indivíduos por população, enquanto o presente estudo a amostragem foi de 50 indivíduos, desta forma, a diferença na amostragem pode ter afetado os índices em avaliação, embora não possa ser descartado diferenças entre estas populações.

Para Cascales et al. (2014) em estudo com *Ilex paraguariensis* em regiões do Uruguai, foi encontrado um índice de fixação elevado ( $F = 0,457$ ), o que corrobora com os resultados do presente trabalho, levando em consideração que a amostragem adotada pelo autor foi semelhante com a coleta de 58 indivíduos.

Outro fator observado foi que embora as populações das unidades de conservação tenham apresentado elevados índices de fixação, os índices de riqueza alélica e número médio de alelos para todos os *loci* foram de médios a altos, com destaque dos maiores valores para as populações do Parque Nacional de São Joaquim ( $R = 9,503$ ;  $N_a = 10,6$ ), FLONA de Três Barras ( $R = 9,522$ ;  $N_a = 10,2$ ) e Parque Nacional das Araucárias ( $R = 9,223$ ;  $N_a = 10$ ), apresentando maior diversidade intrapopulacional, fornecendo informações importantes para a escolha de populações prioritárias em programas de manejo e conservação.

No que se refere ao coeficiente de endogamia dentro de cada população ( $F_{IS}$ ), observou-se valores médios de (0,470; 0,459; 0,367; 0,458; 0,451; 0,415) para as populações FLONA de Chapecó, Parque Nacional das Araucárias, Parque municipal Teixeira Soares, FLONA de Três Barras, Parque Nacional de São Joaquim e RPPN Complexo Serra da Farofa respectivamente. O que demonstra que as populações não estão em equilíbrio de HW, devido aos valores encontrados serem diferentes de zero. Sabendo que a espécie é dioica não permite autofecundação espera-se que as taxas de endogamia sejam baixas. Os resultados encontrados para estas populações sugerem cruzamentos entre indivíduos aparentados. Podendo causar efeitos negativos na capacidade adaptativa e reprodutiva da espécie.

Adicionalmente, a distribuição da variabilidade genética entre as populações ( $F_{ST}$ ) foi de 0,0816 (Tabela 5), demonstrando que as populações têm frequências alélicas semelhantes, indicando que a variabilidade genética entre as populações é menor que dentro ( $F_{IS} = 0,4325$ ), situação que se encontra dentro do esperado (GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000; WENDT, 2005; HARTL; CLARK, 2010).

Tabela 5 – Parâmetros de estrutura genética em dez *loci* de microssatélites para as populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. em Unidades de Conservação, em que:  $F_{IS}$  – Diversidade genética dentro das populações;  $F_{ST}$  – Diversidade genética entre populações;  $F_{IT}$  – Diversidade genética total; IC – Intervalo de confiança (\*significativamente diferente de zero)

<i>Locí</i>	$F_{IS}$	$F_{ST}$	$F_{IT}$
<b>IPG_49</b>	0,14382	0,0609	0,1959
<b>IPG_10</b>	0,13806	0,0767	0,2042
<b>IPG_06</b>	0,61101	0,1356	0,6637
<b>IPG_41</b>	0,28815	0,0551	0,3273
<b>IPG_19</b>	0,76854	0,0671	0,7841
<b>IPG_23</b>	0,23326	0,0284	0,255
<b>IPG_46</b>	0,52217	0,1186	0,5789
<b>IPG_01</b>	0,60098	0,0977	0,64
<b>IPG_08</b>	0,21383	0,0674	0,2668
<b>IPG_03</b>	0,80521	0,1083	0,8263
<b>Média</b>	0,4325*	0,0816*	0,4742*
<b>IC</b>	(-0,766 - 0,929)	(-0,150 - 0,170)	(-0,851 - 1,008)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Estes resultados juntamente com a presença de alelos privados nas populações (Tabela 6), indicam que ainda se tem um fluxo gênico aparente. Levando em consideração e que as populações estão distantes geograficamente e que o cenário atual se apresenta em formato de mosaicos e populações altamente fragmentadas, a diversidade genética ainda está mantida, no entanto, deve-se ter cautela e manter a conservação e as ações sobre estes fragmentos para que não haja problemas futuros com a perda da diversidade genética da espécie.

Tabela 6 – Alelos privados por *loci* de microssatélites por população de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. em Unidades de Conservação, com as respectivas frequências

<i>Loci</i>	FLONA Chapecó	PN Araucaria	PM Teixeira Soares	FLONA Três Barras	PN São Joaquim	RPPN Serra da Farofa
<b>Alelos</b>						
<b>IPG_01</b>	-	-	-	-	282 [0,043]	-
<b>IPG_03</b>	-	-	-	-	374 [0,011]	356 [0,011]
<b>IPG_06</b>	-	172 [0,020]	-	166 [0,010]	150 [0,031]	-
<b>IPG_08</b>	272 [0,022] 281 [0,011]	-	-	-	-	-
<b>IPG_10</b>	-	-	-	331 [0,020]	-	-
<b>IPG_19</b>	203 [0,106]	-	-	-	-	-
<b>IPG_23</b>	-	-	232 [0,024]	263 [0,013]	254 [0,010] 346 [0,021]	-
<b>IPG_46</b>	148 [0,023]	204 [0,011]	-	194 [0,085]	168 [0,011]	200 [0,012]
<b>IPG_49</b>	-	-	-	151 [0,010]	117 [0,051]	149 [0,020]

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Os alelos privados encontrados nas populações para os dez *loci* analisados, variaram de 0 a 2 alelos por loco, sendo suas frequências variando de 1% a 10% (Tabela 6). Estes valores demonstram a diferença e a importância da manutenção

dessas populações, uma vez que estes alelos são exclusivos, e sua manutenção está associado a conservação da população em que o respectivo alelo se encontra.

#### 4.2 DIVERSIDADE GENÉTICA EM ÁREAS PARTICULARES COM EXTRATIVISMO

Os parâmetros de diversidade genética para as propriedades particulares estimados para os dados de dez *loci* microssatélites estão contemplados na Tabela 7. Foi constatado uma média de 9,25 alelos por *loci* totalizando de 118 alelos, variando de 5 (IPG\_46 e IPG\_08) a 19 alelos (IPG\_49).

A heterozigosidade observada para as populações apresentadas foram inferiores a heterozigosidade esperada em equilíbrio de HW, resultando em índices de fixação elevados. Estes resultados podem ser decorrentes do histórico de utilização das áreas, já que as mesmas pertencem a empresas e ou produtores rurais. Ou também os fatores históricos naturais e antrópicos como: fragmentação dos remanescentes florestais, superexploração e manejo indevido.

O maior índice de fixação observado no presente trabalho foi encontrado na população da Ervateira Valérios ( $F = 0,443 \pm 0,100$ ) seguido da Propriedade particular no município de Lacerdópolis ( $F = 0,436 \pm 0,116$ ), Ervateira Soccol ( $F = 0,403 \pm 0,094$ ) e Klabin/ SA ( $F = 0,378 \pm 0,102$ ). Levando em consideração que as ervateiras e a propriedade particular em Lacerdópolis, onde a espécie se encontrava em pequenas populações como podem ser observadas nas Figuras (9, 10 e 12) , estes resultados nos mostram uma tendência ao aumento do índice de fixação ao passo que o tamanho do fragmento seja reduzido, este fato também foi observado por Silva et al (2008).

A propriedade da Klabin/SA que se encontra em uma paisagem mais conservada, e o fragmento está inserido entre plantios homogêneos, e os indivíduos foram encontrados a maiores distâncias entre si, do que as demais populações e foi constatado a presença de indivíduos isolados em áreas úmidas podendo favorecer a troca de alelos que resultou em um menor F. Fatos estes que corroboram com Viana; Pinheiro (1998), que mencionam que paisagens não homogêneas, com fragmentação, remanescentes florestais isolados por áreas cultivadas ou perturbações naturais podem afetar na conectividade entre as populações vegetais, podendo interferir na polinização e dispersão de sementes, consequentemente alterando os níveis de fluxo gênico, o que pode causar uma diminuição da diversidade genética das populações, devido ao aumento do cruzamento entre indivíduos aparentados.

Tabela 7 – Parâmetros de diversidade genética em dez *loci* de microssatélites para cada população de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil, em que: N – Número total de indivíduos;  $N_a$  – Número de alelos;  $N_e$  – Número de alelos efetivos; R – Riqueza alélica;  $H_o$  – Heterozigosidade observada;  $H_e$  – Heterozigosidade esperada; F – Índice de fixação \*( $p < 0,05$ ).

Populações	Índices	Loci										Média	SE
		IPG_49	IPG_10	IPG_06	IPG_41	IPG_19	IPG_23	IPG_46	IPG_01	IPG_08	IPG_03		
Ervateira Soccol	Na	11,000	8,000	10,000	17,000	7,000	8,000	5,000	14,000	6,000	12,000	9,800	1,191
	Ne	7,181	3,424	4,677	8,562	4,119	5,362	4,318	10,159	3,901	6,901	5,860	0,711
	Ho	0,744	0,721	0,356	0,556	0,159	0,643	0,400	0,250	0,698	0,229	0,475	0,071
	He	0,861	0,708	0,786	0,883	0,757	0,813	0,768	0,902	0,744	0,855	0,808	0,021
	F	0,135	-0,018	0,548	0,371	0,790	0,210	0,479	0,723	0,062	0,733	0,403*	0,094
Ervateira Valério	Na	12,000	10,000	9,000	11,000	7,000	9,000	5,000	10,000	7,000	10,000	9,000	0,667
	Ne	6,046	2,925	5,598	6,841	3,789	5,023	3,346	6,464	5,038	4,534	4,960	0,418
	Ho	0,717	0,674	0,261	0,386	0,087	0,528	0,375	0,200	0,791	0,300	0,432	0,075
	He	0,835	0,658	0,821	0,854	0,736	0,801	0,701	0,845	0,802	0,779	0,783	0,021
	F	0,140	-0,024	0,682	0,547	0,882	0,341	0,465	0,763	0,013	0,615	0,443*	0,100
P.P. Lacerdópolis	Na	11,000	6,000	9,000	10,000	6,000	9,000	6,000	14,000	6,000	6,000	8,300	0,883
	Ne	5,010	2,302	4,045	3,114	3,785	4,065	3,308	4,659	4,202	2,202	3,669	0,295
	Ho	0,840	0,640	0,286	0,479	0,020	0,360	0,250	0,250	0,700	0,149	0,397	0,083
	He	0,800	0,566	0,753	0,679	0,736	0,754	0,698	0,785	0,762	0,546	0,708	0,028
	F	-0,049	-0,132	0,620	0,294	0,973	0,523	0,642	0,682	0,081	0,727	0,436*	0,116
P.P.Klabin S/A	Na	19,000	7,000	9,000	13,000	6,000	8,000	6,000	15,000	5,000	11,000	9,900	1,441
	Ne	12,346	3,903	6,105	5,252	3,912	5,793	3,935	10,020	2,046	4,336	5,765	0,988
	Ho	0,900	0,760	0,320	0,740	0,200	0,633	0,295	0,360	0,460	0,149	0,482	0,082
	He	0,919	0,744	0,836	0,810	0,744	0,827	0,746	0,900	0,511	0,769	0,781	0,036
	F	0,021	-0,022	0,617	0,086	0,731	0,235	0,604	0,600	0,100	0,806	0,378*	0,102

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

O número de alelos presentes nas populações foram semelhantes (Tabela 7), com exceção da propriedade particular de Lacerdópolis ( $N_a = 8,3$ ), que também apresentou, conseqüentemente a menor riqueza alélica ( $R = 7,494$ ), fato que pode estar ligado a baixa heterozigosidade observada ( $H_o = 0,395$ ) em relação as outras, também pelo fato observado de que os indivíduos coletados apresentavam diâmetros relativamente superiores aos encontrados nas demais populações. Outro fato constatado foi que haviam bastante indivíduos regenerantes (não reprodutivos) de diversas classes diamétricas, que em estudos posteriores podem demonstrar uma riqueza alélica maior a qual não foi constatada neste estudo.

No que se refere ao coeficiente de endogamia dentro de cada população ( $F_{IS}$ ), observou-se valores médios de (0,421; 0,459; 0,449; 0,392) para as populações Ervateira Soccol, Ervateira Valérios, PP Lacerdópolis e PP Klabin/SA, respectivamente. Mostrando o não equilíbrio de HW. Além disso, a distribuição da variabilidade genética entre as populações ( $F_{ST}$ ) foi de 0,065 (Tabela 8), demonstrando que esta situação se encontra dentro do esperado, ou seja, a variabilidade genética entre as populações é menor que dentro ( $F_{IS} = 0,414$ ), fato este também foi encontrado por outros autores (GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000; WENDT, 2005; HARTL; CLARK, 2010).

Tabela 8 – Parâmetros de estrutura genética em dez *loci* de microssatélites para as populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. em Propriedades Particulares, em que:  $F_{IS}$  – Diversidade genética dentro das populações;  $F_{ST}$  – Diversidade genética entre populações;  $F_{IT}$  – Diversidade genética total; IC: Intervalo de confiança, (\*significativamente diferente de zero)

<b>Locí</b>	<b>FIS</b>	<b>FST</b>	<b>FIT</b>
<b>IPG_49</b>	0,06242	0,0572	0,1161
<b>IPG_10</b>	-0,04463	0,0329	-0,0103
<b>IPG_06</b>	0,61767	0,0568	0,6394
<b>IPG_41</b>	0,32999	0,087	0,3883
<b>IPG_19</b>	0,84327	0,0412	0,8497
<b>IPG_23</b>	0,32308	0,0448	0,3534
<b>IPG_46</b>	0,54673	0,0711	0,5789
<b>IPG_01</b>	0,69118	0,0499	0,7066
<b>IPG_08</b>	0,06031	0,0755	0,1312
<b>IPG_03</b>	0,71984	0,139	0,7588
<b>Média</b>	0,41499	0,0655	0,4512
<b>IC</b>	(0,220 - 0,610)	(0,047 - 0,085)	(0,265 - 0,637)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Os valores intermediários de divergência genética somados com o aparecimento de alelos privados nas populações (Tabela 9), pode se indicar que existe um fluxo gênico, não havendo uma grande diferença entre as populações. Sendo que a população localizada na propriedade da Klabin apresentou o maior número de alelos privados o que corrobora com seus índices de diversidade e estrutura genética.

Os alelos privados encontrados nas populações para os dez *loci* analisados, variaram de 0 a 4 alelos por loco, sendo suas frequências variando de 1% a 11% (Tabela 9), estes valores demonstram que as propriedades particulares possuem grande importância na manutenção da diversidade genética para a espécie.

Tabela 9 – Alelos privados por *loci* de microssatélites por população de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. em Propriedades Particulares, com as respectivas frequências

<i>Loci</i>	Ervateira Socol	Ervateira Valério	PP Lacerdópolis	PP Klabin
IPG_01	-	-	-	288 [0,040]
				318 [0,010]
IPG_03	302 [0,014]	-	367 [0,011]	352 [0,021]
	310 [0,014]			
IPG_06	154 [0,022]	-	-	-
IPG_08	-	281 [0,105]	-	-
IPG_10	-	325 [0,033]	-	-
		339 [0,054]		
IPG_19	-	-	203 [0,100]	-
IPG_46			178 [0,010]	200 [0,011]
IPG_23	258 [0,012]	232 [0,014]	254 [0,010]	240 [0,082]
IPG_41	153 [0,011]			
	161 [0,044]	-	-	159 [0,010]
	171 [0,056]			
	177 [0,011]			
IPG_49				107 [0,020]
	149 [0,012]	-	-	111 [0,010]
				141 [0,110]
				155 [0,010]

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

### 4.3 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA QUANDO COMPARADAS AS DEZ POPULAÇÕES

As populações estudadas se encontram em cenários distintos, no entanto, todas demonstraram comportamento semelhante quanto aos índices genéticos avaliados.

Analisando as dez populações foi observado que a distribuição da diversidade genética está dentro do esperado já que é menor entre as populações do que dentro das populações de *Ilex paraguariensis* (Tabela 10). Considerando que a espécie tem ampla distribuição natural devido a seu sistema reprodutivo e sua interação com a fauna para sua polinização e dispersão, a média de alelos por loco encontrada foi de 9,4 sendo um índice que representa a diversidade genética, considerado um valor relativamente alto comparando com o estudo realizado por Diaz (2013) que observou uma média de 4,5 alelos por loco, fator que pode ter ocorrido pelo seu estudo possuir poucos marcadores e espaço amostral menor, divergindo do presente trabalho.

Tabela 10 – Parâmetros de estrutura genética em dez *loci* de microssatélites para dez populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., em que:  $F_{IS}$  – Diversidade genética dentro das populações;  $F_{ST}$  – Diversidade genética entre populações;  $F_{IT}$  – Diversidade genética total; IC: Intervalo de confiança, (\*significativamente diferente de zero)

<b>Loci</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b><math>F_{ST}</math></b>	<b><math>F_{IT}</math></b>
<b>IPG_49</b>	0,112	0,065	0,169
<b>IPG_10</b>	0,066	0,093	0,153
<b>IPG_06</b>	0,614	0,110	0,656
<b>IPG_41</b>	0,304	0,074	0,356
<b>IPG_19</b>	0,799	0,066	0,812
<b>IPG_23</b>	0,269	0,040	0,298
<b>IPG_46</b>	0,532	0,105	0,581
<b>IPG_01</b>	0,640	0,084	0,670
<b>IPG_08</b>	0,152	0,080	0,220
<b>IPG_03</b>	0,772	0,128	0,802
<b>Média</b>	0,426*	0,085*	0,472*
<b>IC</b>	(0,254 – 0,598)	(0,069 – 0,101)	(0,311 – 0,633)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Os resultados encontrados mostram uma divergência genética relativamente baixa entre as populações, independentemente de serem estudadas em propriedades particulares ou em unidades de conservação. No entanto, apesar do  $F_{ST}$  ser baixo, indica que no espaço amostral em que estão inseridas as populações avaliadas, e esta diferença pode sugerir possíveis adaptações locais. Desta forma, sob o ponto de vista de conservação, é importante manter e manejar adequadamente estas populações para aumentar as chances de manutenção da variabilidade genética presente. Cabe ressaltar que mesmo as análises realizadas com marcadores isoenzimáticos, RAPD ou marcadores microssatélites mantem-se o padrão de que a maior divergência genética está dentro das populações do que entre (WINGE et al., 1995; GAUER; CAVALLI-MOLINA, 2000; WENDT, 2005; WENDT et al., 2007). Devido a estes fatos para a estratégia de conservação da espécie em estudo recomenda-se um que em fragmentos menores não sejam realizadas conversões de áreas, para evitar perdas de indivíduos, e em fragmentos maiores estes também devem ser conservados para que possibilite a troca de alelos entre populações, para manutenção da variabilidade genética intrapopulacional e interpopulacional.

Quando comparados os dados de diversidade genética das populações em áreas de conservação contrastadas com as propriedades particulares, pode-se perceber que não houve diferença significativa entre esses dois grupos (Tabela 11), uma vez que há situações favoráveis para a conservação da diversidade da espécie nas populações em estudo, pois apresentam grande potencial como fonte de diversidade para restauração, independentemente de estarem em UCs ou não.

Tabela 11 – Riqueza alélica (R), heterozigosidades esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) e índice de fixação (F) entre dois grupos de populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. separadas em Unidades de Conservação (FLONA Chapecó; PN Araucária; PM Teixeira Soares; RPPN Serra da Farofa; FLONA de Três Barras e PN São Joaquim) e Propriedades Particulares (Ervateira Soccol; Ervateira Valério; PP Lacerdópolis e PP Klabin)

	<b>Unidades Conservação</b>	<b>de Propriedades Particulares</b>	<b>P-value (95%)</b>
<b>R</b>	8,734	8,558	0,74875
<b><math>H_o</math></b>	0,442	0,445	0,85986
<b><math>H_s</math></b>	0,783	0,780	0,88388
<b><math>F_{IS}</math></b>	0,435	0,430	0,85185
<b><math>F_{ST}</math></b>	0,082	0,075	0,81682

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Para os dados referentes a riqueza alélica, obteve-se uma média de 8,558 para as propriedades particulares e 8,734 para as unidades de conservação, dados estes revelam a quantidade de alelos segregando em um loco em determinada população. Além de representar uma medida de diversidade genética, segundo Leberg (2002) a riqueza alélica é um parâmetro informativo sobre mudanças do passado demográfico das populações. Os valores de riqueza alélica podem ser utilizados em estudos que buscam avaliar a hipótese de que as populações passaram por um evento de *boottleneck* em um passado recente, pois a redução do tamanho efetivo populacional causa uma perda em proporções maiores, sobre a riqueza alélica do que sobre a diversidade genética conforme definida por Nei (1973). A riqueza alélica é mais sensível aos efeitos de um evento de *boottleneck* se comparada com a heterozigosidade propriamente dita (PETIT et al., 1988; SPENCER et al., 2000). Para estes autores a riqueza alélica é um bom indicador das mudanças demográficas sofridas por uma população no passado.

As distâncias genéticas entre as populações foram estimadas através das equações de Nei (1978), sendo representados através dos dendrograma com as respectivas distâncias de Nei (1978) e dendrograma das distâncias geográficas na Figura 14, quando comparado as distâncias geográficas com as distâncias de Nei Figura 15. As análises de estrutura populacional indicam a formação de três grandes grupos sendo eles formados por grupo um: PN São Joaquim, Serra da Farofa, PP Klabin e FLONA 3 Barras; Grupo dois, composto unicamente pela ervateira Valérios;

e, Grupo três, composto por: FLONA de Chapecó, PP Lacerdópolis, PM Teixeira Soares e Ervateira Soccol. Pode-se perceber que a ervateira Valérios ficou em grupo separado devido também a sua distância geográfica em relação as outras populações.

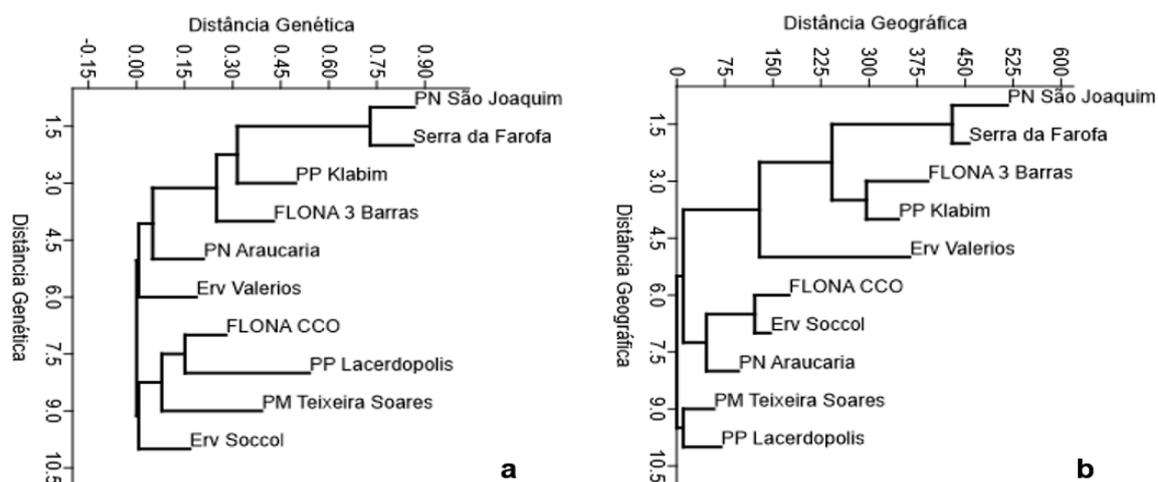
Tabela 12 – Matriz número de migrantes entre as populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

	FLONA Chapecó	Ervateira Soccol	PARNA Araucária	PM Teixeira Soares	Ervateira Valério	FLONA Três Barras	PARNA São Joaquim	RPPN Serra da Farofa	PP Lacerdópolis	PP Klabin S/A
FLONA Chapecó	0									
Ervateira Soccol	7,106	0								
PARNA Araucária	7,101	13,289	0							
PM Teixeira Soares	5,800	6,119	4,826	0						
Ervateira Valério	5,653	10,895	7,985	4,283	0					
FLONA Três Barras	4,798	8,101	9,759	3,759	5,573	0				
PARNA São Joaquim	3,434	4,017	5,650	3,072	4,324	5,090	0			
RPPN Serra da Farofa	3,358	4,474	4,987	2,974	4,186	4,669	10,684	0		
PP Lacerdópolis	6,303	5,778	5,760	2,787	4,510	3,593	2,664	2,890	0	
PP Klabin S/A	4,450	5,930	7,116	3,973	6,282	8,915	5,648	4,661	3,051	0

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

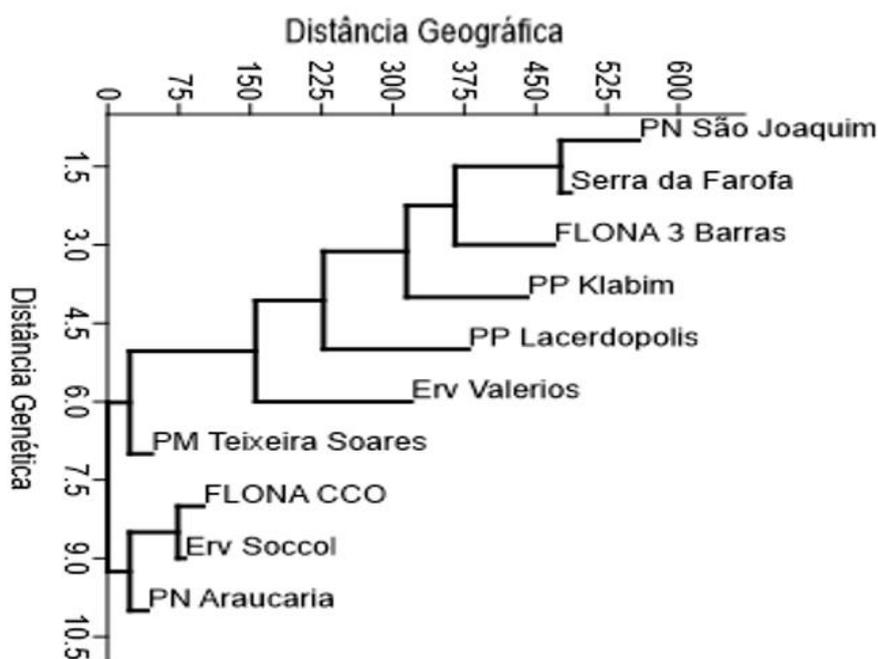
Gottlieb et al. (2005), em um estudo comparativo entre várias espécies do gênero *Ilex* da América do Sul, encontraram as médias mais baixas de distância genética entre populações para a *I. paraguariensis*, e que representou a ausência de evidências de um padrão geográfico para a espécie. Para Gauer; Cavalli-Molina (2000) o grande potencial de dispersão de sementes pode estar relacionado as baixas taxas de divergência genética entre populações de *I. paraguariensis*, este fato também vai de encontro ao grande número de migrantes observados no presente trabalho (Tabela 12), sendo encontrados valores médios superiores a 3, onde o fluxo gênico é a força evolutiva predominante na determinação das frequências alélicas homogeneizando as populações. Neste mesmo sentido após realizar o Teste de mantel com 9999 permutações obteve-se uma correlação baixa de 22% sendo o valor de  $p = 0,0724$  indicando que para a espécie em estudo não há uma correlação entre a distância genética e distância geográfica (Figura 14).

Figura 14 – Dendrograma baseado nas distâncias genéticas de NEI (1978), para as dez populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., onde em (a) dendrograma das distâncias genéticas de NEI, (b) distâncias geográficas



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

Figura 15 – Dendrograma baseado na correlação entre as distâncias genéticas de NEI (1978), com as distâncias geográficas, para as dez populações de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2019

Estudos realizados com outros tipos de marcadores genéticos, em erva-mate, concordam com os resultados obtidos neste trabalho. Gauer; Cavalli-Molina (2000), utilizando marcadores RAPD, revelaram que 85% da variabilidade genética encontra-

se dentro das populações e 15% entre populações, Cansian et al. (2003a), empregando a mesma técnica, obtiveram o índice de similaridade de Jaccard entre populações de 0,908. Gregianini; Winge (2000), analisando proteínas de reserva de sementes, verificaram variabilidade intrapopulacional de 85%, sendo a diversidade entre populações de 15%. O índice  $F_{IS}$  confirma o um elevado grau de homozigotos ( $F_{IS} = 0,426$ ), ou seja, há cruzamento entre aparentados para espécie em estudo.

## 5 CONCLUSÕES

1. Foi possível caracterizar a estrutura e a diversidade genética utilizando marcadores microssatélites
2. A divergência genética foi maior dentro do que entre das populações;
3. Por mais que as populações estejam fragmentadas não houve divergência genética entre as populações, fato este estar relacionado ao número de migrantes observados no estudo;
4. Não houve diferenças genéticas e estruturais significativas entre as populações situadas em unidades de conservação e propriedades particulares, fato este podendo estar relacionado as práticas de manejo da espécie;



## REFERÊNCIAS

- ABDELNOOR, R. V.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Determination of genetic diversity within brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree data. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 18, p. 265-273, 1995.
- AGUIAR, R. V. et al. Variabilidade genética de *Eugenia uniflora* L. em remanescentes florestais em diferentes estádios sucessionais. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n.2, p. 226-233, mar/abr, 2013.
- ALBAGLI, S. Interesse global no saber local: geopolítica da biodiversidade. In: Seminário "Saber Local/ Interesse Global": propriedade intelectual, biodiversidade e conhecimento tradicional na Amazônia, **Cesupa**, Belém, set. 2003.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Editora UFV, 1998. 574 p.
- AVISE, J. C. *Molecular markers, natural history and evolution*. New York: **Chapman & Hall**, 1993. 511 p.
- AYAD, W. G.; HODGKIN, T.; JARADAT, A.; RAO, V. R. (Ed.). *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. Rome: International **Plant Genetic Resources** Institute, 1997. 137 p.
- ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, p. 121-144, 1987.
- ANDRADE, Fabiana Maia. **Diagnóstico da cadeia produtiva da (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) erva-mate**. Campinas: Unicamp, 1999.
- AULER, N. M. F. et al. The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptive variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 25, 3, 2002.
- AZEVEDO, T. S. **Análise espaço temporal da dimensão fractal das matas ciliares na alta bacia do rio Passa Cinco – Centro Leste do Estado de São Paulo**. 2003. 161f. Dissertação (Mestrado em Geografia). Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – SP.

BARREIRA, Sybelle. **Diversidade genética em população natural de *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish como base para o manejo florestal.** 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. de. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 513-520, 1997.

BITTENCOURT, J. V. M.; SEBBENN, A. M. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. **Heredity**, v. 99, n. 6, p. 580, 2007.

BRACK, P.; KINUPP, V. F.; SOBRAL, M. E. G. Levantamento preliminar de espécies frutíferas de árvores e arbustos nativos com uso atual ou potencial do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 1, fev. 2007.

CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO. Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas, R. Visconde do Rio Branco: **Suprema**, 2013. 336p.

CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p. 15-25, 2006.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, Colombo-PR: Embrapa Florestas, p. 1039, 2003.

CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho et al. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira.** Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1994.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A.; FUKUDA, W. M. G. **Phenetic relationships and genetic diversity among geographic landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) revealed by PCR-based markers.** In: INTERNATIONAL SCIENTIFIC MEETING CASSAVA BIOTECHNOLOGY NETWORK, 4., 1998, Salvador. Proceedings... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. p. 65-79.

CASCALES, J. et al. Genetic diversity of wild germplasm of “yerba mate” (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) from Uruguay. **Genetica**, 2014.

CONTE, R.; REIS M.S.; MANTOVANI, A.; VENCOSKY, R. Genetic structure and mating system of *Euterpe edulis* Mart. populations: a comparative analysis using microsatellite and allozyme markers. **J Hered.** 99(5):476-482, 2008.

CORRÊA, R. X.; COSTA, M. R.; GOOD-GOD, P. I.; RAGAGNIN, V. A.; FALEIRO, F. G.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Sequence characterized amplified regions linked to rust resistance genes in the common bean. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 804-807, 2000.

COSTA, N. C. F. et al. Efeitos da paisagem de campo e florestamento com *Pinus* na diversidade e estrutura genética de pequenas populações remanescentes de *Araucaria angustifolia*. **Scientia Forestalis**, Piracicaba - SP, v. 43, n. 107, p. 551-560, set. 2015.

COSTA, A. M. **Uso de marcadores RAPD e do Sistema de Informação Geográfica no estudo da variabilidade genética e ecológica de *Stylosanthes macrocephala* M. B. Ferr et S. Costa.** 2004. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) - Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2004.

COUCH, J.A.; FRITZ, P.J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.8, p.8-12, 1990.

DALLAS, J. F. Detection of DNA "fingerprints" of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. **Proceedings of the National Academic of Science USA**, Washington, v. 85, p. 6831-6835, 1988.

DA CROCE, D. M. **Cadeias produtivas de Santa Catarina: Erva-mate.** Florianópolis: Epagri, 2000. 41p.

DA CROCE, D. M.; FLOSS, P. A. **Cultura da erva-mate no Estado de Santa Catarina.** Florianópolis: EPAGRI, 1999. 81 p. (EPAGRI, Boletim Técnico, n.100).

DA CROCE, D.M. **Cadeia Produtiva da erva-mate em Santa Catarina.** Chapecó: EPAGRI/CPMP, 1996. 35 p. (Boletim de Pesquisa).

DANIEL, O. **Erva-mate: sistema de produção e processamento industrial.** Ed. UFGD, Dourados, MS, UEMS, p. 288, 2009.

DE AZEVEDO, Thiago Salomão. O USO DA LEGISLAÇÃO AMBIENTAL NA RESTAURAÇÃO DA CONECTIVIDADE ESTRUTURAL DA PAISAGEM: UM ESTUDO DE CASO PARA A BACIA HIDROGRÁFICA DO CORRÉGO DAS POSSES, EXTREMA-MG. *Estudos Geográficos: Revista Eletrônica de Geografia*, v. 15, n. 2, p. 78-112, 2017.

DE OLIVEIRA, Yeda Maria Malheiros; ROTTA, Emilio. Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: Embrapa Florestas-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SEMINÁRIO SOBRE ATUALIDADES E PERSPECTIVAS FLORESTAIS, 10., 1983, Curitiba. *Silvicultura da erva-mate (Ilex paraguariensis): anais...* Curitiba: EMBRAPA-CNPQ, 1985. p. 17-36., 1983.

DEL RIO, A. H.; BAMBERG, J. B.; HUAMAN, Z. Assessing changes in the genetic diversity of potato gene banks. 1. Effects of seed increase. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 95, p. 191-198, 1997.

DIAZ, Vinicius 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 Iguaçu.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2013.

DONADUZZI, C. M.; COELHO, S. R. M.; CARDOZO JR., E. L.; GALLO, A. G.; HUPPES, G. K.; KUHN, I. M. V.; SCHICHEL, C. Teores de cafeína, polifenóis totais e taninos em amostras de erva mate comercializadas na região de Toledo, Paraná. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA MATE. 3. 2000, Encantado/RS. *Anais...* Porto Alegre: Edição dos Organizadores, 2000. p. 158-161.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.; HORTORIUM, L.H.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, n.1, p.13-15, 1987.

DUARTE, F. **Tecnologia Química na Universidade Federal do Paraná: seleção, treinamento de julgadores e metodologia para análise sensorial de extrato de erva mate.** Curitiba, 2000. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química), Universidade Federal do Paraná.

DUTECH C, JOLY HI, JARNE P. Gene flow, historical population dynamics and genetic diversity within French Guianan populations of a rainforest tree species, *Vouacapoua americana*. *Heredity*. 92:69–77, 2004.

DUTRA, L. F.; HANSEL, L. F.; WENDLING, I. **Introdução ao Cultivo in vitro de Erva-mate (*Ilex paraguariensis*).** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Embrapa Florestas, Colombo, PR, 2008.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.

FALEIRO, A. S. G.; FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; YAMADA, M. M.; BAHIA, R. C. S.; CORRÊA, R. X. Variability in cacao selected by producers for resistance to witches' broom based on microsatellite markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, p. 290-297, 2004a.

FALEIRO, F. G. Seleção assistida por marcadores moleculares: diferentes aplicações: mesa redonda. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2., 2003, Porto Seguro. **Anais...** Londrina: Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas, 2003. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, R. P.; KARIA, C. T.; CORDEIRO, M. C. R.; SOUZA, T. L. P. O.; MÉRIDA, J. L. Similaridade genética de acessos de *Arachis pintoi* com diferentes níveis de produtividade de matéria seca com base em marcadores RAPD. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003a. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F. G.; FERNANDES, F. D.; KARIA, C. T.; BELLON, G.; RAMOS, A. K. B.; MARTHA JÚNIOR, G. B.; ANDRADE, R. P.; JANK, L. Diversidade genética de uma coleção de trabalho de *Panicum maximum* com base em marcadores moleculares. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004b. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F. G.; BARROS, A. M.; FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R.; KARIA, C. T.; GOMES, A. C.; ANDRADE, R. P. Caracterização molecular e estabelecimento de coleção de trabalho de *Stylosanthes macrocephala* com base em marcadores RAPD. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003b. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P.; BARROS, A. M.; SILVA, D. O. C. Diversidade genética de uma coleção de trabalho de *Stylosanthes guianensis* com base em marcadores RAPD. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003c. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F. G.; KARIA, C. T.; ANDRADE, R. P.; RAMOS, A. K. B. Seleção de genitores de *Stylosanthes guianensis* utilizando a diversidade genética analisada com base em características morfológicas, agronômicas e moleculares. In:

REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004c. 1 CD-ROM.

FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; ROCHA, J. B.; BAHIA, R. C. S.; GOMES, L. M. C.; ARAÚJO, I. S.; FALEIRO, A. S. G. Genetic diversity of cacao accessions selected for resistance to witches' broom disease based on RAPD Markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, p. 12-17, 2004d.

FALEIRO, F. G.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIRES, J. L.; BAHIA, R. C. S.; SANTOS, R. S.; GOMES, L. M. C.; ARAÚJO, I. S.; FALEIRO, A. S. G.; GRAMACHO, K. P.; MELO, G. R. P.; MONTEIRO, W. R.; VALLE, R. R. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotropica**, Itabuna, v. 13, p. 79-86, 2001.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotropica**, Itabuna, v. 15, p. 41-46, 2003d.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; MONTEIRO, W. R.; LOPES, U. V.; YAMADA, M. M.; PIEDRA, A. G.; MOURA, A. D.; ARÉVALO-GARDINI, E.; MARQUES, J. R. B.; GRAMACHO, K. P.; FALEIRO, A. S. G.; SANTOS, M. C. M. Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 4, p. 227-233, 2004e.

FALEIRO, F. G.; QUEIROZ, V. T.; LOPES, U. V.; GUIMARÃES, C. T.; PIRES, J. L.; YAMADA, M. M.; ARAÚJO, I. S.; PEREIRA, M. G.; SCHNELL, R.; SOUZA FILHO, G. A.; FERREIRA, C. F.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Mapping QTLs for witches' broom (*Crinipellis perniciosus*) resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 149, n. 1/2, p. 227-235, may 2006.

FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; SHUSTER, I.; CORRÊA, R. X.; GOOD-GOD, P. I.; BROMMONSHENKEL, S. H.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Mapeamento de genes de resistência do feijoeiro-comum à ferrugem, antracnose e mancha-angular com o auxílio de marcadores RAPD. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 28, p. 59-66, 2003e.

FALEIRO, F. G.; SCHUSTER, I.; RAGAGNIN, V. A.; CRUZ, C. D.; CORRÊA, R. X.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Caracterização de linhagens endogâmicas recombinantes e mapeamento de *loci* de características quantitativas associadas a

ciclo e produtividade do feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 1387-1397, 2003f.

FALEIRO, F. G.; VINHADELLI, W. S.; RAGAGNIN, V. A.; CORRÊA, R. X.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, Riberão Preto, v. 23, p. 399- 402, 2000.

FALEIRO, F. G.; YAMADA, M. M.; LOPES, U. V.; FALEIRO, A. S. G.; BAHIA, R. C. S.; GOMES, L. M. C.; SANTOS, R. C.; SANTOS, R. F. Genetic similarity of *Theobroma cacao* L. accessions maintained in duplicates in the Cacao Research Center germplasm collection, based on RAPD markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 2, p. 435-440, 2002.

FARIAS, J. A. C. et al. Estrutura fitossociológica de uma Floresta Estacional Decidual na região de Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 4, n. 1, p. 109-128, 1994.

FERREIRA, A. G. et al. Proporção de sexo e polinização em *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Brasil Florestal**, v. 53, n. 1, p. 29-33, 1983.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: Embrapa-**Cenargen**, 1998. 220 p. FINKELDEY, Reiner; HATTEMER, Hans H. Tropical forest genetics. Berlin: **Springer**, 2007.

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

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. 2. ed., Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1998. 678 p.

GARCIA, L. S. Fragmentação florestal e sua influência sobre a fauna: Estudo de Caso na Província Ocidental da Amazônia, Município de Urupá, Estado de Rondônia. In: **Anais..**, XVI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto - SBSR, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, abril de 2013, INPE.

GASPER, A. L. et al. Inventário florístico florestal de Santa Catarina: espécies da Floresta Ombrófila Mista. **Rodriguésia**, 64(2): 201-210. 2013.

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

GREENE, S. L.; HART, T. C.; AFOONIN, A. Using geographic information to acquire wild crop germoplasm for ex situ collections: II Post-collektion analysis. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 234-240, 1999.

GREGIANINI, T.S. **Variabilidade de proteínas de reserva em populações naturais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil., Aquifoliaceae)**. Porto Alegre, 1999. 94p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

GRONDONA, Eduardo M. Historia de la yerba mate. Rev. **Arg. Agron**, v. 21, n. 1, p. 9-24, 1954.

GUARINO, L.; JARVIS, A.; HIJMANS, R. J.; MAXTED, N. Geographic information systems (GIS) and the conservation and use of plant genetic resource. In: EGELS, J. M. M.; RAMATHA RAO, V.; BROWN, A. H. D.; JACKSON, M. T. (Ed.). **Managing plant genetic diversity**. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 387-404.

GUERRA, Miguel Pedro et al. Evolução, ontogênese e diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. Origem e evolução de plantas cultivadas. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, p. 149-184, 2008.

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

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.E.; WEIR, B.S. (eds.) Plant population genetics, breeding and genetic resources. **Sunderland**: Sinauer, MA. Pp.43-63, 1989.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. [tradução: Laura Roberta Pinto Utz, Maria Regina Borges-Osório, Nelson Jurandi Rosa Fagundes, 4. ed. – Porto Alegre, Artmed, 2010. 660 p.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Principles of population genetics, Sinauer Assoc. **Inc, Sunderland, Massachusetts**, 1989.

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**: In Tech, 2012. v. 1, p. 149 – 170.

HUANG, H. W.; LAYNE, D. R.; RIEMENSCHNEIDER, D. E. Genetic diversity and geographic differentiation in pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal] populations from nine states as revealed by allozyme analysis. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 123, p. 635-641, 1998.

HUANG, X.; BÖRNER, A.; RÖDER, M.; GANAL, M. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 105, p. 699-707, 2002.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 1998. **Plano de Manejo da Floresta Nacional de Chapecó**. Chapecó, SC.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura dados de 2017. Disponível em: <  
<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289#resultado>> Acesso em: 27 jan. 2019.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable “minisatellite” regions in human DNA. **Nature**, London, v. 314, p. 67-73, 1985.

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

KAGEYAMA, Paulo Yoshio et al. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. **Scientia Forestalis**, v. 64, p. 93-107, 2003.

KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K. V.; AYAD, W. G.; HODGKIN, T. **Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies**. Rome: IPGRI, 1997. 47 p. (Technical Bulletin, 2).

KEPHART, S. R. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**, Bronx, v. 77, p. 693-712, 1990.

KIDWELL, Kimberlee K.; OSBORN, Thomas C. Simple plant DNA isolation procedures. In: *Plant genomes: methods for genetic and physical mapping*. Springer, Dordrecht, 1992. p. 1-13.

KLAUBERG, C. et al. Florística e estrutura de um fragmento de Floresta Ombrófila Mista no Planalto Catarinense. **Revista Biotemas**, 23 (1): 35-47, março de 2010.

KUNZ, S. H. et al. Fitossociologia do componente arbóreo de dois trechos de floresta estacional perenifólia, Bacia do Rio das Pacas, Querência - MT. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 1-11, jan.-mar. 2014.

LEBERG, P. L. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 2445-2449, 2002.

LINGNER, D. V. et al. Floresta Ombrófila Densa de Santa Catarina - Brasil: Agrupamento e Ordenação baseados em Amostragem Sistemática. **Ciência Florestal**, Santa Maria - RS, v. 25, n. 4, p. 933-946, out.- dez., 2015.

LINHARES, T. **História econômica do mate**. Rio de Janeiro: Editora José Olympio, 1969. 522 p.

LITT, M.; LUTH, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Atlanta, v. 44, p. 398-401, 1989.

LIVINI, C.; AJMONE-MARSAN, P.; MELCHINGER, A. E.; MESSEMER, M. M.; MOTTO, M. Genetic diversity of maize inbred lines within and among heterotic group revealed by RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 84, p. 17-25, 1992.

LODHI, M.A.; YE, G.N.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and -Vitis species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.12, p.6-13, 1994.

LONGHI, S. J. et al. Aspectos fitossociológicos de fragmento de Floresta Estacional Decidual, Santa Maria, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 10, n. 2, p. 59-74, 2000.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, vol. 1, 6<sup>o</sup> ed., 2014.

MACCARI JUNIOR, A. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Câmara Setorial de Cadeia Produtiva da Erva-mate, 2000. 160 p. (Série PDACT, 1)

MANTOVANI, A.; MORELLATO, A. P. C.; REIS, M. S. Internal genetic structure and outcrossing rate in a natural population of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Journal of Heredity**, London, v. 97, n. 5, p. 466-472, set. 2006.

MARIATH, J. E. A.; COELHO, G. C.; SANTOS, R. P.; HEUSE, E. D.; AYUB, D. M.; COCUCI, A. E. Aspectos anatômicos e embriológicos em espécies do gênero *Ilex*. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. DE A.; TARASCONI, L. C. (Org). **ERVA-MATE: BIOLOGIA E CULTURA NO CONE SUL**, 1995, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1995. p.263-280.

MATTOS, Andréa Gabriela et al. Caracterização das práticas de manejo e das populações de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. Sant. Hil) nativa em exploração no planalto norte catarinense. 2012.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **A cultura da erva-mate**. Curitiba: EMATER, 1989. 36 p.

MAZUCHOWSKI, J. Z. **Alternativas para o incremento da produtividade em ervais nativos**. In: II Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e III Reunião Técnica da Erva-mate. Encantado, Ed. dos Organizadores. 2000. p. 6-9.

MAY, B. Starch gel electrophoresis of allozymes In: HOELZEL, A. R. (Ed.). **Molecular genetic analysis of populations: a practical approach**. Oxford: Oxford University, 1992. p. 1-27.

MENDES, R. M. O. **Caracterização e avaliação da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), beneficiada no estado de Santa Catarina**. UFSC, 2005. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MERCADO, J.A.; MANSOURI, I.; JIMÉNEZ-BERMUDEZ, S.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M.A. A convenient protocol for extraction and purification of DNA from

Fragaria. In Vitro Cellular and Developmental **Biology Plant**, v.35, n.2, p.152-153, 1999.

MILAN, E.; MORO, R. S. Padrões de fragmentação florestal natural no parque estadual de Vila Velha, Ponta Grossa (PR). **Ambiência** - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais, v. 8, Ed. Especial – Nov., 2012.

MILLACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S.C.K. Millach, 1998. 141p.

MITTON, J.B.; LINHART, Y.B.; STURGEON, K.B.; HAMRICK, J.L. Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of Ponderosa pine. **Journal of Heredity**, v.70, n.2, p.86-89, 1979.

MONTAGNA, T. et al. A importância das Unidades de Conservação na manutenção da diversidade genética de Araucária (*Araucaria angustifolia*) no estado de Santa Catarina. **Biodiversidade Brasileira**, ano II, n. 2, p. 17-24, 2012.

MORAES, M. L. T.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBEN, A. M. Diversidade e estrutura genética espacial em duas populações de *Myracrodruon urundeuva* fr. All. sob diferentes condições antrópicas. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 29, n. 2, p.281-289, 2005.

MORAES, R. C. S. et al. Microsatellite markers for an endemic Atlantic Forest tree, *Manilkara multifida* (Sapotaceae). **AoB PLANTS**, 5: plt006, doi:10.1093/aobpla/plt006, 2013.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Heslington, v. 3, p. 175-182, 1993.

NARVAES, I. S.; BRENA, D. A.; LONGHI, S. J. Estrutura da regeneração natural em Floresta Ombrófila mista na floresta nacional de São Francisco de Paula, RS. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 4, p. 331-342, 2005.

NASCIMENTO, H. E. M.; LAURANCE, W. F. Efeitos de área e de borda sobre a estrutura florestal em fragmentos de floresta de terra-firme após 13-17 anos de isolamento. **Acta amazonica**, vol. 36(2), 2006. p. 183-192.

NEALE, David B. Genomics to tree breeding and forest health. **Current opinion in genetics & development**, v. 17, n. 6, p. 539-544, 2007.

NEALE, D. B.; WILLIAMS, C. G. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. **Canadian Journal of Forest Research**, Ottawa, v. 21, p. 545-554, 1991.

NEEL, Maile C.; ELLSTRAND, Norman C. Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum* (Polygonaceae). **Conservation Genetics**, v. 4, n. 3, p. 337-352, 2003.

NEWTON, A. C. et al. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in ecology & evolution**, v. 14, n. 4, p. 140-145, 1999.

OLIVEIRA, A. K. M.; SCHLEDER, E. D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Revista Árvore**, Viçosa – MG, v. 30, n. 1, p. 25-32, 2006.

OLSEN, K. M.; SCHAAL, B. A. Evidence on the origin of cassava: phylogeography of *Manihot esculenta*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 96, p. 5586-5591, 1999.

OUBORG, N. J.; PIQUOT, Y.; VAN GROENENDAEL, J. M. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 87, p. 551- 568, 1999.

PEREIRA, Marlei F. et al. Shotgun sequencing for microsatellite identification in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *Applications in plant sciences*, v. 1, n. 3, p. 1200245, 2013.

PETIT, R. J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, A. O. Identifying Populations for Conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, Gainesville, v.12, n.4, p. 844-855, 1998.

PINTO, L. P. (Coord.). Mata Atlântica e Campos Sulinos. In: MAURY, C. M. (Org.). **Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília: MMA/SBF, 2002.

PIRES, Edicléa Zulian et al. Biologia reprodutiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) em remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana. **Rev. Ciênc. Agrovet**, v. 13, p. 171-180, 2014.

PIRES, I. E. et al. **Genética Florestal**. Viçosa – MG: Arka, 2011. 318p.

QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 8, p. 285-288, 1993.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Genética na Agropecuária**. 5º ed. rev., Ed. UFLA, Lavras – MG, 2012.

REIS, A.; WIESBAUER, M. B. **O uso de sementes na restauração ambiental. Pomar de sementes de espécies florestais nativas**. Curitiba, FUPEF, p. 83-92, 2006.

REIS, M.S. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais em plantas. **Revista Brasileira de Genética**. v.19, n.4, p.37-47, 1996.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio grande do Sul**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues-HBR, 1988. p. 284-292.

REEDY, M. E.; KNAPP, A. D.; LAMKEY, K. R. Isozyme allelic frequency changes following maize (*Zea mays* L.) germplasm regeneration. **Maydica**, Bergamo, v. 40, p. 269-273, 1995.

RESENDE, M. D. V. de; STURION, J. A.; CARVALHO, A. P. DE; SIMEÃO, R. M.; FERNADES, J. S. C. **Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 66 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica, 43).

RIBEIRO, J. M.; TEIXEIRA, S. L.; BASTOS, D. C. Calogênese em explantes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen cultivados em meio nutritivo esterilizado com hipoclorito de sódio. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 537-541, set/out., 2009.

RICK, C. M.; ZOBEL, R. W.; FOBES, J. F. Four peroxidase loci in red-fruited tomato species: genetics and geographic distribution. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 71, p. 835-839, 1974.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A.C.M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia**, v.2, n.9, p.40-43, 1999.

ROSSI, E.; SARTORETTO, L. M. Caracterização de três espécies florestais de importância econômica. **Unoesc & Ciência** – ACET, Joaçaba, v. 5, n. 2, p. 145-152, jul./dez., 2014.

RUCKER, N. G. A.; MACCARI, A. J.; ROCHA, W. F. J. **Agronegócio da erva-mate no Estado do Paraná: diagnóstico e perspectivas para 2003**. Curitiba, 2002.

SANTONIERI, L.; BUSTAMANTE, P. G. Conservação ex situ e on farm de recursos genéticos: desafios para promover sinergias e complementaridades. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. **Ciências Humanas**, v. 11, n. 3, p. 677-690, 2016.

SARMENTO, M. B.; SILVA, A. C. S.; SILVA, C. S. Recursos genéticos de frutas nativas da família Myrtaceae no Sul do Brasil. **Magistra**, Cruz das Almas – BA, v. 24, n. 4, p. 250-262, out./dez. 2012.

SARMENTO, M. B.; VILLELA, F. A. **Sementes de espécies florestais nativas do sul do Brasil**. Informativo ABRATES, v. 20, n. 1,2 p. 039-044, 2010.

SCHERER, R. A. **Early selection of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. Bonn: Rheinischen friedrich-Wilhelms-Universit, 1997. 58 p.

SCHOEMBERG, M. M.; DINOUTTI, L. A. Ontogênese do fruto de *Ilex paraguariensis* St. Hil.- morfologia externa e interna da flor. **Estudos de Biologia**: Curitiba, v. 22, p. 5-35, 1989.

SCIPIONI, M. C. et al. Fitossociologia em fragmento florestal no noroeste do estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, n. 3, p. 409-419, jul.-set., 2011.

SEBBENN, A. M. Sistema de reprodução em espécies arbóreas tropicais e suas implicações para a seleção de árvores matrizes para reflorestamentos ambientais. Pomares de sementes de espécies florestais nativas. Curitiba: **FUPEF**, p. 193-198, 2006.

SEBBENN, Alexandre Magno. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, v. 14, n. 2, p. 115-132, 2002.

SEOANE, C. E. S.; SEBBENN, A. M.; KAGEYAMA, P. Y. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Forestalis**, n. 57, p. 123-139, jun. 2000.

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

SHELHAS, J.; GREENBERG, R. **Forest Patches in Tropical Landscapes**. Washington D.C.: Islands Press, 1996. p. 151-167.

SHIMIZU, J. Y.; JAEGER, P.; SOPCHAKI, S. A. Variabilidade genética em uma população remanescente de araucária no parque nacional do Iguaçu, Brasil. **Boletim Pesquisa Florestal**, Colombo - PR, n. 41, jul./dez. 2000 p.18-36.

SPAGNOLETTI-ZEULI, P. L.; SERGIO, L.; PERRINO, P. Changes in the genetic structure of wheat germplasm accessions during seed rejuvenation. **Plant Breeding**, Berlin, v. 114, p. 193-198, 1995.

SILVA, A. C. et al. Relações florísticas e fitossociologia de uma Floresta Ombrófila Mista Montana secundária em Lages, Santa Catarina. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 193-206, jan.-mar., 2012.

SILVA, E. D.; TOOZZI, A. M. G. A. Leguminosae na Floresta Ombrófila Densa do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, **Rodriguésia**, 64(2): 285-309. 2013.

SILVA, D. T.; BITTENCOURT, L. MANTOVANI, A. Extração de DNA genômico total de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil: comparação de protocolos e idade fenológica de tecido foliar. In: XIII Congresso Florestal Do Rio Grande do Sul, 2018, Nova Prata. **Anais...** Nova Prata: Prefeitura Municipal; Câmara Municipal de Vereadores; Câmara da Indústria e Comércio, 2018.

SIQUEIRA, H. F. et al. **A família Myrtaceae no Brasil**. 64° Congresso Nacional de Botânica. Belo Horizonte, MG, nov. 2013.

SOUSA, V.A.; DAROS, T.L.; STURION, J.A. Fenologia reprodutiva de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: Congresso Florestal Do Rio Grande do Sul, 9, 2003, Nova Prata. **Anais...** Nova Prata: Prefeitura Municipal; Câmara Municipal de Vereadores; Câmara da Indústria e Comércio, 2003.

SPENCER, C. C.; NEIGEL, J. E.; LEBERG, P. L. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 1517-1528, 2000.

STEFENON, V. M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. Genetic structure of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) populations in Brazil: implications for the in situ conservation of genetic resources. **Plant Biology**, New York, v. 9, n. 4, p. 516–525, jul. 2007.

SUERTEGARAY, C. E. De O. **Dinâmica da cultura Erva-mate *Ilex paraguariensis* St. Hil.) em Sistemas Agroflorestais e Monocultivo**. Florianópolis, 2002. 51f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Programa de Pós- Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina.

TANKSLEY, S. D. Molecular markers in plant breeding. **Plant Molecular Biology Report**, Athens, v. 1, p. 3-8, 1983.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2013.

VASCONCELOS, M.J.V. **Avaliação da variabilidade genética de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pelo uso de marcadores moleculares RAPD**. Viçosa: UFV, 1995. 54p. Tese Mestrado.

VASCONCELOS, M. J.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A.; VIEIRA, C. Genetic diversity of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. determined by DNA-based molecular markers. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, p. 447-451, 1996.

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

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

VIBRANS, Alexander C. et al. **O Inventário Florístico Florestal de Santa Catarina (IFFSC) 2013**.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Genetic variability in a trial of erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies. **Ciência Rural**. v. 32, p. 584-587, 2002a.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Molecular markers in erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) characterization studies: the taste. **Ciência Rural**. v. 32, p. 415-420, 2002b.

VIEIRA, A. H. et al. **Técnicas de produção de sementes florestais**. Comunicado técnico 205, Embrapa – CPAF Rondônia, p. 2-4, ago. 2001.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRIGTRS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WENDT, S. N. et al. Baixa taxa de contaminação de pólen, desvios de cruzamentos aleatórios e endogamia em um pomar de sementes de *Ilex paraguariensis* l. **Scientia Forestalis**, Piracicaba - SP, v. 37, n. 82, p. 185-196, jun. 2009.

WENDT, S. N. et al. Caracterização genética de procedências e progênes de *Ilex paraguariensis* St. Hil. utilizando marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, n. 73, p. 47-53, março 2007.

WENDT, Simone Neumann. **Genética de populações em *Ilex paraguariensis* St. Hil.** 2005.

WHITE, T. L.; ADAMS, W. T.; NEALE, D. B. **Forest genetics**. CABI Publishing, EUA, 2007.

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

WINGE, H. Conservação genética da erva-mate no Brasil. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 1.; REUNIAO TECNICA DO CONE SUL SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 2., 1997, Curitiba. **Anais...** Colombo: EMBRAPA-CNPf, 1997. p.209-226. (EMBRAPA-CNPf. Documentos, 33).

WOLLHEIM, C.; WINGE, H. Análise de paternidade em populações de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae. In: REUNIÃO TÉCNICA DE CONE SUL

SOBRE A CULTURA DA ERVA-MATE, 1, 1992, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 1992. 41 p.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. Ann. **Eugenics**. v. 15, p. 395 – 420, 1951.

WU, X. M.; WU, N. F.; QIAN, X. Z.; LI, R. G.; HUANG, F. H.; ZHU, L. Phenotypic and genotypic changes in rapeseed after 18 years of storage and regeneration. **Seed Science Research**, Oxon, v. 8, p. 55-64, 1998.

ZANON, A. **Produção de sementes de erva-mate**. Curitiba: EMBRAPA-CNPF, 1988. 7 p. (EMBRAPA-CNPF. Circular Técnica, 16).

ZIMMERER, K. S.; DOUCHES, D. S. Geographical approaches to crop conservation: the partitioning of genetic diversity in Andean potatoes. **Economic Botany**, New York, v. 45, p. 176-189, 1991.

ZIMBACK, L. et al. Estrutura genética de populações *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) por marcadores RAPD. **Scientia Forestalis**, n. 65, p. 114-119, jun., 2004.